

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19870025
 研究課題名（和文） 組換え酵素を用いた人工コンドロイチン硫酸の合成と生理機能の解明
 研究課題名（英文） Synthesis of artificial chondroitin sulfates using recombinant enzymes and investigation of the physiological functions
 研究代表者
 杉浦 信夫
 愛知医科大学・分子医科学研究所・准教授
 研究者番号： 90454420

研究成果の概要： 蛍光標識コンドロイチン(PA-CH)オリゴ糖およびポリマーを大腸菌由来コンドロイチンポリメラーゼ (K4CP) で合成し、遺伝子組み換えコンドロイチン硫酸基転移酵素群で上記 PA-CH を硫酸化修飾し、各種合成コンドロイチン硫酸ライブラリーを構築した。また、合成コンドロイチン硫酸オリゴ 8 糖 (PA-CS 8) の糖鎖配列を決定できる方法を確立した。合成 PA-CS ライブラリーを用いて表面プラズモン測定装置や蛍光高速液体クロマトグラフィーにより、CS 結合性生理活性分子との親和性解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,360,000 円	0 円	1,360,000 円
20 年度	1,350,000 円	405,000 円	1,755,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000 円	405,000 円	3,115,000 円

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 機能生物化学

キーワード： 糖鎖工学、遺伝子組換え酵素、コンドロイチン硫酸、グリコサミノグリカン、硫酸基転移酵素、糖転移酵素、表面プラズモン測定、蛍光高速液体クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

(1) コンドロイチン硫酸の生理機能について注目されてきたが、天然コンドロイチン硫酸は多様で複雑な構造のため、本格的な構造と活性の相関を探求するツールに欠けていた。

(2) また、コンドロイチン硫酸を合成する各種酵素の遺伝子がほぼ同定され、組換え酵素の入手が可能になってきた。

2. 研究の目的

大腸菌由来のコンドロイチンポリメラーゼと、組換え硫酸基転移酵素群を用いて、糖鎖長と硫酸基修飾位置と量を自在に制御したコンドロイ

チン硫酸の人工合成を行い、構造特異的なコンドロイチン硫酸の生理機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 我々がクローニングした大腸菌 K4 株由来コンドロイチンポリメラーゼ (K4CP) の組換え酵素を大腸菌発現系で調製し、バキュロウイルス感染昆虫細胞培養発現系で組換えヒト由来コンドロイチン硫酸合成関連酵素(CSTs)を取得した。

(2) 蛍光標識したコンドロイチンオリゴ 6 糖 (PA-CH6) および UDP-GlcA と UDP-GalNAc を基質として K4CP を働かせ、合成蛍光標識コ

ンドロイチンポリマー(PA-CH)を調製した。

(3) 組換え CSTs を用いて、合成 PA-CH に硫酸基供与体基質 PAPS を作用させ、特異的な酵素反応を利用した各種蛍光標識コンドロイチン硫酸誘導体を合成した。

(4) 得られた硫酸化体を二糖組成解析などによる構造解析を行うとともに、蛍光標識硫酸化オリゴ糖 (PA-CS8) については、PA 標識還元末端糖鎖構造解析及び飽和型非還元末端糖鎖の解析を行った。

(5) プレイオトロピンやミッドカインなどの CS 結合性生理活性分子を表面プラズモンセンサーチップや NHS 活性化アガロースビーズに固定化し、各種合成コンドロイチン硫酸との親和性を熱力学的に測定した。

4. 研究成果

(1) コンドロイチンの合成 --- K4CP の酵素反応により蛍光標識コンドロイチンポリマー(分子量 1 万、1.2 万、3 万および 4 万)を mg スケールで調製した。

(2) コンドロイチン硫酸ポリマーの調製 --- 昆虫細胞培養系により発現させた硫酸基転移酵素群(C4ST-1, C6ST-1, GalNAc4S-6ST, U2ST)を単独あるいは複数作用させて各種コンドロイチン硫酸ライブラリーを構築した (表 1)。

表 1 : 主な合成 PA-CS の二糖組成(%)

合成品	0S	4S	6S	SD	SE
PA-CH	100	0	0	0	0
PA-C4S	1.6	98.4	0	0	0
PA-C6S	3.7	0	96.3	0	0
PA-C4S6S	1.8	34.5	63.6	0	0
PA-C4S-SE	4.6	23.8	0	0	71.6
PA-C4S6S-SD	7.0	10.8	61.3	20.9	0

(注) 0S : GlcA-GalNAc
 4S : GlcA-GalNAc(4S)
 6S : GlcA-GalNAc(6S)
 SD : GlcA(2S)-GalNAc(6S)
 SE : GlcA-GalNAc(4S,6S)

(3) 合成コンドロイチン硫酸オリゴ糖の配列決定 ---

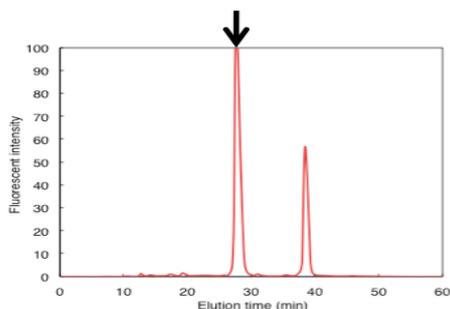


図 1 : 蛍光標識硫酸化コンドロイチン 8 糖の合成

蛍光標識コンドロイチン 8 糖 [PA-CH8, (GlcA-GalNAc)₄-PA] を 4 硫酸基転移酵素 (C4ST-1) で硫酸化した。イオン交換クロマトで得られた主ピーク (図 1 矢印) を集めた。

その画分を脱離型分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC および ACII で分解すると、それぞれ還元末端から PA 標識不飽和 4 糖及び 2 糖が得られ、非還元末端からは飽和 GlcA を含む 2 糖が共に得られ、不飽和 GlcA を含む 2 糖が 1 分子分と 2 分子分がそれぞれ得られる。これらを PA 標識糖分析用蛍光 HPLC システム (図 2) とポストカラム蛍光 HPLC 2 糖分析システムにかけ、さらに酢酸水銀処理することにより不飽和 GlcA を分解することで飽和 2 糖を分析した (図 3)。

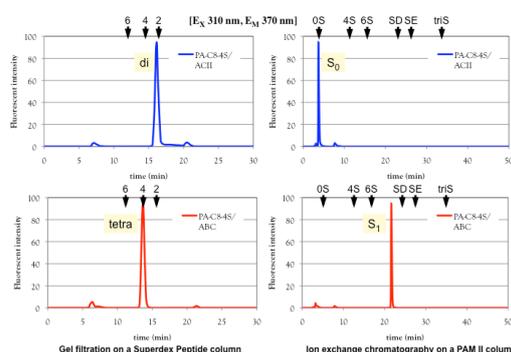


図 2 : PA-C4S-8 糖酵素分解物の PA 糖分析

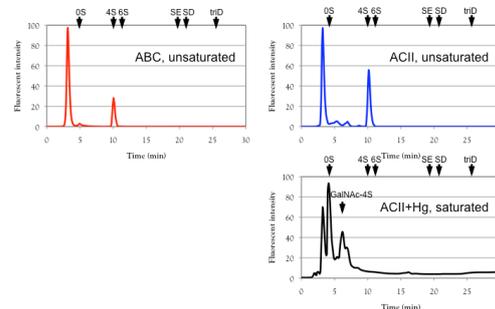


図 3 : PA-C4S-8 糖酵素分解物の二糖解析

これらの結果から、この硫酸基修飾体の糖鎖配列は糖鎖中の中間 2 ユニットの GalNAc の 4 位が硫酸化された GlcA-GalNAc-GlcA-GalNAc(4S)-GlcA-GalNAc(4S)-GlcA-GalNAc-PA の 8 糖 2 硫酸構造であることが判明した。他の硫酸基修飾体も同じ方法で配列決定が可能

である。

(4) プレイオトロピンやミッドカインなどの CS 結合性生理活性分子を表面プラズモン測定センサーチップや NHS 活性化アガロースゲルに固定化し、合成コンドロイチン硫酸ライブラリーとの親和性解析を表面プラズモン測定装置(ピアコア)やアフィニティークロマトグラフィーを用いて実施した。一例を図4に示す。

現在、詳細な条件検討をしており、完全な熱力学的解析まで到達していないが、D 構造や E 構造を含む合成高硫酸基修飾体がプレイオトロピンやミッドカインに対して高い親和性を示すことを見出している。

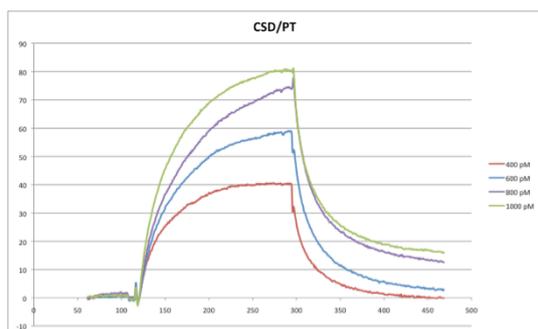


図4: プレイオトロピン固定化チップへのD構造を含む合成コンドロイチン硫酸の表面プラズモンセンサーグラム

(5) まとめと今後の展望 --- 本研究により、組換え酵素を使って効率よく自在にコンドロイチンの硫酸化修飾ができ、糖鎖長と硫酸化位置と量を制御した合成コンドロイチン硫酸糖鎖ライブラリーを構築できることを初めて示した。また、蛍光標識コンドロイチン硫酸8糖での糖鎖配列を決定できるシステムチックな構造解析方法を開発した。この方法はさらに多種類のCS糖鎖配列の決定に発展できる可能性を含んでいる。

得られた硫酸基修飾糖鎖ライブラリーは、引き続きCS結合性生理活性分子との親和性の解析に使用すると共に、細胞のシグナル伝達解析など、コンドロイチン硫酸の持つ生理活性を探索するために有用であり、今後の研究進展が大いに期待できる。

今回開発した配列決定方法を含む精密な構造解析方法をさらに進め、特異的活性構造の配列決定や、生合成機構の解明に役立てるように技術開発を進めていく。

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 5 件)

(1) Osawa T, Sugiura N, Shimada H, Hirooka R, Tsuji A, Shirakawa T, Fukuyama K, Kimura M, Kimata K, Kakuta Y. (2009) Crystal structure of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* K4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 10-14. 査読有

(2) Sugiura N, Shimokata S, Minamisawa T, Hirabayashi J, Kimata K, Watanabe H. (2008) Sequential synthesis of chondroitin oligosaccharides by immobilized chondroitin polymerase mutants. *Glycoconj. J.* **25**, 521-30. 査読有

(3) Sobhany M, Kakuta Y, Sugiura N, Kimata K, Negishi M. (2008) The chondroitin polymerase K4CP: Molecular mechanism of selective bindings of donor substrates to two active sites. *J. Biol. Chem.* **283**, 32328-33. 査読有

(4) Sugiura N, Shimokata S, Watanabe H, Kimata K. (2007) MS analysis of chondroitin polymerization: effects of Mn^{2+} ions on the stability of UDP-sugars and chondroitin synthesis. *Anal. Biochem.* **365**, 62-73. 査読有

(5) Minamisawa T, Suzuki K, Maeda H, Shimokata S, Sugiura N, Kimata K, Hirabayashi J. (2007) Characterization of isomeric unsulfated glycosaminoglycan oligosaccharides by mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **55**, 1-6. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

(1) 小寺貴之、杉浦信夫、木全弘治、森 俊明、岡畑恵雄、コンドロイチンポリメラーゼの交互糖転移反応の解析、第89回日本化学会春季年会、2009年3月30日(日本大学)

(2) 在原雅貴、左 一八、渡邊一平、杉浦信夫、木全弘治、森田公一、鈴木隆、フラビウイルス感染におけるグリコサミノグリカン分子の構造と機能、日本薬学会129年会、2009年3月27日(国立京都国際会館)

(3) 杉浦信夫、遺伝子工学を利用した糖鎖医薬品の創製 -人工コンドロイチン硫酸の合成-、私立大学連携による研究シーズ発表会、2008年11月26日(メルパルク名古屋)

(4) 小寺貴之、杉浦信夫、木全弘治、森 俊明、岡畑恵雄、水晶発振子上でのコンドロイチン伸長酵素反応の動力学的解析、第57回高分子討論会、2008年9月24-26日(大阪市立大学)

(5) 杉浦信夫、原沙緒里、木全弘治、渡辺秀人、酵素合成コンドロイチン硫酸オリゴ糖及び多糖ライブラリー、第28回日本糖質学会年会、2008年8月19日(つくば国際会議場)

(6) 安藤覚、杉浦信夫、木全弘治、前田信明、高橋智、一條裕之、網膜軸索は培養基質上のコンドロイチン硫酸を改変する。第28回日本糖質学会年会、2008年8月20日(ちくば国際会議場)

(7) 安藤覚、杉浦信夫、木全弘治、前田信明、高橋智、一條裕之、網膜軸索がコンドロイチン

硫酸を含む培養基質に及ぼす影響、第31回日本神経科学学会大会、2008年7月9日（東京国際フォーラム）

(8) 杉浦信夫、遺伝子工学を利用したコンドロイチン硫酸の合成、第40回日本結合組織学会学術集会第55回マトリックス研究大会合同学術集会シンポジウム、2008年5月30日（東京こばまエミナース）

(9) 在原雅貴、左一八、杉浦信夫、木全弘治、鈴木康夫、森田公一、鈴木隆。グリコサミノグリカンに対する Deng ウイルス結合性の解析。第72回日本生化学会中部支部例会、2008年5月24日。（岐阜大学）

(10) 小寺貴之、杉浦信夫、木全弘治、森俊明、岡畑恵雄、水晶発振子上でのコンドロイチンポリマーゼの反応解析、第88回日本化学会春季年会、2008年3月26日（立教大学）

(11) 杉浦信夫、下方郷嗣、木全弘治、渡辺秀人。菌体酵素リアクターを用いたコンドロイチンポリマーの合成。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年12月14日（パシフィコ横浜）

(12) 大澤拓生、嶋田宏章、杉浦信夫、木村誠、木全弘治、角田佳充。K4大腸菌コンドロイチン糖鎖ポリマーゼの結晶構造解析。日本結晶学会2007年度年会、2007年12月2日（東京工業大学）

(13) 安藤覚、杉浦信夫、木全弘治、高橋智、一條裕之。コンドロイチン硫酸のガイダンス効果を検討する培養実験系の確立。Neuro2007、第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学会大会、第17回日本神経回路学会大会合同大会、2007年9月10日（パシフィコ横浜）

(14) 杉浦信夫、角田佳充、大澤拓生、下方郷嗣、木全弘治、渡辺秀人。大腸菌由来コンドロイチンポリマーゼ変異酵素による高分子コンドロイチン多糖の合成。第27回日本糖質学会年会、2007年8月2日（九州大学）

(15) 杉浦信夫、遺伝子組換え酵素を利用したGAG糖鎖医薬品の創薬、第5回糖鎖分科会講演会、2007年6月21日（名古屋市立大学）

〔図書〕（計 1 件）

(1) 杉浦信夫、木全弘治。(2008) 酵素修飾法による GAG 糖鎖ライブラリーの構築。遺伝子医学 MOOK 臨床糖鎖バイオマーカーの開発－糖鎖機能の解明とその応用。11, 120-127、編集 成松久、メディカルドゥ。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 信夫

愛知医科大学・分子医学研究所・准教授

研究者番号：90454420

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者