

Fig. 2(A) 及び2(B) は、HA及びH15の¹H-NMRスペクトルである。HAは粘性が高いためにピークがブロードしているが、両者のスペクトルパターンはほぼ一致することが明らかとなった。¹H-NMRスペクトルのシグナルは、COSYスペクトル解析、及び以前に報告されたHAのNMRスペクトルデータとの比較により帰属した(Table 1)。Fig. 3A及びFig. 4Aは、それぞれHA及びH15のCOSYスペクトルである。4.4及び4.5 ppmのシグナルは、それぞれGlcA及びGlcNAcのアノメリックプロトン(H1)であった。また3.4~3.8 ppm付近に観察されたGlcNAc及びGlcAのリングプロトンは、HAとH15でほぼ一致しており、繰り返し構成2糖の物理化学的性状は類似していることが示唆された。一方、H15のCOSYスペクトル(Fig. 4 A)では、4.42及び3.29 ppmの間に相関ピークが観察された。このピークは、繰り返し2糖のGlcAのH1及びH2の相関ピーク(H1/2)よりも0.3~0.4 ppm低磁場にシフトしており、還元末端のGlcNAcに結合したGlcAの特徴的なH1/2の相関ピークであることが示唆された。

¹³C-NMRスペクトルのシグナルは、HMQCスペクトルで観察された¹Hと¹³Cの相関ピークを解析することにより帰属した。Fig. 3B及び4Bに、HA及びH15のHMQCスペクトルを示す。また、Table 1に¹³C化学シフトの帰属結果を示した。一般的に糖のアノメリックカーボン(C1)は、リングカーボン(75 ppm付近)よりも低磁場の100 ppm付近に観察される。HA及びH15のGlcNAc及びGlcAのH1は、いずれもC1に特徴的な100 ppm付近のカーボンと相関を示した。またGlcNAcのH2はアミノ糖のC2に特徴的な55 ppm付近のカーボンと相関を示した。一般的に糖のリングカーボンは置換基が結合すると化学シフトが75 ppmから80 ppm以上に低磁場シフトすることが知られている。HA及びH15のGlcNAcのH3及びGlcAのH4と相関を示したカーボンの化学シフトはいずれも80 ppmを超えており、GlcNAcの3位及びGlcAの4位が結合位置であることが確認された。これらの結果はCOSYスペクトルの解析が正しいことを裏付けるものであった。以上の結果から、HA及びH15の繰り返し2糖構造のプロトン及びカーボンの化学シフトは、ほぼ一致することが明らかとなった。

次に、硫酸エステル基の結合位置をプロトン及びカーボンの化学シフトから特定できるかどうかを確認するために、戸井田ら(*Glycobiology*, 2001)によって報告されている全ての水酸基が硫酸化されたHA(over-sulfated HA, OSHA)とHA及びH15のNMRデータを比較した。Table 1に示したようにOSHAのリングプロトン由来のシグナルの化学シフトはいずれも3.9 ppmよりも低磁場に観測されており、HAのリングプロトン(3.4~3.8 ppm)と比較して大幅に低磁場にシフトしていることが明らかとなった。また、リングカーボンの化学シフトの比較では、過剰に硫酸化することによりGlcNAcのC6及びGlcAのC2が顕著に低磁場シフトすることが示唆された。これらの結果

から、プロトン及びカーボンの化学シフトに基づき、硫酸エステル基の結合位置を特定可能であることが明らかとなった。

2) 硫酸化H15の構造解析

硫酸化H15の¹H-NMRスペクトルをFig. 2Cに示す。Fig. 2A及び2Bと比較して、2 ppm付近のGlcNAc由来Nアセチル基のメチルプロトンのシグナルが複数存在すること、3.9~4.3 ppm付近にHA及びH15では観察されなかったシグナルが観察されていることから、部分的に硫酸化されていることが予測された。HA、H15及びOSHAの¹H-NMR及び¹³C-NMRの帰属結果を基に硫酸化H15のCOSY及びHMQCスペクトルを解析し、¹H-NMR及び¹³C-NMRスペクトルを帰属した。Fig. 5Aに示したように、COSYスペクトルで得られた相関ピークA~Gは、HA及びH15のGlcNAc1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6a, 5/6b及び6a/6bとほぼ一致していた。また相関ピークH~Lは、GlcA1/2, 2/3, 3/4, 4/5及び還元末端に結合したGlcAの1/2とそれぞれ一致していることが明らかとなった。さらにこれらの相関ピークから推測されるGlcNAc及びGlcAのカーボンの化学シフトをHMQCスペクトルを用いて解析した結果(Fig. 5B)、いずれもHA及びH15のGlcNAc及びGlcAの化学シフトと一致することが確認された。これらの結果から硫酸化H15に非硫酸化GlcNAc及びGlcAが混在することが明らかとなった(Table 1)。

一方で、硫酸化H15のCOSYスペクトルにおいて、HA及びH15にはみられない相関ピークM, N, O, P及びQが観測された。相関ピークM(3.39/3.65 ppm)及びN(3.39/3.81 ppm)の化学シフトから、3.65と3.81 ppmのプロトンはどちらも3.39 ppmのプロトンと隣接していることが確認された。また相関ピークO(3.65/3.81 ppm)から、3.65と3.81 ppmのプロトンも隣接していることが明らかとなった。このような相関ピークのパターンは、H5とH6(a, b), 及びH6(a)とH6(b)の特徴的な相関ピークであり、非硫酸化HA及びH15とは異なるGlcNAcの存在する可能性が示唆された。そこで、3.65と3.81 ppmのプロトンがGlcNAcのH6であること、さらに6位の水酸基が硫酸化されているかどうかを確認するために、HMQCスペクトル解析により、それらのプロトンが結合するカーボンのシグナルを帰属した。3.65及び3.81 ppmのプロトンはいずれも69.7 ppmのカーボンと相関を示すことから、同一炭素上に存在することが明らかとなり、これらはH6であることが確認された。また、その化学シフトはHA及びH15と比較して低磁場にシフトしていること、OSHAのC6とほぼ一致していることから、GlcNAcの6位の水酸基が硫酸化されていることが明らかとなった(Table 1)。

COSYスペクトル(Fig. 5A)の相関ピークPは、4.4 ppmと4.05 ppmのプロトンの相関ピークであった。4.4 ppm付近は、アノメリックプロトンの観測位置であり、H1及びH2のプロトンの間の相関であることが示唆された。しかしGlcNAc由来のカーボンで

あれば、C2は55 ppm付近に検出されるはずであるが、HMQCにより観察された4.05 ppmと相関を示すカーボンの化学シフトは82.5 ppm (Fig. 5B)であったことから、相関ピークPはGlcAのH1/2であることが示唆された。さらにHA及びH15由来GlcAのC2 (72~75 ppm)と比較して低磁場にシフトしていること、OSHA由来GlcAのC2の化学シフトとほぼ一致していることから、硫酸化H15には、2位の水酸基が硫酸化されたGlcAが存在することが示唆された (Table 1)。

以上の結果から、硫酸化H15は、GlcNAcの6位及びGlcAの2位の水酸基が部分的に硫酸化されていることが明らかとなった。また、相関ピークF (非硫酸化GlcNAc5/6b)とN (6-O-硫酸化GlcNAc5/6b)、及び相関ピークH (非硫酸化GlcA1/2)とP (2-O-硫酸化GlcA1/2)の積分値から、GlcNAcの6位及びGlcAの2位は、それぞれ約55%及び6%が硫酸化されていることが示唆された (Fig. 6)。

3) P4H15の構造解析

Fig. 2DはP4H15の¹H-NMRスペクトルである。HA及びH15のスペクトル (Fig. 2A及び2B)と比較して、1.3~1.8, 2.9及び4.2 ppm付近に新たにシグナルが観察されたが、その他のスペクトルパターンはほぼ類似していた。昨年度の報告を基にCOSYスペクトルを解析し、 α -PLLのプロトンを帰属した結果、H α 、H δ 及びH ϵ は4.23, 1.63及び2.94 ppmに検出されていることが明らかとなった (Fig. 7A)。一方、H β (1.67, 1.73 ppm)及びH γ (1.35, 1.40 ppm)は2種類ずつ存在することが示唆された (Table 1)。COSY及びHMQCスペクトル解析により (Fig. 7)、糖鎖部分の¹H-NMR及び¹³C-NMRスペクトルを帰属した結果、H15の化学シフトと類似しており、 α -PLLと共有結合させても、繰返し2糖の物理化学的性状に殆ど違いはみられないことが示唆された。今回、H15の還元末端GlcNAcと α -PLLの ϵ -アミノ基の結合を確認するために、ロングレンジカップリングを証明できるHMBC、及び空間的に隣接することを確認できるNOESY測定を行なったが (data not shown)、 α -PLLと糖鎖の共有結合を確認することはできなかった。しかし、P4H15のCOSYスペクトルでは、還元末端に結合したGlcA1/2の相関ピークがほぼ消失したこと (Fig. 7A)、¹H-NMRで還元末端GlcNAcのアノメリックプロトンが消失したことから (Fig. 8)、H15と α -PLLとは共有結合しているものと考えられる。

D. 考察

本年度は、シュードPGの構造特性を解明することを目的として、二次元NMRによる硫酸化H15及びP4H15の構造解析を行った。HAは硫酸エステル基を持たないグリコサミノグリカンであり、硫酸化によりGlcNAcの4位及び6位、GlcAの2位及び3位の水酸基が硫酸化される可能性がある。HA、H15及びOSHAと硫酸化H15のプロトン及びカーボンの化学シフトを比較検討した結果、GlcNAcの6位及びGlcAの2位の水酸基が

硫酸化されていることが明らかとなった。以前に、HIV-1は細胞表層に発現したヘパラン硫酸を介してマクロファージに接着することが報告されている (Sapireら *J. Virol.* 2001)。ヘパラン硫酸は、2位のアミノ基がアセチル化或いは硫酸化されたGlcNと、ウロン酸 (GlcA又はイズロン酸)で構成されるグリコサミノグリカンである。その硫酸エステル基の結合位置はすでに詳細な検討が成されており (菅原ら, *Glycobiology*, 1994; 戸井田ら, *J. Biol. Chem.*, 1996)、GlcNAcの6位及びウロン酸の2位の水酸基が高度に硫酸化されていることが報告されている。ウロン酸の結合位置及び結合様式が異なることを除いて、硫酸化H15の構造はヘパラン硫酸と極めて類似していた。また、ヘパラン硫酸を模倣した硫酸化ポリマーが抗HIV-1活性を示すことも報告されており (Bugattiら, *Antimicrob Agents Chemother.*, 2007)、ヘパラン硫酸に類似した硫酸化H15の構造が抗HIV-1活性に関係している可能性が示唆された。一方で、GlcNAcの4位及びGlcAの3位の水酸基の硫酸化を確認することはできなかった。これらの水酸基が硫酸化されにくい可能性もあるが、硫酸化の程度が低いために十分なシグナルが得られず、複雑なスペクトルの中で帰属できなかった可能性もある。今後、5~8糖程度のHA低分子量オリゴ糖を硫酸化し、単純化したNMRスペクトルを詳細に検討する必要があると思われる。

P4H15の構造解析の結果、糖鎖部分のNMRスペクトルはH15のスペクトルと類似していることが明らかとなった。昨年度、硫酸化していないH15及び α -PLLは、それぞれ単独では抗HIV-1活性を示さないことが報告されていることから、 α -PLLとH15を共有結合させて樹状共重合体とすることが活性に関係していると考えられる。以前に、ポリカチオン性の α -PLLがDNAとの結合能を有すること、またHAがある種の細胞表層レセプターのリガンドであることから、PLL-HA共重合体がDNAの細胞特異的キャリアーとして利用できる可能性があることが報告されている (Asayamaら, *Bioconjugate Chem.*, 1998)。P4H15についてもポリカチオン性及びポリアニオン性を有するユニークな特性が抗HIV-1活性に関係している可能性があることから、糖鎖の種類、硫酸化の程度だけでなく、糖鎖とPLLの重合率及び電荷比率も検討する必要があるのかもしれない。

また、PLL-HAは、溶液の塩濃度により構造が変化することが知られている。PLL-HAは、塩が存在しない溶液中ではポリイオン複合体を形成し、静電的に安定な分子コロイドとして分散しているが、100~300 mM程度のNaClを含む溶液中では不安定となって複合体が凝集し、さらに高濃度のNaClを添加すると、ポリイオン複合体が解離して凝集体は溶解するといわれている。本研究では、塩無添加状態で分子コロイド状P4H15のNMRスペクトルを測定し、P4H15

のPLL部分の β -及び γ -メチレン基のプロトンを2種類観察した。しかし、昨年度報告されたPLL-dextran (P4H7) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは、1種類ずつしか観察されていない。このことはP4H15とP4H7では分子コロイドを形成するポリイオン複合体の形状が異なることを示唆していると思われる。このようにシェードPGは糖鎖の種類及び塩濃度等により立体構造が変化することが予測されることから、抗HIV-1活性を測定するときのシェードPGの分子内及び分子間構造を正確に把握する必要があると考えられる。

E. 結論

二次元NMRによる構造解析を行い、硫酸化H15のN-アセチルグルコサミンの6位の水酸基及びグルクロン酸の2位の水酸基が約55%及び6%程度硫酸化されていることを明らかにした。またP4H15の構造解析により糖鎖部分はH15と類似した物理化学的性状を有することを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi Glycosylation: Analysis using LC/MS and LC/MSⁿ. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein. John Walker, The protein Protocols Handbook. Third Edition. Humana Press, USA, In press
- 2) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Teruhide Yamaguchi LC/MSⁿ for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides. Nicolle H. Packer, Methods in Molecular Biology, Humana Press, USA, In press
- 3) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Qin, Yan, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.* In press
- 4) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. Ed. Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Yasunari, Itoh, Hisashi Narimatsu, Toshisuke Kawasaki, Sumihiro Hase, Experimental Glycoscience, Springer, Tokyo 39-41 (2008)
- 5) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein. *Trends in Glycosci. Glycotech.*, (2008) 20, 97-116.

- 6) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. 実験医学増刊号, 25, 1127-1136 (2007) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. 蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性. (2008), 25, 1690-96.

2. 学会発表

- 1) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島 紫, 伊藤さつき, 山口照英: d_5 -フェニルヒドラジンを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析による糖鎖の定量解析. 第81回 日本生化学会大会(2008. 12. 21-24) 神戸
- 2) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 篠原 聡, 橋井則貴, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞のThy-1の糖鎖構造解析. 第81回 日本生化学会大会(2008. 12. 21-24) 神戸
- 3) 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶, 黄笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖プロファイルを指標とした細胞治療薬の特性解析. 第8回 日本再生医療学会総会 (2009. 3. 5-6) 東京
- 4) 原園 景, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 低分子量ヘパリンの酸加水分解及びHPAEC-PADを用いた確認試験及び純度試験法の検討. 日本薬学会 第129年会 (2009. 3. 26-28), 京都
- 5) 秦 艶, 橋井則貴, 川崎ナナ, 山口照英: 強陰イオン交換HPLCを用いたヘパリンナトリウム確認試験及び限度試験に関する研究. 日本薬学会 第129年会 (2009. 3. 26-28), 京都
- 6) 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶, 黄笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖を指標とした細胞治療薬の特性解析. 日本薬学会 第129年会 (2009. 3. 26-28), 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

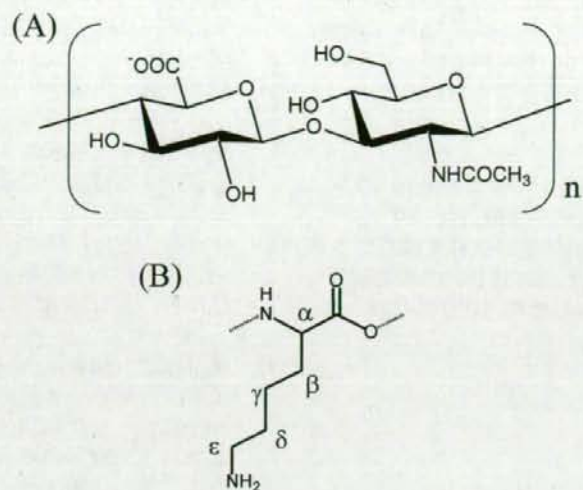


Fig. 1 ヒアルロン酸(A)及びポリ-L-リジン(PLL) (B)の構造

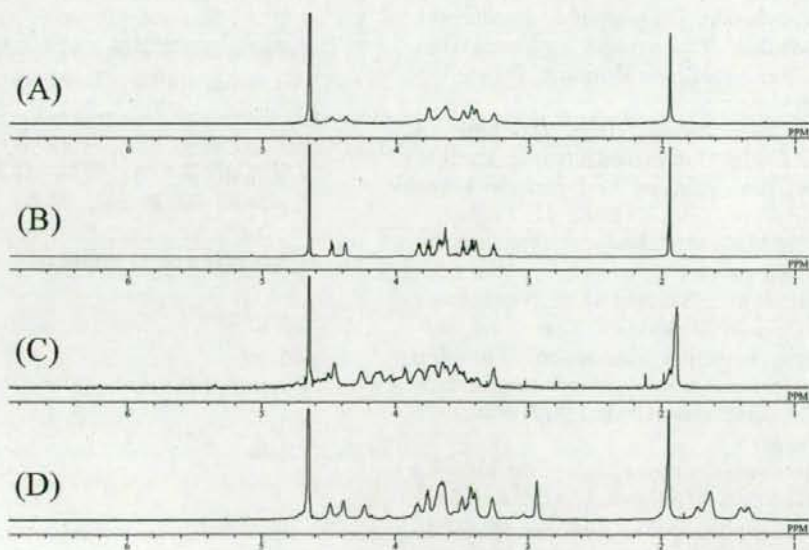


Fig. 2 ヒアルロン酸(M.W. 130,000) (A), 低分子量ヒアルロン酸(H15, M.W. 4,700) (B), 硫酸化H15(C) 及び シュードPG (PLL(M.W. 約20,000) + H15(P4H15))(D) の¹H NMR

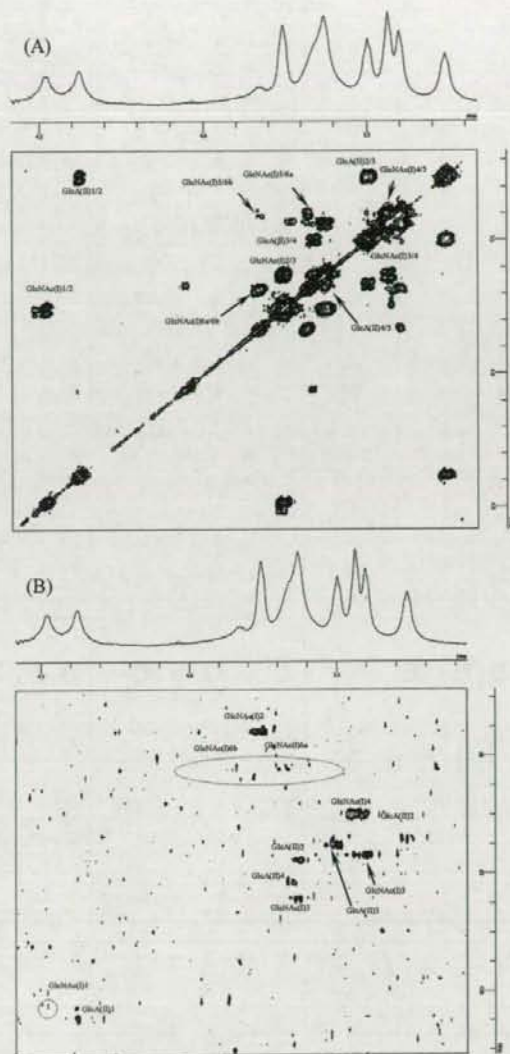


Fig.3 ヒアルロン酸 (M.W. 130,000) の COSY スペクトル (A) 及び HMQC スペクトル (B). (I) 非硫酸化 GlcNAc, (II) 非硫酸化 GlcA. (例) GlcNAc(I)1/2, 非硫酸化 GlcNAc の H1 と H2 の相関ピークを表す (COSY スペクトル). GlcA(II)1, 非硫酸化 GlcA の H1 と C1 の相関ピークを表す (HMQC スペクトル).

表1 ヒアルロン酸 (HA, M.W.130,000), 低分子量ヒアルロン酸 (HL5, M.W.4,700), 硫酸化ヒアルロン酸 (SH5, M.W.4,700), 硫酸化HI5(HL5S), シュードFG (PLL, (MW 約20,000)+HL5 (P4HL5))及び硫酸化ヒアルロン酸 (OSH5, MW.130,000) の化学シフト

Residue	Proton	¹ H Chemical shift (ppm)						¹³ C Chemical shift (ppm)					
		HA	HL5	HL5S	P4HL5	OSH5	Carbon	HA	HL5	HL5S	P4HL5	OSH5	
GlcNAc	H1	① 4.6	4.48	4.51	① 4.49	484	C1	① 102.9	① 101.3	nd	① 103.1	101.3	
	H2	3.76	3.76	3.75	3.77	387	C2	53.2	57.2	nd	57.0	56.6	
	H3	3.63	3.62	3.63	3.64	439	C3	82.0	85.1	nd	82.5	78.2	
	H4	3.44	3.44	3.45	3.46	406	C4	67.0	71.2	nd	71.4	70.5	
	H5	3.41	3.41	3.39	3.40	387	C5	74.2	78.3	nd	78.2	74.4	
	H6a	3.66	3.68	3.65	3.69	417	C6	60.8	63.3	62.7	63.4	69.3	
GlcA	H6b	3.84	3.84	3.81	3.84	454							
	H1	① 4.38	4.42	4.46	① 4.39	489	C1	① 101.8	① 105.8	105.8	① 106.0	108.9	
	H2	3.26	3.29	3.26	3.27	445	C2	71.5	74.9	75.0	75.3	81.1	
	H3	3.30	nd	3.55	3.50	482	C3	72.4	75.9	nd	75.9	78.2	
	H4	3.66	3.68	3.71	3.67	447	C4	81.0	82.3	nd	78.9	77.2	
	H5	3.41	3.63	3.68	3.64	422	C5	75.1	78.5	nd	78.9	81.5	
PLL	Hc				① 4.23	423	Cα				① 55.9	55.9	
	Hβ				1.67	173	Cβ				33.4	33.4	
	Hγ				1.35	140	Cγ				25.1	25.1	
	Hδ				1.63	163	Cδ				29.1	29.1	
	He				2.94	294	Cε				42.0	42.0	

¹H NMR のケミカルシフトは DOH を 4.65 ppm に設定して算出した。① 非硫酸化GlcNAc (I) 非硫酸化GlcA (II) 非硫酸化GlcA (III) 還元糖GlcNAcに結合したGlcA (IV) α-G-硫酸化GlcNAc (V) 2-O-硫酸化GlcA (VI) 還元糖GlcNAc (VII)。アンダーラインの値は、HA 及びHL5 と比較して大幅に低シフトしていることを示す。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
棚元憲一	エンドトキシン試験法	佐々木次雄 棚元憲一 川村邦夫	新GMP微生物試験法	じほう	東京都	2008	244-270
棚元憲一	食品添加物の法規制と食品安全基本法	義平邦利、棚元憲一 他	食品添加物活用ハンドブック	産業調査会 辞典出版センター	東京都	2009	17-22
棚元憲一	食品添加物公定書	義平邦利、棚元憲一 他	食品添加物活用ハンドブック	産業調査会 辞典出版センター	東京都	2009	37-42
Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi	Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MS ⁿ . Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein.	John Walker	The protein Protocols Handbook. Third Edition.	Humana Press	USA	In press	
Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Teruhide Yamaguchi	LC/MS ⁿ for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides	Nicolle H. Packer	Methods in Molecular Biology	Humana Press	USA	In press	
Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Teruhide Yamaguchi	LC/MS of oligosaccharides.	Naoyuki Taniguchi, Ake mi Suzuki Yasunari, Itoh, Hisashi Narimatsu, Toshisuke Kawasaki, Sumihiro Hase,	Experimental Glycoscience	Springer	Tokyo	2008	39-41

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐野琴音 小川 温子	ビトロネクチンのコラーゲンおよび線溶系因子との相互作用	生体の科学	59(2)	118-122	2008
Ogawa, H. and Nakagawa, K.	Development of neoglycoconjugate probes and detection of lectins.	Experimental Glycoscience, Glycochemistry			
Sano K, Asahi M, Yanagibashi M, Hashii N, Itoh S, Kawasaki N, Ogawa H.	Glycosylation and ligand-binding activities of rat plasma fibronectin during liver regeneration after partial hepatectomy.	Carbohydr Res,	343	2329-35	2008
Nakagawa, K., Nakamura, K., Haishima, Y., Yamagami, M., Saito, K., Sakagami, H., Ogawa H.	Pseudoproteoglycan (pseudoPG) probes that simulate PG macromolecular structure for screening and isolation of PG-binding proteins.	Glycoconj. J.			in press
Muroi M.& Tanamoto K.	TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF-kB.	J.Leukocyte. Biol.	83	702-707	2008
Kumada H, Haishima Y, Watanabe K, Hasegawa C, Tsuchiya T, Tanamoto K, Umemoto T	Biological properties of the native and synthetic lipid A of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide	Oral Microbiol Immunol	23	60-69	2008
Sugimoto N, Tada A, Kuroyanagi M, Yoneda Y, Yun YS, Kunugi A, Sato K, Yamazaki T, Tanamoto K.	Survey of synthetic disinfectants in grapefruit seed extract and its compounded products	J. Food. Hyg. Soc	49	56-62	2008

Hatao F., Yamamoto M., Muroi M., Kaminishi M. & <u>Tanamoto K.</u>	MyD88-induced downregulation of IRAK-4 and its structural requirements	FEMS Immunol. Med. Microbiol	53	260-264	2008
Kikuchi Y, Kakeya T, Nakajima O, Sakai A, Ikeda K, Yamaguchi N, Yamazaki T, <u>Tanamoto K.</u>	Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein.	FEBS J.	275	2965-2976	2008
Kawamura Y, Yamaguchi M, Mutsuga M, Sonobe H, Miyamoto S, <u>Tanamoto K.</u>	Analysis of antimony and lead in pewtèreares.	JJFC	15	1-5	2008
Mutsuga M, Kawamura Y, <u>Tanamoto K.</u>	Semicarbazide in the sealing gasket of bottled food.	JJFC	15	23-27	2008
棚元憲一、室井正 志、中川恭好、 島圭介、市村克 彦	日本薬局法指定菌株の 特性と保存管理法に関 する研究	医薬品研究	39	309-312	2008
Mutsuga M, Kawamura Y. & <u>Tanamoto K.</u>	Migration of lactic acid, lactide and oligomers from polylactide.	Food Addit Contam	27	1-8	2008
Mutsuga M, Yamaguchi M, Kawamura Y, <u>Tanamoto K.</u>	Study on semicarbazide in the glass bottled foods	JJFC	15	67-72	2008
Tatebe C, Kawasaki H, Sugimoto N, Sato K. & <u>Tanamoto K.</u>	Quantitative analysis of polysorbates using liquid chromatography-mass spectrometry. Lpn.	J.Food Chem	15	129-134	2008
Kawasaki H, Tatebe C, Takagi S, Kawasaki Y, Hara T, Iizuka T, Sugimoto N, Sato K. & <u>Tanamoto K.</u>	Analysis of polysorbates in foods.	J.Food Chem	15	122-128	2008

Chan-It W, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Thongprachum A, Peerakome S, Ushijima H, Maneekarn N.	Multiple combinations of P[13]-like genotype with G3, G4, and G5 in porcine rotaviruses.	J Clin Microbiol.	46(4)	1169-73	Epub 2008 Jan 30.
Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzuki T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N.	Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children.	Arch Virol.	153(4)	667-74	Epub 2008 Feb 14.
Khamrin P, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N.	Novel nonstructural protein 4 genetic group in rotavirus of porcine origin.	Emerg Infect Dis	14(4)	686-688	2008.
Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H.	Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006.	J Trop Pediatr.	54(2)	102-113	2008 Apr, Epub 2008 Mar 4
Rathore A, Chatterjee A, Sood V, Khan SZ, Banerjee AC, Yamamoto N., Dhole TN.	Risk for HIV-1 infection is not associated with repeat polymorphism in the DC-SIGN neck domain and novel genetic DC-SIGN variants among North Indians	Clin Chim Acta	391(1-2)	1-5.	2008 May
Pham NTK, Trinh, QD, Khamrin P, Nguyen TA, Aichi D, Dey SK, Phadn TG, Hoang L, P, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H.	Sequence analysis of the capsid gene of Aichi viruses detected from Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam.	J Med Virol	80(7)	1222-1227.	2008 Jul
Rathore A, Chatterjee A, Sivarajama P, Yamamoto N., Singhal PK, Dhole TN.	Association of RANTES_403 G/A, _28 C/G and In1.1 T/C polymorphism With HIV-1 transmission and progression among North Indians.	J Med Virol	80 (7)	1133-1141.	2008 Jul;
Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H.	Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrhea.	Emerg Infect Dis	14(6)	985-986,	2008.

Schröder HC, Wang X, Tremel W, Ushijima H, Müller WE.	Biofabrication of biosilica-glass by living organisms.	Nat Prod Res	25(3)	455-474.	2008 Jun ,Epub 2008 Apr 8
Dey SK, Islam A, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H.	Epidemiological and molecular analysis of astrovirus gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh.	J Trop Pediatr	54(6)	423-425	2008 Dec ,Epub 2008 Jul 9.
Khamrin P, Peeraekarn N, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H, Maneeakarn N.	Genetic characterization of group C rotavirus isolated from a child hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand.	Virus Genes.	37	314-321	2008 Aug 12, Epub ahead of print
Malasao R, Maneeakarn N, Khamrin P, Pantip C, Tonusin S, Ushijima H, Peeraekarn S.	Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand.	J Med Virol	80(10)	1749-1755	2008 Aug 19, Epub ahead of print
Rathore A, Chatterjee A, Yamamoto N, Dhole TN.	Absence of H186R polymorphism in exon 4 of the APOBEC3G Gene among North Indian individuals.	Genet Test	12(3)	453-456.	2008
Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzuki T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N.	Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and postnatally infected Japanese infants.	J Gen Virol	89(pt 9)	2275-2279	2008
Khamrin P, Maneeakarn N, Peeraekarn S, Malasao R, Thongprachum A, Chan-It W, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H.	Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies a unusual G3P[10] human rotavirus strain.	J Med Virol	81(1)	176-182	2008 Nov 21
Thongprachum A, Khamrin P, Saekhow P, Pantip C, Peeraekarn S, Ushijima H, Maneeakarn N.	Analysis of the VP6 gene of human and porcine group A rotavirus strains with unusual subgroup specificities.	J Med Virol	81(1)	183-191	2008 Nov 21

Pham NT, Trinh QD, Nguyen TA, Dey SK, Phan TG, Hoang LP, Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H.	Development of genotype-specific primers for differentiation of genotypes A and B of Aichi viruses.	J Virol Methods			2008 Dec 4, Epub ahead of print
Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoo T, Khamrin P, Ushijima H.	Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapoviruses, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand.	J Med Virol	81(2)	345-353	2009 Feb
Dey SK, Hayakawa Y, Rhamans M, Islam R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H.	G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh.	Emerg Infect Dis	15(1)	91-94	2009 Jan
Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Phan TG, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H.	Detection, genetic characterization, and quantification of Norovirus RNA from serosa of children with gastroenteritis.	J Clin Virol	44	161-163	2009, Epub 2009 Jan 6
Khamrin P, Takanashi S, Chayn-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H.	Immunochromatographic test for rapid detection of norovirus in fecal specimens.	J Virol Methods			2009 Jan 9, Epub ahead of print
Usami M, Trinh QD, Yagyu F, Hayakawa Y, Lin naba N, Okitsu S, Phan TG, Ushijima H.	Throughput expression of multiple G-protein coupled receptors for HIV infection in choriocarcinoma cells, trophoblasts, and breast milk cells.	Clin Lab			in press.

Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Mori T, Apichartpiyakul C, Hoshino H.	A short amino acid sequence containing tyrosine in the N-terminal region of G protein-coupled receptors is critical for their potential use as co-receptors for human and simian immunodeficiency viruses.	J Gen Virol	89	3126-36.	2008
Xiao P, Usami O, Suzuki Y, Ling H, Shimizu N, Hoshino H, Zhuang M, Ashino Y, Gu H, Hattori T.	Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through chemokine (C-X-C motif) receptor 4.	AIDS	12;22(14)	1749-57	2008
Shimizu N, Tanaka A, Mori T, Ohtsuki T, Hoque A, Jinno-Oue A, Apichartpiyakul C, Kusagawa S, Takebe Y, Hoshino H.	A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus.	Retrovirology	25	5:52.	2008
Shimizu A, Tamura A, Abe M, Motegi S, Nagai Y, Ishikawa O, Nakatani Y, Yamamoto Y, Uezato H, Hoshino H.	Detection of human papillomavirus type 56 in Bowen's disease involving the nail matrix.	Br J Dermatol.	158(6)	1273-9.	2008
Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T.	The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals,	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>			In press
Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, D., Yamaguchi, T.	Mass spectrometry for a analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products.	<i>Trends in Glycosci. Glycotec h.</i>	20	97-116	2008
川崎ナナ 橋井則貴 山口照英	糖鎖異常の網羅的解析	蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性	53	1690-1696	2008

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

HIV感染を阻害する

シュードプロテオグリカン型薬剤の作用メカニズム

（別冊： 論文別刷）

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 温子

平成21（2009）年 4月

ビトロネクチンのコラーゲンおよび線 溶系因子との相互作用

佐野琴音 小川温子

1 ビトロネクチンの構造と機能

細胞外マトリックス (ECM) は、細胞を固定、維持する物理的な「足場」であるだけではなく、細胞の接着、移動、増殖、発育、分化などを調節している。細胞接着性糖タンパク質ビトロネクチン (VN) は ECM の主要糖タンパク質の 1 つであり、0.2-0.4 mg/ml の高濃度で血液中にも存在する。VN は細胞の ECM への接着、分化、増殖などに関与する上に、血液凝固系、線維素・組織溶解系、補体系など、種々のタンパク質分解カスケードを制御する多機能性糖タンパク質である¹⁾。外科手術や急性・慢性炎症時に産生が増加する急性期反応物でもあることから、組織修復・再生における VN の機能が注目されている²⁾。本稿では、VN の基本的性質とともに、組織修復に関わる生物学的活性が糖鎖修飾によって調節されるという最近の発見を紹介する。

1. VN の局在

VN は主に肝実質細胞によって産生され血中に分泌されるが、脳、心臓、骨格筋、肺、子宮、精巣、胸腺などにも mRNA が発現している³⁾。また血小板、尿、羊水、脳脊髄液などにも VN が検出される。血小板では α -顆粒中に多量体の形で蓄積しており、血小板が活性化した際に血中へ放出される²⁾。

免疫蛍光分析により、VN は *in vivo* で骨格筋、腎基底膜、肺のマトリックス等に繊維状に分布していることが報告されている⁴⁾。また正常ヒト皮膚ではエラスチン線維に結合しているほか、アポトーシスを起こしているケラチノサイトにも結合している⁵⁾。

2. VN の一次構造

ヒト VN は 459 のアミノ酸残基から構成され、図 1 に示すように、N 末端側からソマトメジン B、コネクティング領域、ヘモペキシン I、ヘモペキシン II の 4 つのドメインからなる。N 末端のソマトメジン B 領域には 1 型プラスミノゲン活性化因子阻害因子 (PAI-1) やウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体 (uPAR) との結合部位があり、この領域に隣接してインテグリン結合部位である Arg-Gly-Asp (RGD) 配列が存在する。ヘモペキシン II ドメインは塩基性アミノ酸に富み、ヘパリン、補体複合体 C5b-7、PAI-1 などが結合する領域が存在する。コラーゲン結合部位は細胞結合部位付近にあると考えられていたが⁶⁾、ヘモペキシン I および II 領域に存在することが明らかになった⁷⁾。

VN の糖鎖修飾には多様性があり、ラット、ウサギ、ウシなどは O-結合型糖鎖も含むが、ヒトやブタでは N-結合型糖鎖が主である⁸⁾。ヒト VN は 3 箇所の N-型糖鎖付加部位をもち (図 1)、1 箇所はコネクティング領域、残りの 2 箇所はヘモペキシン I 領域に存在する。N-結合型糖鎖付加部位はラットを含む種間でよく保存されており、糖鎖付加は VN の機能上不可欠な意義を持っていると考えられる。

3. VN の生物学的機能

VN は細胞表面受容体であるインテグリンを介したシグナル伝達によって、細胞接着や増殖を誘導する⁹⁾。インテグリンは α と β の 2 つのサブユニットからなり、その組み合わせにより 20 種以上の分子を構成するが、VN 受容体としては主に $\alpha_v\beta_3$ と $\alpha_v\beta_5$ が機能する。また、細胞表面の uPAR は、組織溶解調節機能に加えて細胞内シグナル伝達機能も有し、VN が uPAR に結合するとシグナル伝達を誘導する¹⁰⁾。

一方、VN は線維素溶解系および組織溶解系の抑制因子である PAI-1 の生体内唯一の安定化因子である¹¹⁾。活性型 PAI-1 は生理的条件下で自然発生的なコンホメーション変化により反応中心 (Arg346-Met347) のペプチド結合が切断されることなく潜在型になるという性質がある。活性型か

ら潜在型への移行の半減期は約 2 時間であるが、VN と結合することによって安定化され¹²⁾、2-10 倍半減期が延びる。その結果プラスミン産生を抑制する。

2 VN のコラーゲン結合性と多量体形成

VN は少なくとも 2 つのコンホメーションをとる。ヘパリン等の結合部位が不活性な状態で存在する単量体型と、リガンド結合活性をもつ多量体型が存在する。組織中の VN は活性多量体型で、コラーゲンやプロテオグリカンなど様々なマトリックスリガンドと結合する¹³⁾。一方、血漿中の VN はほとんどがリガンド結合において不活性な単量体型で存在するが¹⁴⁾、尿素変性や熱処理、あるいはヘパリン、トロンビン・アンチトロンビン III 複合体、膜侵襲複合体などの特定のリガンド存在下で構造変化が起こり、多量体形成を伴ってリガンド結合性を獲得する¹⁵⁾。最近、我々は VN の多量体形成による多価の効果がコラーゲン結合を増大させることを見出し、さらにこの多量体形成は VN 上の糖鎖によって調節されることを証明した¹⁶⁾。

糖鎖末端のシアル酸をシアリダーゼ処理して除去するか、または N-結合型糖鎖をペプチド-N-グリコアミダーゼ F(PNGase F)処理により除去した VN の多量体形成状態を超速心分析法により観察したところ、図 2 に示すように、いずれも高分子の多量体を形成することが示された。これらの糖鎖除去 VN はいずれも、ELISA 法による結合実験で未処理の VN よりも高いコラーゲン結合性を示した。

3 肝再生時の VN の糖鎖と活性変化

組織再生モデルである部分肝切除手術 24 時間後のラット血漿 VN (PH-VN) では、シアル酸をはじめとする糖含量が著しく減少することを我々は見出した¹⁷⁾。PH-VN のコラーゲン結合活性と多量体形成能を、非手術 (NO-VN) および偽手術

ラット血漿 VN (SH-VN) と比較したところ、PH-VN では酵素による糖鎖除去 VN と同様に、NO-VN と比較してコラーゲン結合活性が著しく増強することが SPR 法と ELISA による相互作用解析から示され、同時に多量体形成が増加した¹⁶⁾ (図 3)。

肝切除後のコラーゲン結合の増強は、VN の糖鎖変化により高分子量の多量体形成と架橋安定化が誘導され、多価の効果が発揮されるためと考えられる。

4 細胞外マトリックス分解への VN の関与

血栓溶解 (線溶) および組織再構築の際起こるマトリックス分解は、多くはプラスミンやマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などのセリンプロテアーゼにより引き起こされる。プラスミンはフィブロネクチン、VN、ラミニンのようなマトリックス糖タンパク質も分解する。さらに、MMP は潜在型として産生されプラスミンなどによる分解を受けて活性型になることから、プラスミンの活性制御が ECM 分解調節に大きく関わる¹⁸⁾。

プラスミンの前駆体であるプラスミノゲンを活性化するのは主に 2 つのプラスミノゲン活性化因子で、組織型 (tPA) ならびにウロキナーゼ型 (uPA) がある。血栓の溶解反応ではフィブリンに結合性をもつ tPA が主要因子として働くのに対し、マトリックス分解系では、主に uPA が働く (図 4)¹⁰⁾。可溶性の uPA は uPAR を介して細胞表面に結合する¹⁰⁾。VN は uPA、uPAR の両者に結合し、細胞表面の局所的な溶解反応を促進する。一方、VN は tPA、uPA の主要阻害因子である PAI-1 とも結合し、その阻害活性を安定させ半減期を伸ばす。この結合は線溶、組織溶解を抑制する方向にはたらく。

最近の我々の知見では、肝切除ラットの産生する PH-VN の PAI-1 結合活性は著しく減弱する一方、uPA に対する結合活性は増強する。この変化は肝再生初期におけるプラスミン産生の増大を導き、傷害組織の溶解除去が促進されると考えられる。一方、VN の N-結合型糖鎖の逐次消化による

活性変化から、PAI-1結合はVN糖鎖の内部構造の影響を受けて結合活性が減弱することが示唆された(著者ら、未発表)。

我々は部分肝切除手術72時間後の血漿中では、肝由来星細胞存在下におけるプラスミン産生が亢進されることも見出している。このことはVNとuPARなどの因子間相互作用により、星細胞表面での局所的な溶解活性が増強する機構を示唆する。

肝再生の初期には傷害を受けた組織の除去のため、組織溶解が必要である一方、循環血液中の線溶促進は止血血栓の形成を妨げ、血栓を溶解して後出血を起こす原因となる。細胞表面特異的な溶解活性促進の機構解明は、組織の再生調節に加え、血栓症や線維症などの治療法の確立にも応用できるものと期待される。

おわりに

VNの糖鎖変化によって、組織溶解を開始するプラスミン生成過程、コラーゲンマトリックス構築など、組織修復の多段階を制御しうる可能性が提示された。また肝障害・肝硬変組織において、通常時にはほとんど検出されないVNの沈着が起こることが報告されており(19,20)、この過程でも糖鎖修飾の変化が起こることを我々は明らかにした。これらの機構の解明は、正常な修復または線維化進展(異常な修復)、癌化の機構解明にも結びつくと考えられる。新しい肝線維化の治療法確立へ向けてのターゲットとしてもVN活性の糖鎖調節機構には関心が持たれる。

特に肝線維化に関して、インターフェロンを代表とする従来の治療法は進行を食い止めることに主眼を置いており、一度完成されてしまった肝線維症を積極的に治療する方法は未だ確立されていない。このような肝線維症に対しては、沈着した細胞外マトリックスの分解系の亢進や、過剰に増殖した星細胞にアポトーシスを誘導するといった方策が有効であると考えられる。VNを介してコラーゲン沈着、組織溶解系、さらには星細胞の生存、活性化、増殖を制御することが可能になれば、

今後、線維化の治療法確立の基礎として一つの方向性を示すものと期待される。

- 1) Preissner, K. T. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 275-310, 1991
- 2) Seiffert, D. *Histol. Histopathol.* 12: 787-97, 1997
- 3) Seiffert, D., Keeton, M., Eguchi, Y., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88: 9402-6, 1991
- 4) Hayman, E. G., Pierschbacher, M. D., Ohgren, Y., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80: 4003-7, 1983
- 5) Hintner, H., Stanzl, U., Dahlback, K., et al. *J. Invest. Dermatol.* 93: 656-61, 1989
- 6) Izumi, M., Shimo-Oka, T., Morishita, N., et al. *Cell Struct. Funct.* 13: 217-25, 1988
- 7) Yoneda, A., Ogawa, H., Kojima, K., et al. *Biochemistry* 37: 6351-60, 1998
- 8) Kitagaki-Ogawa, H., Yatohgo, T., Izumi, M., et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1033: 49-56, 1990
- 9) Leavesley, D. I., Ferguson, G. D., Wayner, E. A., et al. *J. Cell Biol.* 117: 1101-7, 1992
- 10) Preissner, K. T., Kanse, S. M., and May, A. E. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 621-8, 2000
- 11) Kost, C., Stuber, W., Ehrlich, H. J., et al. *J. Biol. Chem.* 267: 12098-105, 1992
- 12) Mimuro, J., Muramatsu, S., Kurano, Y., et al. *Biochemistry* 32: 2314-20, 1993
- 13) Preissner, K. T., and Seiffert, D. *Thromb. Res.* 89: 1-21, 1998
- 14) Izumi, M., Yamada, K. M., and Hayashi, M. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 101-8, 1989
- 15) Hayashi, M., Akama, T., Kono, I., et al. *J. Biochem. (Tokyo)* 98: 1135-8, 1985
- 16) Sano, K., Asanuma-Date, K., Arisaka, F., et al. *Glycobiology* 17: 784-94, 2007
- 17) Uchibori-Iwaki, H., Yoneda, A., Oda-Tamai, S., et al. *Glycobiology* 10: 865-74, 2000
- 18) Hahn-Dantona, E., Ramos-DeSimone, N.,