

人工複合糖質プローブの創製と高次生命機能の制御

Creation of artificial complex carbohydrate probes and modulation of higher biological functions



木曾 真 (KISO MAKOTO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究の概要

糖鎖の中でも特に多彩な生理機能を発現するシアル酸含有スフィンゴ糖脂質ガングリオシドならびにプロテオグリカンを標的とし、様々な人工複合糖質プローブを創製することによってセレクチン及び **Siglec** をメディエーターとするがん・免疫制御、ならびに自己免疫性神経疾患や脳の発生・分化の分子機構の解明と制御について総合的研究を行う。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：①糖鎖 ②複合糖質 ③癌 ④免疫 ⑤脳・神経

1. 研究開始当初の背景・動機

近年、糖鎖・複合糖質は、その多彩な分子構造と生命機能に大きな注目が集まっている。これらの分子は、ウイルスや細菌毒素、ホルモンなどの受容体機能の他に、細胞の認識や情報伝達、細胞の分化・増殖、がん化、免疫応答、血栓形成、炎症、脳神経機能などの基本的でかつ動的な生命現象に深く関わっており、ポスト・ゲノム研究の中心的研究課題となっている。

2. 研究の目的

(1) 人工生理活性複合糖質の創製と革新的利用技術の創出

(2) セレクチン及び **Siglec** をメディエーターとするがん関連糖鎖抗原の分子基盤、ならびにがん・免疫制御への応用

(3) シアル酸認識レクチン **Siglec** による免疫系高次生命機能の制御と動的分子機構の解明

(4) 自己免疫性神経疾患及び脳の発生・分化の分子機構の解明と制御

3. 研究の方法

L-セレクチンリガンド、**Siglec** リガンド、がん関連シアロ糖鎖抗原、自己免疫性疾患関連糖鎖抗原、神経分化性複合糖質の創製を岐阜大学チームが担当、供給し、分子基盤を確立するとともに、神奈木グループ、矢部グループ、Crocker グループ

らとの共同研究により高次生命機能の解明と制御を目指す。そのため、蛍光顕微鏡、イメージアナライザー、生体分子間相互作用解析装置等を購入する。

4. これまでの成果

(1) ラクタム化によりシアル酸の反応性を向上させることに成功し、それを糖受容体に用いることで、シアル酸の二量体、オリゴ体を構築する方法を確立した。糖鎖への脂質導入にも新しい方法を開発し、ガングリオシドの効率的大量合成と各種人工ガングリオシドプローブの創出に成功した。一方で、糖タンパク質糖鎖の効率的合成法も開発した。更に、糖鎖認識タンパク質の構造生物学的研究に有用なセレン含有糖鎖プローブの合成法を確立した。

(2) 免疫制御において中心的役割を演じるTリンパ球のシアリル6-スルホリスXをモチーフとするプローブの開発 (*Glycoconjugate J.*, **22**, 95-108, 2005) によって、この糖鎖の生体内の発現を調べた。その結果、シアリル6-スルホリスXは、正常人の末梢血ではごく少数の集団に特異的に発現し、解析の結果、これらのT細胞は皮膚に特異的にホーミングするヘルパーメモリーT細胞であることが判明した。一方、合成ジシアリルリスa糖鎖プローブを用いた実験から、この糖鎖

は糖鎖認識蛋白質のうちセレクトインには結合せず、Siglec-7 と特異的に結合する (*Biochem. J.*, **397**, 271-278, 2006) ことを明らかにした。

(3) ギランバレー症候群発症メカニズム解明のための化学的アプローチとして *C. jejuni* リポオリゴ糖 8 糖の部分構造である GM1 エピトープ 4 糖、インナーコア 3 糖、KDO 単糖の効率的な構築に成功した。一方で部分構造として得られた GM1 エピトープをハプテンとして KLH と縮合し、自己免疫性神経疾患の発症分子機構解明に有用な新規人工複合糖質プローブの設計と合成に初めて成功した。プロテオグリカンの研究では、ヘパリン糖鎖を認識する 12 残基からなるペプチドを見出した。

(4) 新たな人工ガングリオシド GT1b プローブを創成し、シアル酸認識レクチン Siglec-7 との共結晶の作成に成功した。X 線結晶構造解析 (1.85Å) により、 α (2,8) ジシアル酸を含む 5 糖糖鎖部分との水素結合に加えて、疎水性相互作用によるインデュースト・フィットメカニズムを初めて明らかにした。この発見は、Siglecs と糖鎖リガンドの結合にドラマチックな動的メカニズムが存在するという新知見を提唱したもので、大きな学術的インパクトを与えた (*J. Biol. Chem.*, **281**, 32774-32783, 2006)。

5. これまでの進捗状況と今後の計画

(1) これまでの方法を組み合わせてガングリオシド GQ1b のような最も複雑な人工ガングリオ系ガングリオシドを大量にかつ効率的に合成するとともに、新しいコンセプトのプローブを設計・合成する。

(2) ジシアリルルイス a, シアリル 6-スルホルイス X, サイクリックシアリル 6-スルホルイス X など、世界で初めて人工ラクト系 (1 型, 2 型) ガングリオシドプローブの創製に成功し、がん・免疫科学の分野で新しい局面を拓いてきた。またこれらのプローブに対する特異抗体も得られ、今後の飛躍的発展が期待される。

(3) GM1 糖鎖エピトープの効率的大量合成を推進し、自己免疫性神経疾患の発症動物モデルを確立する。また、ヘパリ

ン認識ペプチドを用い、組織や細胞中でのヘパリン、ヘパラン硫酸の分布を調べる。

(4) Siglec の他の分子種として B 細胞の負の制御因子である Siglec-2 に注目し、そのリガンド認識構築を調べる。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)
Imamura, A., Yoshikawa, T., Komori, T., Ando, M., Ando, H., Wakao, M., Suda, Y., Ishida, H. and **Kiso, M.**: Design and synthesis of versatile ganglioside probes for carbohydrate microarrays. *Glycoconjugate J.*, **25**, 269-278, 2008.

Roger Lawrence, Tomio Yabe, Sassan HajMohammadi, John Rhodes, Melissa McNeely, Jian Liu, Edward D. Lamperti, Paul A. Toselli, Miroslaw Lech, Patricia G. Spear, Robert D. Rosenberg, Nicholas W. Shworak, "The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues", *Matrix Biology*, **26**, 442-455 (2007).

Attrill, H., Imamura, A., Sharma, R. S., **Kiso, M.**, Crocker, P. R., van Aalten, D. M. F.: Siglec-7 undergoes a major conformational change when complexed with the (2,8)-disialylganglioside GT1b. *J. Biol. Chem.*, **281**(43), 32774-32783, 2006.

Ando, H., Koike, Y., Koizumi, S., Ishida, H. and **Kiso, M.**: 1,5-Lactamized sialyl acceptors for various disialoside syntheses: Novel synthesis method for glycan portions of Hp-s6 and HLG-2 gangliosides. *Angewandte Chem., Int. Ed. Engl.*, **44**, 6759-6763, 2005.

Y. Kawai, H. Ando, H. Ozeki, M. Koketsu, H. Ishihara, A facile method for β -selenoglycoside synthesis using β -*p*-methylbenzoyl selenoglycosides as selenating unit; *Org. Lett.*, **7**, 4653-4656, **2005**.

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~kassei/>