

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：72690

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590036

研究課題名(和文)筋ジストロフィーの治療法開発を目指した発症メカニズムの解明研究

研究課題名(英文)Study of the pathogenic mechanism of muscular dystrophy

研究代表者

大隅 賢二 (OSUMI, KENJI)

公益財団法人野口研究所・研究部・研究員

研究者番号：90203778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)： $\alpha$ -ジストログリカン(α-Dystroglycan)は、細胞骨格と細胞外マトリックスとの相互作用において必須な細胞膜外表在性糖タンパク質である。この相互作用において  $\alpha$ -ジストログリカン上のリン酸化O-マンノース型糖鎖が重要な役割を果たしている。本研究では、この糖鎖の合成ルートを確立した。また、マイクロプレートへ固定化した糖鎖とレクチンとの相互作用解析法を開発した。

研究成果の概要(英文)：alpha-Dystroglycan is an extracellular peripheral membrane glycoprotein, which is essential for the interaction between the cytoskeleton and the extracellular matrix. The important factor of this interaction is considered to be the phosphorylated O-mannosyl glycan on alpha-dystroglycan. In the present study, a synthetic route to the phosphorylated O-mannosyl glycan has been developed. We also developed a method to analyze interactions between oligosaccharides immobilized on microtiter plates and lectins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：筋ジストロフィー ラミニン オリゴ糖

### 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは筋細胞膜上の糖タンパク質 ( $\alpha$ -ジストログリカン) の糖鎖と、細胞外マトリックスの主要成分であるラミニンとの相互作用が失われることによって発症する。この相互作用に関与している糖鎖構造が、*O*-マンノース型4糖 (図1) であることが最初に報告された (Chiba 等 1997年)。

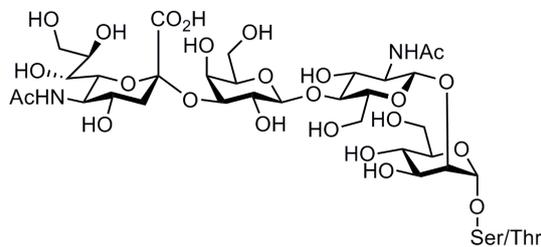


図1. *O*-マンノース型4糖

またこの糖鎖を合成する酵素の機能不全が、筋ジストロフィー患者において確認された。その後、*O*-マンノース型4糖のシアル酸を除去した場合に、ラミニンとの相互作用には影響が出ないという報告 (Ervasti 等 1997年) と、逆に相互作用が強くなるという報告 (Combs 等 2005年) が発表され、糖鎖構造についての議論が行われた。さらに、ヒト胎児腎臓細胞からリン酸化*O*-マンノース型糖鎖 (図2) が単離され、この糖鎖がラミニンと相互作用において重要な役割を果たしているという報告が発表された (Yoshida-Moriguchi 等 2010年)。

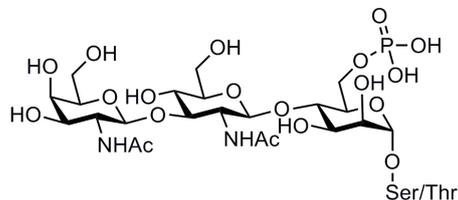


図2. リン酸化*O*-マンノース型糖鎖

しかし、この糖鎖はヒト骨格筋からは見出されなかったため、ラミニンのリガンドであるという確証は得られていなかった (Nilsson 等 2010年)。以上の報告では、糖鎖とラミニンとの相互作用の評価は、 $\alpha$ -ジストログリカン上の糖鎖を酵素的、または化学的に処理することによる相互作用の低下や、部分構造が一致する糖鎖を用いた阻害実験によって行われていた。本研究開始当初までに、糖鎖そのものを用いた *in vitro* でのラミニンとの相互作用比較はまだ報告されていなかった。

申請者は、2008年度より *O*-マンノース型4糖の合成について検討し、ELISA法 (Enzyme Linked Immunosolvent Assay: 酵素免疫測定法) を用いた相互作用解析に利用可能な *O*-マンノース型4糖誘導体を合成した。しかし、ラミニンのリガンドとなる糖鎖構造を明らかにするためには、リン酸化

*O*-マンノース型糖鎖の合成が必要と考えられた。さらに、糖鎖と細胞外マトリックスとの簡便な相互作用解析法の開発が求められていた。

### 2. 研究の目的

本課題研究ではラミニンとの相互作用に関与する糖鎖構造を明らかにする目的で、以下4項目の小課題について検討する。まず、リン酸化*O*-マンノース型糖鎖の合成ルートを確立する (1)。次に、糖鎖と細胞外マトリックスとの簡便な相互作用解析法を開発する (2)。次に、*O*-マンノース型4糖とリン酸化*O*-マンノース型糖鎖を用いて細胞外マトリックスとの相互作用解析を行い、筋ジストロフィー発症に関与する糖鎖を特定する (3)。また治療薬開発に貢献するため、本課題研究で合成するリン酸化*O*-マンノース型糖鎖やその合成中間体を、筋ジストロフィーに関する研究を行っている研究者へ提供する (4)。

(1) リン酸化*O*-マンノース型糖鎖の合成ルートの確立。

リン酸化*O*-マンノース型糖鎖と細胞外マトリックスとの相互作用解析をELISA法によって行うために、マイクロプレートへの固定化が可能な糖鎖誘導体を調製する。

(2) 糖鎖と細胞外マトリックスとの相互作用解析法の開発

マイクロプレートへ固定化した糖鎖と、細胞外マトリックスとの相互作用を解析する方法の開発について検討する。

(3) 筋ジストロフィー発症に関与する糖鎖の特定

既に調製済みの*O*-マンノース型4糖と、(1)で調製するリン酸化*O*-マンノース型糖鎖を用いて、(2)で検討する相互作用解析条件においてラミニンと相互作用する糖鎖の特定を目指す。

(4) 糖鎖の提供

(1)で検討する糖鎖の調製において得られる合成中間体を、筋ジストロフィーの発症メカニズムを解明するための研究用基質として提供する。

### 3. 研究の方法

(1)ではリン酸化*O*-マンノース型糖鎖を有機化学的手法によって合成する。(2)では既に調製済みの*O*-マンノース型4糖誘導体を用いて、糖鎖のマイクロプレートへの固定化方法について検討する。具体的にはプレートの種類やブロッキング剤、糖鎖に導入するリンカーの構造などについて検討することで、糖鎖と細胞外マトリックスとの相互作用解析を十分な感度で行える条件を探索する。(3)では(2)の検討で得られる固定化条件を用いて、(1)で調製するリン酸化*O*-マンノース型糖鎖と、既に調製済みの*O*-マンノース型4糖とを用いて、ラミニンとの相互作用解析を行う。二種類の糖鎖と

ラミニンとの相互作用の強さを比較することで、筋ジストロフィー発症メカニズムに関与する糖鎖構造についての知見を得る。(4)では、(1)で合成する3糖の合成中間体から、還元末端側2糖や単糖から成る化合物を調製し、共同研究者へ提供する。

#### 4. 研究成果

(1)では、還元末端側から糖鎖を伸長する手法で、リン酸化O-マンノース型糖鎖の合成ルートを低収率ながら確立することができた。この研究の開始直後にG. J. Boons等のグループがリン酸化O-マンノース型糖鎖の調製を報告した(*J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14418-14430, 2011)。しかし、この研究報告では、 $\alpha$ -ジストログリカンから単離された糖鎖の構造確認のために合成が行われたもので、本課題研究のようなラミニンのリガンドを特定するためのものではなかった。

(2)では、既に調製済みのO-マンノース型4糖を用いた予備実験で、アミノ基を導入したリンカーを用いてマイクロプレートへの固定化を検討した。しかし、この方法では相互作用解析ができないことが明らかになった。そこで計画を変更し、入手容易なシアルオリゴ糖ペプチド(図3、SGP)を用いて糖鎖の固定化方法について検討した。



図3. SGP

すなわちSGPに3種類の疎水性官能基を導入した誘導体(図4、C6-SGP, C11-SGP, Ph-SGP)を調製し、疎水性相互作用による糖鎖のマイクロプレートへの固定化を試みた。

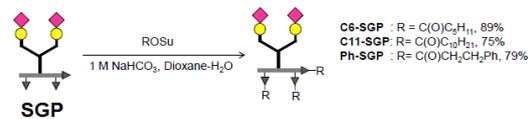


図4. SGP誘導体の調製

具体的には、ポリスチレン製マイクロプレートを用いて、図5に示す方法で糖鎖の固定化について評価した。

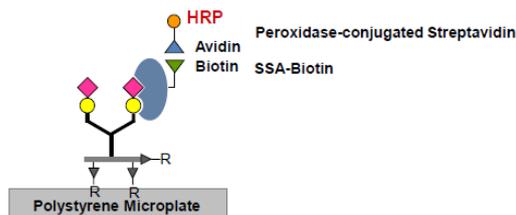


図5. 相互作用解析法の概略図

この方法では、まずSGP誘導体をマイクロ

プレートへ加え、そこへビオチン標識SSA(*Sambucus sieboldiana*)レクチンを加えることでSGPのシアル酸とSSAレクチンを相互作用させた。引き続きHRP標識ストレプトアビジンを加えることで、ビオチン-アビジン相互作用によって糖鎖をHRP標識化した。最後に発色バッファーを加え吸光度を測定することで、糖鎖のマイクロプレートへの固定化を評価した。

まず、3種類の疎水性官能基を導入したSGPの濃度に対する吸光度を測定したところ、いずれの化合物もポリスチレン製マイクロプレートへ固定化することができた(図6)。また、C11-SGPは、高濃度になると吸光度が減少した。これはC11-SGPでは疎水性の大きい長鎖アルキル基が結合しているため、高濃度になるとミセルを形成し、マイクロプレートへ固定化できなかったものと考えられる。

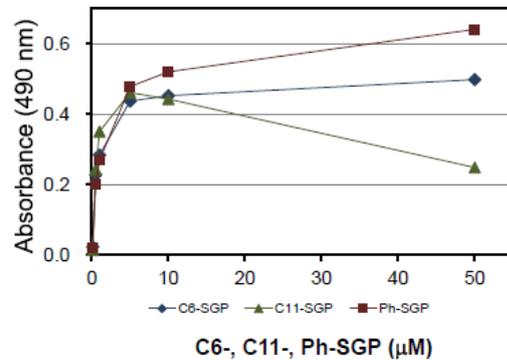


図6. SGP誘導体とSSAとの相互作用

また、Ph-SGPについては低濃度のSSAとの相互作用解析を行った結果、0.3~2.5 μg/mLのレクチン濃度範囲で、SSAの濃度と吸光度との間に良好な直線関係が得られた(図7)。

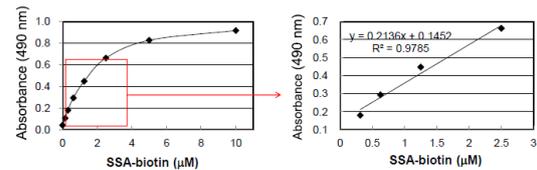


図7. Ph-SGPとSSAとの相互作用

このように、疎水性相互作用によって糖鎖をマイクロプレートへ固定化する方法が、糖鎖とレクチンとの相互作用解析に利用できることが示唆された。そこで現在、SGPを出発原料として、O-マンノース型4糖と同じ非還元末端に $\alpha$ 2,3結合したシアル酸残基を有する糖鎖の調製について検討している。

(3)については、(2)の検討において新たな固定化用リンカーを調製する必要が生じたため、十分に検討する時間がなくなってしまいまだ手つかずの状態である。今後検討していきたい。

(4)では、リン酸化O-マンノース型糖鎖の合成検討(1)において得られた合成中間

体から、リン酸化マンノース残基を有する糖ペプチド(図8)を調製し、共同研究者へ提供した。この基質は、*O*-マンノース型4糖の合成酵素であるPOMGnT1の基質にならなかったことから、マンノースのリン酸化と*O*-マンノース型4糖の合成が競合していることが示唆された。

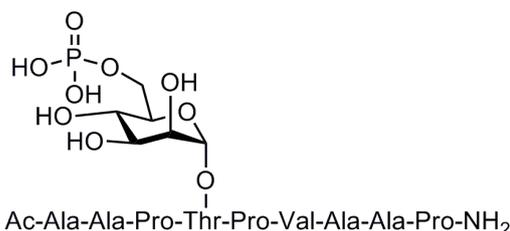


図8. リン酸化*O*-マンノシルペプチド

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ①S. -I. Sugahara, T. Shirai, M. Mizuno, K. Osumi, Sialyloligopeptide-conjugated beads bind recombinant human influenza A virus hemagglutinin, *Glycoconjugate Journal*, 査読無し, 28, 2011, 347-348.  
 ②菅原州一, 大隅賢二, シアリルオリゴ糖ペプチド(SGP)の研究開発, *野口研究所時報*, 査読無し, 54, 2011, 44-48.

〔学会発表〕(計6件)

- ①K. Osumi, T. Shirai, M. Mizuno, S. -I. Sugahara, The use of Sialylglycopeptide from Hen's Egg Yolk in a lectin-binding assay, 16th European Carbohydrate Symposium, 2011年7月5日, Hilton Sorrento Palace (Sorrento, Italy)  
 ②水野真盛, 大隅賢二, 弘瀬友理子, 萬谷博, 遠藤玉夫, alphaジストログリカン/ラミニン相互作用基質としてのリン酸化マンノース残基を有する糖ペプチド合成, 第48回ペプチド討論会, 2011年9月28日, 札幌コンベンションセンター(札幌)  
 ③K. Osumi, T. Shirai, M. Mizuno, S. -I. Sugahara, Use of sialylglycopeptide from Hen's egg yolk as a tool for biochemical studies, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011年1月21日, 京王プラザホテル(東京)  
 ④大隅賢二, 後藤浩太郎, 土田明子, 弘瀬友理子, 藤田雅也, 水野真盛,  $\alpha$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ基質の合成研究, 日本薬学会第132回年会, 2012年3月30日, 北海道大学(札幌)  
 ⑤大隅賢二, 近藤純平, 水野真盛, 菅原州一, 鶏卵卵黄由来シアリルオリゴ糖ペプチドを用いる糖鎖-レクチン間相互作用解析, 日本ケミカルバイオロジー学会第7回年会, 2012年6月7-9日, 京都大学百周年時計台記念館(京都)  
 ⑥大隅賢二, 弘瀬友理子, 水野真盛, *O*-マンノース型糖鎖の生合成に係わる基質合成,

日本薬学会第133年会, 2013年3月27-30日, パシフィコ横浜(横浜)

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

名称: 糖ペプチド誘導体およびその製造方法  
 発明者: 菅原州一、大隅賢二  
 権利者: 旭化成(株)・(公財)野口研究所  
 種類: 特許  
 番号: 特願2011-093308  
 出願年月日: 2011年4月13日  
 国内外の別: 国内

名称: シアリルオリゴ糖固定化ビーズ  
 発明者: 菅原州一、大隅賢二  
 権利者: 旭化成(株)・(公財)野口研究所  
 種類: 特許  
 番号: 特願2011-179649  
 出願年月日: 2011年8月19日  
 国内外の別: 国内

名称: 11糖シアリルオリゴ糖アスパラギンの製造方法  
 発明者: 菅原州一、大隅賢二  
 権利者: 旭化成(株)・(公財)野口研究所  
 種類: 特許  
 番号: 特願2012-145417  
 出願年月日: 2012年3月1日  
 国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅 賢二 (OSUMI KENJI)  
 (公財)野口研究所・研究員

研究者番号: 90203778

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: