

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 感染と共生を制御する糖鎖医薬品の基盤研究

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

木曾 真(岐阜大学応用生物科学部 教授)

主たる共同研究者

山本 憲二(京都大学大学院生命科学研究科 教授)

西河 淳(東京農工大学大学院共生科学技術研究院 教授)

長束 俊治(大阪大学大学院理学研究科 准教授)

3. 研究内容及び成果

ウイルスや病原性細菌の感染及び細菌毒素の侵入は、多くの場合、宿主細胞が持つ糖鎖への付着により開始される。また有用な腸内細菌が体内に止まるための足場も糖鎖複合体である。本研究では、これら糖鎖を介した相互作用の制御を目的として、糖鎖の構造と機能情報に基づいて、化学合成法と酵素合成法を駆使することにより、天然型や非天然型の様々な糖鎖複合体の創製を行い、さらに感染症の抑制あるいは有益な共生の促進効果を持つ糖鎖医薬品の開発を目指した。

糖鎖構造研究グループではまず、ヒドラジンによる糖鎖の切り出しとピリジルアミノ化法を O-結合型糖鎖に適用し、種々の検討を行い、生体試料由来のムチン型糖鎖を網羅的にかつ高感度で分析する手法を確立した。次に、標準ピリジルアミノ化糖鎖の調製とライブラリーの構築、システム生物学に向けた細胞丸ごとの糖鎖構造解析、糖鎖末端ユニットを網羅的に分析する手法の開発を行った。COS7 細胞をモデルとして選択し、その O-結合型および N-結合型糖鎖の網羅的解析を、本手法を用いて行った。その結果、ハイマンノース型、パウチマンノース型、および2本鎖、3本鎖、4本鎖のコンプレックス型の N-結合型糖鎖と、コア1型およびコア2型のムチン型糖鎖を一括して検出し、解析することができた。このように、本手法の糖鎖多様性解析への有効性を、細胞培養系において示すことができた。

糖鎖化学合成グループでは、主としてムチン型糖鎖を標的として、新しい化学合成法の開発を行った。糖タンパク質ムチンは、一般にガラクトサミン残基の1位とセリンあるいはスレオニンの水酸基が結合した -GalNAc-Ser/Thr 骨格をコア構造として有している。本研究では、O-結合型糖タンパク質のコア構造の効率的再構築技術として、「DTBS 効果」を応用する新規な 1-立体選択的ガラクトシル化/ガラクトサミニル化法を開発した。この反応を応用してナチュラルキラー T 細胞(NKT 細胞)のリガンドとして注目されている 1-galactosyl ceramide(1-GalCer)や isoglobotriaosyl ceramide(iGb3)の全合成に成功した。また、糖鎖生物学研究用プローブの設計・合成も進め Endo- 1-GalNAc-ase の高感度蛍光標識糖鎖 4-methylumbelliferyl T-antigen(4-MU-T-antigen)の新規合成法の開発に成功した。さらに、当該酵素の本来の基質であるムチン型糖鎖 Core-1 構造(Gal 1-3GalNAc-serin/threonin)をモチーフにして、その類縁体を系統的に設計・合成することで、酵素の基質特異性を解明した。これらの研究は、糖鎖酵素合成グループとの共同である。また細菌毒素研究グループとの共同で小腸上皮に存在する可能性のあるムチン型糖鎖を系統的に合成することで、ボツリヌス毒素小腸リガンドの探索を行い、シアリル Tn 抗原、シアリル T 抗原糖鎖が有意な阻害効果を発現することを明らかにした。

糖鎖酵素合成グループでは、酵素法による機能性糖鎖複合体の合成及び腸内細菌と糖鎖の相互作用解析を行った。ピフィズ菌の遺伝子をクローニングして得られた酵素組換え大腸菌より酵素を生成単離した。次に同酵素の生産する Endo- 1-N-acetylgalactosaminidase の糖転移活性を利用して、ムチン型糖鎖をさま

さまざまなペプチドや化合物に転移付加し、ムチン型糖鎖を有する機能性糖鎖複合体(ムチンをミミックした化合物など)を酵素合成した。次に酵母を宿主として得られる、糸状菌由来の組換え型 Endo-β-N-acetylglucosaminidase(Endo-M)糖転移活性を用いて、シアロ糖鎖をキトサンに多価に付加した生理活性糖鎖複合体を酵素合成した。さらには、腸管ムチンとビフィズス菌との接着における 1,2-β-L-Fucosidase の役割や機能を解析した。

細菌毒素研究グループでは、ボツリヌス神経毒素に注目し、細菌毒素と糖鎖の相互作用を解析した。ボツリヌス神経毒素は一度細胞内に侵入した毒素が別の方向から出て行くというトランスサイトーシスの機構を利用していることが考えられ、まずトランスサイトーシス機構の解析を行い、ボツリヌス毒素複合体の消化管から体内循環系への移行は、毒素複合体が上皮細胞表面のムチンタンパク質の糖鎖に結合してクラスリン依存性エンドサイトーシス機構で細胞内に侵入し、神経毒素はエンドソームからゴルジ装置にまで移行することを発見した。次に C 型毒素複合体を形成しているタンパク質の糖認識特異性の解析を行い、HA1 と HA3 の糖結合特異性をムチンタンパク質を用いて明らかにした。さらに、HA1 と HA3 の結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行い、それぞれの糖結合サイトを決定した。最後に、HA1 の二箇所の糖結合クレフトに存在するアミノ酸に変異を加え、糖認識特異性の異なるミュータントの作製に成功した。

以上述べたように、本研究では、構造解析、化学合成、酵素合成、相互作用解析グループの有機的な連携により、感染と共生を制御する医薬品開発の基盤となる知見を得るという当初の目的を十分に果たすことができた。今後は、実用化へ向けてのさらなる検討が望まれる。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

O-結合型糖タンパク質のコア構造の効率的再構築技術として、「DTBS 効果」を応用する新規な 立体選択的ガラクトシル化/ガラクトサミン化法の開発は素晴らしい成果であり、海外にも特許出願をしている。ビフィズス菌から Endo-β-GalNAc-ase の遺伝子をクローニングし、この酵素の糖転移活性を利用して、ムチン型糖鎖を様々なペプチドや化合物に転移付加し、ムチン型糖鎖を有する機能性糖鎖複合体を合成した。またボツリヌス毒素の細胞内への侵入機構の解明、O-グリカンとN-グリカンの同時解析法の開発等、各々のグループは専門分野で一定の成果を挙げていることは評価できるが、グループ間の共同研究テーマが少ないと言える。論文数、特許出願数もチーム規模としては妥当である。

論文発表(国内 0件、国際 40件) 招待講演(国内 2件、国際 6件)

口頭発表(国内 47件、国際 12件) 特許出願(国内 4件、海外 2件)

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

感染と共生という研究課題は大変興味深い。感染についてはボツリヌス毒素の細胞内への侵入機構の解明、Endo-M の糖転移活性を利用したインフルエンザウイルスの感染阻害剤の化学 酵素合成等、十分成果があがった。また共生についてはビフィズス菌を対象に分解酵素糖トランスポーターに関する興味ある知見が得られており、新しい研究手法を提供している。

DTBS 効果の発見に基いた 選択的糖鎖合成法は、 立体選択性が極めて高く、しかも高収率であることから、糖鎖化学分野で大変インパクトが高く、広く利用されることを期待したい。また、Endo-β-GalNAc-ase の発見は更に多種類の酵素発見に進展する糸口となる重要な成果である。

4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

本チームは DTBS 基を用いた高収率の 立体選択性の高い複合糖鎖合成法を機軸に、ムチン型糖鎖合成とその機能・構造の解明、糖タンパク質の糖鎖解析のための新規酵素の発見と機能解析、ボツリヌス毒素

複合体の細胞進入における糖鎖認識の役割などについての研究展開を行った。「感染と共生」という大きな命題については一定程度の成果が得られたが、ここで開発された非常にユニークな糖鎖合成法をより広く世界に発信するには、今後、共同研究のネットワークをさらに広げていくことが強く望まれる。

研究代表者の木曾 真は第 57 回岐阜新聞大賞(学術部門)(平成 18 年)を受賞した。

共同研究者の西河 敦が助教授から教授に、長束俊治が京都工芸繊維大学の講師から大阪大学の准教授に昇格した。