

事業 報告

硫酸化糖鎖の生合成機構を操り、細胞機能を制御する

○北川 裕之, 灘中 里美

神戸薬大・生化

細胞表面をビッシリと覆う硫酸化糖鎖は、細胞外の情報を細胞内へ伝えるアンテナの役割を果たすと考えられている。したがって、糖鎖が正常に合成されない場合、細胞は正しい情報を受け取ることができず、細胞本来の機能を発揮することができない。私たちは、硫酸化糖鎖の生合成や分解に異常が生じることで、病気に関連する糖鎖（疾患糖鎖）がつくられ、これが病気を引き起こしたり、病気になりやすい体質をつくりだしていると予想しており、硫酸化糖鎖の生合成制御あるいは分解制御を基盤とした新しい作用機序をもった創薬開発を目指し、本プロジェクトを立ち上げた。従来の創薬ターゲットは受容体やサイトカインをはじめとするタンパク質であるが、これらでは対処のできない病気も存在することから、糖鎖を利用した創薬技術開発は期待されている研究領域の一つである。

さて、硫酸化糖鎖の生合成機構を操るために注目したのは、生合成酵素遺伝子の発現調節機構であった。例えば、転写因子の活性を低分子化合物などで人為的に制御することで生合成酵素遺伝子の発現を操作し、硫酸化糖鎖の生合成を調節しようというアイデアである。このアイデアの問題点は、硫酸化糖鎖の生合成系が複数の合成酵素からなるネットワークを形成しているため、どの合成酵素遺伝子に狙いをつければ硫酸化糖鎖の生合成系が制御できるのかがわかりにくいということである。私たちは、これまでの研究で蓄積してきたデータから、硫酸化糖鎖のうち、コンドロイチン硫酸の生合成に中心的役割を果たす生合成酵素がコンドロイチン 4-*O*-硫酸基転移酵素 (**C4ST-1**)であることを既に見いだしていた。この生合成酵素遺伝子の発現レベルがコンドロイチン硫酸の量と構造を調節すること、**C4ST-1** 遺伝子の欠損によりマウスが胎生致死になること、**C4ST-1** 遺伝子が癌抑制遺伝子として報告されていることなどから、**C4ST-1** が機能的に重要なコンドロイチン硫酸の合成に関与することが示されている。これらのことから、**C4ST-1** 遺伝子の発現を調節できれば、コンドロイチン硫酸の生合成機構を操ることが可能となり、その結果、細胞機能を制御できると考えた。そこで、私たちは、**C4ST-1** 遺伝子の発現を制御する転写因子に着目し、この転写活性をモニターするアッセイ系を構築し、本学薬品化学研究室が作成した低分子化合物ライブラリーから **C4ST-1** 遺伝子の転写を誘導する化合物を同定した。このようにして得られた低分子化合物を細胞に添加して低分子化合物の効果を検討した結果、得られた化合物によってコンドロイチン硫酸の生合成が操作され、**C4ST-1** がつくるコンドロイチン硫酸によって制御される細胞機能が調節できることがわかった。

本発表では、硫酸化糖鎖合成酵素遺伝子の発現を制御する転写因子の活性を制御する化合物について報告するが、糖鎖を利用した創薬の作用点はこれだけに限らない。今後、本プロジェクトの成果を基盤として、糖鎖に注目した新たな創薬標的の探索手段の拡充が図られることが期待される。

事業
報告

疾患糖鎖生物学に基づく動脈硬化症発症機序の解明

○江本憲昭¹, 八木敬子¹, Adhikara Imam Manggalya², 池田宏二¹,

¹神戸薬大・薬・臨床薬学, ²神大・院医・循環器

動脈硬化症の発症・進展機序仮説として、血管内皮細胞の機能障害に伴う炎症が重要であるとする Russell Ross の「障害反応説 response-to-injury hypotesis」が広く受け入れられてきた。しかし、近年、動脈硬化症の発症機構として「貯留反応説 response-to-retention hypothesis」が着目されている。血管壁に脂質が溜まるのが、動脈硬化の始まりで、脂質が溜まる鍵となるのが「糖鎖」ではないかとするものである。つまり、動脈硬化のきっかけとなる「糖鎖」は、脂質と結合しやすい「糖鎖」に変化するのではないかとされている。実際、我々は、動脈硬化症発症モデルマウスを用いて、動脈硬化症発症・進展に伴い、血管における糖鎖が変化し、糖鎖長が長くなることを見いだした (Anggraeni, *et al.* BBRC 2011)。すなわち、糖鎖の性質変化が血管壁における脂質の貯留を招き、動脈硬化発症・進展させている可能性を、生体において明らかにしたのである。

糖鎖の合成に関わる酵素の詳細は未だ不明な点が多いが、糖鎖長の伸展に糖鎖合成酵素の一種である Chondroitin 4-*O*-sulfotransferase 1 (C4ST-1) および Chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyl transferase 2 (ChGn-2) が協働して作用することが報告された (Izumikawa *et al.* Biochem. J. 2011)。我々は、動脈硬化発症モデルマウスを用いて両酵素の発現を確認したところ、動脈硬化症病態成立に伴い、C4ST-1 および ChGn-2 の発現量が増加することがわかった。つまり、生体においても「動脈硬化病変において C4ST-1 および ChGn-2 の発現量が亢進し、その結果として糖鎖長が伸長し、同部位に脂質が貯留している」という可能性が示唆されたのである。そこで、我々は「血管の糖鎖長を短くすれば、その結果、動脈硬化が抑制される」のではないかと考え、*ChGn-2* 遺伝子改変動物を用いて研究を行っている。

本講演では、「糖鎖を制御することが疾病治療に結びつくか」という観点から、成果を報告する。

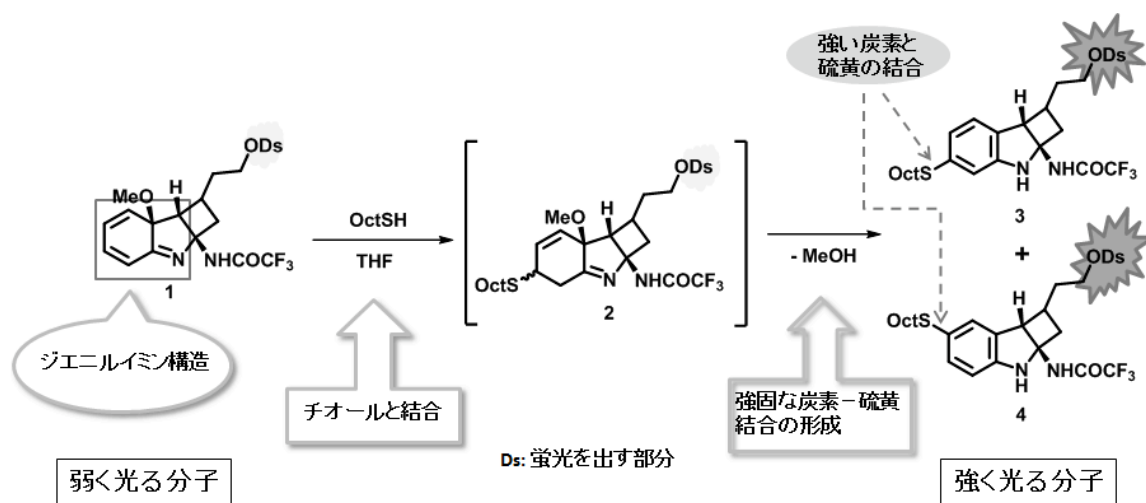
事業
報告

チオール選択的蛍光ラベル化剤の開発研究

○宮田興子, 上田昌史
神戸薬大

薬品化学研究室が取り組んでいるのは、疾患糖鎖と動脈硬化症の関係を解明するためのツールの開発研究（臨床薬学研究室との共同プロジェクト）と糖鎖合成を調節する化合物の探索研究（生化学研究室との共同プロジェクト）である。今回は、前者の基礎的研究に相当するチオール選択的蛍光ラベル化剤の開発研究について述べる。

チオールは生体内においてタンパク質を構成するアミノ酸のなかでシステインにのみ含まれている。そのため、チオールとのみ反応できる分子はシステインを含まないタンパク質とシステインを含むタンパク質を識別することができる。たとえば、悪玉コレステロールである LDL と善玉コレステロールである HDL を比較すると LDL にはシステインを含むタンパク質が存在するが、HDL には存在しません。そのため、チオールとのみ反応する蛍光ラベル化剤は両者のうち動脈硬化の原因となる LDL コレステロールのみを光らせることが可能になり、これをツールとして動脈硬化症発症の原因を解明できると考えられる。このような考えのもと基礎的研究として、チオールと選択的に結合する蛍光ラベル化剤の開発を行った。チオールの選択的蛍光ラベル化剤にはアルコールやアミンが存在するなかでチオールとのみ反応し、強固な結合を形成する性質が求められる。我々が開発した独自の手法でのみ合成可能なジェニルイミン **1** がチオールと選択的に反応し芳香化することによって非常に強固な炭素-硫黄結合を形成した **3** および **4** が得られることを見出した^{1,2}。蛍光基であるダンシル(Ds) 基を有するジェニルイミン **1** とチオールが結合後、生成した **3** および **4** の蛍光スペクトルを測定したところ、化合物 **1** では蛍光強度が低かったのに対して、化合物 **3**, **4** ではより強くなることが明らかになった。また、この蛍光変化は目視によっても確認できた。さらに、比較的蛍光強度が強く、溶媒の影響を受けにくいという特徴を有する BODIPY 骨格を蛍光団とした新規チオール選択的な蛍光ラベル化剤の開発研究も行ったので、併せて述べる。



- 【文献】 1. Miyoshi, T., Aoki, Y., Uno, Y., Araki, M., Kamatani, T., Fujii, D., Fujita, Y., Takeda, N., Ueda, M., Kitagawa, H., Emoto, N., Mukai, T., Tanaka, M., Miyata, O. (2013) *J. Org. Chem.* 78, 11433-11443.
2. Miyata, O., Kimura, Y., and Naito, T. (1999) *Chem. Commun.* 2429-2430.

事業
報告

AAアミロイドーシス発症に及ぼすグリコサミノグリカン硫酸基の影響

○田中将史¹, 高瀬ひろか¹, 関山慶紀¹, 灘中里美², 北川裕之², 向高弘¹

¹神戸薬大・物化, ²神戸薬大・生化

AA アミロイドーシスは、関節リウマチなど慢性炎症性疾患に続発する合併症であり、その原因タンパク質は感染や炎症に伴い血中濃度が急激に上昇する血清アミロイドA (SAA) である¹⁾。SAA の凝集によって形成されるアミロイド線維が臓器に沈着して、臓器の機能障害を引き起こす。AA アミロイドーシス患者の臓器沈着部位からは、SAA とともにヘパラン硫酸 (HS) が検出され、グリコサミノグリカン (GAG) が AA アミロイドーシスの発症に関与すると考えられる²⁾。本研究では、その構造要因としての硫酸基の影響について調べた。

まず、SAA 分子中でアミロイド線維形成能をもつ領域からなるペプチドを作製した。SAA ペプチドに対して GAG やそのアナログを加え、アミロイド線維形成の指標となるチオフラビン T (ThT) の蛍光測定や円二色性 (CD) 測定による二次構造評価を行った。また、原子間力顕微鏡 (AFM) により凝集体の形態を観察した。

SAA ペプチドに、HS と構造が類似したヘパリンを添加すると、ThT 蛍光強度の増大およびβシート構造の形成が認められ、AFM により凝集体の形成が観察された。さらに、ヘパリンのみならず、他の GAG 分子種においても ThT 蛍光強度の増大が認められ、その増大は硫酸基含有量と概ね相関していることが示唆された。そこで、段階的に脱硫酸化したヘパリンを用いて同様に評価したところ、ThT 蛍光強度がヘパリン分子中の硫酸基含有量と非常に良い相関を示した。次に、糖構造や硫酸基の有無が異なるアニオン性高分子を用いて、ThT 蛍光強度の増大に影響を及ぼす GAG の構造について検討した。その結果、アミロイド線維形成を促進する GAG の構造要因として、糖構造は必須ではなく、硫酸基が必須であることが示された。

上述の GAG 分子種を用いた結果において、HS は他の GAG に比べて硫酸基含有量が低いにもかかわらず、比較的高い ThT 蛍光強度の増大効果を示した。これは、HS 分子内に存在する高硫酸化ドメインが寄与したためであると考えた。HS の高硫酸化ドメインのモデルとして断片化したヘパリンを用い、アミロイド線維の形成に必要なドメインの長さについて検討した。20 糖からならヘパリン断片では全長ヘパリンに匹敵する ThT 蛍光強度の増大および二次構造変化が認められたのに対して、6 糖ヘパリン断片ではそのような変化はほとんど認められず、12 糖ヘパリン断片ではその中間的な性質を示した。以上の結果より、高硫酸化ドメインとして 12 糖程度以上の長さが必要であることが分かった。

GAG は全身に遍く存在しているにもかかわらず、SAA が線維として沈着する臓器は限られている。このようにアミロイド線維の沈着に臓器特異性が認められるのは、臓器によって GAG の硫酸基含有量が異なるためであると考えた。すなわち、アミロイド線維の沈着しやすい部位には硫酸基含有量の高い GAG が局在していると予想した。そこで現在、アミロイドーシスモデルマウスを作製し、アミロイド沈着部位に存在する GAG の硫酸基含有量を測定する試みを行っており、本発表ではその一部も紹介する。

- 【文献】 1. Westermarck, G.T., Fändrich, M., Westermarck, P. (2015) *Annu. Rev. Pathol.* 10, 321–344
2. Lu, J., Yu, Y., Zhu, I., Cheng, Y., Sun, P.D. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 5189–5194