

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05617

研究課題名(和文) 抗ウイルス性硫酸化糖鎖の生理活性作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of antiviral mechanism of sulfated polysaccharides

研究代表者

吉田 孝 (Yoshida, Takashi)

北見工業大学・工学部・教授

研究者番号：40166955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：硫酸化糖鎖の抗ウイルス作用や抗凝血作用などの特異な生理活性は、ウイルスや細胞表面に存在するタンパク質中の(+)電荷と硫酸基の(-)電荷との静電的相互作用によると推定されている。当研究室ではこれまでに表皮タンパク質のモデル化合物としてポリリジンをを用い表面プラズモン共鳴装置(SPR)等によって調べてきた。

その結果、結合速度定数、解離速度定数、解離定数は、 $k_a=5.69 \times 10^5 \text{ 1/Ms}$ 、 $k_d=2.25 \times 10^{-4} \text{ 1/s}$ 、 $KD=3.95 \times 10^{-10}$ となりカーダン硫酸と高い相互作用を示すことを予備的であるが定量的に示した。デキストラン硫酸についても同様な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Sulfated polysaccharides were found to have potent antiviral activity such as HIV, dengue fever, influenza viruses, assumed by an electrostatic interaction between negatively charged sulfated groups and positively charged surface glycoproteins of viruses. We have investigated the interaction mechanism of sulfated polysaccharides and a model compound of the proteins, polylysine, using surface plasmon resonance (SPR). In this work, we present a quantitative analysis of the interaction using peptides from HIV-1 surface glycoprotein gp120.

The association (k_a) and dissociation-rate (k_d) constants were $k_a=5.69 \times 10^5 \text{ 1/Ms}$, $k_d=2.25 \times 10^{-4} \text{ 1/s}$, and dissociation constant (KD) $KD=3.95 \times 10^{-10}$, respectively. The peptides were found to be interacted strongly with curdlan sulfate, however, the peptide C showed no interaction. Dextran sulfate gave the similar results.

研究分野：生体高分子

キーワード：硫酸化糖鎖 HIV 相互作用 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

天然糖鎖は種々の認識や生理活性に関わっているが、複雑な構造を持つため構造と生理活性との関係を調べることは難しい。当研究室では無水糖類の開環重合法によって構造明確な立体規則性糖鎖を合成し、構造と生理活性との関係を解明する研究に取り組んでいる。オリゴ糖鎖に長鎖アルキル鎖を導入した硫酸化オリゴ糖鎖は高い抗 HIV 性を示すことも報告した。すなわち、3-*O*-オクタデシル-(1→6)- α -D-グルコピラノースの合成は報告されているが、抗ウイルス性などの生理活性は調べられていない。長鎖アルキル鎖の役割は細胞膜との相互作用と推測されている。また、私たちは、硫酸化糖鎖の抗ウイルス性は硫酸基の(-)電荷とウイルス表面のタンパク質に由来する(+)電荷との静電的相互作用によるものと推定している。

2. 研究の目的

本研究では3位に長鎖アルキル鎖を導入した硫酸化糖鎖を開環重合によって合成し、長鎖アルキル鎖と細胞のモデル化合物としてリポソームとの相互作用および HIV などの表皮タンパク質の配列から何種類かのペプチドを合成し、硫酸化糖鎖との相互作用を SPR、粒子径、ゼータ(ζ)電位測定によって調べ、硫酸化糖鎖の抗ウイルス性生理活性作用メカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

3-*O*-オクタデシル-2, 4-ジ-*O*-ベンジル-(1→6)- α -D-グルコピラノース (LGDBE18) と 2, 3, 4-トリ-*O*-ベンジル-(1→6)- α -D-グルコピラノース(LGTBE)との開環共重合を行い、脱保護、硫酸化により種々の割合で3位にオクタデシル基を持つ糖鎖を合成した。600 MHz 高分解能 NMR 等で構造解析を行い、ポリリジン(モデルペプチド、 $M_w=5000-9000$)、50 nm および 100 nm のリポソームとの相互作用を SPR、粒子径、ゼータ(ζ)電位測定により調べた。デキストラン硫酸 ($\bar{M}_n=8500$ 、 $S=18.4\%$) を比較に用いた。

次に MW-SPPS 方法に準拠し、ペプチド合成器(Biotage)を用いて、HIV-1 subtype B gp120

の3種類のペプチド(HIV-1 subtype B gp120 V3 loop モデルペプチド A、[Biotin]-²⁹⁷TRPNNNTRKRIRIQRGPGRA³¹⁶-[OH]、($M_w=2586.65$); HIV-1 subtype B gp120 C terminus モデルペプチド B、[Biotin]-⁴⁹³PLGVAPTKAKRRVVQREKR⁵¹¹-[OH]、($M_w=2414.64$); HIV-1 subtype B gp120 CD4-binding domain モデルペプチド C、[Biotin]-³⁶²KQSSGGDPEIVTHSFNCGG³⁸⁰-[OH]、($M_w=2145.15$))を合成した。ペプチドのN-末端にはビオチン基を導入した。合成ビオチン化ペプチドを HPLC(TSK gel ODS-80TM column, 7.8×300mm)を用いて精製し、MALDI TOF MS (Bruker Ultra Flex III)、LC/MS/MS 装置(AB Science 社 API 4000QTrap)により目的物のペプチドを同定した。ストレプトアビジンとビオチンとの親和性を利用しセンサーチップ (Sensorchip SA)上にビオチン化ペプチドを固定化し硫酸化糖鎖との相互作用を定量した。HBS-EP+バッファ溶液を用いてカードラン硫酸やデキストラン硫酸などとの相互作用を SPR 装置(Biacore X100)によって定量し、結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)、解離定数(K_D)を求めた。

4. 研究成果

(1) 長鎖アルキル鎖を持つ硫酸化糖鎖の合成とリポソームとの相互作用

LGDBE18 と LGTBE モノマーの開環共重合は、PF₅触媒、高真空下、-60°Cで行い、いずれの割合でも好収率で対応する共重合体が得られた。比旋光度、NMR 測定から(1→6)- α 体の立体規則性ポリマーであることが明らかになった。ペペリジン硫酸によって硫酸化して種々の割合で3位にオクタデシル基を持つ糖鎖を合成した。これら長鎖アルキル鎖を持つ硫酸化糖鎖は、分子量やSの割合が低いにも係わらず高い抗 HIV 性を示すことが分かり、長鎖アルキル鎖の導入は抗 HIV 性を高める働きをしていることが明らかになった。ポリリジンとの相互作用を SPR によって調べ、見掛けの結合速度定数、解離速度定数、解離定数は、 $k_a=8.1 \times 10^4$ 1/Ms、 $k_d=3.7 \times 10^{-4}$ 1/s、 $K_D=4.6 \times 10^{-9}$ M(デキストラン硫酸では $k_a=29.1 \times 10^4$ 1/Ms、 $k_d=1.9 \times 10^{-4}$ 1/s、

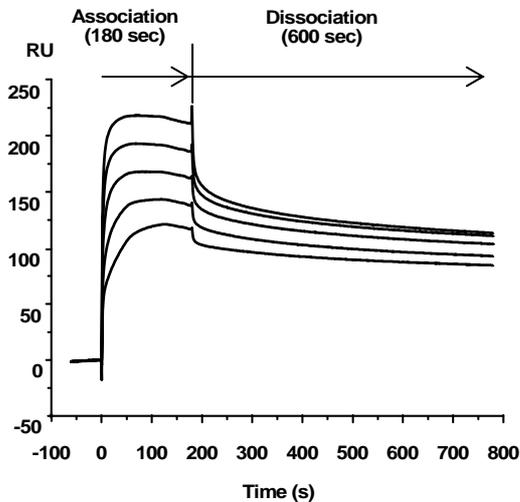


図1. 50nm リポソームとオクタデシルグルコシル化グルコピランとの相互作用を示す SPR

$K_D=0.15 \times 10^{-9}$ M) となり、デキストラン硫酸と同程度で強く相互作用することを見出した。粒子径は大きくなり、ゼータ (ζ) 電位を変化し、硫酸基の(-)電荷とアミノ基の(+)電荷相互作用を示した。

次に 50 および 100nm のリポソームとの相互作用を調べた。粒子径はデキストラン硫酸では変化しなかったが、オクタデシル硫酸化グルコピランではそれぞれ 104 および 267nm となった。ゼータ (ζ) 電位 (リポソーム 0.12 および 0.07mV) はデキストラン硫酸では -10.4 および -8.64mV であるのに対し、オクタデシル硫酸化グルコピランでは -33.46 および -34.86mV と大きく変化した。さらにリポソームを固定化したセンサーチップを用いて SPR を測定したところ、デキストラン硫酸では相互作用を示さなかったが、オクタデシル硫酸化グルコピランでは図 1 に示す通り、 $k_a=5.72 \times 10^5$ 1/Ms, $k_d=4.47 \times 10^{-4}$ 1/s, $K_D=7.82 \times 10^{-10}$ M となった。粒子径、ゼータ (ζ) 電位測定、および SPR の結果からオクタデシル硫酸化グルコピランはリポソームと強く相互作用を示すことが明らかになり、リポソームの二重膜にオクタデシル基が侵入 (入込み) した結果と考えた。

高い抗 HIV 性は細胞の脂質二重膜にオクタデシル基が侵入および (+) と (-) の静電的相

相互作用によってウイルス表面に硫酸化糖鎖やオリゴ糖鎖が強く固定化され HIV の感染力を弱めたと考えた。今後はさらに抗 HIV 性メカニズムを詳細に検討し、抗ウイルス材料化を目指す。

(2) 硫酸化糖鎖と HIV ペプチドとの相互作用

図 2 に HIV の表皮タンパク質 gp120 のいくつかの部分から得られたペプチドの 1 次構造を示す。これらはペプチド合成器を用いて合成し、センサーチップに固定化して硫酸化糖鎖とこれらのペプチドとの定量的な相互作用を SPR で測定するため、N-末端にビオチン基を導入した。ペプチド A と B はリジンや

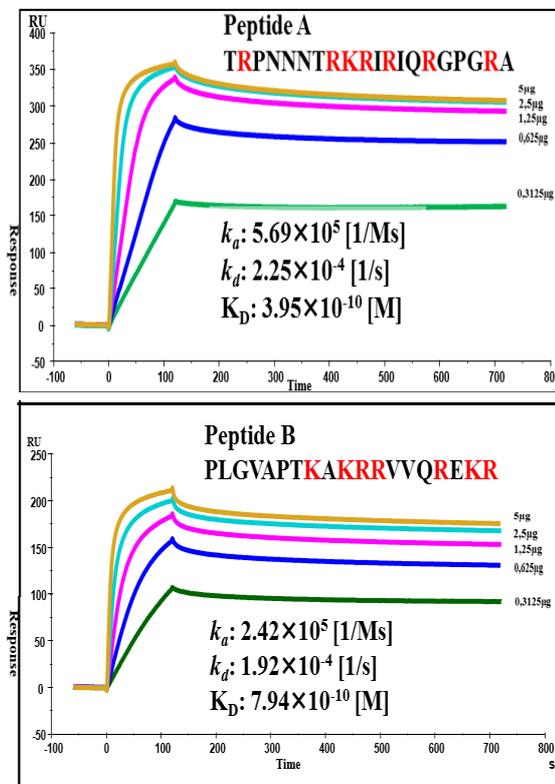


図2. 硫酸化カードランとペプチドとの相互作用

アルギニンなど塩基性アミノ酸が多い部分、ペプチド C は N-末端にリジン 1 コを持つ配列である。

また、gp120 は HIV がヒトの細胞に感染するときに、ヒト細胞表面にある CD4 タンパク質と相互作用することにより細胞中に入り込み感染することが明らかにされている。

我々は硫酸化糖鎖は HIV の gp120 と相互作用することにより抗ウイルス性を発揮しているのではと推定しているため、gp120 との相互作用の定量的解析を試みている。

MALDI TOF MS、LC/MS/MS によりペプチド A の分子量 $m/z = 863.4(+3)$ 、ペプチド B の分子量 $m/z = 805.6(+3)$ 、ペプチド C の分子量 $m/z = 716.5(+3)$ および構造を確認した。合成ペプチドをリガンドとしてセンサーチップ上に固定化し、硫酸化糖鎖との相互作用を SPR で測定した。図 2 に示すようにカードラン硫酸はペプチド A 及び B に対して強い相互作用を示すことが分かった。デキストラン硫酸でも同様な強い相互作用が観測された。すなわち、結合速度定数 (k_a) は $k_a = 5.69 \times 10^5$ 1/Ms、解離速度定数 (k_d) は $k_d = 2.25 \times 10^{-4}$ 1/s、解離定数 (K_D) は $K_D = 3.95 \times 10^{-10}$ 、しかしリジンやアルギニンなどの (+) 電荷を持つアミノ酸の割合が少ないペプチド C では相互作用はまったく観測されなかったことから、硫酸化糖鎖の抗ウイルス作用は (-) 電荷を持つ硫酸基と (+) 電荷を持つ表皮タンパク質との静電的相互作用が重要な役割を担っていると考えた。

以上のように、硫酸化糖鎖は HIV の表皮タンパク質 gp120 中の陽電荷を持つアミノ酸部分と相互作用することにより HIV の感染を抑制する抗ウイルス性を発揮すると予測しているが、ペプチドとの相互作用を定量的に解析することによって作用メカニズムの解明につながると考える。今回の研究はまだ予備的な結果であるが、硫酸化糖鎖とペプチドとの相互作用を定量的に調べることができた。

また、我々は以前に、硫酸化オリゴ糖鎖は抗ウイルス性を示さないが、長鎖アルキル鎖を導入した硫酸化オリゴ糖鎖は高い抗ウイルス性を示すことを報告している。長鎖アルキル鎖の作用メカニズムはよく分かっていなかったが、今回、リポソームとの相互作用を SPR や粒子径の測定により定量的に調べることができ、長鎖アルキル鎖はリポソームと相互作用していることが示唆される結果を得ることができた。

今後はこれらの知見をさらに詳細に検討

し、硫酸化糖鎖の抗ウイルス性作用メカニズムについて検討する。

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 11 件)

すべて査読あり。

(1) Takeshi Kawasaki, Tomohiko Iwasaki, Michi Yamada, Takashi Yoshida, Takafumi Watanabe, "Rapid growth rate results in remarkably hardened breast in broilers during the middle stage of rearing: a biochemical and histopathological study", *PLoS One*, **2018** Feb 23, **13**(2), e0193307. doi: 10.1371/journal.pone.0193307. eCollection (2018).

(2) Gulibusitan Aierkentai, Xianxiang Liang, Toshiyuki Uryu, Takashi Yoshida*, "Effective saccharification and fermentation of kraft pulp to produce bioethanol", *J. Fiber Sci. Technol.*, **73**(10), 261–269 (2017).

(3) Bai Chaolumen, Davaanyam Budragchaa, Takashi Yoshida*, "Ring-opening polymerization of new 3-O-branched 1, 6-anhydro glucopyranose di- and trisaccharide monomers", *Carbohydr. Res.*, **446–447**, 52–60 (2017).

(4) Ganzoric Oyundelger, Futoshi Sumisa, Batjargal Batdorj, Takashi Yoshida*, "Isolation and identification of new lactic acid bacteria with potent biological activity and yeasts in Airag, a traditional Mongolian fermented beverage", *Food Sci. Technol. Res.*, **22**(5), 575–582 (2016).

(5) Takeshi Kawasaki, Takashi Yoshida, Takafumi Watanabe, "Simple method for screening the affected birds with remarkably hardened pectoralis major muscles among broiler chickens", *J. Poultry Sci.* (Japan Poultry Science Association), **53**, 291–297 (2016).

(6) Tegshi Muschin, Davaanyam Budragchaa, Taisei Kanamoto, Hideki Nakashima, Koji Ichiyama, Naoki Yamamoto, Han Shuqin, Takashi Yoshida*, "Synthesis of sulfated natural galactomannans with specific antiviral activities", *Int. J. Biol. Macromol.*, **89**, 415–420 (2016).

(7) Suvdmaa Tuvaanjav, Han Shuqin, Masashi Komata, Chunjie Ma, Taisei Kanamoto, Hideki Nakashima, Takashi Yoshida*, "Structure and antiviral activity of water-soluble *Cynomorium songaricum* Rupr. polysaccharides", *J. Asian Natural Product Res.*, 1–13 (2016), DOI: 10.1080/10286020.2015.1082547.

(8) Davaanyam Budragchaa, Bai Shiming, Taisei Kanamoto, Hideki Nakashima, Han Shuqina, Takashi Yoshida*, "Synthetic galactomannans with potent anti-HIV activity", *Carbohydr. Polym.*, **130**, 233–242 (2015).

(9) Tumurbaatar Oyunjargal, Takashi Yoshida*, "Enzymatic digestion and mass spectroscopies of

N-linked glycans in lacquer stellacyanin from *Rhus vernicifera*", *Int. J. Polym. Sci.*, 1-9 (2015), Article ID 547907.

(10) Takahisa Ishimura, Takashi Yoshida*, "Polymerization of oriental lacquer (urushi) with epoxidized linseed oil as a new reactive diluent", *Int. J. Polym. Sci.*, 1-7 (2015), Article ID 782843, 7 pages.

(11) Bai Shiming, Davaanyam Budragchaa, Han Shuqin, Taisei Kanamoto, Hideki Nakashima, Toshiyuki Uryu, Takashi Yoshida*, "Sulfated alkyl glucopyranans with potent antiviral activity synthesized by ring-opening copolymerization of anhydro glucose and alkyl anhydro glucose monomers", *Int. J. Polym. Sci.*, Article ID 317420, 1-9 (2015).

〔学会発表〕(計16件)

(1) グリボスタン、吉田、"クラフトパルプを原料としたバイオエタノール"、第52回高分子学会北海道支部研究発表会(2018年1月、札幌)。

(2) Oyundelger, Badjargal, 佐藤, 吉田、"モンゴル伝統的発酵乳からの乳酸菌が生産する抗菌ペプチド"、第52回高分子学会北海道支部研究発表会(2018年1月、札幌)。

(3) Tungalag, Oyunjargal, 吉田、"硫酸化糖鎖とペプチドとの相互作用"、第52回高分子学会北海道支部研究発表会(2018年1月、札幌)。

(4) 宮崎、田中、五味淵、山田、吉田、"水熱処理木廃材を用いた生分解性プラスチック複合材料の開発"、第52回高分子学会北海道支部研究発表会(2018年1月、札幌)。

(5) Oyundelger, Badjargal, 佐藤, 吉田、"モンゴル産発酵乳中の抗菌ペプチドの分析"、平成29年高分子分析討論会(2017年9月、名古屋)。

(6) Chaolumen, 吉田、"1,6-無水オリゴ糖誘導体の開環重合"、第66回高分子討論会(2017年9月、船橋)。

(7) Oyundelger, Badjargal, 吉田、"モンゴル産発酵乳中の抗菌ペプチドの単離精製"、日本食品工学会第64回大会(2017年8月、藤沢)。

(8) グリボスタン、吉田、"セルロース系原料からのエタノール合成"、第24回セルロース学会年次大会(2017年7月、つくば)。

(9) グリボスタン、吉田、"クラフトパルプの糖化と発酵"、第6回JACI/GSCシンポジウム(2017年6月、東京)。

(10) Chaolumen, 吉田、"3位に糖鎖置換基を持つ新規1,6-無水グルコース2糖、3糖モノマーの開環重合性"、第66回高分子年次大会(2017年5月、東京)。

(11) Budragchaa, 吉田、瓜生、"長鎖アルキル鎖を持つ硫酸化糖鎖とリボソームとの相

互作用"、平成28繊維学会秋季研究発表会(2016年9月、山形)。

(12) Budragchaa, 吉田、"新規モノマー無水二糖の開環重合によるマンノグルカンの合成と構造解析"、平成28繊維学会年次大会(2016年6月、東京)。

(13) 住佐、ムタイリップ、吉田、"紫蘇蒸留廃液の抗菌性に関する研究"、第65回高分子年次大会、(2016年5月、神戸)。

(14) Bostan, Yoshida、"Effective saccharification of cellulosic biomass and ethanol fermentation"、環太平洋化学会議、(2015年12月、ホノルル)。

(15) Sumisa, Yoshida、"Bacterial expansins which enhance saccharification of cellulose"、環太平洋化学会議、(2015年12月、ホノルル)。

(16) Oyunjargal, Yoshida、"Structure analysis of N-linked glycan of laccase from Japanese lacquer tree"、環太平洋化学会議、(2015年12月、ホノルル)。

〔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〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 孝 (Yoshida, Takashi)
北見工業大学・工学部・教授
研究者番号: 40166955

(2) 研究分担者

中島 秀喜 (Nakashima, Hideki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20192669