

令和元年5月27日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05848

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸を分子基盤とする機能解析と創薬応用

研究課題名(英文)Functional analysis and medical application of chondroitin sulfate partial structures

研究代表者

若尾 雅広 (Wakao, Masahiro)

鹿児島大学・理工学域工学系・助教

研究者番号：20404535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：グリコサミノグリカン(GAG)は、生体内で最も複雑な構造と機能を持つ糖鎖の一つである。本研究では、GAGの分子レベルでの機能解析と創薬応用を目指し、GAGの中でもコンドロイチン硫酸(CS)(デルマトン硫酸(DS)も含む)に着目し、これらの部分構造の系統的合成法の確立について検討した。また、これまでに合成を達成しているCS・DS部分構造については、独自開発のGAG糖鎖ライブラリーを固定化した糖鎖チップを用いて、GAG結合性タンパク質の構造活性相関について解析した。さらに相互作用が見られた糖鎖構造については、分子モデリングによる解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GAGは、様々なタンパク質と相互作用し細胞の分化や増殖に関与する。GAGの生合成不全は、がんや免疫異常などの様々な疾患を引き起こすため、GAGの分子レベルでの機能解明は、非常に重要である。しかし、GAGは複雑な糖鎖構造を有するため、分子レベルでの機能解明は容易でない。本研究では、GAGの中でも特にCS・DSに着目し、系統的合成法を基盤として、CS・DS部分構造ライブラリーの合成法の確立と機能解析について検討した。本研究の成果は、合成化学、糖鎖工学の発展のみならず、生化学、分子生物学、創薬、医学分野での応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Glycosaminoglycans (GAGs) are one of the most complex molecule among glycans and play a role in a variety of biological event such as cell development, proliferation, and canceration. In this research, aiming functional analysis and medical application of GAGs, we examined systematic synthesis of partial structures containing chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS). In addition we evaluated their binding properties to GAG-binding proteins by surface plasmon resonance (SPR) imaging sensor using array-type sugar chip on which synthesised CS/DS partial structure library is immobilised. Furthermore, we analysed the binding interaction of CD/DS partial structure and GAG-binding proteins by molecular modeling.

研究分野：有機化学、糖鎖工学

キーワード：グリコサミノグリカン コンドロイチン硫酸 デルマトン硫酸 系統的合成 相互作用解析

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は生命現象に深く関与する生体分子であり、様々な分子とのダイナミックな相互作用を通して多くの機能を発現する。細胞表面に見られる酸性多糖である硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) は、最も複雑で多彩な機能を有する糖鎖の一つに分類され、成長因子やサイトカインなどの高生理活性タンパク質のシグナルを調節する他、細胞の分化や増殖、がん化、がんの転移などにも関与する。近年、iPS 細胞や ES 細胞においては、特定の構造の GAG が発現することが明らかにされており、多能性機能、未分化維持能、自己複製能における GAG の役割も注目されており、創薬研究だけでなく、バイオマーカー開発、再生医療への展開も期待されている。

GAG の多彩な機能は、鎖中に内在する微細構造が関連すると考えられている。これらの微細構造は『糖鎖暗号』として捉えられおり、GAG の分子レベルでの機能解析においては、これらの微細構造の解析、すなわち、糖鎖暗号の『解読』が重要な課題である。しかしながら、天然由来の GAG は複雑な多糖構造であるため、特定の微細構造を得ることが非常に難しい。そのため、GAG の分子レベルでの機能解析においては、合成化学的に調製された構造明確な GAG 部分構造が求められている。

我々の研究グループでは、GAG の機能解析を分子レベルで行うため、GAG 部分構造の化学合成について検討してきた。GAG 部分構造の合成においては、系統的合成法による CS・DS 部分二糖構造のライブラリーを構築している (Bioorg. Med. Chem. 2015, 25, 1407-1411、Tetrahedron Lett. 2016, 57, 1154-1157.)。また、調製した CS・DS ライブラリーからアレイ型糖鎖チップを作製し、このチップを表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置のセンサーチップとして用いることによって、簡便かつ効率良く CS、DS 部分構造とタンパク質の相互作用解析が可能であることを明らかにしている。さらに MOE による分子モデリングにおいては、がんの増殖や様々な炎症に関与する、代表的な GAG 結合性タンパク質である、塩基性繊維芽細胞成長因子 (FGF-2) を用いた場合、SPR 実験より得られる結合性と、モデリングによるドッキング親和性がよく一致しており、分子モデリングによる結合配向性の予測が可能であった。FGF-2 はじめとする成長因子やサイトカイン類は、種々のがんや炎症において重要な分子であり、これらの活性を調節できる CS・DS 糖鎖は新薬候補として期待される。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの結果をさらに発展させるべく、CS・DS 部分構造を分子基盤として、GAG 結合性タンパク質の機能解析および創薬応用を目指す。具体的には、以下の 4 項目について検討することにした。

(1) GAG 結合性タンパク質を用いた結合特性解析

本解析では、これまでに構築している CS・DS 部分構造ライブラリーを用いて作製した糖鎖チップを用いて、SPR イメージングによる網羅的解析を行い、結合タンパク質の結合特性を明らかにする目的とする。CS・DS 糖鎖構造に応じた結合パターンの違いが見られたタンパク質については、項目 2 にしたがって、分子モデリングによる解析を検討する。

(2) 分子モデリングによるドッキング解析

項目 1 の結合解析の結果と *in silico* での予測に基づいて、CS・DS 部分構造の分子設計を行い、ドッキング解析を行う。また CS・DS 部分構造の結合部位、親和性等についても評価する。

(3) CS・DS 部分構造の化学合成

申請者が開発しているビルディングブロックを用いた系統的合成法を用いて、項目 1、2 で予測された高親和性 CS・DS 部分構造の化学合成を行う。

(4) 合成した CS・DS 糖鎖の活性評価

細胞増殖性や酵素活性などを指標に、化学合成した CS・DS 部分構造の生理活性について検討する。

3. 研究の方法

(1) GAG 結合性タンパク質を用いた結合特性解析

結合解析は、CS・DS 部分構造を固定化した糖鎖チップと SPR イメージング装置を用いて行った。GAG 結合性タンパク質には、成長因子として繊維芽細胞増殖因子 (FGF) や神経細胞成長因子 (NGF)、Wnt、骨形成に関与するカテプシン、また、最近見いだされた硫酸化糖鎖結合性的一本鎖抗体 (scFv) を用いた。糖鎖チップの作製においては、固定化する糖鎖の密度によって結合性が異なることが明らかにされていることから、三倍希釈、9 倍希釈の糖鎖濃度での固定化を行った。

(2) 分子モデリングによるドッキング解析

分子モデリングは MOE を用いて *in silico* でのドッキング解析を行った。タンパク質部分の構造には X-線構造解析のデータを、糖鎖構造には GLYCAM で得られた初期構造を使用した。解析結果は SPR のデータと比較し、結合に優位な構造を予測し、その構造を持つ CS・DS 部分構造の化学合成について検討した。

(3) CS・DS 部分構造の化学合成

分子モデリングから予想される CS・DS 部分構造の合成と並行して系統的合成法の改良につ

いて検討した。CS 部分二糖構造の合成においては、すでに系統的合成法を確立しているが、四糖構造の合成においては、糖鎖伸長反応に課題があることが明らかとなっている。そこで保護基の再検討および新規グリコシル化について検討した。合成できた CS・DS 部分構造については、GAG 結合性タンパク質との結合実験に用いた。

(4) 合成した CS・DS 糖鎖の生理活性評価

合成した CS・DS 部分構造の生物活性試験を行うにあたり、まず CS 多糖との酵素活性評価について検討した。酵素にはカテプシンを、酵素基質には市販のカテプシン基質を用いて、CS 多糖添加による阻害活性または増強活性について評価した。

4. 研究成果

本研究は、CS・DS 部分構造の合成し、合成した糖鎖を用いて GAG 結合性タンパク質との相互作用解析を行うことで、CS・DS 糖鎖の機能を解明しようとしている。CS・DS 糖鎖は、細胞の増殖や分化、がん化などにおいて重要な分子であり、自己免疫疾患にも関係すると考えられている。本研究では、4つの項目において実験を行い、以下に示す結果が得られた。

(1) GAG 結合性タンパク質を用いた結合特性解析

GAG 結合性タンパク質として、成長因子である繊維芽細胞増殖因子 (FGF) や神経細胞成長因子 (NGF)、Wnt、骨形成に関与するカテプシン、また、最近見いだされた GAG 結合性的一本鎖抗体 (scFv) を用いて結合性評価を行った。その結果、成長因子類では顕著な結合活性が見られなかったが、特定の配列を持つ scFv においては、CS-M 二糖構造に結合することが明らかとなった。この scFv は特定のがん細胞に結合することが明らかにされており、CS・DS 糖鎖とがん細胞との関連に興味を持たれる。

(2) 分子モデリングによるドッキング解析

これまでに相互作用解析が行われている FGF-2 とのドッキング解析の結果、CS-E+T、CS-T+T、DS-E+E、DS-E+CS-E において、CS-E+E と同程度の結合親和性が予測された。したがって、項目3では、これらの糖鎖構造を含む糖鎖の合成について検討した。

(3) CS・DS 部分構造の化学合成

CS、DS 部分構造の合成では、糖鎖伸長反応の効率が悪く量的に確保することが難しいことが分かったことから、従来法の四糖構造の合成と並行して合成経路の改良についても検討した。従来法による合成では、DS-E+E の四糖部分構造の合成について検討し、硫酸化四糖構造への誘導を行った。新規の合成経路においては、グルクロン酸 (GlcA) 成分、イズロン酸 (IdoA) 成分の3位にナフチルメチル (NAP) 基を持つウロン酸成分を設計し、GlcA-GalNAc 配列を持つ二糖共通中間体、IdoA-GalNAc 配列を持つ二糖共通中間体の合成を行った。また合成した二糖中間体から糖供与体成分、受容体成分へ誘導し、四糖構造が構築できる共通五糖中間体を合成した。今後、CS-T+T、CS-E+T、DS-E+CS-E 四糖構造の合成を行う予定である。

(4) 合成した CS・DS 糖鎖の生理活性評価

生理活性評価を行うにあたり、まず CS 多糖を用いた酵素活性評価について検討した。酵素にはカテプシンを、酵素基質には市販のカテプシン基質を用いて、CS 多糖添加による阻害活性または増強活性について評価した。その結果、明確な活性の差異は見いだせなかった。CS・DS 部分構造については、活性測定を行える十分量が得られしだい検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Muchima K, Todaka T, Shinchi H, Sato A, Tazoe A, Aramaki R, Kakitsubata Y, Yokoyama R, Arima N, Baba M, Wakao M, Ito Y, Suda Y, Development of sugar chain-binding single-chain variable fragment antibody to adult T-cell leukemia cells using glyco-nanotechnology and phage display method, 査読有, J. Biochem., 163, 2018, 281-291, DOI:10.1093/jb/mvy005

〔学会発表〕(計2件)

石丸慎太郎、新地浩之、若尾雅広、伊東祐二、隅田泰生、硫酸化糖鎖結合性一本鎖抗体の探索、平成30年度日本生化学会九州支部例会、2018年6月。

大山雄滝、西岡京祐、原之園龍輝、杜若祐平、若尾雅広、隅田泰生、デルマタン硫酸ノコンドロイチン硫酸ハイブリット四糖構造に関する合成研究、日本化学会第97回春季年会、2017年3月。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
鹿児島大学工学部化学生命工学科隅田研究室
(<http://www.cb.kagoshima-u.ac.jp/lab/suda-lab>)

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者：なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。