

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19590052
 研究課題名（和文） 肝疾患の発症や治療に関わる硫酸化グリコサミノグリカンの構造及び作用機序の解明
 研究課題名（英文） Study on the structure and functions of sulfated glycosaminoglycans involved in the development or treatment of liver diseases.
 研究代表者
 山田 修平（YAMADA SHUHEI）
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授
 研究者番号：70240017

研究成果の概要：

硫酸化グリコサミノグリカン（GAG）は細胞増殖因子など様々な生理活性タンパク質と特異的に相互作用し、それらの活性を調節する。また、ウイルス感染の過程においても極めて重要な役割を果たしている。本研究では、再生期間の異なる再生肝より GAG を精製し、その構造変化と機能変化を解析した。また、様々な GAG について、C 型肝炎ウイルスの感染への影響を検討した。さらに GAG の構造解析を行うための新規の技術や酵素を開発した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：グリコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、肝再生、C 型肝炎ウイルス、細胞増殖因子、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

肝臓は体内の基礎代謝のかなりの部分を担い、毒物の解毒なども行う生体内で最も重要な臓器の一つである。従って、肝炎、肝硬変、肝臓癌などの肝臓疾患は、生命を脅かす危険性があり、これらの治療のためにも、肝臓に関する研究は、基礎医療分野で最も重要な領域であるといえる。

肝再生における液性因子の研究は非常に進んでおり、その作用機序も明らかにされつつある。しかし、肝臓の再生には、それらの液性因子だけでは十分ではなく、足場となるマトリックスも無視できない。グリコサミノ

グリカン（GAG）は細胞外マトリックスの主要な成分であり、GAG も肝再生において不可欠であると思われる。GAG は非常に複雑な構造を持った硫酸化多糖であり、その多様な機能を効果的に発揮するために、必要に応じてその微細構造を、時間的空間的に、大きく変化させている。肝再生過程においても、GAG がその構造を変化させ、対応するタンパク質因子の種類や結合能を変えることによって機能調節を行っていると考えられる。従って、肝臓の再生期における硫酸化 GAG の構造的機能的変化を知ることは、肝再生のメカニズムを理解し、これを医療応用する上で極めて

重要な情報となる。

近年、細胞表面に存在する硫酸化 GAG が、細菌やウイルスの感染ターゲットとなっているとの報告が後を絶たない。すなわち、硫酸化 GAG は、ウイルス感染の過程においても極めて重要な役割を果たしていることが証明されている。特に、社会的に大きな問題となっている C 型肝炎の病原ウイルスである C 型肝炎ウイルスについて、感染初期に宿主細胞表面のヘパラン硫酸がターゲットとなっていることが明らかになっている。他のウイルスの場合で徐々に明らかになりつつあるが、ウイルス感染においては細胞表面のヘパラン硫酸のみならずコンドロイチン硫酸もそのターゲットとなりうるため、硫酸化 GAG を全般的に検証する必要がある。GAG を介した C 型肝炎ウイルスの感染メカニズムの解明は非常に興味深く、感染防御法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

肝臓の再生期における硫酸化 GAG の構造的機能的変化を知ることは、肝再生のメカニズムを理解し、これを医療応用する上で極めて重要な情報となる。そこで、肝再生過程における GAG を、再生の様々なステップで精製し、その量的変化、分子量の変化、構成二糖組成の変化、各種細胞増殖・分化因子との結合能力の変化を探る。また、GAG 関連生成酵素群の遺伝子発現の変化も関連させて調べる。肝再生過程における GAG の役割が解明されれば、組織再生医療への応用が期待される。

また、肝炎ウイルスに関連する実験では、ウイルス感染への各種硫酸化 GAG の効果を解明し、その活性に必要な構造上の特徴（硫酸化部位、結合に必要な最小サイズなど）を解明する。さらに、GAG と直接相互作用する可能性のあるウイルスタンパク質を大量に発現・精製して、硫酸化 GAG との直接の結合を示し、結合に必要な GAG 上の構造を明らかにする。可能ならば、結合に必要な糖鎖配列のシーケンシングを行う。そのような糖鎖配列に基づいて、C 型肝炎ウイルスの細胞への結合を特異的に阻害する物質を検索し、C 型肝炎ウイルス感染阻害物質の人工合成のための手がかりを得る。

上記の目標を達成するため、より高感度で有用な GAG の構造解析法、機能解析法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 肝再生に関する実験

①マウスの肝臓の 3 分の 2 程度を切除し、1 週間から 10 日程度飼育を続ける。手術後の飼育期間が異なるマウスより、再生途中あるいは再生後の肝臓を摘出する。肝臓組織から GAG を単離、精製する。精製した各硫酸化

GAG について、その総量、組成、構成二糖単位の割合、糖鎖長等を決定し、構造に関する情報を得る。

②精製した各硫酸化 GAG について、相互作用解析装置 BIAcore を用いて、繊維芽細胞増殖因子や肝細胞増殖因子などの各種細胞増殖分化因子との結合能の変化を観察する。

③再生肝臓の組織から mRNA を精製し、リアルタイム RT-PCR を行って、GAG 生成酵素群、コアタンパク質の主要なものなど GAG 関連遺伝子群について、mRNA の発現量の変化を調べる。

④肝臓の再生に深く関与しているタンパク質因子の中で、特に GAG との相互作用が確認できたものについては、ウシの肝臓から大量に調製した GAG を用いて、結合に必要な糖鎖配列を解明する。

⑤再生研究のモデル生物であるヒドラについても、GAG を単離、精製する。精製した各硫酸化 GAG について、その総量、組成、構成二糖単位の割合、糖鎖長等を決定し、構造に関する情報を得る。

⑥発生研究のモデル生物であるアフリカツメガエルの GAG についても、発生時期の異なる胚より単離し、その総量、組成、構成二糖単位の割合、糖鎖長等を決定し、構造に関する情報を得る。また、発生段階の異なる胚から精製した GAG と各種増殖因子との相互作用を BIAcore を用いて解析し、発生に伴う結合能の変化を観察する。

(2) C 型肝炎ウイルスに関する実験

①様々な GAG を使って、C 型肝炎ウイルスの感染阻害能を検討する。また、ウイルスの感染に効果を示す GAG の最小サイズを知るために、高硫酸化コンドロイチン硫酸由来のオリゴ糖を用いて感染阻害実験を行う。

②C 型肝炎ウイルスの表面タンパク質の E1、E2 タンパク質と、GAG、特に高硫酸化コンドロイチン硫酸との相互作用を調べる。E1 及び E2 タンパク質の遺伝子を PCR で増幅後、発現ベクターに組み込む。さらにそれを培養細胞にトランスフェクションし、タンパク質を発現させる。タグを利用して発現したタンパク質の精製を行う。また、タグに対する抗体を利用して、発現を確認する。タンパク質の発現量が十分でない場合には、昆虫細胞を利用して、あるいは安定トランスフェクタントを作成して、大量に調製する。

③大量に発現、精製できた E1、E2 タンパク質を用い、高硫酸化コンドロイチン硫酸との直接の相互作用を ELISA 実験によって調べる。つまり、糖鎖をビオチン化し、それらを固定したプレートを用いて行う。また、この実験系に、ビオチン化していない多糖や様々なサイズのオリゴ糖を加えて阻害実験を行うことにより、相互作用に必要な構造の特徴を推定

し、結合に必要なオリゴ糖の最小サイズを知る。

④C型肝炎ウイルス感染性の細胞である肝ガン由来培養細胞株HepG2細胞へのE1、E2タンパク質の結合を、免疫組織染色、フローサイトメーターを用いて解析する。さらに、この実験系に、様々な多糖やオリゴ糖を加えて阻害実験を行う。

⑤C型肝炎ウイルスの肝臓における受容体の1つに、繊維芽細胞増殖因子(FGF)の受容体が推定されているので、FGFをGAGと同時に添加したときの、E1、E2タンパク質への結合能や感染への影響を調べる。

⑥E1、E2タンパク質と特異的に結合するオリゴ糖の糖鎖配列を決定する。

(3) イカの肝臓のコンドロイチン硫酸に関する実験

①イカの肝臓のコンドロイチン硫酸を単離、精製する。精製したコンドロイチン硫酸について、その総量、組成、構成二糖単位の割合、糖鎖長等を決定し、構造に関する情報を得る。

②精製したコンドロイチン硫酸と各種増殖因子との相互作用をBIAcoreを用いて解析する。

③神経突起伸長促進活性等の生理活性を測定する。

(4) コンドロイチン硫酸の新規解析法の開発に関する実験

①オリゴ糖マイクロアレイの手法を用いて、複数の抗コンドロイチン硫酸抗体のエピトープを解析する。

②¹H NMRを用いてコンドロイチン硫酸中のウロン酸のタイプを定量する方法を開発する。

③質量分析装置を用いて、コンドロイチン硫酸中のグルクロン酸3硫酸という稀な構造を検出、定量する方法を開発する。

④新規のエンド型コンドロイチン加水分解酵素を探索し、その基質特異性を解明し、コンドロイチン硫酸の構造解析を行うためのツールの一つとして利用する。

4. 研究成果

(1) 再生期間の異なる再生肝より GAG を精製し、その構造の特徴、再生過程における構造変化を解析した。また、肝細胞増殖因子など肝再生に関わる増殖因子との相互作用についても解析した。さらに、再生期間の異なる再生肝より mRNA を単離し、GAG の生合成に関わる酵素群の発現レベルの変化についても調べた。この研究成果については、現在論文作成中である。一方、再生研究のモデル生物であるヒドラの GAG の構造を初めて明らかにし、発生研究のモデル生物であるアフリカツメガエルの GAG についても、発生時期の異なる胚より単離し、構造と増殖因子との相互作用能の変化を解明した。これらは、肝

再生における GAG の構造・機能の変化を解明する上で、非常に良いモデルになると考えられる。ヒドラとアフリカツメガエルの GAG に関する研究成果については、それぞれ国際学術誌に論文として報告した。

(2) 大阪大学微生物病研究所の松浦善治教授らとの共同研究により、様々な GAG を用いて、C型肝炎ウイルスの感染への影響を検討した。その結果、ある特定の構造を持った高硫酸化コンドロイチン硫酸の添加が、C型肝炎ウイルスの宿主細胞への感染を促進することを見いだした。この結果は感染に対し阻害的に働くヘパリンの作用とは正反対の結果であり、この感染メカニズムの解明は非常に興味深い。そこで、C型肝炎ウイルスの表面タンパク質の E1、E2 タンパク質と様々な GAG との相互作用解析を試みた。解析を行うにあたり、E1、E2 タンパク質を昆虫細胞を用いて大量に調製した。特に C型肝炎ウイルスの感染に影響を及ぼすことが明らかになった高硫酸化コンドロイチン硫酸 E について、E1、E2 タンパク質との相互作用を調べた。また、ウシの肝臓から単離した GAG についても、E1、E2 タンパク質との相互作用を調べ、相互作用に必要な GAG 鎖上の構造的特徴を解明した。感染促進のメカニズムについては、現在も引き続き解析中である。これまで得られている研究成果については学会発表しており、現在論文作成中である。

(3) イカの肝臓のコンドロイチン硫酸についても、その構造および生理活性を調べた。イカは無脊椎動物であるにも関わらず、哺乳動物の肝臓と同様に高硫酸化コンドロイチン硫酸に富んでいること、また強い生理活性をもつことを明らかにした。この性質は、肝臓の GAG に普遍的に見られるものであるのかも知れない。この研究成果については学会発表しており、国際学術誌に論文としても報告した。

(4) コンドロイチン硫酸の解析をより効果的に行うことを目的として、以下の実験を行った。①複数の抗コンドロイチン硫酸抗体のエピトープをオリゴ糖マイクロアレイの手法を用いて決定した。②¹H NMR を用いてコンドロイチン硫酸中のウロン酸のタイプを定量する方法を開発した。③コンドロイチン硫酸中のグルクロン酸 3 硫酸という稀な構造を検出、定量する方法を開発した。④コンドロイチン硫酸の構造解析を行うためのツールの一つとして、新規のエンド型コンドロイチン加水分解酵素を発見し、その特異性を解明した。これらの研究成果については、既に学会発表を行っており、国際学術誌に論文として掲載されている。

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 8 件)

- ① Ajaya Kumar Shetty, Takanari Kobayashi, Shuji Mizumoto, Masaki Narumi, Yoshiaki Kudo, Shuhei Yamada, and Kazuyuki Sugahara, Isolation and Characterization of a Novel Chondroitin Sulfate from Squid Liver Integument Rich in *N*-Acetylgalactosamine(4,6-*O*-disulfate) and Glucuronate(3-*O*-sulfate) Residues. **Carbohydr. Res.**, 2009 in press. 査読有
- ② Shuhei Yamada, Masako Onishi, Reiko Fujinawa, Yuko Tadokoro, Koji Okabayashi, Makoto Asashima, and Kazuyuki Sugahara, Structural and Functional Changes of Sulfated Glycosaminoglycans in *Xenopus laevis* during Embryogenesis. **Glycobiology**, 2009 in press. 査読有
- ③ Tomoyuki Kaneiwa*, Shuhei Yamada*, Shuji Mizumoto, Adriana M. Montaño, Souhei Mitani and Kazuyuki Sugahara, Identification of a Novel Chondroitin Hydrolase in *Caenorhabditis elegans*. *These authors contributed equally to the work. **J. Biol. Chem.**, 2008, 283, 14971-14979. 査読有
- ④ Shuhei Yamada and Kazuyuki Sugahara, Potential Therapeutic Application of Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate. **Current Drug Discovery Technologies**, 2008, 5, 289-301. 査読有
- ⑤ Fuchuan Li*, Shuhei Yamada*, Basappa, Ajaya K. Shetty, Makiko Sugiura, and Kazuyuki Sugahara, Determination of Iduronic Acid and Glucuronic Acid in Sulfated Chondroitin/Dermatan Hybrid Chains by ¹H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *These authors contributed equally to the work. **Glycoconjugate J.**, 2008, 25, 603-610. 査読有
- ⑥ Duriya Fongmoon, Ajaya Kumar Shetty, Basappa, Shuhei Yamada, Makiko Sugiura, Prachya Kongtawelert, and Kazuyuki Sugahara, Chondroitinase-mediated Degradation of Rare 3-*O*-Sulfated Glucuronic Acid in Functional Oversulfated Chondroitin Sulfate K and E. **J. Biol. Chem.**, 2007, 282, 36895-36904. 査読有
- ⑦ Shuhei Yamada, Hideto Morimoto, Toshitaka Fujisawa, and Kazuyuki Sugahara. Glycosaminoglycans in *Hydra magnipapillata* (Hydrozoa, Cnidaria): Demonstration of Chondroitin in the Developing Nematocyst, Sting Organelle, and Structural

Characterization of Glycosaminoglycans. **Glycobiology**, 2007, 17, 886-894. 査読有

- ⑧ Sarama S. Deepa, Shuhei Yamada, Shigeyuki Fukui, and Kazuyuki Sugahara, Structural Determination of Novel Sulfated Octasaccharides Isolated from Chondroitin Sulfate of Shark Cartilage and Their Application for Characterizing Monoclonal Antibody Epitopes. **Glycobiology**, 2007, 17, 631-645. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- ① 山田修平、Structural analysis of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in heparan sulfate glucuronyl C5-epimerase-deficient mice, BMB2008 (第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会 合同大会、2008.12.9、神戸)
- ② 小林芙美、硫酸化グリコサミノグリカンと C 型肝炎ウイルスのエンベロプタンパク質との相互作用の解析、BMB2008 (第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会 合同大会、2008.12.9、神戸)
- ③ 小林芙美、C 型肝炎ウイルスのエンベロプタンパク質と硫酸化グリコサミノグリカンとの相互作用解析、シオノギイノベーションフェア 2008、2008.8.28、札幌
- ④ 小林芙美、C 型肝炎ウイルスのエンベロプタンパク質と硫酸化グリコサミノグリカンとの相互作用解析、第 28 回日本糖質学会年会、2008.8.20、つくば
- ⑤ 金岩知之、線虫 *Caenorhabditis elegans* のコンドロイチン加水分解酵素による主要な分解産物の構造解析、第 28 回日本糖質学会年会、2008.8.20、つくば
- ⑥ 山田修平、組換え体ヒトヒアルロニダーゼ-1 および-2 の基質特異性の研究、第 28 回日本糖質学会年会、2008.8.19、つくば
- ⑦ 小林孝成、イカ肝臓外皮由来のコンドロイチン硫酸の構造および生理活性の解析、第 28 回日本糖質学会年会、2008.8.19、つくば
- ⑧ 山田修平、組換え体ヒトヒアルロニダーゼ-4 の基質特異性の研究、第 28 回日本糖質学会年会、2008.8.19、つくば
- ⑨ 山田修平、線虫 *Caenorhabditis elegans* における新規のコンドロイチン加水分解酵素の同定、第 28 回日本糖質学会年会、2008.8.19、つくば
- ⑩ 小林孝成、イカ肝臓外皮由来のコンドロイチン硫酸の構造と神経突起伸長促進活性、日本生化学会北海道支部第 45 回例会、2008.8.8、札幌
- ⑪ 山田修平、線虫 *Caenorhabditis elegans*

- における新規のコンドロイチン加水分解酵素の同定、日本薬学会第 128 年会、2008.3.28、横浜
- ⑫ 金岩知之、線虫 *Caenorhabditis elegans* における新規のコンドロイチン加水分解酵素の同定、第 42 回高分子学会北海道支部研究発表会、2008.1.29、札幌
- ⑬ Ajaya K. Shetty、Chondroitinase-Mediated Degradation of Rare 3-O-Sulfated Glucuronic Acid in Functional Oversulfated Chondroitin Sulfate Chains、BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)、2007.12.12、横浜
- ⑭ 山田修平、コンドロイチン硫酸 (CS) / デルマトン硫酸 (DS) 中のグルクロン酸 (GlcA) とイズロン酸 (IdoA) の ¹H NMR 解析による定量、BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)、2007.12.12、横浜
- ⑮ 山田修平、単クローン抗体 MO-225 が認識するコンドロイチン硫酸 E 由来のオリゴ糖の構造解析、第 27 回日本糖質学会年会、2007.8.3、福岡
- ⑯ 山田修平、サメ軟骨コンドロイチン硫酸由来の八糖の構造解析と抗体のエピトープ解析への応用、第 27 回日本糖質学会年会、2007.8.3、福岡
- ⑰ 菅原一幸、抗コンドロイチン硫酸抗体のエピトープ構造、第 27 回日本糖質学会年会、2007.8.1、福岡
- ⑱ Duriya Fongmoon、Chondroitinase-Mediated Degradation of Rare 3-O-Sulfated Glucuronic acid in Functional Oversulfated Chondroitin Sulfate Chains、Glyco19 (XIX International Symposium on Glycoconjugates)、2007.7.16、Cairns
- ⑲ 山田修平、抗コンドロイチン硫酸 D (CS-D) 抗体 MO-225 が認識する CS-E 由来のオリゴ糖の構造解析、第 44 回日本生化学会北海道支部例会、2007.7.6、札幌

[図書] (計 1 件)

- ① Kazuyuki Sugahara and Shuhei Yamada, Springer, Tokyo, **Experimental Glycoscience Glycochemistry**, 2008, 64-69.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：ムコ多糖分解促進剤

発明者：菅原一幸、山田修平、水本秀二

権利者：北海道大学

種類：特願

番号：2007-291424

出願年月日：2007 年 11 月 9 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 修平 (YAMADA SHUHEI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：70240017

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし