

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07841

研究課題名(和文) 抗花粉症薬剤の開発を目指した機能性糖鎖ポリマーの作製と細胞性免疫活性解析

研究課題名(英文) Preparation of functional glyco-polymers and analysis of their cellular immune activities to develop anti-pollinosis drugs

研究代表者

前田 恵 (MAEDA, Megumi)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：20434988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物複合型糖鎖によるスギ花粉アレルゲンCry j1特異的Th2免疫応答の抑制機構を解明するため、3種類の糖鎖ポリマー(植物複合型、ハイマンノース型、動物複合型)を合成し、樹状細胞の分化抑制を解析した。新規ヒノキ花粉アレルゲンCha o3の糖鎖構造解析を行い、その構造的特徴は日本スギ花粉アレルゲンCry j1及びマウンテンシダーアレルゲンJun a1と非常に高い相同性を有することを明らかにした。

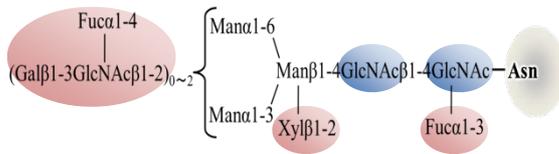
研究成果の概要(英文)：Three types of glycopolymers bearing multivalent N-glycans (plant complex type, high-mannose type, or animal complex type) were synthesized. Their suppressive functions on Th2 cellular immune response induced by Japanese cedar pollen allergen, Cry j1, were analyzed by using dendritic cells. And then, structural features of newly identified Japanese cypress pollen allergen, Cha o3, were analyzed. The glycoform of Cha o3 is similar to those of major glycoallergens in cedar or cypress pollens (Cry j1 and Jun a1).

研究分野：糖鎖生物学, 生化学, 免疫学

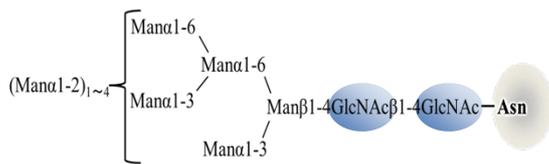
キーワード：糖鎖ポリマー 花粉アレルゲン N-グリカン 植物抗原性糖鎖 ルイスa抗原 Th2免疫応答 樹状細胞
-ポリグルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

(1)花粉アレルゲンは 1-2 キシロース残基と 1-3 フコース残基を持つ $\text{Man}_2\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2$ (M3FX) を骨格に有する植物複合型糖鎖を結合している場合が多い。これまでに、日本スギ花粉アレルゲン Cry j1、マウンテンセダーアレルゲン Jun a1、ヒノキ花粉アレルゲン Cha o1 の糖鎖構造解析を行い、M3FX の非還元末端が N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基やルイス a 抗原 (Fuc 1-4Gal 1-3GlcNAc 1-) で更に修飾された構造を同定している。下図、参考論文



ルイス a 抗原 M3FX
植物複合型糖鎖, 植物抗原性糖鎖
(植物にのみ発現)



ハイマンノース型糖鎖
(動物・植物に共通の構造)

(2)面白いことに、この M3FX 構造は日本スギ花粉アレルゲン Cry j1 の主要な IgE エピトープにならないが、スギ花粉症患者の Cry j1 特異的な Th2 免疫応答(細胞増殖、IL-4 産生)を *in vitro* で有意に抑制し、花粉症治療薬となりうる可能性を有している。参考論文

(3)そこで本研究では、M3FX による Th2 免疫応答抑制機構を解明するため、種々の糖鎖(植物複合型、ハイマンノース型、動物複合型)を -L-ポリグルタミン酸(-L-PGA)に結合させた3種類の糖鎖ポリマーを合成し、それらの細胞性免疫活性について、糖鎖認識タンパク質(Toll 様受容体、C 型レクチンなど)を発現している樹状細胞を介した T 細胞の分化調節機構の解析により明らかにすることを試みる。

(4)すでに、糖鎖ポリマー合成に必要な Asn-糖鎖(アスパラギン 1 残基を結合した糖鎖)の多量精製法は Asn-M3FX について確立しており、ハイマンノース型、動物複合型、ルイス a 抗原含有糖鎖についても同様に多量精製を行う。参考論文

2. 研究の目的

(1)糖鎖ポリマーの合成と樹状細胞分化制御

糖鎖構造の違いによって生じるヒト免疫応答について解析するため、様々な構造の糖鎖(植物複合型、ハイマンノース型、動物複合型)を Asn-糖鎖として多量精製し、それら Asn-糖鎖を多価に結合させた3種類の糖鎖ポリマーの合成を行い、それら糖鎖ポリマーによる樹状細胞を介した T 細胞の分化調節機構を明らかにすることを目的とした。

(2)新規ヒノキ花粉アレルゲン Cha o3 の糖鎖構造解析

新規ヒノキ花粉アレルゲンとして Cha o3 が同定された(参考論文)。Cha o3 はセルラーゼ様ドメインを有しており、複数の推定 N-グリコシル化部位を有する糖タンパク質である。そこで花粉症発症と植物複合型糖鎖(抗原性糖鎖)の相関を明らかにする研究の一環として、新規ヒノキ花粉アレルゲン Cha o3 に結合する糖鎖構造解析を行った。

(3)ルイス a 抗原含有糖鎖の多量調整と糖鎖ポリマーの合成

主要なスギ・ヒノキ花粉アレルゲン(Cry j1, Jun a1, Cho 3)に存在しているルイス a 抗原含有糖鎖の細胞性免疫活性を解析するため、これまでのスクリーニング実験で有用であることが明らかになった水草(オオカナダモ)糖タンパク質を用い、ルイス a 抗原含有糖鎖の多量精製を行い、糖鎖ポリマーを合成することを目的とした。発表論文 参照

3. 研究の方法

(1)糖鎖ポリマーの合成と樹状細胞分化制御
各種 Asn-糖鎖の多量精製

糖鎖ポリマー合成に使用する糖鎖は糖ペプチド(Asn-糖鎖)として精製した。具体的には、これまでに報告したように(参考論文参照)、抽出した糖タンパク質や糖ペプチドに対してプロテアーゼ消化とゲルろ過を繰り返し、親水性クロマトにより精製した。植物複合型糖鎖は銀杏種子貯蔵糖タンパク質から、ハイマンノース型糖鎖はトラマメ貯蔵糖タンパク質から、そして動物複合型糖鎖は卵黄糖ペプチドからそれぞれ調製・精製した。Asn-糖鎖の構造はアミノ酸組成分析と糖鎖構造解析により行った。

各種糖鎖ポリマーの合成
糖鎖ポリマーの担体には L 体で構成される生物分解性ポリマーのポリグルタミン酸(-L-PGA, 平均分子量 75 万, TOYOBO 社製)を用いた。Asn-糖鎖のアミノ基を脱水縮合剤の DMT-MM により -L-PGA のカルボキシル基に共有結合させた。糖鎖ポリマーは、ゲルろ過と逆相 HPLC により精製を行った。-L-PGA への Asn-糖鎖の結合率(mol%)は、アミノ酸組成分析によりアスパラギン酸とグルタミン酸のモル比から算出した。

ヒト樹状細胞の分化制御
ヒト末梢血由来 CD14 陽性単球を回収し、IL-4 と GM-CSF の存在化で 6 日間培養し、誘導し

た未熟樹状細胞を用い、糖鎖ポリマーで2日間刺激を行い、分化マーカーである(CD80, CD86, HLA-DR)の発現をフローサイトメーターで解析した。

(2)新規ヒノキ花粉アレルゲン Cha o3 の糖鎖構造解析

精製ヒノキ花粉アレルゲン(0.3 mg)からヒドラジン分解により糖鎖を切り出し、N-アセチル化後、ピリジルアミノ化により蛍光標識を行い、RP-HPLC及びSF-HPLCにより糖鎖を分離後、逐次酵素消化法及びESI-MS, MS/MS分析により構造解析を行った。

(3)ルイス a 抗原含有糖鎖の多量調整と糖鎖ポリマーの合成

水草(オオカナダモ)550 gから、プロテアーゼ消化、逆相クロマト、ゲル濾過、親水性クロマトを組み合わせるによりAsn-糖鎖(10.3 mg)を精製した。アミノ酸組成分析と糖鎖構造解析によりAsn-糖鎖の構造を確認した。糖鎖ポリマーの合成は3-(1)-の方法に従った。

4. 研究成果

(1)糖鎖ポリマーの合成と樹状細胞分化制御

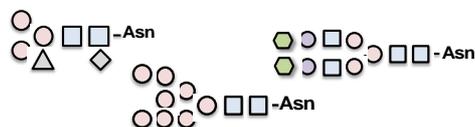
各種Asn-糖鎖の多量精製

各種Asn-糖鎖は、銀杏種子貯蔵タンパク質21 gから植物複合型(Man3Xyl1Fuc1GlcNAc2, M3FX)37 mg, 雑豆(大納言)糖タンパク質33 gからハイマンノース型(Man8GlcNAc2)30 mg, 卵黄糖ペプチド50 mgから動物複合型(NeuAc2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2)39 mgを精製できた。

各種糖鎖ポリマーの合成

各種糖鎖ポリマーは、植物複合型5.7 mg, ハイマンノース型2.2 mg, 動物複合型3.8 mgを合成し精製できた。アミノ酸組成分析により、-L-PGAへのAsn-糖鎖の結合率(mol%)は植物複合型15.4%, ハイマンノース型8.6%, 動物複合型11.1%だった。すなわち、-L-PGAの1分子あたり、Asn-糖鎖が植物複合型890分子, ハイマンノース型500分子, 動物複合型640分子を結合した各種糖鎖ポリマーの作製に成功した。発表論文, 学会発表 参照

Asn-糖鎖の収量と糖鎖ポリマー結合率



糖鎖構造	植物抗原性 (M3FX)	ハイマンノース型 (M8)	動物複合型
収量	37 mg/銀杏種子貯蔵タンパク質21 g	30 mg/大納言タンパク質33 g	39 mg/卵黄糖ペプチド50 mg
糖鎖結合率(%) Asp/Glu x 100	15.4	8.6	11.1
γPGA1分子に結合した糖鎖数	890	500	640

Asn, アスパラギン; ○, D-マンノース; □, N-アセチル-D-グルコサミン; ●, D-ガラクトース; ◇, L-フコース; △, D-キシロース; ○, N-アセチルノイラミン酸

ヒト樹状細胞の分化制御

各種糖鎖ポリマーによるCD80/CD86の発現影響は確認できなかったが、植物抗原性糖鎖ポリマーはHLA-DRの発現を抑制し、抗原提示抑制によるTh2免疫応答抑制への関与が示唆された。ヒト末梢血を用いた実験は個人差が大きく、再現性を確認する必要性が考えられた。そこでヒト単球細胞株(THP-1)を用いた実験系の構築も検討中である。また、アレルゲン存在化における糖鎖ポリマーの影響を解析するため、アレルゲン精製にも取り組んでいる。

その他の培養実験の結果

植物抗原性糖鎖ポリマーは結核菌抗原(PPD)特異的Th1応答(IFN-産生)の促進することは無かった。また、いずれの糖鎖ポリマーについてもLPSによるNFκB活性化の抑制には影響しなかった。

(2)新規ヒノキ花粉アレルゲン Cha o3 の糖鎖構造解析

Cha o3に存在している糖鎖の主要構造はGlcNAc2M3FX(39.0%)であり、ルイスa抗原含有M3FX(46.7%)も多く結合していた。既報のヒノキ花粉アレルゲンCha o1とは異なり、Cha o3糖鎖の構造的特徴は日本スギ花粉アレルゲンCry j1及びマウンテンシダーアレルゲンJun a1と非常に高い相同性を有していた。ルイスa抗原含有糖鎖の細胞性免疫活性に興味を持たれる。発表論文 参照

(3)ルイス a 抗原含有Asn-糖鎖の多量調整と糖鎖ポリマーの合成

水草糖タンパク質由来のルイスa抗原含有糖鎖を結合させた糖鎖ポリマー0.7 mgを合成した。アミノ酸組成分析により、-L-PGAへのAsn-糖鎖の結合率(mol%)は約3%に過ぎず、-L-PGAの1分子あたり、Asn-糖鎖が170分子程度結合していることを確認した。タケノコ(可食部)の糖タンパク質にルイスa抗原含有糖鎖が豊富に含まれて入ることを明らかにしたので、より多価にルイスa抗原含有糖鎖を結合させることが可能になった。発表論文 参照

(4)その他

植物抗原性糖鎖の抗原性低下に関与する1,3/4フコシダーゼとガラクトシダーゼの精製をイネ培養細胞および銀杏種子からそれぞれ行った。イネ-L-フコシダーゼは分子量58 kDa, 至適pHは6.0であった。銀杏種子由来ガラクトシダーゼは、ホモダイマー(分子量35 kDa)で至適pHは5.0であった。発表論文 参照

【参考論文】

Osada T, Harada T, Asaka N, Haruma T, Kino K, Sasaki E, Okano M, Yamada A, Utsugi T. Identification and gene cloning of a new

major allergen Cha o 3 from *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. *J Allergy Clin Immunol.*, 138, 911-913(2016)
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)
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6件)

前田恵, 木村万里子, 木村吉伸 スギ・ヒノキ花粉アレルギーに結合した N-グリカンの構造特性と免疫活性解析に向けた新技術アレルギーの臨床, 38, 55-59(2018)査読有

Osada T, Maeda M., Tanabe C, Furuta K, Vavricka CJ, Sasaki E, Okano M., Kimura Y. Glycoform of a newly identified pollen allergen, Cha o 3, from *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress, Hinoki). *Carbohydr Res.*, 448, 18-23(2018)査読有

Tanabe C, Furuta K, Maeda M., Kimura Y. Structural feature of N-glycans of bamboo shoot glycoproteins: useful source of plant antigenic N-glycans. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 81, 1405-1408(2017)査読有

Maeda M., Tani M., Yoshiie T., Vavricka CJ., Kimura Y. Structural features of N-glycans linked to glycoproteins expressed in three kinds of water plants: Predominant occurrence of the plant complex type N-glycans bearing Lewis a epitope. *Carbohydr Res.*, 435, 50-57(2016)査読有

Rahman MZ, Fujishige M, Maeda M., Kimura Y. Rice -fucosidase active against plant

complex type N-glycans containing Lewis a epitope: purification and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 80, 291-294(2016)査読有

Rahman MZ, Maeda M., Kimura Y. -Galactosidase from *Ginkgo biloba* seeds active against -galactose-containing N-glycans: purification and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 79, 1464-1472(2015)査読有

[学会発表](計10件)

田邊千夏, 抗原性糖鎖の多量調製法確立を目指したタケノコ糖タンパク質糖鎖の構造解析, 日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会(例会), 2018年1月27日, 広島大学東広島キャンパス

C. Tanabe, Glycoform analysis of a new major allergen, Cha o3, from Japanese cypress pollen, 12th Carbohydrate Bioengineering Meeting (The CBM12), 2017年4月25日, Audi Max, Augasse 2-6, 1090 Vienna/Austria

前田 恵, 免疫活性 N-グリカンをも有する糖鎖ポリマーの合成と応用, 第58回日本生化学会中国・四国支部例会 シンポジウム「糖鎖認識の生化学」, 2017年5月20日, サンポートホール高松, 香川

板野紗月, 多価糖鎖結合ポリマーが Th1, Th2 免疫応答に及ぼす免疫活性の解析, 支部創立15周年記念 日本農芸化学会中四国第47回講演会(支部例会), 2017年1月28日, 島根大学 松江キャンパス

田邊千夏, 新規ヒノキ花粉アレルギー Cha o3 の糖鎖構造解析, 支部創立15周年記念 日本農芸化学会中四国第47回講演会(支部例会), 2017年1月28日, 島根大学 松江キャンパス

Satsuki Itano, Immunomodulatory activity of glycopolymers bearing highly clustered N-glycans for Th1 and Th2 immune response. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016年12月7日, 沖縄コンベンションセンター, ラグナガーデンホテル

谷美里, Lewis a 抗原含有 N-グリカンの多量精製及び糖鎖ポリマーの作製, 第88回生化学会大会(BMB2015), 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド

Megumi Maeda, SYNTHESIS OF A NOVEL GLYCOPOLYMER CARRYING MULTIVALENT PLANT ANTIGENIC N-GLYCANS, 23rd International Symposium on Glycoconjugates, 2015年9月18日, Split, Croatia

Satsuki Itano, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *GINKGO BILOBA* 1,3/4-FUCOSIDASE (-FUC'ASE GB) ACTIVE AGAINST LEWIS A ANTIGEN, 23rd International Symposium on Glycoconjugates, 2015年9月16日, Split, Croatia

前田恵, 植物・動物複合型 N-グリカンをも有する結合した糖鎖ポリマーの作製, 第34回

日本糖質学会年会, 2015年8月2日, 東京大学安田講堂・工学部・山上会館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

糖鎖機能化学研究室

http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku01_3.html

岡山大学 研究者総覧

<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=ec49c68c89dc75d674506e4da22f6611>

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・准教授

研究者番号: 20434988

(2) 研究分担者

なし

(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

岡野 光博 (OKANO Mitsuhiro)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号: 60304359

(4) 研究協力者

なし