

201407023A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進 研究事業

新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発

平成26年度 総括・分担 研究報告書

研究代表者 鏑田 武志

平成27 (2015) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告

新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発 ----- 1

鏑田 武志

II. 分担研究報告

1. CD22と阻害剤の相互作用に関する研究 ----- 1 1

山口 芳樹

2. X線結晶解析によるCD22の立体構造とリガンド相互作用の研究 ----- 1 8

伊東 暢聡

3. CD22阻害化合物の設計及び合成 ----- 2 4

石田 秀治

4. CD22 結合化合物の活性評価とメカニズムの解明 ----- 3 3

鏑田 武志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 4 2

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 4 4

新規コンセプトによる炎症を誘導しないワクチン用免疫増強剤の開発

研究代表者 鏑田 武志 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研究要旨

昨年度 CD22 に結合しアジュバント活性を有することが明らかとなったシアル酸誘導体 GSC780 と CD22 の結合についてのホモロジーモデリングを行い、その知見をもとに合理的なシアル酸誘導体の分子設計を行った。この分子設計などをもとに GSC780 の誘導体を合成し、CD22 への親和性や B リンパ球活性化能力を測定し、より優れた化合物の同定を行った。さらに、GSC780 を抗原とともに投与することにより一次応答での抗体産生増強のみでなく免疫記憶を誘導することを明らかにするとともに、GSC780 がインフルエンザウイルスワクチンによる感染防御効果を増強することを示した。これらの結果から CD22 結合シアル酸誘導体がワクチン用のアジュバントとして有用であることが明らかとなった。

分担研究者：

石田秀治
岐阜大学応用生物科学部 教授
山口芳樹
理化学研究所 チームリーダー
伊藤暢聡
東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

A. 研究目的

近年スプリットワクチンなど安全性の高いワクチンが希求されているが、安全なワクチンは免疫原性が低いために、適切な免疫増強剤（アジュバント）を併用し、免疫原性を高める必要がある。開発済みおよび開発中のアジュバントは基本的に自然免疫細胞を標的とする。その結果、樹状細胞の活性化により免疫応答を増強するが、マクロファージなどの自然免疫細胞も活性化し、炎症性サイトカインの産生等を介して炎症を惹起して副反応を誘導する。このため、ヒト用ワクチンでは安全性の確認された限られたアジュバントを少量使用できるのみである。ワクチンによる感染防御は、ウイルスに対するものも含め、もっぱら抗体、とりわけ中和抗体により成立し、キラーT 細胞などの細胞性免疫の寄与は少ない (Edghill-Smith et

al. Nature Medicine 2005 等)。したがって、安全で有効なワクチン開発には、自然免疫を標的とせず抗体産生を担う B リンパ球 (B 細胞) の活性化のみを増強するような、新規コンセプトによる免疫増強剤の開発が必要である。

CD22 は、もっぱら B 細胞に発現する膜分子で、Siglec2 ともよばれる Siglec ファミリーの分子である。CD22 は細胞外のレクチンドメインで $\alpha 2, 6$ シアル酸を特異的に結合する。また、細胞内には immuno receptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) があり、B 細胞抗原受容体シグナル伝達を負に制御し、B 細胞の活性化を抑制する。我々は CD22 欠損 B リンパ球で抗体産生が顕著に増強することを示した (Onodera et al. 2008)。さらに我々は、マウスおよびヒト CD22 に天然リガンドの約 1 万倍の高親和性で特異的に結合するシアル酸誘導体 GSC-718 の合成に成功し (Abdu-Allah et al. 2009)、この化合物が B 細胞の活性化を増強するという結果を得ている。CD22 はもっぱら B 細胞に発現するため、CD22 を制御することにより B 細胞の活性化を増強し、抗体産生を増強する化合物を開発できれば、炎症を誘導しない画期的なアジュバントとなると期待される。昨年度は

GSC-718 から合成展開により多数の化合物を合成し、フルオロ基を導入した GSC-780 でより高い抗体産生増強活性を認めるとともに、GSC-718 が B 細胞のトニックシグナルを増強し、TLR リガンドによる活性化を増強することを明らかにした。本年度は、本年度はホモロジーモデリングにより CD22 とシアル酸誘導体の結合様式を予測し、その結果に基づいた化合物の合理的な分子設計を行い、より高活性なシアル酸誘導体の合成を行うとともに、シアル酸誘導体のワクチンアジュバントとしての有用性の評価を行った。

B. 研究方法

1) ホモロジーモデリング

CD22 と同様にシアル酸を認識する受容体ファミリーに属し、CD22 と構造の類似性が予想されるタンパク質で既に結晶構造が報告されているものをテンプレートとし、ホモロジーモデリングにより CD22 リガンド結合ドメインの立体構造を予測した。これをもとに、CD22 阻害剤候補分子との結合様式を予測した。

2) 競合 ELISA によるシアル酸誘導体の CD22 への親和性の測定

GSC-660 は CD22 に IC₅₀ が数 μ M で結合するシアル酸誘導体である (Abdu-Allah et al. 2007)。GSC-660 をビオチン化した化合物 GSC-731 を ELISA プレートに固相化し、種々の濃度のシアル酸誘導体を hCD22Fc または mCD22Fc と混合した溶液を加え、洗浄後に ELISA プレートに結合した CD22Fc をアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (SouthernBiotech) とアルカリホスファターゼ基質溶液 (SIGMA) により検出し、CD22Fc の GSC-731 への結合を 50% 阻害するシアル酸誘導体の濃度を求めた (IC₅₀)。

3) B 細胞増殖の測定

マウス脾臓より精製した B 細胞を、細胞分裂の指標として広く用いられている CFSE

(carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, Molecular Probes) を 2μ M で標識し、 10μ g/ml の抗マウス CD40 抗体 (FGK45) または $10\text{--}20\text{nM}$ の CpG オリゴ (ODN1668、北海道システムサイエンス)、 0.5μ g/ml の LPS (0111, SIGMA) および 50μ M のシアル酸誘導体とともに血清添加 RPMI1640 培地で 72 時間培養した。培養後の CFSE の蛍光をフローサイトメーター (CyAn, Dako) で解析し、分裂した細胞の割合を求めた。

4) アジュバント活性の評価

8 週令の野生型 C57BL/6 マウス (三共ラボサービス (株)) に抗原として 2.5μ g の鶏卵アルブミン (OVA)、または 0.1μ g のインフルエンザ HA 抗原を $10\text{--}100\mu$ g のシアル酸誘導体またはコントロールとして溶媒である PBS、また認可されているアジュバントとして 100μ g の CpG オリゴと共にそれぞれ腹腔内、耳介皮内投与した。14 日後にマウスから採血して血清を回収した。血清中の OVA または HA 抗原特異的 IgG を ELISA により測定した。

5) 感染実験

8 週令の野生型 C57BL/6 マウス (三共ラボサービス (株)) に HA 抗原を単独またはシアル酸誘導体と共に耳介皮内投与した。3 週間後に採血し、血清中の HA 抗原特異的抗体価を ELISA 法により測定した。抗原投与から 4 週間後に、インフルエンザウイルス (influenza A/PR8/34) を経鼻的に感染させ、14 日間、体重減少を指標にして症状の観察を行った。感染から 6 日目、14 日目にマウスを解剖し、肺切片を作製して H&E 染色を行った。また、肺胞洗浄液中の細胞をスライドグラス上に貼り付け、メイグリンワルド液 (武藤化学) で染色した。

倫理面への配慮

本研究の動物実験は、東京医科歯科大学動物実験委員会により承認されたもので、東京医科歯科大学動物実験規則に基づき適切に行なった。また、遺伝子組換え体の使用は、東京医科歯科大学遺伝子組換え生物等実験安全委員会による承認を得て、

必要な拡散防止措置のもとで実施した。

C. 研究成果

1) ホモロジーモデリングによる構造予測と化合物の合理的なデザイン

CD22 と同様にシアル酸を認識する受容体ファミリーに属し、CD22 と構造の類似性が予想されるタンパク質のうち、構造決定がなされている sialoadhesin (PDB ID: 10DA)、Siglec-5 (PDB ID: 2ZG1)、Siglec-7 (PDB ID: 107S) をテンプレート構造とし、ホモロジーモデリングサーバー-SWISS-MODEL により CD22 リガンド結合ドメインの立体構造を予測した。一方で、sialoadhesin と種々の阻害剤との複合体の結晶構造は報告されており、Biphenyl 型阻害剤、Benzyl 型阻害剤との複合体が得られている。2つの阻害剤複合体の構造を重ねて表示することにより、GSC718 の結合様式を類推した。この相互作用様式は、昨年度に STD-NMR 法と TR-NOE 法により得られた阻害剤 (GSC854, GSC718) の相互作用様式をよく説明できる。さらに、CD22 とこれら阻害剤との複合体のモデルを構築した (図 1)。その結果、阻害剤の結合に重要になるアミノ酸残基を推定することができた (W2, Y42, N43, R97, W106, M109, R111)。これらの空間配置を考慮にいれつつ、以下のような

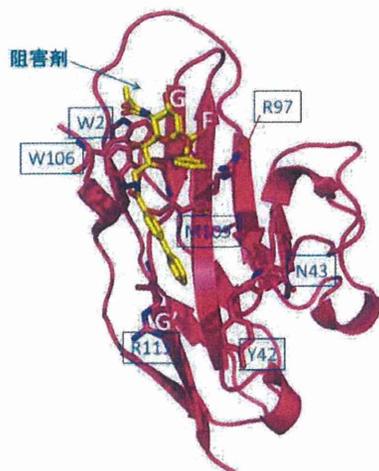


図 1. ホモロジーモデリングによる CD22 とシアル酸誘導体の複合体

高親和性阻害剤のデザインを行った。

- ① シアル酸 5 位へグアニジル基などのカチオン性官能基の導入
- ② フェニル部分の親水基の導入
- ③ ベンジル部分の含窒素芳香環への置換

①はシアル酸の 5 位のアセチル基/グリコシル基が W2, W106 に近いことを考慮し、トリプトファン側の鎖π電子とグアニジル基などによる cation の相互作用を期待した。②については、阻害剤の化合物の水に対する溶解性が低いことから、溶解性を上げることと、ビフェニル部分とタンパク質部分で水素結合が形成されることを想定した。③についても同様に、ピリジンやイミダゾールのような化合物に置換することにより、水素結合がペプチド鎖部分と形成されることを期待した。

2) アグリコンにアミノジエチレングリコール基を導入した類縁体の合成

GSC-780 の特徴的な構造としてアグリコンのベンジル基、5 位のグリコシル基、9 位の 4'-フルオロ-4-ビフェニル基が挙げられる。これまでの研究ではアグリコンや 5 位、9 位の置換基の変換が行われてきており、5 位や 9 位の変換では活性に数百から数千倍以上の差が生じるが、アグリコンの変換における活性の差は数十倍程度しか差が生じないという結果が得られた。そこで本研究では、アグリコンをアミノジエチレングリコール基に変換した GSC-780 類縁体の合成を目指した。このアグリコンを選択した理由は、アミノジエチレングリコール基の親水性により水溶性を向上させることと、アミノ基の高反応性を利用して合成終盤での種々の置換基導入を簡便化することを期待したことにある。また、末端のアミノ基には蛍光色素 (フルオレセイン)、ビオチン基、ジエチレングリコール酸やベンゾイル基を導入し、種々の GSC-780 類縁体 (図 2) の合成を計画した。種々の類縁体は以下の理由で設計した。蛍光色素体は Siglec-2 阻害剤としてマウスの体内に投与した時、Siglec-2 と特異的に相互作用するかを蛍光染色によって確認するためであり、ビオチン体は、

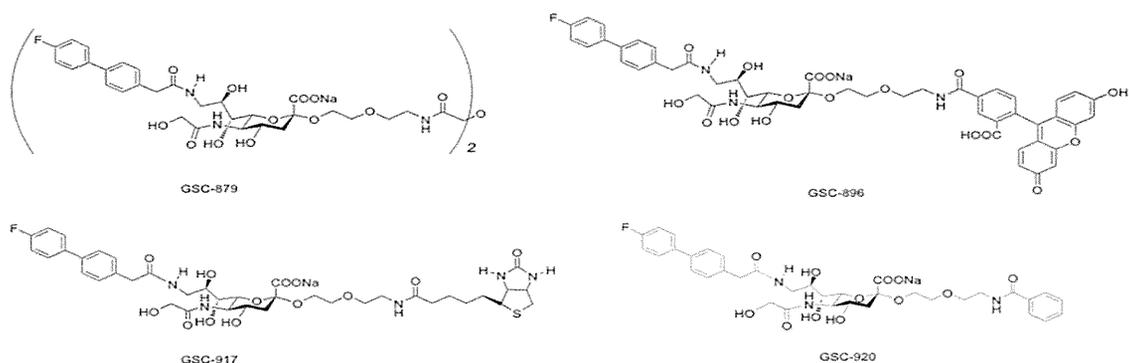


図2。アグリコンにアミノジエチレングリコール基を導入した類縁体

Siglec-2 をアフィニティー分離するために合成することとした。二量体は、Siglec-2 と相互作用し得る置換基が二倍になることで、活性増強に繋がると考えたためであり、ベンゾイル体は芳香環の有無と、その存在位置による活性の影響を検証するために合成した。

3) アグリコンに4-アミノメチルベンジル基を導入した GSC-780 類縁体の合成

前節の結果から、合成したアミノジエチレングリコール型 GSC-780 類縁体はいずれも Siglec-2 阻害活性試験、B 細胞増殖活性試験及びアジュバント活性試験において、活性指標としている GSC-718 より非常に低い活性を有することが示された。また、アグリコンに芳香環を有するベンゾイル体が GSC-718 と比較して十倍以上低い Siglec-2 阻害活性を示したことから、アグリコンの芳香環は結合位

置によって Siglec-2 との相互作用に大きな影響を与えることが示唆された。そこで、アグリコンのベンジル基が活性増強に重要であるかを検証するために、アグリコンに4-アミノメチルベンジル基を導入した GSC-780 類縁体の合成を目指すこととした。これを合成することで、アミノ基の高反応性を利用した合成終盤での種々の置換基導入を簡便化することと、ベンジル基の有用性を検証することができると期待した。また、末端のアミノ基にアセチル基や長さの異なるジエチレングリコール酸を導入した種々の GSC-780 類縁体を設計した (図3)。

4) 5位末端にグアニジル基を有する GSC-780 類縁体の合成

トリプトファンとカチオン- π 相互作用し得るグアニジル基をシアル酸5位に導入することで

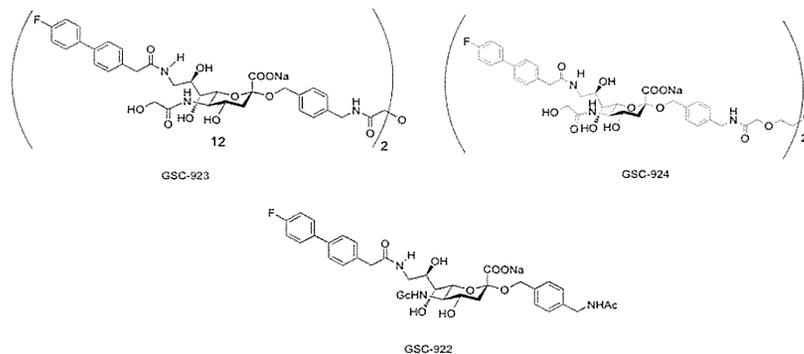


図3。アグリコンに4-アミノメチルベンジル基を導入した GSC-780 類縁体

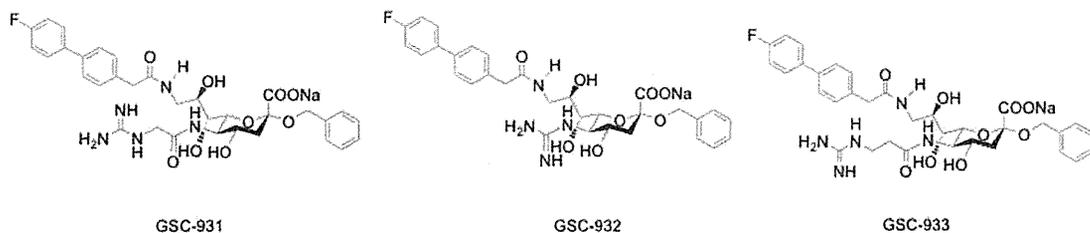


図4。 5位末端にグアニジル基を有する GSC-780 類縁体

Siglec-2 との相互作用を増強できると期待し、グアニジル基の位置が異なる種々の類縁体を設計した。目的物として定めた構造は、5位アミノ基を直接グアニジル化した5位グアニジノ型、2-グアニジノアセトアミド型、3-グアニジノプロパナミド型に加え、グアニジル基の有用性を検証するために用いるグリシン型である（図4）。以上、三種類の5位にグアニジル基を有する GSC-780 類縁体と5位グリシン型 GSC-780 類縁体を合成し、グアニジル基の有用性とグアニジル基の位置による活性の違いを検証することとした。

5) 分子設計により合成したシアル酸誘導体の活性

分子設計によりアミノジエチレングリコール基を導入した GSC879 や、さらに GSC879 にベンジル基を導入した GSC920、GSC879 のダイマーである GSC922、GSC780 のダイマーである GSC924 さらに5

位末端にグアニジル基を有する GSC-780 類縁体 GSC-931~934 など10個の新規化合物の mCD22 への親和性を競合 ELISA 法により測定した。その結果、GSC924、932 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96%、21%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5）。

次いで、精製したマウス脾臓B細胞をCFSEでラベルした後に、これらの化合物と抗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の希釈度によって解析した。GSC-718 よりも親和性が低い化合物 GSC879、920、923、931、933、934（IC50 が1μM以上）ではB細胞増殖活性化が顕著に低下していた。一方、GSC-718 よりも親和性の高い GSC924 および GSC932 のB細胞の増殖は GSC718 と同程度であった（図5）。

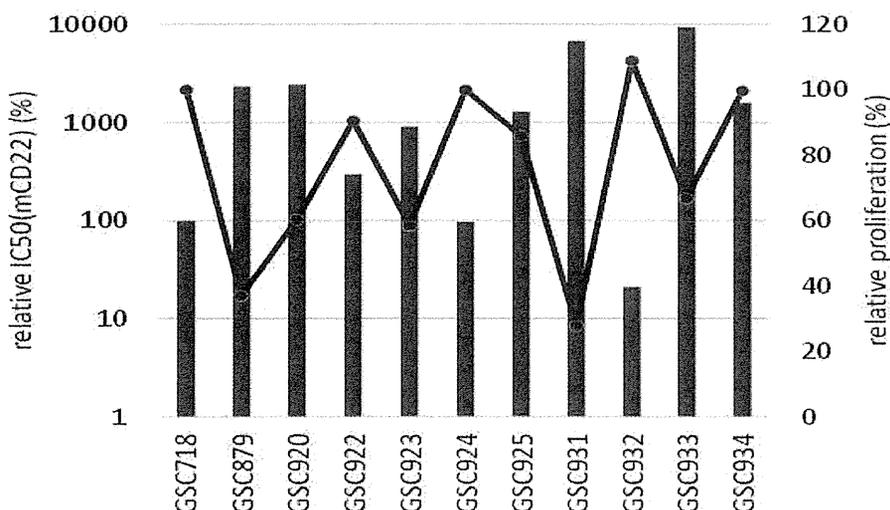


図5。新規合成シアル酸誘導体の CD22 親和性（棒グラフ）と B 細胞増殖効果（折線グラフ）

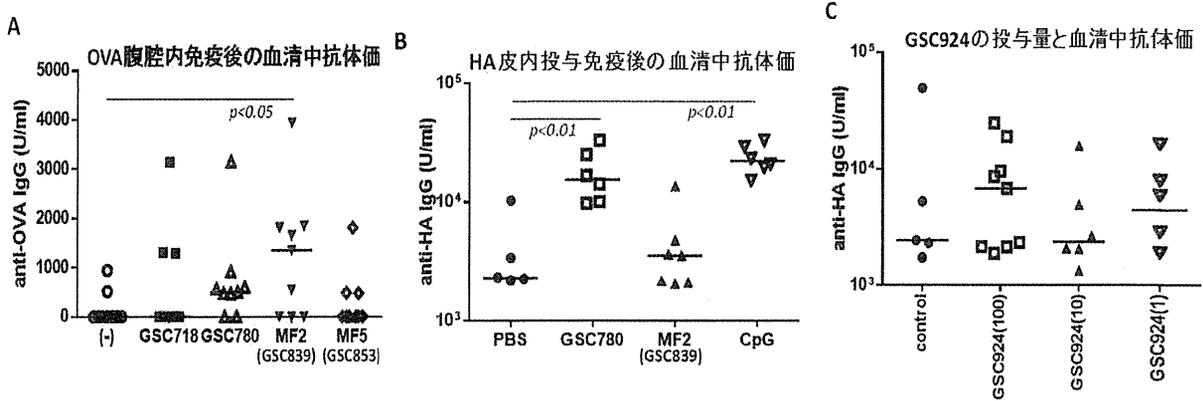


図6. 合成シアル酸誘導体のアジュバント効果 A : OVA 腹腔内免疫、B, C : インフルエンザ HA 抗原皮内免疫後 2 週間の血清中抗体価

昨年度合成展開により得られた GSC718 の類縁体 16 化合物のうち CD22 への親和性が比較的高い GSC839 と GSC853 および今年度合成し、GSC718 よりも親和性が增強していた GSC924 を OVA とともにマウスの腹腔内に投与したところ、GSC839 で強い抗体産生増強効果があった (図 6A)。また、インフルエンザワクチン用抗原 (HA 抗原) を皮内投与し、化合物のアジュバント効果を比較したところ、GSC780 が最も強い活性を示し (図 6B)、CpG オリゴと同等のアジュバント効果を示した。また、ダイマーである GSC924 は、投与量を減じてもアジュバント効果が維持されていた (図 6C)。

6) CD22 結合シアル酸誘導体による免疫記憶の誘導 GSC718, GSC780 をアジュバントとして OVA を腹腔

内投与したところ、投与から 2 週間後に GSC780 群で有意な OVA 特異的抗体価の上昇が認められた。さらに、5 週間後に抗原を投与したところ、その 1 週間後には 1 桁以上の抗体価の上昇が認められ、記憶応答が誘導されていることが確認された。

7) CD22 結合シアル酸誘導体をアジュバントとして用いたワクチンの感染防御効果

GSC780 とインフルエンザ HA 抗原をマウスに接種し、3 週間後に血清中の抗 HA 特異的抗体価を測定したところ、GSC780 投与群で有意に高い HA 特異的抗体産生が認められた (図 7A)。HA 抗原接種から 4 週間後にインフルエンザウイルス感染を行った。HA 抗原のみを接種したマウス群では、10 匹中 2 匹が感染から約 1 週間後に死亡し、多くのマウスで顕著な

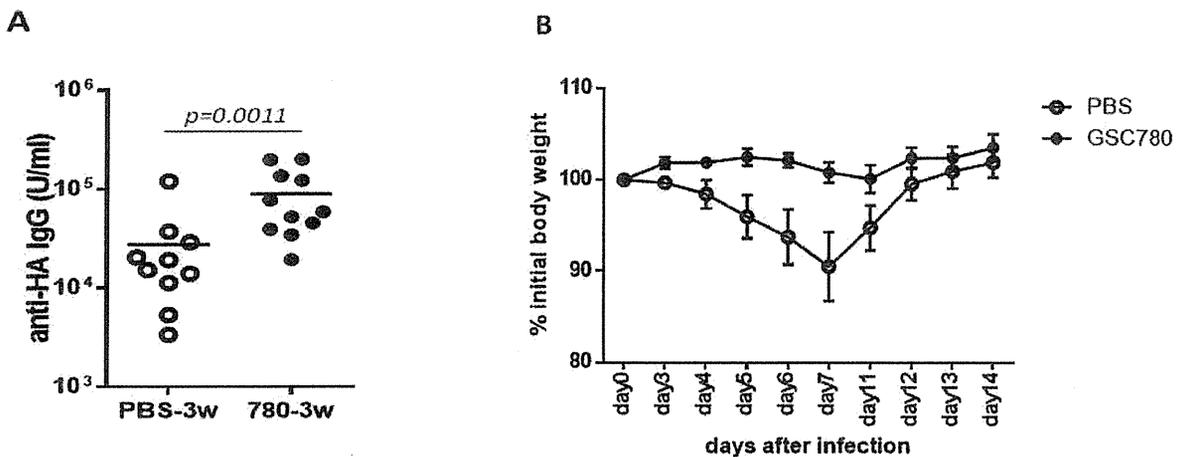


図7 インフルエンザウイルス感染実験 A : 感染 1 週間前 (ワクチン接種 3 週間後) の血清中抗ウイルス抗体価、B : 感染後の体重変化

体重減少を認めた。一方、HA 抗原を GSC780 とともに接種しマウス群では、感染に伴う体重減少がほとんど認められなかった (図 7B)。肺の切片を観察したところ、GSC780 投与群で炎症が少ないことが認められた。

8) CD22 結合シアル酸誘導体による B リンパ球活性化のメカニズム

昨年度までの GSC718 の作用メカニズムの解析により、GSC718 が BCR 架橋時に CD22 の抑制機能を増強して BCR シグナル伝達を負に制御するが、無刺激時のシグナルレベルであるトニックシグナルを増強し、LPS や CpG オリゴなどの TLR リガンドによる B 細胞の活性化を増強することを明らかにした。本年度は、シアル酸誘導体による B 細胞の活性化メカニズムを明らかにするため、リガンドを欠損する ST6GalII 欠損マウス B 細胞を用いて検討を行った。その結果、ST6GalII 欠損マウス B 細胞では野生型 B 細胞に比べて TLR リガンドによる活性化が増強していたが、GSC718 により B 細胞活性化はさらに増強した。また、GSC718 の単独投与により ST6GalII 欠損マウス B 細胞のカルシウムイオン濃度が若干増強した。一方で、ST6GalII 欠損マウス B 細胞では野生型 B 細胞

とは異なり GSC718 は BCR 架橋によるカルシウムイオン濃度の変化 BCR シグナル伝達には影響を与えなかった (図 8)。

D. 考察

昨年度までに CD22 に高親和性に結合するシアル酸誘導体 GSC718 および GSC780 が抗体産生増強作用を有することを明らかにしたが、本年度は、CD22 とこれらシアル酸誘導体の結合についてのホモロジーモデリングを行い、CD22 により親和性の高い化合物のデザインを行った。また、アグリコンにアミノジエチレングリコール基を導入し、ダイマーを合成するなど、分子設計に基づくシアル酸誘導体の合成を進めた。これらの化合物の活性を、CD22 への親和性、B 細胞活性化、抗体産生増強などで測定したところ、シアル酸の 5 位にグアニジル基を導入した GSC932 で GSC718 に比べて CD22 への親和性が約 5 倍高いことが明らかとなり、ホモロジーモデリングによる合理的な化合物デザインが有用であることを示している。また、GSC780 のダイマーである GSC924 では、GSC780 より少ない量で抗体産生増強作用を発揮することを明らかにするなど、高活性の化合物の合成

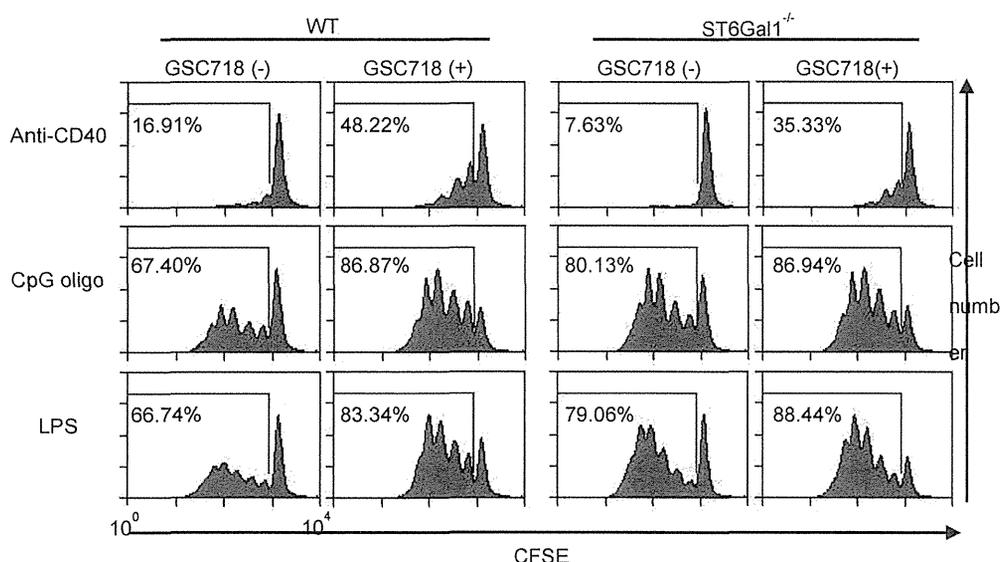


図 8 CD22 の糖鎖リガンド欠損 B 細胞を用いたシアル酸誘導体の作用メカニズムの解析 正常 C57BL/6 マウスおよび CD22 の糖鎖リガンドを欠損する ST6GalII 欠損マウス B 細胞を CFSE で染色後、記載の試薬とともに 72 時間培養し、細胞増殖を FCM で測定した。

に成功した。GSC932 は水に難溶性のため個体レベルでのアジュバント活性を測定することができなかった。現在、親水基を導入して可溶化をはかっている。

また、昨年度までに GSC780 を抗原とともに投与した際に抗体産生を増強することを示していたが、本年度は、GSC780 を抗原と投与して抗体産生を誘導し、4 週後に再度抗原を投与して 2 次応答を観察したところ、GSC780 投与群では二次応答も増強していることが明らかとなった。この結果は、GSC780 が免疫記憶も増強することを示している。さらに、GSC780 をインフルエンザウイルス HA 抗原とともにマウスに接種し、その後インフルエンザウイルスの感染を行うと、GSC780 とともに HA 抗原を接種した群では、HA 抗原のみを接種した群に比べ優位に症状や病変が軽く、GSC780 をワクチンアジュバントとして用いた際に、感染防御効果があることが明らかとなった。GSC780 は記憶応答を増強し、ウイルス抗原とともに投与することで感染防御作用があることが明らかとなり、ワクチンのアジュバントとして有用であることが示された。

昨年度 GSC718 が BCR 架橋時のシグナル伝達を減弱させるが、GSC718 単独で B 細胞のカルシウムイオン濃度を上昇させることからトニックシグナルを増強すること、また、LPS や CpG オリゴなどの TLR リガンドによる B 細胞の活性化を増強することを明らかにした。GSC718 は BCR 架橋時のシグナル伝達を減弱させるが、超低親和性抗原でも抗体産生が誘導されるという知見があることから、BCR 架橋時のシグナル減弱は抗体産生には大きな影響は与えないと考えられる。一方、TLR が抗体応答で重要であることが示されているので、TLR 応答の増強がシアル酸誘導体による抗体産生増強に関与すると考えられる。また昨年度 GSC718 によるトニックシグナルの増強や TLR リガンド応答の増強が CD22 欠損 B 細胞ではおこらないことを示し、GSC718 が CD22 の抑制機能を解除することにより、B 細胞の活性化を増強することを明らかにした。CD22 は同じ B 細胞が発現する糖鎖リガンド $\alpha 2,6$ シアル酸 (シスリガンド) と結合していることが示されている。したがって、GSC718 が CD22 とシスリガンドの反応を阻害し、シスリガンド

による CD22 の制御を解除することにより CD22 の機能を制御することが想定された。今回、CD22 の糖鎖リガンドである $\alpha 2,6$ シアル酸を欠損する ST6GalI 欠損 B 細胞では、TLR リガンドへの反応性が増強していることを示したが、この知見はシスリガンドによる CD22 の制御を GSC718 が解除することにより B 細胞の活性化を増強することを支持している。一方、GSC718 が ST6GalI 欠損 B 細胞の TLR リガンドによる活性化をさらに増強させることから、GSC718 がシスリガンドとは無関係に CD22 を制御し、B 細胞を活性化する経路もあることが明らかである。したがって、GSC718 はシスリガンドによる CD22 制御を解除するとともに、直接 CD22 に作用してその機能を抑制し、この両方のメカニズムにより B 細胞の活性化を増強することが明らかとなった。

E. 結論

より強力に CD22 を制御して B 細胞を活性化するシアル酸誘導体を開発するために、ホモロジーモデリングにより CD22 とシアル酸誘導体の結合様式を予測し、その予測などに基づき化合物の合理的なデザインを行った。実際に既存のシアル酸誘導体 GSC718 に比べより高親和性に CD22 に結合する化合物やより低濃度で抗体産生増強作用を持つ化合物を合成することができた。さらに、シアル酸誘導体が免疫記憶を増強し、ウイルス抗原とともに投与することで感染防御効果を増強することから、ワクチンアジュバントとして有用であることが明らかとなった。

F. 研究発表

原著論文

1. 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.
2. Suzuki, T., Makyio, H., Ando, H., Komura, N., Menjo, M., Yamada, Y., Imamura, A., Ishida, H., Wakatsuki, S., Kato, R. and Kiso, M. (2014): Expanded potential of seleno-carbohydrates as a molecular tool for X-ray structural determination of a carbohydrate-protein complex with single/multi-wavelength anomalous dispersion phasing. *Bioorg. Med. Chem.* 22: 2090-2101.
 3. Suzuki, T., Komura, N., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M. (2014): A facile method for synthesizing selenoglycosides based on selenium-transfer to glycosyl imidate. *Tetrahedron Lett.* 55: 1920-1923.
 4. Kudo, T., Ishizawa, M., Maekawa, K., Nakabayashi, M., Watarai, Y., Uchida, H., Tokiwa, H., Ikura, T., Ito, N., Makishima, M. and Yamada, S. (2014): Combination of triple bond and adamantane ring on the vitamin D side chain produced partial agonists for vitamin D receptor. *J. Med. Chem.*, 57: 4073-4087
- ligand in B lymphocyte activation. Joint annual meeting of SFG & JSCR, Integrating Glycoscience from Biology and Chemistry to Medicine. November 16-19, 2014. Honolulu, Hawaii (USA)
2. Tsubata, T.: CD22-binding synthetic sialosides as a tool to elucidate the role of CD22 cis-ligand and as a novel immunostimulant. Medical Research Institute 40th Anniversary, 13th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium. November 28, 2014. Tokyo.
 3. Tsubata, T.: Synthetic sialosides that regulate CD22/Siglec-2, a B lymphocyte membrane molecule activating SH2-containing phosphatases. 11th International Conference on Protein Phosphatase, November 12-14, 2014. Sendai.
 4. Ishida, H.: Chemical Synthesis of Sialoglycosphingolipids, *Frontiers in Chemical Sciences*. December 4-6, 2014, Indian Institute of Technology Guwahati, India.
 5. Ishida, H., Imamura, A., Ando, H., Kiso, M.: Chemical synthesis of neuritegenic gangliosides from echinoderms. *Sialoglyco2014*, September 6-12, 2014, The Institute for Glycomics, Griffith University at the Gold Coast, Australia.

総説

1. Hanashima, S. and Yamaguchi, Y. (2014): Indirect detection of hydroxy proton exchange through deuterium-induced ¹³C-NMR isotope shifts. *Glycoscience: Biology and Medicine*, Volume1: 129-135
2. Yamaguchi, Y., Yamaguchi, T., and Kato, K. (2014): Structural Analysis of oligosaccharides and glycoconjugates using NMR, *Advances in Neurobiology*, 9: 165-183

学会発表

(国際)

招待講演

1. Tsubata, T.: Role of CD22/Siglec2 and its

(国内)

招待講演

1. 鏝田武志「Bリンパ球に発現するCD22/Siglec-2を標的とした免疫増強化合物の開発」第8回次世代アジュバント研究会、2015年1月20日、大阪
2. 鏝田武志「シアル酸誘導体による炎症を伴わない免疫応答の増強とそのメカニズム」第12回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 2014年

12月4日-5日、東京

- 山口芳樹「糖鎖のタンパク質による認識—構造生物学によるアプローチ」第12回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム2014年12月4日-5日、東京
- 石田秀治「科学的アプローチによる動物レクチンの機能解析」第12回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム2014年12月4日-5日、東京

一般

(国際)

- Numoto, N., Nakagawa, T., Kita, A., Ito, N., Fukumori, Y. and Miki, K.: Partial oxygen-dissociation of crystalline giant hemoglobin. Twenty-Third Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography. August 6-7, 2014. Montreal.

(国内)

- Kurukaruni, M. R., Elahi, M., Islamu, M. M., Ito, N., Numoto, N. and Kuroda, Y.: Epitope-grafted mutants provide molecular insights into sero-specific interactions of Dengue's ED3 with its monoclonal antibody. 第14回日本蛋白質科学会年会、2014年6月25日、横浜
- 品川健朗、沼本修好、鏑田武志、伊藤暢聡、「B細胞共受容体CD72のC型レクチン様ドメインのX線結晶構造解析」第52回日本生物物理学会、2014年9月25日-27日、札幌
- Matsubara, N., Takematsu, H. and Tsubata, T.: Synthetic sialosides that bind to CD22 with nanomolar potency activate B lymphocytes. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2014. December 10-12, 2014. Kyoto.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
該当なし。
- 実用新案登録
該当なし。
- その他
該当なし。

H. 健康危険情報

特記すべきことはなかった。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
（分担）研究報告書

CD22 と阻害剤の相互作用に関する研究

研究分担者 山口 芳樹 理化学研究所・チームリーダー

研究要旨

CD22 と相同性を有するマウス Sialoadhesin をベースにした疑似 CD22 分子を発現・精製し、そのタンパク質が CD22 阻害剤と結合することを化学シフト摂動法により確認した。さらに CD22 のホモロジーモデリングを行い、CD22 阻害剤との複合体モデルを構築することにより、高親和性 CD22 阻害剤の合理的デザインを行った。

A. 研究目的

CD22 の阻害剤開発には、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が必須である。核磁気共鳴（NMR）法は水溶液中におけるタンパク質の立体構造や運動性、リガンドとの相互作用に関する原子レベルの情報をもたらす。我々はこれまで NMR を用いた糖鎖関連分子の相互作用解析を行ってきた経験をもち、糖鎖認識分子の相互作用様式を調べるための基盤が整っている。

これまでシグレックファミリーの糖結合ドメインは Siglec-1(sialoadhesin), Siglec-5, Siglec-9 において X 線結晶構造が報告されている。しかしながら我々が対象としている Siglec-2(CD22)においては未だ立体構造情報が得られていない。CD22 の構造解析が進んでいない要因の一つとして CD22 の糖結合ドメインを組み換えタンパク質として大量に発現することの困難さがあると思われる。

本年度では、ヒトおよびマウス由来の CD22 の構造解析を指向した大腸菌の大量発現系の構築の検討を行った。また、CD22 とアミノ酸配列において相同性があり、既に結晶構造が解かれている sialoadhesin をベースにして、変異を施し CD22 様分子（疑似 CD22 分子）を作成して阻害剤との相互作用解析を実施した。さらに、CD22 の糖結合ドメインのホモロジーモデリ

ングを行い、CD22 阻害剤との複合体モデルの構築を構築して高親和性の阻害剤のデザインを試みた。

B. 研究方法

ヒトおよびマウス CD22 の大腸菌による大量発現の検討

以下の 7 つの遺伝子を pCold ベクターに組み込み、大腸菌に transformation 後、可溶性発現もしくは封入体からの巻き戻しによりタンパク質を調製した。

- (1) GB1-hCD22 (V-set)
- (2) hCD22 (V-set)-GB1
- (3) hCD22 (V-set)-T4L insertion
- (4) GB1-hCD22 (V-set)-GB1
- (5) mCD22 (V-set)
- (6) GB1-hCD22 (V-set, N->D)-GB1
- (7) hCD22 (V-set+C2-set)

GB1: protein G B1 domain

hCD22: human CD22

mCD22: mouse CD22

T4L: T4 lysozyme

N->D: N 型糖鎖付加部位に存在する N を D に置換したもの。CD22 の遺伝子は東京医科歯科大学・鏑田武志教授・伊藤教授より恵与していただいた。

可溶性画分あるいは封入体の可溶性・巻き戻しにより得られた画分を Ni sepharose で精製し、ゲル濾過

カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。可溶性タグを付加した場合は TEV protease による切断・除去を行った。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる溶出時間からタンパク質の会合状態を見積もった。タンパク質のフォールディング・リガンド結合能の確認はサーマルシフトアッセイ、¹H-NMR 測定により行った。リガンドとして用いたシアル酸誘導体は化学合成法により得られたものを用いた。合成化合物は岐阜大学・石田秀治教授より恵与していただいた。

sialoadhesin をベースにした疑似 CD22 分子の作成

マウス sialoadhesin D1 ドメイン (C36S)、ヒト CD22 様分子 (C36S, S122T, R124K, L126M, V128K)、マウス CD22 様分子 (C36S, Y63F, S122T, L126M, V128P)、ヒト CD22-sialoadhesin キメラ (A, F, G strand と F-G loop を human CD22 の配列にし、残りを sialoadhesin の配列とした)、siglec-4a (Myelin-associated glycoprotein, MAG) の 5 つのコストラクトを作成した。これら遺伝子を pCold ベクターに組み込み、大腸菌に transformation 後、可溶性発現よりタンパク質を調製した。可溶性タグを TEV protease で切断・除去して、ゲル濾過クロマトグラフィーにより目的タンパク質を得た。タンパク質のフォールディング・リガンド結合能の確認は ¹H-NMR 測定により行った。2D ¹H-¹⁵N HSQC 測定を行うときは、アミノ酸選択的に ¹⁵N 標識を施した試料を調製した。一部のシグナルの帰属は ¹³C/¹⁵N 2重標識法およびスペクトルの比較により行った。

溶液 NMR 測定

NMR 測定は TXI cryogenic probe を装着した DRX-500 (BrukerBioSpin) もしくは TXI probe を装着した DRX-600 (BrukerBioSpin) を用いて行った。

ホモロジーモデリング・複合体モデルの構築

ホモロジーモデリングは RaptorX を用いた (Nature Protocols, 7, 1511-1522, 2012)。複数の鋳型を用い、以下の座標を用いた (PDB ID 1od7A, 1nkoA, 3wuzA,

4jkwA, 2zg2A)。阻害剤の情報は sialoadhesin とシアル酸誘導体の複合体の結晶構造から得た (Zaccai et al. Structure 11, 557-567, 2003; Zaccai et al. J. Mol. Biol. 365, 1469-1479, 2007)。Sialoadhesin と CD22 のモデルをスーパーインポーズすることにより、CD22 モデルと阻害剤との疑似的な複合体モデルを構築した。立体構造は PyMol を用いて図示した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究成果

ヒトおよびマウス CD22 の大腸菌による大量発現の検討

研究方法に記載した 7 つのコストラクトについて発現を検討した。しかしながら、いずれの系においてもゲル濾過の溶出時間から大半は可溶性のオリゴマーを形成しており、単量体に相当するフラクションは得られたとしても非常にわずかであった。GB1 タグを融合させることにより可溶性は向上することが判明したが、CD22 部分のフォールディングは正しく行われていないことが判明した。昨年度の哺乳細胞を用いた検討結果より、hCD22 のドメイン 1-2 では N-結合型糖鎖の修飾が行われていることが明らかになっているため、大腸菌発現系で正しくフォールドしたタンパク質が得られない一つの原因として、N-結合糖鎖修飾が正しい立体構造形成をする際に必要である可能性が示された。

sialoadhesin をベースにした疑似 CD22 分子の作成

sialoadhesin と CD22 のアミノ酸配列を比較したところ、mouse sialoadhesin と human CD22 のアミノ酸同一性は 22%、mouse CD22 との同一性は 23% であった (V-set domain)。Sialoadhesin と CD22 を比較すると配列相同性は高くないが、イムノグロブリンフォールドの形成に重要なアミノ酸残基やシアル酸との結合に直接関わる重要な残基はよく保存されていることがわかる (Zaccai et al. Structure 11, 557-567,

2003)。特にシアル酸結合部位付近 (C-9付近) では、human CD22とmouse CD22で2残基のみ異なる。このことから、sialoadhesinをベースにしてシアル酸残基の結合に関わるアミノ酸残基をhuman CD22, mouse CD22のアミノ酸に置換すれば、human CD22やmouse CD22のようなリガンド結合特性を備えた言わば“CD22様分子” (疑似CD22分子) の作成ができると考えた。

そこで研究方法に記載した5つのコンストラクトについて大腸菌による可溶性発現を試みた。ヒトCD22-sialoadhesinキメラの系およびsiglec-4a (MAG)は正しく立体構造を形成したタンパク質を得ることができなかったが、マウスsialoadhesin D1ドメイン、ヒトCD22様分子、マウスCD22様分子の3つについては、正しく立体構造を維持したタンパク質を単量体にて得ることに成功した。

疑似CD22分子と阻害剤との相互作用解析

Sialoadhesin、human CD22様分子、mouse CD22様分子と阻害剤との結合を調べるために、¹H-NMRスペクトルによる滴定実験を行った (図1)。阻害剤Xを滴定した結果、sialoadhesinは10.5 ppm付近に由来するシグナルにわずかに化学シフト変化が認められた。

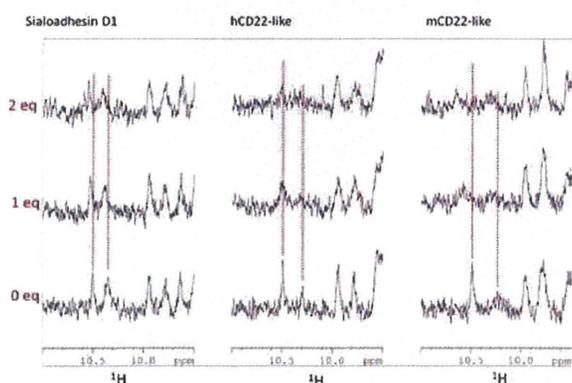
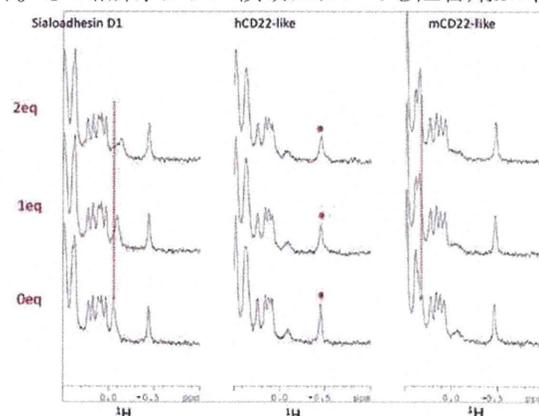


図1 ¹H-NMRスペクトルによる阻害剤Xの滴定実験 (トリプトファンの側鎖NH領域)。Sialoadhesin D1 (左)、human CD22様分子 (中央)、mouse CD22様分子 (右) を示している。阻害剤Xをタンパク質に対して、0等量 (下段)、1等量 (中段)、2等量加えている。

一方で、human CD22様分子、mouse CD22様分子では、同じシグナルにおいて大きな化学シフト変化およびシグナルの広幅化が観測された。10.5 ppmに観測されているシグナルは3つのタンパク質において共通して観測されていることから、同一アミノ酸残基の同一部分に由来すると考えられる。これらのことから、sialoadhesinは阻害剤Xと弱く結合するが、human CD22様分子やmouse CD22様分子はsialoadhesinよりも強く阻害剤Xと結合することが予想された。

他のスペクトル領域においても解析を行った (図2)。その結果、メチル領域においても阻害剤Xの滴定



に伴うシグナルの化学シフト変化、広幅化が観測された。特に-0.5 ppm近傍に位置するシグナルは3つのタンパク質において共通してみられることから、同一アミノ酸残基の同一部分に由来すると考えられるが、阻害剤Xを添加することによりhuman CD22様分子の場合のみ、線幅の広幅化が観測された。これらの実験は、3者において、阻害剤Xに対する結合の親和性、結合様式が異なることが考えられた。特にhuman CD22様分子、mouse CD22様分子を作成するにあたり、導入した変異箇所がこれらの性状を規定していると言える。

図2 ¹H-NMRスペクトルによる阻害剤Xの滴定実験 (メチル領域を示している)。実験・図のアレンジは図1と同じ。

阻害剤との相互作用解析においてタンパク質側の情報を得るために、アミノ酸選択的に標識したタンパク質試料を調製した。標識するアミノ酸残基として阻害剤結合に重要と思われるアルギニンおよびトリプ

トファンを選択した。 ^{15}N -arginine および ^{15}N -tryptophan を含む培地で大腸菌を培養後、タンパク質を精製することにより ^{15}N 標識を施したタンパク質を得た (図 3)。

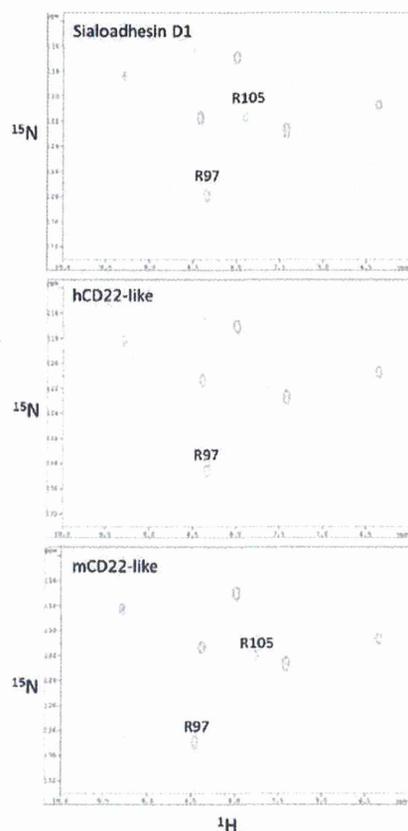


図 3 Arg 残基を ^{15}N 標識したタンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。Sialoadhesin (上段)、human CD22 様分子 (中段)、mouse CD22 様分子 (下段)。阻害剤 X 添加前 (黒)、2 等量添加後 (赤) のスペクトルを重ねて表示している。

スペクトル中に観測されたシグナルの個数から Arg 残基は ^{15}N 標識されたが、トリプトファン残基は標識されていないことが判明した。おそらくは大腸菌で長時間の培養中にトリプトファンが生合成されたためと考えられる。

阻害剤 X を滴定した結果、いずれの場合においても R97 に由来するシグナルにおいて化学シフトが観測された。興味深いことに滴定により変化する程度や方向が異なることが判明した。このことは、阻害剤 X はこれらのタンパク質に結合はするが、その結合様式

は若干異なることが示唆された。また R105 は sialoadhesin, mouse CD22 様分子のみに観測されているが (human CD22 様分子では該当箇所が Lys となっている)、いずれのタンパク質においても阻害剤 X の添加に伴い、シグナルの広幅化が観察された。このことは R105 が阻害剤結合に深く関わっていることを示唆している。

以上より、疑似 CD22 分子は sialoadhesin にはない CD22 の性質をある程度備えており、相互作用解析に有用であることが示唆された。特に変異を導入した部分はリガンド結合の特異性・相互作用様式に少なからず影響を与えていることが判明した。

ホモロジーモデリング・複合体モデルの構築

現時点で CD22 の立体構造に関する情報が得られていないため、CD22 の V-set ドメインのホモロジーモデリングを行った。CD22 のホモロジーモデルと sialoadhesin の結晶構造を重ねた図を図 4 に示す。

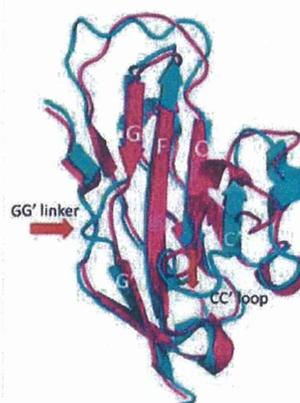


図 4 CD22 のホモロジーモデル (ピンク)。Sialoadhesin の結晶構造 (シアン) を重ねて表示。Sialoadhesin の結晶構造と比較したところ、CD22 のモデルの特徴として strand G と strand G' をつなぐ領域 (GG' linker) が短い、strand C の終わりから strand C' までの領域 (CC' loop) が鋳型と大きく異なることが明らかになった。しかし、loop 部分の構造は用いる鋳型によって大きく影響されるので解釈には注意を要する。

一方で、sialoadhesin と種々の阻害剤との複合体

の結晶構造は報告されており、Biphenyl 型阻害剤、Benzyl 型阻害剤との複合体が得られている。2つの阻害剤複合体の構造を重ねて表示することにより、阻害剤 X の結合様式を類推した (図5)。

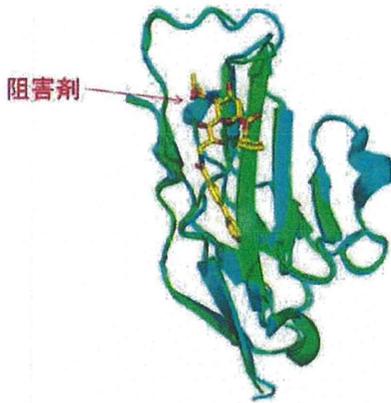


図5 biphenyl 型阻害剤の複合体 (緑) と benzyl 型阻害剤の複合体 (シアン) の重ねあわせ (sialoadhesin)。

図5から阻害剤 X、Y の結合様式を類推することができた。この相互作用様式は、昨年度に STD-NMR 法と TR-NOE 法により得られた阻害剤 X、Y の相互作用様式をよく説明できる。さらに、CD22 とこれら阻害剤との複合体のモデルの構築を試みた (図6)。

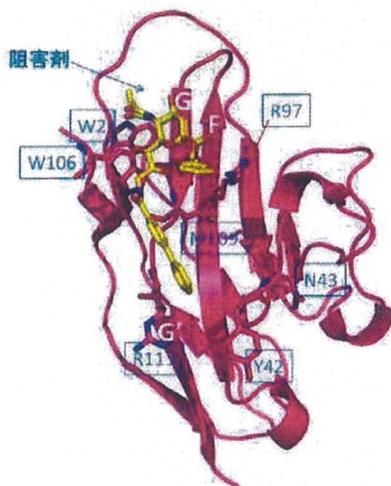


図6 biphenyl 型阻害剤 (黄色) および benzyl 型阻害剤 (黄色) と CD22 モデルとの複合体モデル (ピンク)。複合体モデルから阻害剤結合に重要になると思われるアミノ酸残基を示した。

その結果、阻害剤の結合に重要になるアミノ酸残基を推定することができた (W2, Y42, N43, R97, W106, M109, R111)。これらの空間配置を考慮にいれつつ、高親和性阻害剤のデザインを試みた。その結果、

- 1) シアル酸 5 位へカチオン性官能基の導入
- 2) ビフェニル部分の親水基の導入
- 3) ベンジル部分の含窒素芳香環への置換

の3つを提案した。1)はシアル酸の5位のアセチル基/グリコシル基が W2, W106 に近いことを考慮し、トリプトファン側の側鎖 π 電子とグアニジル基などによる cation の相互作用を期待した。2)については、阻害剤の化合物の水に対する溶解性が低いことから、溶解性を上げることと、ビフェニル部分とタンパク質部分で水素結合が形成されることを想定した。3)についても同様に、ピリジンやイミダゾールのような化合物に置換することにより、水素結合がペプチド鎖部分と形成されることを期待した。現在これらの点を考慮した阻害剤は合成中であるが、一部はすでに合成完了しておりアッセイが進行している。

D. 考察

CD22 の大腸菌による発現系はこれまで試した限りでは成功しなかった。考えられる可能性として、CD22 の立体構造形成に糖鎖が必要であることである。Sgroi らは CD22 の V-set ドメインに存在する Asn101 に結合している糖鎖をなくすと細胞接着活性が喪失することを報告している (Sgroi et al. J. Biol. Chem. 271, 18803-18809, 1996)。このことは、この糖鎖が CD22 のコンフォメーションの維持に重要であることを示唆している。今後は、哺乳細胞を用いた CD22 の大量発現系を構築するとともに、糖鎖の立体構造・活性に果たす役割を調査する。

Sialoadhesin をベースにして疑似 CD22 分子を作成し、阻害剤との相互作用を確認することができた。このことは疑似 CD22 分子が CD22 のもつ性質をある程度反映しており、阻害剤との相互作用解析のツールとして使える可能性を示した。今後は CD22 そのものの発現系構築を行うとともに、その進捗状況を踏まえつつ、

疑似 CD22 分子を用いた相互作用解析を行う。

CD22 と阻害剤の複合体モデルを構築することにより、阻害剤結合に重要なアミノ酸残基を示すことができた。今後はこれらのアミノ酸残基に着目して阻害剤とタンパク質部分との分子間 NOE の観測、部位特異変異実験などを行い、阻害剤の親和性獲得機構を明らかにしていく予定である。

E. 結論

Sialoadhesin をベースにした疑似 CD22 分子を調製することにより、そのタンパク質が CD22 阻害剤と結合することを明らかにした。さらに CD22 のホモロジーモデリング・複合体モデルを構築することにより、高親和性 CD22 阻害剤の合理的デザインを行うことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Shinya Hanashima, Akemi Ikeda, Hiroshi Tanaka, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno, Takashi Takahashi, and Yoshiki Yamaguchi
Glycoconj J., 31(3), 199-207 (2014)
NMR study of short β (1,3)-glucans provides insights into the structure and interaction with Dectin-1
- (2) Masamichi Nagae, Akemi Ikeda, Yu Kitago, Y, Naoki Matsumoto, Kazuo Yamamoto, and Yoshiki Yamaguchi
Proteins, 82(7), 1512-8 (2014)
Crystal structures of carbohydrate recognition domain of Blood Dendritic Cell Antigen-2 (BDCA2) reveal a common domain-swapped dimer.
- (3) Masamichi Nagae, Keisuke Soga, Kana Morita-Matsumoto, Shinya Hanashima, Akemi Ikeda, Kazuo Yamamoto, and Yoshiki Yamaguchi
Glycobiology, 24(4), 368-78 (2014)
Phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) displays a novel glycan recognition mode using a common legume lectin fold
- (4) Masamichi Nagae, Kana Morita-Matsumoto, Seisuke Arai, Ikuo Wada, Yuka Matsumoto, Kiyoshi Saito, Yasuhiro Hashimoto, and Yoshiki Yamaguchi
Glycobiology, 24(8), 693-702 (2014)
Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin

- (5) Mayumi Kanagawa, Yan Liu, Shinya Hanashima, Akemi Ikeda, Wengang Chai, Yukiko Nakano, Kyoko Kojima-Aikawa, Ten Feizi, and Yoshiki Yamaguchi
J Biol Chem., 289(24), 16954-65 (2014)
Structural Basis for Multiple Sugar Recognition of Jacalin-Related Human ZG16p Lectin
- (6) Shinya Hanashima, Hiroaki Korekane, Naoyuki Taniguchi, and Yoshiki Yamaguchi
Bioorg Med Chem Lett., 24(18), 4533-7 (2014)
Synthesis of N-glycan units for assessment of substrate structural requirements of N-acetylglucosaminyltransferase III
- (7) Masamichi Nagae, Kana Morita-Matsumoto, Masaki Kato, Mika Kato Kaneko, Yukinari Kato, and Yoshiki Yamaguchi
Structure, 22(12), 1711-21 (2014)
A Platform of C-type Lectin-like Receptor CLEC-2 for Binding O-Glycosylated Podoplanin and Nonglycosylated Rhodocytin

2. 学会発表

- (1) 山口 芳樹
NMR を用いた硫酸化糖鎖の構造解析
硫酸化糖鎖創薬研究会 (セミナー)
2014 年 4 月 16 日 (徳島市)
- (2) Yoshiki Yamaguchi
H/D exchange : Applications in NMR and MS
H/D 交換測定法 : NMR と MS におけるアプリケーション
第 5 回生体分子相互作用解析フォーラム HDX-MS
ワークショップ
2014 年 4 月 22 日 (吹田市)
- (3) Masamichi Nagae, Keisuke Soga, Kana Morita-Matsumoto, Shinya Hanashima, Akemi Ikeda, Kazuo Yamamoto and Yoshiki Yamaguchi
The effect of bisecting GlcNAc is indirect on binding to PHA-E lectin: A possible role for conformer selection
RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology
3rd Annual Symposium
2014 年 5 月 21 日~24 日 (Kreuth, Germany)
- (4) 山口芳樹
糖鎖構造生物学における未解明問題への取り組み
(Our approach toward unsolved issues in structural glycobiology)
NIRF プロジェクト第 7 回研究会 (セミナー)
2014 年 8 月 30 日 (千代田区)
- (5) 山口芳樹
糖鎖の立体構造・ダイナミクスと相互作用 : その機能発現メカニズム
第 87 回日本生化学会大会シンポジウム

2014年10月15日-18日（京都市）

- (6) 山口芳樹
糖鎖の構造と相互作用：構造生物学によるアプローチ

神戸大学医学部学術講演（セミナー）

2014年10月16日（神戸市）

- (7) 山口芳樹
糖鎖のタンパク質による認識－構造生物学によるアプローチ

第12回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム

2014年12月5日-6日（文京区）

- (8) Yoshiki Yamaguchi
The indirect effect of bisecting GlcNAc on binding to PHA-E lectin: A possible role for conformer selection

6th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology

2014年12月9日 - 12日（Hyderabad, India）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

X線結晶解析による CD22 の立体構造とリガンド相互作用の研究

研究分担者 伊藤 暢聡（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

研究要旨

B細胞の抗体産生を増強させる CD22 阻害剤の合理的設計を行うためには、CD22 とそのリガンド結合部位の詳細な立体構造情報が不可欠である。しかしながら CD22 の構造はこれまで明らかにされていない。

本年度は X 線結晶構造解析による CD22 リガンド結合部位の立体構造決定をめざし、バクテリアを用いた CD22 リガンド結合ドメインの大量発現系改善、および結晶化条件の探索を行った。またホモロジーモデリングにより、CD22 リガンド結合ドメインと阻害剤との複合体構造を予測した。

A. 研究目的

CD22 は抗体を産生する B 細胞の働きを抑制する受容体であり、CD22 が活性化されると B 細胞を負に制御する。すなわち、CD22 の機能を阻害することで、B 細胞の抗体産生は増強される。CD22 の有効な阻害剤の開発にむけて、CD22 のリガンドであるシアル酸を改変した各種誘導体の設計をより合理的に行うためには、CD22 とリガンドの結合部位の詳細な立体構造情報が必要不可欠である。CD22 の立体構造の報告例はこれまでになく、CD22 のリガンド結合部位を含む N 末端側のドメインの立体構造を、X 線結晶構造解析の手法を用いて決定することを目的とする。

前年度より引き続き、CD22 の結晶化に必要な高純度かつ大量の試料を得るための発現系構築および精製方法の検討を行い、得られた精製標品を用いて結晶化実験を行った。また、構造既知で CD22 と類似していると思われる分子をもとに、CD22 リガンド結合ドメインの構造予測を行った。

B. 研究方法

1) CD22 の大量発現系の構築と粗精製

タンパク質の結晶化には、非常に高純度の精製試

料が大量に必要である。前年度に検討した大腸菌およびヒト培養細胞を用いた大量発現系のうち、非常に可溶性の高いタンパク質である Maltose binding protein (MBP) を N 末端側に融合させた CD22 のリガンド結合ドメインを大腸菌内で大量発現させる手法が、発現量、凝集体形成の少なさなどの観点から最も有効だと判断されたため、この系をもとにさらなる発現、精製条件の最適化を行った。

CD22 部位がより強固に fold するよう、CD22 のリガンドであるシアル酸の構成要素となる N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、ガラクトース (Gal)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 存在下で、組み換え大腸菌の培養、菌体破碎、カラム精製を行い、これら添加物の最適な濃度を検討した。さらに MBP 部と CD22 部を切断するためのプロテアーゼ認識配列を複数種検討し、効率的に切断できる条件を検討した。また、発現後の多量体形成を抑制するための点変異導入を検討した。これら大量発現させたタンパク質は、MBP タグを用いたアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどにより粗精製を行った。