

して作成した 16 化合物 (MF1~MF16)の CD22 への親和性を競合 ELISA 法により測定した。その結果、MF6, MF13 の 2 つの化合物では、GSC718 の IC50 を 100% とした場合の IC50 がそれぞれ 56.9%, 54.9% であり、CD22 への親和性が GSC718 よりも高いシアル酸誘導体であることが示された(図 2)。MF6 と MF13 は構造的に共通点を持った化合物であった。

#### 合成展開したシアル酸誘導体の B 細胞活性化活性

精製したマウス脾臓 B 細胞を細胞分裂の指標として広く用いられている CFSE でラベルした後に、合成展開した化合物と抗 CD40 抗体または CpG オリゴとともに 72 時間培養し、B 細胞の増殖を CFSE の蛍光強度によって解析した。GSC-718 よりも 4 倍程度以上親和性が低い化合物 MF4, 10, 11, 14, 15, 16( IC50 が 1  $\mu$ M 以上) では B 細胞増殖活性化が顕著に低下していた(図 2)。一方、GSC-718 よりも親和性の高い MF6 および MF13 の B 細胞の増殖は GSC718 と同程度であった。

#### 代謝安定化をめざしたシアル酸誘導体の活性評価

GSC-718 から合成展開により代謝安定化をめざした化合物 W の活性評価を行った。化合物 W による組み換え CD22 タンパク質と細胞上のナチュラルリガンドの反応阻害をフローサイトメトリーで測定した。その結果 X の IC50 は GSC718 の約 1.5 倍で、ほぼ同じであることが明らかとなった。さらに、マウス脾臓 B

細胞を W と抗 CD40 抗体または CpG オリゴで刺激したところ、GSC718 同様の、強い B 細胞の増殖が見られた。次に、W または GSC718 と OVA をマウスの腹腔内に投与して、血清中の特異抗体産生を測定したところ、GSC718 に比べて有意に強い特異抗体産生を認めた。これらの結果から、GSC718 よりもアジュバント活性の高いシアル酸誘導体を合成することに成功した。

#### 種々の免疫細胞での CD22 の発現

マウス脾臓および腹腔内滲出細胞、骨髄細胞から細胞を単離し、B 細胞、T 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球のマーカーである、B220, CD19, , CD3, CD11c, F4/80, Gr-1 とともに CD22 を染色し、これら種々の免疫細胞での CD22 の発現をフローサイトメーターで測定した。T 細胞、マクロファージおよび好中球では全く CD22 の発現は認めなかったが、B 細胞の他に樹状細胞では CD22 の発現を認めた。

#### 樹状細胞への GSC718 の作用

マウス骨髄細胞を GM-CSF または Flt3L とともに培養することにより cDC と pDC を誘導したところ、分化後の細胞には共に CD22 の発現があり、とりわけ cDC で CD22 の発現が高かった(cDC: 57.1%, pDC: 22.8%)。そこで、cDC および pDC を 50  $\mu$ M の GSC718 とともに培養した。脾臓 B 細胞は、GSC718 とともに培養すると有意に CD80 や CD86, MHCII の発現が増強した。また、GSC718 とともに代表的な TLR リガンドである

CpG オリゴや LPS を培養に添加すると、CpG オリゴや LPS 単独に比べて GSC718 添加により CD80, CD86, MHCII の発現が増強した。しかしながら、分化誘導した樹状細胞に GSC718 を加えても CD80, CD86, MHCII の発現は増強しなかった。また、LPS や CpG オリゴとともに GSC718 を加えても、これらの作用以上に活性化マーカーの発現増強は認めなかった。以上の結果から、樹状細胞も CD22 を発現するが、GSC718 は樹状細胞の活性化を増強しないことが明らかとなった。

#### CD22 のシグナル制御機能への GSC718 の作用

CD22 は B 細胞抗原受容体 ( B cell receptor: BCR ) のシグナル伝達を抑制することが知られている。そこで、CD22 のシグナル抑制機能への GSC718 の作用を明らかにするために、GSC718 の存在下で野生型 C57BL/6 マウス B 細胞を抗 IgM 抗体で刺激して BCR を架橋し、カルシウムイオン流入を測定した。その結果、GSC718 が BCR 架橋によるカルシウムシグナルが低下させることが明らかとなった。CD22 欠損マウス由来の B 細胞では、カルシウムシグナルは野生型マウス B 細胞に比べ増強していたが、GSC718 添加によってもカルシウムシグナルは変化しなかった。この結果から、GSC718 は CD22 に依存して BCR シグナル伝達を負に制御することが明らかになった。

一方、GSC718 の添加のみにより細胞内カルシウムイオン濃度が軽度ではあるが増加した。しかし、このような GSC718 によるカルシウムイオン濃度の上昇は

CD22 欠損マウスでは認めなかった。BCR は抗原の非存在下でも構成的に弱いシグナルを伝達していることが示されており、このシグナル伝達は緊張性シグナル伝達 (tonic signal) と呼ばれている。GSC-718 は CD22 依存的に緊張性シグナル伝達を増強することが明らかとなった。

#### (3) 組み換え CD22 タンパク質発現系の構築と結晶化の試み

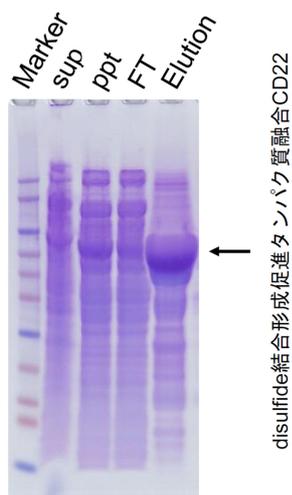
##### CD22 の大量発現系の構築

大腸菌を用い、ジスルフィド結合形成促進タンパク質を融合させた発現系について、CD22 のドメイン 1 のみ、ドメイン 1 と 2、およびドメイン 1 から 3 までの 3 種類を検討した。ドメイン 1 から 3 までを発現させた場合は発現量が少なく、また粗精製の結果、可溶性の凝集体を形成していた。ジスルフィド結合形成促進タンパク質を N 末端側、C 末端側いずれに融合させても同様の結果となり、結晶化には不向きと判断した。

N 末端側にジスルフィド結合形成促進タンパク質融合させ、ドメイン 1 のみ、あるいはドメイン 1 と 2 を発現させた場合、ドメイン間のジスルフィド結合に関わるシステイン残基をセリンに変異させたものについて、発現量が比較的多く、また粗精製後に一定量の単量体成分が確認できた(図 3)。

大腸菌を用い、高可溶性のタンパク質(タグタンパク質)と CD22 を融合させた発現系では、タグタンパク質の分子量が比較的小さいものと、大きなもの 2 種について検討した。分子量の小さなタグタンパク質を用い、CD22 のドメイン 1 のみ、およびドメイン 1 から 3 までを発現させたところ、いずれも発現量が非常に少なく、かつ可溶

性の凝集体を形成していた。



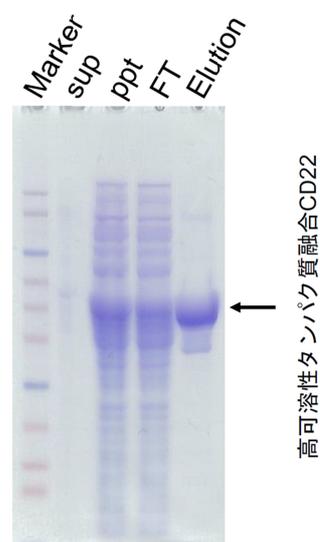
**図3、ジスルフィド結合形成促進タンパク質融合 CD22 ドメイン 1 の SDS-PAGE**  
N末端側にジスルフィド結合形成促進タンパク質を融合させ、ドメイン間ジスルフィド結合に関わるシステインのみを Ser に変異させたもの。

大腸菌を用い、高可溶性のタンパク質( タグタンパク質 ) と CD22 を融合させた発現系では、タグタンパク質の分子量が比較的小さいものと、大きなもの 2 種について検討した。分子量の小さなタグタンパク質を用い、CD22 のドメイン 1 のみ、およびドメイン 1 から 3 までを発現させたところ、いずれも発現量が非常に少なく、かつ可溶性の凝集体を形成していた。

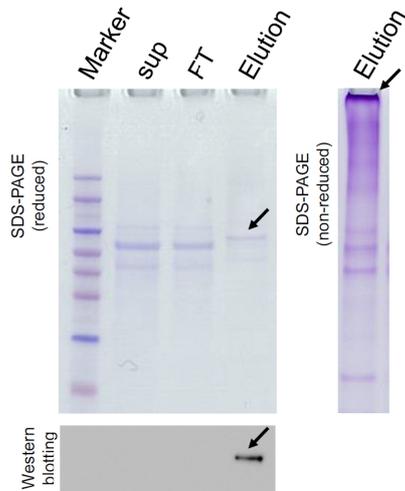
分子量の大きなタグタンパク質を用い、CD22 のドメイン 1 のみ、およびドメイン 1 から 3 までを発現させたところ、発現量が著しく多かった。特にドメイン 1 のみを発現させ、さらにドメイン間ジスルフィド結合に関わるシステイン残基をセリンに変異させたものについては、粗精製後に多量の単量体成分が確認できた。同様に、ドメイ

ン 1 のみを発現させ、すべてのシステイン残基をセリンに変異させたものについても、粗精製後に多量の単量体成分が確認できた。( 図 4 )。

ヒト培養細胞を用いた発現系を用い、CD22 のドメイン 1 から 3 までの C 末端側に Fc ドメインを融合させたタンパク質を発現させたところ、比較的少量の発現が確認できたが、非還元条件での SDS-PAGE の結果から、可溶性の凝集体を形成している可能性が高いと思われた( 図 5 )。



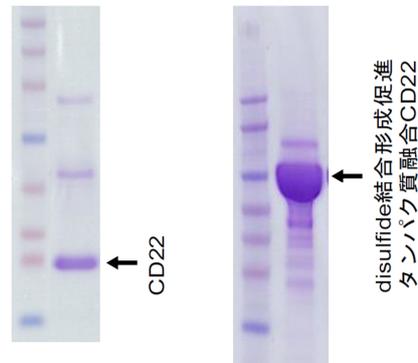
**図4、高可溶性タンパク質融合 CD22 ドメイン 1 の SDS-PAGE**  
N末端側に高可溶性タンパク質を融合させ、すべてのシステイン残基をセリンに変異させたもの。



**図5、ヒト培養細胞発現系によるFc融合CD22のPAGE**  
**黒矢印が、Fc融合CD22に相当するバンド。**

#### CD22の精製と結晶化

ジスルフィド結合形成促進タンパク質融合CD22についてさらなる精製を行い、ドメイン1のみを発現させたものに関しては、ジスルフィド結合形成促進タンパク質部分をプロテアーゼで切断、除去した標品として回収可能であった。しかしながら、結晶化実験に十分な収量を達成することが困難であった。またドメイン1と2を発現させたものについては、ジスルフィド結合形成促進タンパク質部分を切断すると可溶性の凝集体を形成してしまったことから、ジスルフィド結合形成促進タンパク質融合型そのまま精製し、最終精製標品とした(図6)。



**図6、ジスルフィド結合形成促進タンパク質を用いた発現系による最終標品**

高可溶性タグタンパク質融合CD22について、ドメイン1のみを発現させ、ドメイン間ジスルフィド結合に関わるシステイン残基をセリンに変異させたもの、またすべてのシステイン残基をセリンに変異させたものの2種を粗精製後さらに精製した。夾雑タンパク質の混入は低く抑えられたものの、ドメイン間ジスルフィド結合に関わるシステイン残基だけをセリンに変異させたものに関しては、自身のドメイン内ジスルフィド結合に関与するシステイン残基に起因すると考えられる多量体成分が含まれていた。これはTCEPなどの還元剤存在下では単量体に解離するため、還元剤存在下で結晶化することとした。また、タグタンパク質をプロテアーゼにより切断、除去した標品も量は少ないものの、結晶化実験を行うことが可能な量を回収することが出来た。

すべてのシステイン残基をセリンに変異させたものについて、タグタンパク質をプロテアーゼにより切断するとCD22部位が

不安定になったため、タグタンパク質融合型のまま最終精製標品とした(図7)。

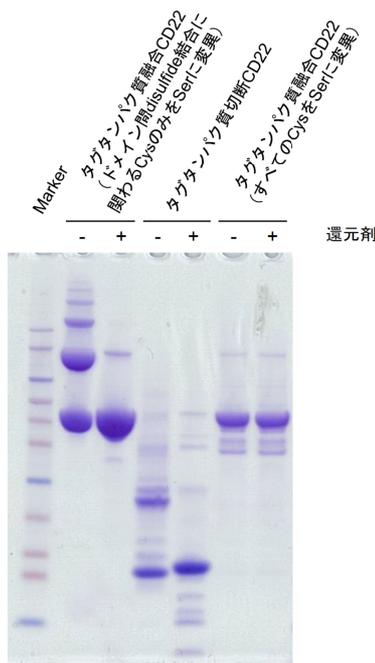


図7, 高可溶性タグタンパク質を用いた発現系による最終標品

以上のすべての最終標品について、結晶化条件の探索を広範囲に行ったが、高可溶性タグタンパク質融合 CD22 においてアモルファス状の凝集体が得られたものの、構造解析が可能な結晶は得られていない。

(4) NMR を用いた CD22 とシアル酸誘導体の相互作用の解析  
ヒトおよびマウス由来 CD22 のドメインの哺乳細胞による発現条件の検討  
 ヒトおよびマウス由来 CD22 のドメインを HEK293S 哺乳動物細胞で大量に発現するた

めの条件検討を行った。CD22 の生物種 (ヒトおよびマウス)、シグナルシーケンス (CD22 に由来するシーケンスおよびベクターに含まれる Nigogen 由来のシーケンス)、CD22 のドメイン (ドメイン 1 およびドメイン 1-2) について検討した。その結果、CD22 に由来するシグナルシーケンスを用いて、human CD22 のドメイン 1-2 を組み込んだ系のみ、発現を確認することができた(図8)。また、そのタンパク質につき、PNGase F 消化を行ったところ、有意に電気泳動の移動度が変化した。これらの結果より、哺乳細胞での発現ではシグナルシーケンスや発現領域は発現量に大きく影響を与えることが判明した。また hCD22 のドメイン 1-2 では N 型糖鎖修飾が確認された。

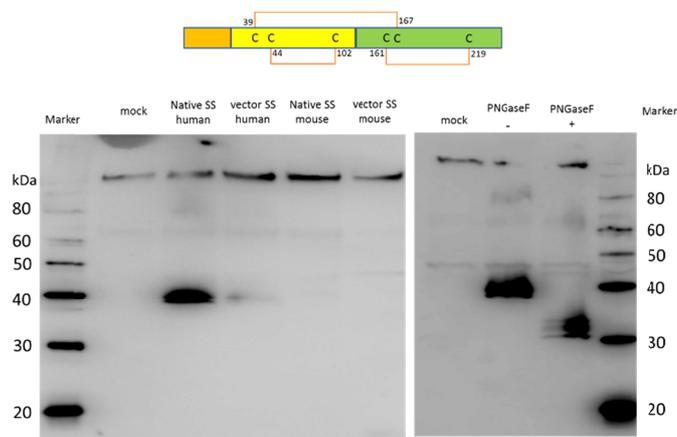


図8, CD22 ドメイン1-2のHEK293Sによる発現検討

CD22-Fc と阻害剤との相互作用解析: STD-NMR  
 STD-NMR 法ではタンパク質に結合するリガンドのエピトープ (蛋白質により認識される面) を同定する方法である (図9)。

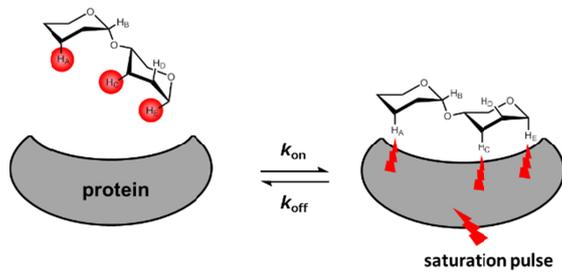


図9, STD-NMR法の概念図

hCD22-Fcの溶液にシアル酸誘導体(阻害剤 Y)を加えて、STD-NMRスペクトルを測定したところ、阻害剤の芳香族部分がタンパク質との相互作用に大きく寄与していることが判明した(図10)。

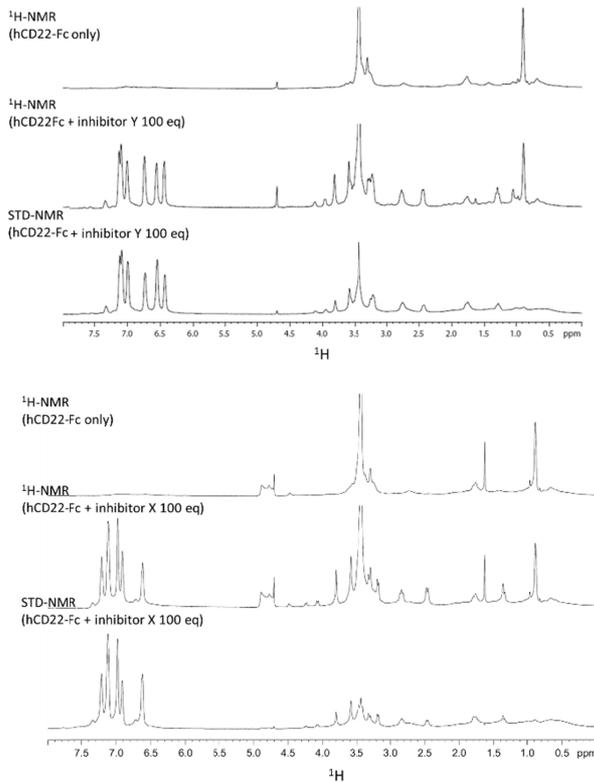


図10, STD-NMR法によるhCD22と阻害剤Y(上段)および阻害剤X(下段)の相互作用解析

阻害剤XとhCD22-Fcとの相互作用解析も同様にSTD-NMR解析を行ったところ、阻害剤Xも阻害剤Yと同様の面を使ってhCD22-Fcと結合していることが判明した。

一方でmCD22-Fcと阻害剤Yとの相互作用をSTD-NMR法で解析したところ、大きなSTDシグナルを与えなかった。その結果は、阻害剤YとmCD22-Fcの結合が弱い、もしくはリガンドの結合解離の速度が遅いことを意味する。阻害剤XとmCD22-Fcの相互作用も同様であった。

CD22-Fcと阻害剤との相互作用解析:

TR-NOE

TR-NOE法はタンパク質に結合した状態のリガンドのコンフォメーションに関する情報をもたらす。

NOEは $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 間の距離が近い時に観測される(通常約5 Å以内)(図11)。

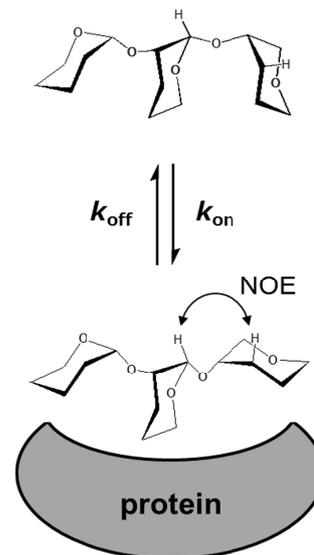


図11, TR-NOE法の概念図

その結果、大変興味深いことに、化学構造上離れている  $^1\text{H}$  同士で TR-NOE シグナルが観測された (図 12)。このことは阻害剤 Y が hCD22-Fc に結合しているときは両末端が空間的に近接した状態になっていることが明らかになった。また、阻害剤 X と阻害剤 Y はほぼ同様のコンフォメーションで hCD22-Fc と結合していることも判明した。

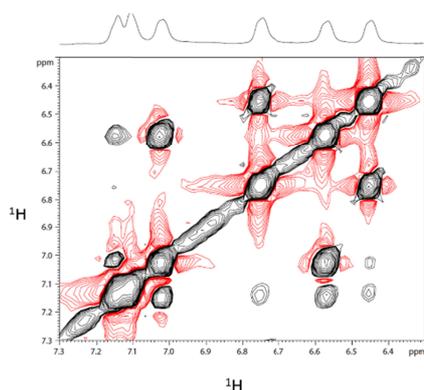


図 12, hCD22-Fc 存在下における阻害剤 Y の TR-NOE スペクトル (芳香族領域)

## A. 考察

### GSC-718 の合成展開と活性評価

シアル酸誘導体 GSC718 は CD22 に高親和性 ( $\text{IC}_{50} \sim 0.1 \mu\text{M}$ ) で結合し、B 細胞の活性化を増強する。我々は、GSC718 のシアル酸の 2 位と 5 位を中心に合成展開して得た化合物 16 個を得た。これらの化合物について CD22 への親和性を測定し、うち 2 つ (MF6 および MF13) で CD22 への親和性の上昇を認めた。次いで、化合物の B 細胞の活性化・増殖への作用を調べたところ、CD22 への親和性が  $1 \mu\text{M}$  程度以上になると B 細胞の活性化・増

殖の亢進は認められなかったが、GSC718 より親和性の高い化合物でも B 細胞の活性化・増殖は GSC718 と同程度であった。また、予備的に MF6 および MF13 を抗原とともにマウスに投与したが、GSC718 に比べてアジュバント活性の増強を認めなかった。この点についてはさらに追試が必要であるものの、親和性の増強のみではアジュバント活性の増強は難しい可能性が示唆された。

そこで、我々は代謝安定性をめざした GSC718 の誘導体 W の評価をおこなったところ、CD22 への親和性や *in vitro* での B 細胞活性化・増殖増強作用は GSC718 と遜色なかった。この化合物を抗原とともにマウスに投与したところ、GSC718 よりも多量の特異抗体の産生を認め、アジュバント活性が増強していることが明らかとなった。したがって、優れたアジュバント活性を得るのに代謝安定性の増強が重要であることが示唆された。

本研究では、マクロファージや好中球などの炎症細胞で CD22 の発現がないことを示した。また、樹状細胞では CD22 の発現があるものの、GSC718 で刺激しても活性化はおこらない。これらの知見から GSC718 はマクロファージ、樹状細胞、好中球といった先天免疫細胞を活性化できないことが明らかである。この知見は、脾細胞を GSC718 で刺激しても炎症性サイトカインの産生がおこらないという我々の知見 (未発表) とよく合致し、GSC718 が抗体産生を増強するが炎症をおこさない画期的な化合物であることを強く示唆している。

## シアル酸誘導体による B 細胞活性化のメカニズム

本研究では、GSC718 が CD22 に作用することにより BCR 架橋の際の BCR シグナル伝達が減弱することを示した。この結果は、GSC718 が CD22 の抑制機能を増強することを示すものである。B 細胞は CD22 のリガンドである 2,6 シアル酸を細胞表面の糖脂質や糖タンパク上に多量に発現し、CD22 は同じ B 細胞上の

2,6 シアル酸と構成的に結合していることが知られている。このような同じ細胞上のリガンドはシスリガンドと呼ばれる。GSC718 は CD22 とシスリガンドの結合を阻害し、シスリガンドによる CD22 の機能制御をキャンセルするものと考えられるので、GSC718 が CD22 のシグナル抑制機能を増強するという我々の結果は、シスリガンドが CD22 の機能を抑制することを示唆し、2,6 シアル酸産生に必須のシアルルトランスフェラーゼ ST6GalII 欠損マウス B 細胞での UCSD の Marth 博士やスクリプス研究所の Paulson 博士ら結果とよく合致する。一方、B 細胞を *in vitro* で抗 CD40 抗体や CpG オリゴとともに培養した場合、正常 B 細胞では GSC718 の添加により B 細胞の活性化マーカーの発現や B 細胞の増殖は顕著に増強するが、このような B 細胞の活性化増強は CD22 欠損 B 細胞でも認められる。CD22 の機能を増強して BCR シグナル伝達を抑制する GSC718 がどのようにして、CD22 欠損 B 細胞と同様の B 細胞活性化増強を誘導するのかが問題である。

我々は、GSC718 が BCR 架橋による

BCR シグナル伝達を抑制するが、BCR 架橋非存在下での緊張性シグナルを増強することを明らかにした。シスリガンドによる制御が BCR 架橋によるシグナル伝達と緊張性シグナルで異なるために、GSC718 が BCR 架橋によるシグナル伝達を抑制し、緊張性シグナルを増強するという相反する作用がおこるのであろう。また、GSC718 による B 細胞活性化増強は、おそらく緊張性シグナル伝達の増強によっておこるのであろう。B 細胞での緊張性シグナルは B 細胞の生存維持に必須であり、その分子メカニズムの解明が進んでいる。我々の結果は、緊張性シグナルが B 細胞の生存のみならず、B 細胞の活性化でも重要な役割を果たすことを示唆している。

## 組み換え CD22 タンパクの大量発現と結晶化

CD22 について、N 末端側のドメイン 1 から 3 までを対象とし、大量発現系の構築と結晶化用標品の精製を行った。発現させるドメインの長さを変化させ、さらに点変異の導入、*folding* や可溶性を改善させるタグタンパク質の融合、バクテリアとヒト培養細胞での発現系の検討など、多くの条件を検討したが、総じて CD22 が凝集しやすいという特性が、効率の良い発現と精製を困難にしていると考えられた。発現させるドメインの長さが増えるごとに発現量が減少し、また凝集性は上昇する傾向がみられ、ドメイン 1 から 3 までを発現させると、バクテリア、ヒト培養細胞いずれの系でも少量の可溶性の凝集体が得られるのみであった。

ドメイン 1 のみ、あるいはドメイン 1 と 2 を発現させた場合、いくつかの条件で結晶化実験を行うに足る精製度と収量を達成することが出来た。ジスルフィド結合形成促進タンパク質を融合させて発現させる系では、このタグタンパク質が融合した状態での CD22 ドメイン 1 と 2、またタグタンパク質を除去した CD22 ドメイン 1 について最終標品を得たが、これらはいずれもリガンド結合活性が低いことがわかり、正しい folding がなされていないか、あるいはタグタンパク質部分がリガンド結合部位を覆い隠している可能性が考えられた。また、結晶化を行ったタグタンパク質融合 CD22 では現在までに結晶が得られていないが、今回使用したジスルフィド結合形成促進タンパク質は結晶化が難しいとされるタンパク質であるため、やはりタグタンパク質を除去することが望ましいと考えられる。この場合、タグタンパク質を除去しても十分な収量を確保できるよう改善が必要である。

高可溶性タグタンパク質を融合させて発現させる系では、タグタンパク質融合 CD22 ドメイン 1 について精製度、収量ともに結晶化実験に十分な水準を達成し、結晶化実験を行った。本高可溶性タグタンパク質はシステイン残基がないために、タグタンパク質を介した多量体化が基本的に生じることがなく、またタグタンパク質単体では結晶化が容易であることなどから、CD22 融合タンパク質についても結晶化には有利であると考えられた。しかしながら結晶化条件の探索において、多くの条件でアモルファス状の凝集体がえられており、これは CD22 部位の一部が fold していないことが原因として考え

られる。結晶構造解析が可能な良質の単結晶を得るためには、CD22 部位が強固に一定の fold を形成するように、さらなる点変異の導入、タグタンパク質の変更、追加、あるいはタグタンパク質と CD22 部分を繋ぐリンカー配列の改善などが必要である。

### CD22 とシアル酸誘導体の相互作用

シアル酸誘導体の両末端が空間的に近接したコンフォメーションで hCD22-Fc と結合することは、これまでの mouse siglec-1 と阻害剤との複合体の結晶構造からも支持される。mouse siglec-1 とシアル酸の 9 位にビフェニルが結合した阻害剤の複合体の結晶構造、およびシアル酸の 2 位にベンジル基が結合した阻害剤の複合体との結晶構造が過去に報告されているが（図 13）、両構造においてシアル酸ユニットは同じ部位に結合しており、両構造を重ねると 9 位側のビフェニル基と 2 位のベンジル基が空間的に近接することがわかる。

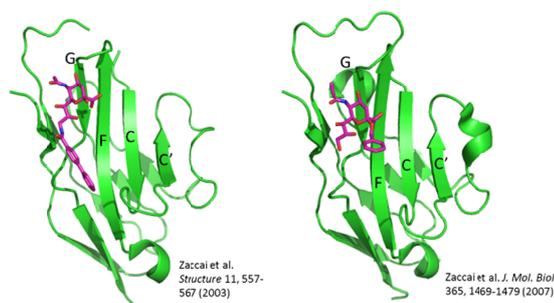


図 13, mouse siglec-1 の糖鎖結合ドメインとシアル酸誘導体の結晶構造

また STD-NMR から特定の芳香族領域がより

タンパク質に近接していることが明らかになった。この実験結果から反対側に位置する部分は親和性向上のために改変の余地が残されていると考えられる。実際、mouse siglec-1 とシアル酸の 2 位にベンジル基が結合した阻害剤の複合体との結晶構造では、ベンジル基は直接タンパク質と相互作用しておらず、結晶中において隣接する分子のベンジル基とスタックしている。

## B. 結 論

我々は、GSC718 より系統的に合成展開した化合物の活性評価を行い、GSC718 よりも CD22 に高親和性に結合する化合物 2 つを得た。これまでのところ、これらの化合物が GSC718 よりも高い抗体産生増強作用を示すという証拠は得られていない。一方、我々は代謝安定性をめざした GSC718 の誘導体 Z が GSC718 よりも抗体産生増強作用が有意に高いことを示し、GSC718 よりも抗体産生増強作用の強い化合物の合成に成功した。また、GSC718 が B 細胞活性化を増強するメカニズムの解明を行い、GSC718 による B 細胞緊張性シグナルの増強が B 細胞活性化に重要であることを明らかにした。CD22 の立体構造情報および阻害剤との相互作用に関する情報を得るために、CD22 の大量発現系の構築を行い、N 末端ドメイン 1 のみ、あるいは N 末端ドメイン 1 と 2 を発現範囲とした条件で、結晶化可能な純度と収量で精製標品を得た。また、シアル酸誘導体のタンパク質結合部位やコンフォメーションに関する情報

を得ることができた。これらの知見はより活性の高い CD22 阻害剤のデザインに貢献する。

## F . 健康危険情報

特記すべきことはなかった。

## G . 研 究 発 表

### ( 1 ). 論文発表

1. Shimoda, M., Bolduc, A., Takezaki, M., Amtani, Y., Huang, L., Nutt S. L., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Mellor A. L, Tsubata, T. and Koni, P. (2013): Constitutively CD40-activated B cells regulate CD8 T cell inflammatory response by IL-10 induction. *J. Immunol.* 190: 3189-3196.
2. Xu, M., Hou, R., Sato-Hayashizaki, A., Man, R., Zhu, C., Wakabayashi, C, Hirose, S., Adachi, T. and Tsubata, T. (2013): *CD72<sup>c</sup>* is a modifier gene that regulates *Fas<sup>lpr</sup>*-induced autoimmune disease. *J. Immunol.* 190: 5436-5445.
3. Aslam, M., Kishi, Y. and Tsubata, T. (2013): Excess CD40L does not rescue anti-DNA B cells from clonal anergy. *F1000 Research* 2:218.
4. Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M, Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. (2014): Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells. *J. Biol. Chem.* 289: 1564-1579.

5. Kawai, Y., Ouchida, R., Yamasaki, S., Dragone, L., Tsubata, T. and J.-Y. Wang (2014): LAPT5 promotes lysosomal degradation of intracellular but not the cell surface CD3 $\zeta$ . *Immunol. Cell Biol.* (in press).
  6. Hara, A., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M. (2014): A New Chemical Approach to Human ABO Histo-Blood Group Type 2 Antigen. *Molecules* 19, 414-437.
  7. Konishi, M., Imamura, A., Fujikawa, K., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M. (2013): Extending the Glucosyl Ceramide Cassette Approach: Application in the Total Synthesis of Ganglioside GalNAc-GM1b. *Molecules* 18, 15153-15181.
  8. Nagae, M. and Yamaguchi, Y. (2014): Three-dimensional structural aspects of protein-polysaccharide interactions. *International Journal of Molecular Science*, 15, 3768-83
  9. Yuasa, N., Koyama, T., P. Subedi, G., Yamaguchi, Y., Matsushita, M. and Fujita-Yamaguchi, Y. (2013): Expression and structural characterization of anti-T-antigen single-chain antibodies (scFvs) and analysis of their binding to T-antigen by surface plasmon resonance and NMR spectroscopy. *The Journal of Biochemistry*, 154, 521-9
  10. Hanashima, S., Sato, C., Tanaka, H., Takahashi, T., Kitajima, K. and Yamaguchi, Y. (2013): NMR study into the mechanism of recognition of the degree of polymerization by oligo/polysialic acid antibodies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21: 6069-76
  11. Masuno, H., Ikura, T., Morizono, D., Orita, I., Yamada, S., Shimizu, M. and Ito, N. (2013): Crystal structures of complexes of vitamin D receptor ligand-binding domain with lithocholic acid derivatives. *J. Lipid. Res.* 54: 2206–2213.
  12. Ikura, T. and Ito, N. (2013): The peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents tau peptide from aggregating. *Protein Eng. Des. Sel.* 26: 539–546.
  13. Nakabayashi, M., Tsukahara, Y., Iwasaki-Miyamoto, Y., Mihori-Shimazaki, M., Yamada, S., Inaba, S., Oda, M., Shimizu, M., Makishima, M., Tokiwa, H., Ikura, T. and Ito, N. (2013): Crystal structures of hereditary vitamin D-resistant rickets-associated vitamin D receptor mutants R270L and W282R bound to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and synthetic ligands. *J. Med. Chem.* 56: 6745–6760.
  14. Higo, K., Ikura, T., Oda, M., Morii, H., Takahashi, J., Abe, R. and Ito, N. (2013): High resolution crystal structure of the Grb2 SH2 domain with a phosphopeptide derived from CD28. *PLoS ONE*. 8, e74482: 1–6.
- ( 2 ) . 学会発表  
(国際学会)
1. Tsubata, T.: CD72<sup>c</sup> a haplotype encoding the SHP-1-binding B lymphocyte molecule is a modifier gene for murine lupus, the 10<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, Feb 7-9, 2013. Tokyo.
  2. Tsubata, T.: Sialic acids and immune responses. Molecular Frontier Science Conference for Humboltians and DAAD Alumni, September 20-22, 2013.

Shanghai.

3. Tsubata, T.: SHP-1-activating Receptors in B lymphocytes. The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatase, November 27-29, 2013. Hsinchu.
  4. Shimoda, M., Bolduc, A., Takezaki, M., Tsubata, T. and Koni, P-A. : Excess B cell CD40/CD40L signaling promotes CD4 T cell-mediated encephalomyelitis in mice. Immunology 2013 AAI Annual meeting. May 3-7, 2013. Honolulu.
  5. Tamai, H., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Total synthesis of ganglioside GAA-7 and evaluation of its neuritegenic activity. 27th International Carbohydrate Symposium (ICS27). January 12-17, 2014. Bangalore.
  6. Yamaguchi, Y., Matsumoto, K., Hirose, K., Nishima, W., Re, S. and Sugita, Y.: Experimental and theoretical approaches to understand the conformational differences in isomeric glycan pairs. 22nd International Symposium on Glycoconjugates. June 27, 2013. Dalian.
  7. Ikura, T. and Ito, N. Analysis of the capability of peptidyl prolyl isomerases to inhibit tau peptides from aggregating. 2nd International Symposium on Intrinsically Disordered Proteins (ISIDP). January 23-24, 2013. Yokohama.
- (国内学会)
1. 鏝田武志「自己抗体産生とアイソタイプ」第20回自己抗体と自己免疫シンポジウム、2013年2月2日、東京
  2. 鏝田武志「CD72<sup>c</sup>は Fas 欠損マウスでの自己免疫疾患発症を制御する修飾遺伝子である」第22回日本 cell death 学会学術集会、2013年7月19日、京都
  3. 品川健朗、沼本修孝、鏝田武志、伊藤暢聡「CD72の構造解析に向けて」第51回日本生物物理学会年会、平成25年10月28日-30日、京都
  4. 山口芳樹、「糖鎖の立体構造とダイナミクス：機能との関係」Glyco TOKYO 2013 シンポジウム、2013年10月19日、東京
  5. 伊倉貞吉、伊藤暢聡「プロリン異性化反応がタウタンパク質の凝集を阻害する」第13回日本蛋白質科学会年会。2013年6月12-14日、鳥取
  6. 沼本修孝、中川太郎、喜田昭子、伊藤暢聡、福森義宏。三木邦夫「巨大ヘモグロビン結晶中での酸素結合状態の操作」日本結晶学会2013年度年会。2013年10月12-13日、熊本
  7. 伊倉貞吉、伊藤暢聡「タウタンパク質に対する Pin1 のプロリン異性化活性を測定するための新しい方法」第51回日本生物物理学会年会。2013年10月28-30日、京都
  8. 品川健朗、沼本修孝、鏝田武志、伊藤暢聡「CD72の構造解析に向けて」第51回日本生物物理学会年会。2013年10月28-30日、京都
  9. Takata, T., Tang, M. and Tsubata, T.: Unconventional B cell antigen receptor endocytosis pathway. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013. December 11-13, 2013. Chiba.
  10. Xu, M., Hou, R., Sato-Hayashizaki, A., Man, R-Y., Zhu, C., Wakabayashi, C., Hirose, S., Adachi, T. and Tsubata, T.: Cd72<sup>c</sup> is a modifier gene that regulates Fas<sup>lpr</sup>-induced autoimmune disease. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013. December 11-13, 2013. Chiba.
  11. Mohammad, A. and Tsubata T.: Distinct

- tolerance mechanisms for anti-DNA and anti-Sm B cells. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013. December 11-13, 2013. Chiba.
12. Li. Y., Hase. K., Tsubata. T. and Wang. J-Y.: Glia maturation factor- $\gamma$  regulates marginal zone B cell migration and humoral immune responses. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013. December 11-13, 2013. Chiba.
  13. Kano. C., Ohno. H., Tsubata. T. and Wang. J-Y.: Identification of a putative form of AID that inhibits Ig gene hypermutation. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013. December 11-13, 2013. Chiba.
  14. Onodera. T., Takahashi. Y., Adachi. T., Tsubata. T., Kurosaki. T. and Ato. M.: Replenishment of long-live plasma cells constitutively restricted by CD4<sup>+</sup> T cells in the ir maintenance phase after influenza vaccination. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013. December 11-13, 2013. Chiba.
- glycan interaction and dynamics. The 3rd Austria / Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology. July 2, 2013. Wako.
3. 鏑田武志 「Sialic acids and immune responses」 徳島大学、2013年8月12日、徳島
  4. 鏑田武志 「リンパ球の選択・分化とUPR」 広島大学、2013年10月29日、広島
  5. 山口芳樹 「Glycan dynamics and interaction: From a 3D structural view」 理研-糖鎖インフォマティクス若手の会 合同セミナー、2013年2月12日、和光市
  6. Ito, N. Structure deposition at PDBj (Protein Data Bank Japan). OIST-CCP4 Workshop, November 4-8, 2013. Onna.

## H . 知的財産権の出願・登録状況

### ( 1 ). 特許取得

### セミナー他

1. Tsubata, T.: Regulation of B lymphocyte responses and sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs). Glyco Medicine Seminar, IBMS, Academia Sinica, November 27, 2013. Taipei.
2. Yamaguchi, Y.: Application of NMR to

1. 発明者：鏑田武志 小野寺大志、「B細胞における CD22 機能を抑制することから成る免疫応答の促進方法」、特許権者：独立行政法人・科学技術振興機構、特許番号：5243269号

### 2 . 実用新案登録

該当なし。

### 3 . その他

該当なし。