

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570176

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸の高硫酸化活性ドメインの酵素合成とその生体内機能の解明

研究課題名(英文)Enzymatic synthesis of chondroitin sulfate high-sulfated active domains and elucidation of the biological functions

研究代表者

杉浦 信夫(SUGIURA, Nobuo)

愛知医科大学・分子医科学研究所・准教授

研究者番号：90454420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：K4CPおよび硫酸転移酵素を用いて、糖鎖長ならびに硫酸化位置・割合が異なる多様な人工コンドロイチン硫酸(CS)を合成し、高硫酸化CS糖鎖ライブラリーを構築した。ビオチン標識CSライブラリーを用いて、ELISAやBiacore分析を行い、CS結合性生理活性分子との親和性を解析した。昆虫に感染するバキュロウイルス由来の新奇CS分解酵素(ODV-E66)を見出し、宿主であるカイコ幼虫の組織にCSが存在することを生化学的・組織化学的に実証した。特に中腸上皮を防御する囲食膜にCSが存在することから、ウイルスCS分解酵素ODV-E66がバキュロウイルス感染の初期段階に影響していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：A large variety of artificial chondroitin sulfate (CS) chains with various molecular sizes, sulfation positions and sulfation ratios was synthesized with chondroitin polymerase from E. coli strain K4 (K4CP) and some kinds of sulfotransferases, and a high sulfated CS library was constructed with defined structures. Affinity of CS-binding physiological active molecules was investigated using the biotin-labeled CS library by ELISA and Biacore assay. A novel chondroitinase (ODV-E66) from insect-pathogenic baculovirus was found, and CS in tissues of silkworm that is host of baculovirus BmNPV was shown by biochemical and histochemical analyses. Presence of CS in peritrophic membrane protecting the midgut epithelium of the insect was especially suggested that ODV-E66 facilitates the primary infection of the virus by digesting of the CS.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学、機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学 グリコサミノグリカン コンドロイチン硫酸 酵素合成 硫酸転移酵素 ELISA 表面プラズモン測定 コンドロイチナーゼ

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸 (CS) は、組織の形態形成や維持・発生・分化・再生などの生命活動に関与し、癌や感染などの疾患に重要な役割を担っている多糖体である。生体内ではプロテオグリカンとしてコア蛋白質に結合した状態で存在している。CS はグルクロン酸 (GlcA) と *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の二糖繰り返し構造を基本骨格とし、その糖鎖骨格に硫酸基が結合して多様な二糖構造 (O, A, C, D, E, T 構造等) が並んだ直鎖多糖体である。生体内の CS 鎖は、動物種・組織・加齢・病態などにより、その糖鎖長や硫酸化の位置・割合および数量が変化する。CS 糖鎖が持つ様々な生理機能には、特有の高硫酸化 CS 構造が対応すると考えられているが、それら CS 構造の詳細は未だ特定されていない。

複雑で不均一な天然由来 CS から、生理機能を特定できるような均一な構造の CS 鎖を量的に分離・精製することはきわめて困難であり、精密な構造活性相関を解析するには天然 CS では限界がある。

2. 研究の目的

近年、CS を合成する酵素遺伝子が明らかにされ、その活性酵素が組換え技術で得られるようになった。それら CS 合成酵素群を用いて、構造が明確な人工 CS 糖鎖ライブラリーを構築することが可能であり、これら人工糖鎖の生理活性を測定することで、特有の生理機能をもつ CS 構造を特定できると考えた。

CS の生理活性に注目し、世界に先駆けて CS の化学修飾体を合成・解析し、CS 合成関連酵素を同定・解析してきた本申請者のこれまでの研究を、本研究によってさらに発展させるものである。遺伝子操作で高発現させた CS 合成関連酵素を使用して高硫酸化 CS 糖鎖を調製する。そして、多彩な生理機能を有する CS の高硫酸化活性ドメインを同定するために、それらの生理活性を解析して、CS の生体内機能を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) **CS 合成酵素の確保**：目的の高硫酸化 CS 糖鎖ライブラリーを構築するためには、GlcA と GalNAc の二糖繰り返し糖鎖を伸長する酵素と、特異的に硫酸基を結合させる複数の硫酸転移酵素が大量に必要である。当研究室が同定した大腸菌由来の伸長酵素コンドロイチンポリメラーゼ (K4CP) とヒト遺伝子由来の硫酸転移酵素群 (C4ST-1, C6ST-1, GalNAc4S-6T, UA2ST) の高活性組換え酵素を大量に発現する培養系を開発し、さらに容易に発現酵素を調製できる精製方法を確立した。

(2) **高硫酸化 CS 糖鎖ライブラリーの調製**：大腸菌由来コンドロイチン糖鎖伸長酵素

(K4CP) を用いて、糖鎖長が異なるコンドロイチンオリゴ糖 (八糖、十二糖など) およびコンドロイチンポリマー (平均分子量 4 千、1 万、3 万、10 万など) を調製した。それらコンドロイチン糖鎖を材料にして、各種組換え硫酸転移酵素を用いて、多様な硫酸基修飾を受けた高硫酸化 CS 糖鎖ライブラリーを構築した。

親和性解析に使用するため、それら CS 糖鎖の還元末端にヘキサメチレンジアミンやピオチン基を修飾した CS 糖鎖ライブラリーや、微量解析のために蛍光標識した CS 糖鎖ライブラリーも調製した。

(3) **高硫酸化 CS 糖鎖ライブラリーの構造解析**：調製した糖鎖の長さ (分子量) はゲルろ過クロマトグラフィーおよび質量分析装置 (MLDI-TOF MS, LC-EST MS) をもちいて決定した。硫酸基修飾後の二糖組成は、コンドロイチナーゼで CS 糖鎖を二糖に分解後、ポストカラム蛍光二糖解析 HPLC システムにより測定した。

(4) **生理活性分子との親和性解析**：CS 糖鎖ライブラリーのピオチン標識体をストレプトアビジンで塗布した ELISA 用マイクロプレートや同表面プラズモン測定用チップに固相化した。それら CS ライブラリー固相化担体を用いて、サイトカインや抗 CS モノクローン抗体などの CS 結合特性を、マイクロプレートリーダーを用いた酵素抗体測定法 (ELISA) や表面プラズモン測定装置 (Biacore) により熱力学的解析を行い、それぞれの生理活性分子との CS 糖鎖の構造親和性を求めた。

(5) **昆虫ウイルス由来コンドロイチン分解酵素と昆虫 CS の解析**：バキュロウイルス感染昆虫細胞培養液からコンドロイチン分解活性分子を分離し、質量分析装置およびアミノ酸配列測定装置を用いて、活性分子の同定を行った。活性分子 (酵素タンパク質) の遺伝子をバキュロウイルスゲノムから切り出し、発現プラスミドに組み込み、組換え酵素タンパク質の大腸菌発現系を作製し、発現タンパク質の酵素活性および基質特異性などの特性を調査した。また、宿主昆虫の一つカイコ幼虫の組織に存在する CS を生化学的・組織化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) **CS 合成酵素の確保**：K4CP は既に構築してある大腸菌 BL21 高発現株を培養・精製して、10,000 pmol/min/mL の高活性酵素液を得た。硫酸転移酵素群はヒト由来遺伝子を HEK293T 細胞に導入し、安定高発現細胞株を樹立した。それら細胞株を培養し、発現酵素タンパク質を精製して、C4ST-1 1,000 pmol/min/mL, C6ST-1 1,800 pmol/min/mL, GalNAc4S-6T 1,000 pmol/min/mL, UA2ST 300

pmol/min/mL の高い活性を持つ酵素液を得た。

(2) **高硫酸化 CS 糖鎖ライブラリーの調製** : K4CP で調製したコンドロイチンオリゴ糖(八糖、十二糖など)およびコンドロイチンポリマー(平均分子量4千、1万、3万、10万など)を材料にして、各種組換え硫酸転移酵素を作用させて、硫酸化率や硫酸化位置を変化させたCS鎖を延べ100種類以上の合成を行った。その結果、多様な硫酸化構造を持つ高硫酸化CS糖鎖ライブラリーを構築した。

(3) **高硫酸化 CS 糖鎖ライブラリーの構造解析** : 調製した各種CS糖鎖の分子量や硫酸化率と硫酸化位置を解析し、生理機能解析や構造活性相関に必要な段階的・広範なCSライブラリーを構築したこと確認した。また、蛍光HPLCや質量分析機を用いることで糖鎖配列構造を解析する手法を開発した。

(4) **生理活性分子との親和性解析** : 構築したピオチン標識CS糖鎖ライブラリーを用いて、ELISAや表面プラズモン解析により、M0225, CS-56, LY111, 2H6などの抗CSモノクローン抗体のCS構造結合性や、ミッドカインやプレイオトロピンなどの神経性サイトカインや成長因子などとの親和性解析を行い、それぞれのCS構造に対する解離定数などの熱力学的パラメーターを求めた。その結果、それぞれの生理活性分子に親和性の高い高硫酸化CS構造を特定した。

5) **昆虫ウイルス由来コンドロイチン分解酵素と昆虫CSの解析** : 硫酸転移酵素の発現系を開発する過程で、偶然にバキュロウイルス感染昆虫細胞培養液中にコンドロイチン分解活性が存在することを見出した。その活性本体はバキュロウイルスが産生するエンペロプタンパク質ODV-E66であり、それがCS糖鎖のOSと6S構造しか切断しない新奇なCS分解酵素(コンドロイチナーゼ)であることを突き止めた。また、バキュロウイルスの宿主であるカイコ幼虫の組織中にはOS,6Sを含むCSが存在することを生化学的・組織化学的に立証した。特に消化管中腸の腔内に存在し、中腸上皮を防御する囲食膜にCSが高密度に存在することから、ウイルスCS分解酵素ODV-E66がバキュロウイルス感染の初期段階に強く影響していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

Kawaguchi Y, Sugiura N, Kimata K, Kimura M, Kakuta Y. (2013) The crystal structure of novel chondroitin lyase ODV-E66, a baculovirus envelope protein. *FEBS Lett.* **587**, 3943-3948. DOI:10.1016/j.febslet.2013.10.021, 査読有

Sugiura N, Ikeda M, Shioiri T, Yoshimura M,

Kobayashi M, Watanabe H. (2013) Chondroitinase from baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and chondroitin sulfate from silkworm *Bombyx mori*. *Glycobiology.* **23**, 1520-1530. DOI:10.1093/glycob/cwt082, 査読有

Sato Y, Shimono C, Li S, Nakano I, Norioka N, Sugiura N, Kimata K, Yamada M, and Sekiguchi K. (2013) Nephronectin binds to heparan sulfate proteoglycans via its MAM domain. *Matrix Biol.* **32**, 188-195. DOI:10.1016/j.matbio.2013.01.005, 査読有

Jinno-Oue J, Tanaka A, Shimizu N, Mori T, Sugiura N, Kimata K, Isomura H, Hoshino H. (2013) Inhibitory effect of chondroitin sulfate type E on the binding step of human T-cell leukemia virus type 1. *AIDS Res. Human Retrovirus.* **29**, 621-629, DOI: 10.1089/AID.2012.0156, 査読有

Ichijo H, Sugiura N, Kimata K. (2013) Application of chondroitin sulfate derivatives for understanding axonal guidance in the nervous system during development. *Polymers.* **5**, 254-268. DOI:10.3390/polym501025, 査読有

Shimbo M, Ando S, Sugiura N, Kimata K, and Ichijo H. (2013) Moderate repulsive effects of E-unit-containing chondroitin sulfate (CSE) on behavior of retinal growth cones. *Brain Res.* **1491**, 34-43. DOI:10.1016/j.brainres.2012.11.011, 査読有

杉浦 信夫. (2013) 囲食膜のコンドロイチン硫酸とバキュロウイルスのコンドロイチン分解酵素, *蚕糸・昆虫バイオテック*, **82**, 109-115, DOI: 10.11416/konchubiotec.82.2_109, 査読有

Sugiura N, Shioiri T, Chiba M, Sato T, Narimatsu H, Kimata K, and Watanabe H. (2012) Construction of a chondroitin sulfate library with defined structures and analysis of molecular interactions. *J. Biol. Chem.* **287**, 43390-43400, DOI: 10.1074/jbc.M112.412676, 査読有

Ogawa H, Hatano S, Sugiura N, Nagai N, Sato T, Shimizu K, Kimata K, Narimatsu, and Watanabe H. (2012) Chondroitin sulfate synthase-2 is necessary for chain extension of chondroitin sulfate but not critical for skeletal development. *PLoS One.* **7**, e43806 1-12. DOI: 10.1371/journal.pone.0043806, 査読有

Sobhany M, Kakuta Y, Sugiura N, Kimata K, and Negishi M. (2012) The structural basis for a coordinated reaction catalyzed by a bifunctional glycosyltransferase in chondroitin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 36022-36028. DOI: 10.1074/jbc.M112.375873, 査読有

Kawaguchi Y, Sugiura N, Onishi M, Kimata K, Kimura M, and Kakuta Y. (2012) Crystallization and X-ray diffraction analysis of chondroitin lyase from baculovirus: envelope protein ODV-E66. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **68**, 190-192.

DOI: 10.1107/S1744309111053164, 査読有

Mori T, Kodera T, Yoshimine H, Kakuta Y, Sugiura N, Kimata K, and Okahata Y. (2012) Kinetics of iterative carbohydrate transfer to polysaccharide catalyzed by chondroitin polymerase on a highly sensitive flow-type 27 MHz quartz-crystal microbalance. *Chem. Eur. J.* **18**, 7388-7393. DOI:10.1002/chem.201200342, 査読有

Imagama S, Sakamoto K, Tauchi R, Shinjo R, Ohgomori T, Ito Z, Zhang H, Nishida Y, Asami N, Takeshita S, Sugiura N, Watanabe H, Yamashita T, Ishiguro N, Matsuyama Y, and Kadomatsu K. (2011) Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, **31**, 17091-17102. DOI:

10.1523/JNEUROSCI.5120-10.2011, 査読有

Sugiura N, Setoyama Y, Chiba M, Kimata K, Watanabe H. (2011) Baculovirus envelope protein ODV-E66 is a novel chondroitinase with distinct substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **286**, 29026-29034, DOI: 10.1074/jbc.M111.251157, 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

Ishimaru D, Sugiura N, Akiyama H, MD, Watanabe H, Matsumoto K, MD. Alterations in the Chondroitin Sulfate Chain in Human Osteoarthritic Cartilage of the Knee, the 60th Annual Meeting of the ORS, 2013年5月15日, ニューオリンズ、米国

杉浦信夫, 吉村真弓, 塩入達政, 渡辺秀人. カイコ組織のコンドロイチン硫酸分布に関する免疫組織化学的解析. 第32回日本糖質学会年会, 2013年8月7日大阪国際交流センター

杉浦信夫, 塩入達政, 池田素子, 小林迪弘, 渡辺秀人. カイコ結合組織中のコンドロイチン硫酸とバキュロウイルスのコンドロイチン分解酵素. 第45回日本結合組織機学会・第60回マトリックス研究会合同学術大会, 2013年6月29日和歌山県立医科大学

塩入達政, 渡辺秀人, 杉浦信夫. 組換え酵素による人工コンドロイチン硫酸ライブラリーの作成と生理機能の検討. 第45回日本結合組織機学会・第60回マトリックス研究会合同学術大会, 2013年6月29日、和歌山県立医科大学

Watanabe H, Ogawa H, Shionyu M, Sugiura N, Hatano S, Nagai N, Sato T, Narimatsu H, Shimizu K, Kimata K. Chondroitin Sulfate synthase-2/chondroitin polymerizing factor: characterization and impact on chondroitin sulfate biosynthesis 2012 Joint Meeting of the Society for Glycobiology & American Society for Matrix Biology. 2012年11月11日. サンディエゴ、米国

杉浦信夫, 吉村真弓, 池田素子, 小林迪弘, 渡辺秀人. 各種バキュロウイルスのコンドロイチナーゼ活性とカイコ囲食膜のコン

ドロイチン硫酸. 第31回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2012年9月18日、鹿児島市民文化ホール

塩入達政, 渡辺秀人, 杉浦信夫. 組換え硫酸基転移酵素を用いた人工コンドロイチン硫酸の合成と構造解析. 第31回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2012年9月18日, 鹿児島市民文化ホール

川口喜郎, 大西桃, 杉浦信夫, 木村誠, 角田佳充. バキュロウイルス由来新奇コンドロイチンリアーゼの結晶構造解析. 平成23年度日本結晶学会年会, 2011年11月24日、北海道大学

福島正行, 杉浦信夫, Mack Sobhany, 木全弘治, 根岸雅彦, 木村誠, 角田佳充. 大腸菌 K4 株コンドロイチンポリメラーゼの構造解析. 平成23年度日本結晶学会年会, 2011年11月25日、北海道大学

Ogawa H, Shionyu M, Sugiura N, Hatano S, Nagai N, Sato T, Gotoh M, Narimatsu H, Shimizu K, Kimata K, Watanabe H: Chondroitin sulfate synthase-2/chondroitin polymerizing factor: characterization and impact on chondroitin sulfate biosynthesis. 7th International Conference on Proteoglycans. 2011年10月16日. シドニー、オーストラリア

杉浦信夫, 瀬戸山由佳, 千葉美恵, 木全弘治, 渡辺秀人. A novel chondroitinase obtained from baculovirus. 第84回日本生化学会大会, 2011年9月24日, 京都国際会館

大上厚志, 清水宣明, 田中 淳, 森 隆久, 星野洪郎, 杉浦信夫, 木全弘治. コンドロイチン硫酸 E (CSE) による HTLV-1 の細胞への吸着阻害. 第4回 HTLV-1 研究会, 2011年9月18日, 東京大学

杉浦信夫, 塩入達政, 伊藤浩美, 佐藤隆, 千葉美恵, 瀬戸山由佳, 成松久, 木全弘治, 渡辺秀人. 高硫酸化コンドロイチン硫酸の酵素合成と低硫酸単位を切断する新奇コンドロイチナーゼ. 第30回日本糖質学会, 2011年7月12日, 新潟県長岡市

杉浦信夫, 瀬戸山由佳, 千葉美恵, 木全弘治, 渡辺秀人. バキュロウイルス由来の新奇なコンドロイチナーゼ. 第30回日本糖質学会, 2011年7月12日, 新潟県長岡市

塩入達政, 伊藤浩美, 千葉美恵, 瀬戸山由佳, 堤内要, 渡辺秀人, 成松久, 木全弘治, 杉浦信夫. コンドロイチン硫酸オリゴ糖および多糖体の酵素合成. 第30回日本糖質学会, 2011年7月13日, 新潟県長岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

発明の名称: コンドロイチン分解用またはコンドロイチン硫酸分解用の酵素, 試薬, 分解

方法，高硫酸化オリゴ糖の製造方法，ならびに粗製物．発明者：杉浦信夫．出願人：学校法人愛知医科大学、特願 2012-6544（2012年1月16日出願）国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su10/su1009/index.html>

ネットデータベース記述

Sugiura N. CS/DS digesting enzymes from bacteria. **GlycoPOD**, 2012年5月9日, JCGGDB, <http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t186>

Sugiura N. HS/HP digesting enzymes from bacteria. **GlycoPOD**, 2012年5月9日, JCGGDB, <http://jcgddb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t187>

説明会講演

杉浦信夫，近畿・中部地区医系大学知的財産管理ネットワーク新技術説明会，昆虫感染ウイルス由来のコンドロイチン分解酵素とその応用，2012年10月26日、JST 東京別館ホール

新聞記事

幼虫の CS 分解酵素発見殺虫剤に応用期待 企業との共同開発目指す 愛知医科大学杉浦信夫准教授、化学工業日報、2012年10月31日

6．研究組織

(1)研究代表者

杉浦 信夫 (SUGURA, Nobuo)

愛知医科大学・分子医科学研究所・准教授
研究者番号： 9 0 4 5 4 4 2 0