

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580494

研究課題名(和文)植物抗原性糖鎖ポリマーによる自然免疫を介したTh2分化抑制の解析

研究課題名(英文)Analysis of suppression of Th2-type immune responses through innate immunity by glyco-polymer bearing plant antigenic N-glycans

研究代表者

前田 恵 (Maeda, Megumi)

岡山大学・環境生命科学研究科・助教

研究者番号：20434988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉アレルゲンによるTh2応答を抑制する植物糖タンパク質の植物抗原性糖鎖は、花粉症治療薬としての利用が期待されており、本研究では免疫活性を高めた糖鎖ポリマー作製を目的として、植物抗原性糖鎖を銀杏種子より多量精製する親水性クロマト法を確立した。次いでルイスa抗原を含有している植物抗原性糖鎖を水草から見出した。更には植物抗原性糖鎖を多価に結合した糖鎖ポリマーを作製し、樹状細胞の分化抑制を解析した。

研究成果の概要(英文)：The plant antigenic N-glycans from plant glycoproteins have suppressed Th2-type immune responses by Japanese cedar pollen allergen, suggesting that the plant antigenic N-glycans could become effective agents in therapy for patients with pollinosis. In this study, a new method with hydrophilic partitioning was developed to prepare the large-scale of Asn-glycopeptide bearing plant antigenic N-glycans from Ginkgo seeds. And then, plant antigenic N-glycans bearing Lewis a antigen(s) at the non-reducing terminal were found in submerged plants. Finally, the glycol-polymer bearing multivalent plant antigenic N-glycans was synthesized, and the differential inhibition of dendritic cells by the glycol-polymer was analyzed.

研究分野：農学

キーワード：N-グリカン 植物抗原性糖鎖 スギ花粉アレルゲン Th2免疫応答抑制 多量精製 ルイスa抗原 糖鎖
ポリマー 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) スギ花粉症は今や国民の4人に1人が悩まされているアレルギー疾患である。スギ花粉症の原因物質であるスギ花粉アレルゲン (Cry j1) は糖タンパク質であり、動物細胞の糖タンパク質には結合していない、 α 1-3 フコース残基や β 1-2 キシロース残基をトリマンノシルコア構造に有する植物抗原性糖鎖 (N-グリカン) Man3Fuc1Xyl1GlcNAc2 (M3FX) を骨格構造として発現しており、これまでに、その非還元末端が N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) やルイス a 抗原 (Fuc α 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-) により修飾された構造が同定されている。参考論文

(2) 植物抗原性 N-グリカンと花粉症発症の関連性について解析を進めた結果、植物抗原性 N-グリカンの骨格構造 M3FX は、Cry j1 の主要な IgE エピトープにはならないが、細胞性免疫応答において、スギ花粉症患者の Cry j1 特異的 Th2 応答 (細胞増殖、IL-4 産生) を有意に抑制することが明らかになった。つまり、植物抗原性 N-グリカンの骨格構造 M3FX は、花粉症の新しい治療薬として利用される可能性を有していると考えられた。参考論文

(3) そこで本研究では、どのようなメカニズムで Th2 免疫応答を抑制するのか解明するため、非自己成分に特異的に応答し自然免疫を活性化する Toll 様受容体 (TLR) や糖鎖に結合性を示すレクチン様受容体を発現している樹状細胞やマクロファージに注目し、植物抗原性 N-グリカンによる自然免疫を介した Th1/Th2 分化制御機構を解析することを目的とした。しかしながら、植物抗原性 N-グリカンの免疫活性は低く、まず、それらを多価に結合させた糖鎖ポリマーの作製を試みた。

2. 研究の目的

(1) Asn-糖鎖多量精製法の確立

植物抗原性 N-グリカンの骨格構造 M3FX が、スギ花粉アレルゲン Cry j1 特異的な Th2 応答を抑制するメカニズムを解明するため、研究を進める上で鍵となる Cry j1 特異的な Th2 免疫応答を抑制する M3FX をアスパラギン (Asn) 残基に結合した糖ペプチド (Asn-糖鎖) として、非標識の状態が多量精製することを目的とした。

(2) ルイス a 抗原含有糖鎖のスクリーニング
Cry j1 に結合した植物抗原性 N-グリカンは M3FX の非還元末端が N-アセチルグルコサミンやルイス a 抗原で修飾されており、ヒト免疫系における活性解明が求められている。しかしながら、植物中の総存在量は非常に少なく多量精製が困難であった。そこで、ルイス a 抗原含有 N-グリカンの供給源のスクリーニングを行った。

(3) γ PGA を用いた糖鎖ポリマーの作製と樹状細胞分化制御

植物抗原性 N-グリカンの骨格構造 M3FX は Cry j1 特異的な Th2 細胞増殖と Th2 細胞からの IL-4 産生を有意に抑制するため、花粉症の新規治療薬として応用利用が期待されている。しかしながら植物抗原性 N-グリカンの免疫活性は非常に弱く、この N-グリカンを多価に結合した糖鎖ポリマーの作製が必要と考えられた。

T細胞の活性化と Th1/Th2 分化には、ヘルパー T 細胞の T 細胞受容体が抗原提示細胞の提示した MHC 抗原ペプチド複合体と結合し、続いてヘルパー T 細胞上の補助受容体 CD28 が抗原提示細胞上の補助刺激分子 CD80/CD86 と結合し刺激される必要がある。そこで、単球から誘導した未分化樹状細胞を用い、糖鎖ポリマーによる分化制御を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Asn-糖鎖多量精製法の確立

植物抗原性糖鎖の供給源として適している銀杏種子 (1.9kg) を用い、アセトン脱脂粉末 (900g) からタンパク質を抽出し凍結乾燥品 (62g) を得た。凍結乾燥品 (33g) は還元後、カルボキシメチル化を行い、アクチナーゼ E で分解後、3種類のゲル濾過によって糖ペプチドを精製した。糖ペプチドは凍結乾燥後、50% アセトニトリルに溶解し、Shodex Asahipak NH2P-50 樹脂を用いた親水性クロマトに供し更なる精製を行った。80% アセトニトリルで洗浄し、次いで 0.1% TFA で吸着している糖ペプチドを溶出した。最後に 0.1N NH₄OH による洗浄を行い、3つの画分に分画した。Asn-糖鎖の検出は、アミノ酸組成分析により行った。また糖鎖構造解析は、ヒドラジン分解、N-アセチル化により N-グリカンを調整後、ピリジルアミノ (PA) 化により蛍光標識を行い、逆相 HPLC、サイズ排阻 HPLC により PA 化糖鎖を精製後、酵素消化、MS、MS/MS 分析にて行った。

(2) ルイス a 抗原含有糖鎖のスクリーニング

試料として河川での異常繁茂と処分方法が問題となっている水草 (オオカナダモ、コカナダモ、マツモ、ササバモ) をミキサーで粉碎し、5% 酢酸中でペプシン消化を行い、糖ペプチドを陽イオン交換、ゲル濾過により精製した。糖鎖構造解析は、ヒドラジン分解により N-グリカンを切り出し、N-アセチル化後、N-グリカンを PA 化し、逆相 HPLC、サイズ排阻 HPLC により分離・精製を行った。N-グリカンの構造は酵素消化、MS、MS/MS 分析により解析した。

未利用資源の利用促進を目的として、瀬

戸内海に生育している海藻（褐藻類，紅藻類，緑藻類）および海草（アマモ）に発現する N-グリカンをと同様の方法で構造解析した。

(3) γ PGA を用いた糖鎖ポリマーの作製と樹状細胞分化制御

γ PGA を用いた糖鎖ポリマー作製は，ポリマーの骨格として，納豆菌由来 DL 体 γ PGA (*Bacillus subtilis chungkookjang*，平均分子量 20 万～50 万，wako 社製) を使用し，ペプチド縮合剤 (BOP, HOBT) により γ PGA のカルボキシル基を活性エステル化し Asn-糖鎖のアミノ基とアミド結合を形成させた。ゲルろ過，逆相 HPLC により糖鎖ポリマーは精製し，アミノ酸の組成分析により糖鎖結合率を算出した。

末梢血由来 CD14 陽性単球を回収し，IL-4 と GM-CSF の存在化，6 日間培養することにより未分化樹状細胞を誘導した。糖鎖ポリマーあるいは γ PGA により未分化樹状細胞を刺激し，2 日間培養後，樹状細胞の分化マーカーである CD80/CD86 の発現をフローサイトメーターで解析した。

4. 研究成果

(1) Asn-糖鎖多量精製法の確立

アミノ酸組成分析により，0.1% TFA 画分からアスパラギン酸と N-アセチルグルコサミンが 1:1.5 の比率で検出され，Asn-糖鎖(103 mg)が精製された事を確認した。また，糖ペプチドに結合した N-グリカンの糖鎖構造解析を行い，約 90 % は Man3Xyl1Fuc1，残り約 10 % は非還元末端に GlcNAc を 1 あるいは 2 残基結合した GlcNAc1~2Man3Xyl1Fuc1 を結合している事が確認できた。後者の構造は β -N-Acetylhexosaminidase 消化により，100% Man3Xyl1Fuc1 を有する Asn-糖鎖を精製することが可能となった。業績論文 参照

(2) ルイス a 抗原含有糖鎖のスクリーニング

糖鎖構造解析の結果，いずれの水草からも植物抗原性 N-グリカンが主要構造として検出され，そのうち約 10~20%はルイス a 抗原を有している事が確認された。今回の実験結果から，100 g の水草から約 100 nmol のルイス a 抗原含有糖鎖を精製することが可能となった。

いずれの海藻，海草からも植物抗原性 N-グリカンは検出されず，ハイマンノース型 N-グリカン (Man5~Man9) を主要構造として結合していることが明らかになった。業績論文 参照

(3) γ PGA を用いた糖鎖ポリマーの作製と樹状細胞分化制御

アミノ酸組成分析の結果，グルタミン酸 (Glu) 10 残基につき 1 残基の糖鎖修飾を

確認できた。つまり，グルタミン酸 1600~3800 個で構成される γ PGA の約 160~380 個のグルタミン酸に糖鎖が結合したと考えられた。縮合剤が発ガン性のある副生成物を生じることが後に判明。

フローサイトメーターによる解析の結果，糖鎖ポリマーは γ PGA による樹状細胞分化促進を有意に抑制しており，Th2 応答の抑制に関わることが示唆された。DL 体 γ PGA は，それ自体が樹状細胞の分化活性を有していた。

(4) その他

銀杏種子から植物抗原性糖鎖の抗原性低下に利用可能となる植物キシロシダーゼの精製を行った。植物キシロシダーゼは分子量約 60 kDa の単量体であり，蛍光標識糖鎖 (Man1Xyl1Fuc1-PA) を基質とすると至適 pH5.0 で強い活性を示し，N 末端配列解析から精製トマトキシロシダーゼと高い相同性を有することが明らかとなった。業績論文 参照

Asn-糖鎖多量精製法を用いて，ローヤルゼリー糖タンパク質より，種々の腺がん細胞 (大腸がん，肺がん，乳がん) に発現している TF (Gal β 1-3GalNAc β 1-) 抗原含有 N-グリカンを結合した Asn-糖鎖の多量精製を行った。業績論文 参照

【参考論文】

Kimura Y. and **Maeda M.**, et al. Glycoform analysis of Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1: a comparison of the glycoforms of cedar and cypress pollen allergens. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **72**, 485-491 (2008)

Maeda M., et al. Glycoform analysis of Japanese cedar pollen allergen, Cry j1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1700-1705 (2005)

Kimura Y. and **Maeda M.**, et al. Occurrence of lewis a epitope in N-glycans of a glycoallergen, Jun a 1, from mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 137-144 (2005)

Okano M. and **Maeda M.**, et al. Roles of major oligosaccharides on Cry j 1 in human immunoglobulin E and T cell responses. *Clin. Exp. Allergy*, **34**, 770-778 (2004)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Maeda M., Tanaka, T., Kimura, M. and Kimura, Y. Large Scale Preparation of Glycopeptides Harboring TF-antigen Unit from Royal Jelly. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 276-278(2014)査読有

Maeda M, Kimura Y. Structural features of free N-glycans occurring in plants and functional features of de-N-glycosylation enzymes, ENGase, and PNGase: the presence of unusual plant complex type N-glycans. *Front Plant Sci.*, **5**, 1-9(2014) 査読有

Maeda M, Chen Y, Hayashi H, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Nishimura Y, Otsuki T. Chronic exposure to asbestos enhances TGF- β 1 production in the human adult T cell leukemia virus-immortalized T cell line MT-2. *Int J Oncol.*, **45**, 2522-2532(2014) 査読有

Maeda, M., Akiyama, T., Yokouchi, D., Woo, K. K. and Kimura, Y. Purification and Molecular Characterization of Ginkgo biloba β -Xylosidase Active for Plant Complex Type N-Glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1973-1976(2013) 査読有

Maeda, M., Takeda, N., Mano, A., Yamanishi, M., Kimura, M. and Kimura, Y. Large-Scale Preparation of Asn-Glycopeptide Carrying Structurally Homologous Antigenic N-Glycan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1269-1274(2013) 査読有

Yokouchi, D., Ono, N., Nakamura, K., Maeda, M. and Kimura, Y. Purification and characterization of β -xylosidase that is active for plant complex type N-glycans from tomato (*Solanum lycopersicum*): Removal of core 1-3 mannosyl residue is prerequisite for hydrolysis of β -2 xylosyl residue. *Glycoconj. J.*, **30**, 463-472(2013) 査読有

Yoshiie T, Maeda M, Kimura M, Hama Y, Uchida M, Kimura Y. Structural features of N-glycans of seaweed glycoproteins: predominant occurrence of high-mannose type N-glycans in marine plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1997-1998(2012) 査読有

〔学会発表〕(計 23 件)

前田 恵, 遊離 N-グリカンの生理機能解析: ENGase と PNGase の発現を制御した植物体の構築, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 平成 27 年 3 月 29 日, 岡山大津島キャンパス

竹田 直人, 植物抗原性糖鎖ポリマーによる樹状細胞分化活性の解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 平成 27 年 3 月 27 日, 岡山大津島キャンパス

板野 紗月, 植物 β 1,3/4-フコシダーゼの精製と基質特異性の解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 平成 27 年 3 月 28 日, 岡山大津島キャンパス

Md. Ziaur RAHMAN, Molecular cloning and gene expression of α 1,3/4-Fucosidase

from *Solanum lycopersicum*, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 平成 27 年 3 月 28 日, 岡山大津島キャンパス

Naoto Takeda, Preparation of poly- γ -L-glutamic acid (γ -PGA) carrying plant antigenic N-glycan and the immunomodulatory activity on human monocyte derived dendritic cells, 第 43 回日本免疫学会学術集会, 平成 26 年 12 月 11 日, 国立京都国際会館

Megumi Maeda, Functional Features of Free N-Glycans in Transgenic Tomato Plants: knock-down of ENGase and overexpression of acidic PNGase, 25th Joint Glycobiology Meeting, 平成 26 年 9 月 15 日, Ghent, Belgium(Oral)

Misato Tani, Plant antigenic N-glycans carrying Lewis a epitope(s) are predominantly expressed in submerged plants., 25th Joint Glycobiology Meeting, 平成 26 年 9 月 15 日, Ghent, Belgium

谷 美里, 淡水性藻類に発現される N-グリカンの構造解析: ルイス a エピトープ含有糖鎖のスクリーニング, 日本農芸化学会 2014 年度東京大会, 平成 26 年 3 月 29 日, 明治大学

Naoto Takeda, Large-scale Preparation of Asn-Glycopeptide Carrying Plant Antigenic N-Glycan and The Immunomodulatory Activity on Human Monocyte Derived Dendritic Cells., Annual Meeting of the Society for Glycobiology 2013, 20th November, 2013, St. Petersburg, Florida, USA

Tsuyoshi AKIYAMA, Purification and characterization of Ginkgo biloba β -xylosidase that is active for plant complex type N-glycans., The 3rd Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology, 2nd July, 2013, Saitama, Japan

前田 恵, 植物 N-グリカンの生理的意義とヒト免疫応答における役割, 第 40 回 GRL バイオサイエンスセミナー(招待講演), 平成 25 年 3 月 8 日, 静岡大学農学部

藤重 誠, 植物複合型 N-グリカンの代謝に関わるイネ α -L-Fucosidase の精製, 基質特異性解析及び遺伝子同定, 日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会), 平成 25 年 1 月 26 日, 高知大学

秋山 剛, 植物複合型 N-グリカンの代謝に関与する β -キシロシダーゼの精製と性質検討, 日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会), 平成 25 年 1 月 26 日, 高知大学

竹田直人, 植物抗原性 N-グリカン含有糖ペプチドの多量調製法の確立とネオグリコペプチドの合成, 日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会), 平成 25 年 1 月 26 日, 高知大学

田中達也, ローヤルゼリーからの TF 抗原

含有糖ペプチドの多量調製法の確立とネオグリコペプチドの合成, 日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会), 平成 25 年 1 月 26 日, 高知大学

Maeda Megumi, PREPARATION AND IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF NEOGLYCOCONJUGATE WITH PLANT ANTIGENIC N-GLYCANS, 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), 平成 24 年 7 月 25 日, Madrid, Spain (Oral)

〔図書〕(計 1 件)

Maeda, M. and Kimura, Y. Elsevier, Structural and Functional Features of Plant Glycoprotein Glycans in “the new online database Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering” (ed. Reedijk, J.) (2013)1-15

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 恵 (MAEDA, Megumi)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助教

研究者番号: 20434988

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

木村 吉伸 (KIMURA Yoshinobu)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授

研究者番号: 70195384

大槻 剛巳 (OTSUKI Takemi)

川崎医科大学・衛生学・教授

研究者番号: 40160551