

この時点で発現量と凝集体形成の有無を SDS-PAGE、Native-PAGE により確認した。

CD22 は disulfide 結合を形成すると予想されるシステイン (Cys) 残基を複数もち、特に大腸菌での発現系では正しいフォールディングが行われにくい。このため、封入体として凝集した CD22 リガンド結合ドメインを一度変性させて可溶化したうえで、再度活性を有する正常なタンパク質へ再生させるリフォールディング法について、最適な条件を検討した。

2) CD22 の精製と結晶化

MBP 融合 CD22 において一定以上の発現量を達成し、かつ凝集体の形成の少ないものについて、MBP 部分の切断をプロテアーゼにより行った。切断後の断片は、再度カラムクロマトグラフィーを行うことで分離し、結晶化用精製標品とした。切断後の MBP を効率的に除去することが難しい場合は、MBP 部分を切断せずに結晶化用標品とした。

得られた結晶化試料について、市販の結晶化スクリーニングキットを用い結晶化条件を広範に探索した。

3) ホモロジーモデリングによる構造予測

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。

倫理面への配慮

本研究では遺伝子組み換え実験を含むため、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. 研究結果

1) CD22 の大量発現系の構築と粗精製

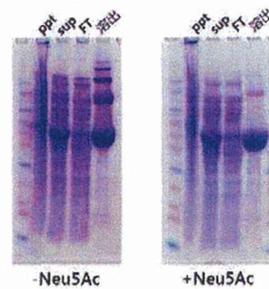


図 1. MBP 融合 CD22 の SDS-PAGE Neu5Ac を加えなかった場合 (左側) に比べ、加えた場合 (右側) では多量体形成が抑制されている。

CD22 のリガンド結合ドメインに MBP を融合させたタンパク質を、大腸菌を用いて大量に発現させた。大腸菌の培養液に CD22 のリガンドであるシアル酸の構成要素となる Neu5Ac を 1 mM または 10 mM の濃度でそれぞれ加えて培養し、その後の菌体破碎、カラム精製についても同濃度で Neu5Ac を加え続けた場合の影響を検討した。Neu5Ac を加えなかった場合と比較したところ、多量体形成が有意に抑制されることがわかった (図 1)。

Neu5Ac を 1 mM 加えた場合と 10 mM 加えた場合については有意な差が認められなかった。

また、Neu5Ac とともにシアル酸の構成要素である Gal、GlcNAc を Neu5Ac と共存させて培養と精

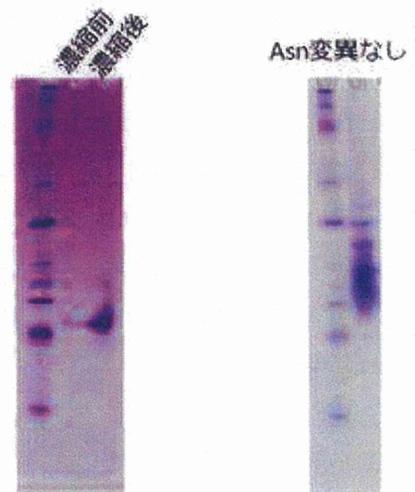


図 2. MBP 融合 CD22 Asn→Asp 変異体の Native-PAGE 変異導入後 (左) ではほぼ単一のバンドのみ観測され、変異導入前 (右) に比べより均一で結晶化に有利な状態と考えられる。

製を行ったが、Neu5Acのみを加えた場合と有意な差はみられなかった。

MBP 融合 CD22 の粗精製後、MBP 部分をプロテアーゼで切断するための認識配列について検討し、PreScission プロテアーゼとその認識配列を用いた切断が最も効率よく切断できることがわかった。

MBP 融合 CD22 の粗精製中に起こる多量体形成をさらに抑制するための点変異導入を検討した。CD22 のリガンド結合ドメインには、糖鎖修飾を受けると推測されるアスパラギン (Asn) 残基が 4 つ存在する。これをすべてアスパラギン酸 (Asp) 残基に変異させて発現、精製を行ったところ、多量体の形成は起こるものの、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、電気泳動で単一のバンドを示す画分を分離することができた。またこの画分は、濃縮しても多量体形成が起きにくいこともわかった (図 2)。

MBP などの高可溶性タンパク質を融合させずに CD22 のリガンド結合ドメインを大腸菌内で大量に発現させると、正しくフォールディングできずに凝集した CD22 が封入体を形成し、可溶性画分に回収できなかった。そこで封入体を回収してリフォールディング法により凝集したタンパク質を再生させるための条件を検討した。共存塩の濃度、酸化剤と還元剤の濃度比などを変化させて最適な条件を探索し、あわせて、カラム単体に CD22 を保持させたままリフォールディングを行う手法なども適用したが、リフォールディング中に形成されてしまう多量体成分が相当量含まれていた。

2) CD22 の精製と結晶化

MBP 融合 CD22 について、PreScission プロテアーゼを用いた MBP 部分の切断後、これを除去するための更なる精製条件の検討を行った。MBP と CD22 リガンド結合ドメインとの分子量の違いを利用したゲル

濾過クロマトグラフィーでの分離を試みたところ、分離が不十分であり、結晶化実験に十分な量で CD22 リガンド結合ドメイン画分を回収することが困難であると考えられた。そこで MBP 融合タンパク質のまま最終精製標品とし、20 mg/ml に調整し結晶化実験を行った。

MBP 融合 CD22 Asn→Asp 変異体についても同様に、MBP 部分の切断後、これを除去するための更なる精製条件の検討を行ったところ、ゲル濾過クロマトグラフィーでの分離は効率的ではなかったが、分子表面の電荷の違いで分離するイオン交換クロマトグラ

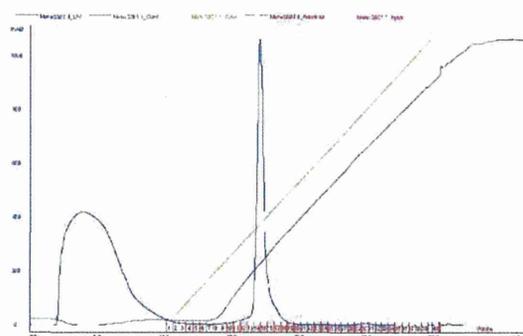


図 3. イオン交換クロマトグラフィーによる MBP と CD22 の分離精製 MBP と CD22 に由来するふたつのピークに明瞭に分離している。

フィーにより効率よく分離することが出来た (図 3)。最終精製標品として MBP を分離した CD22 を 10 mg/ml に調整し結晶化実験を行った。並行して、MBP を切断せずに、融合タンパク質のまま 30 mg/ml に調整した標品についても結晶化実験を行った。

リフォールディング法により粗精製した CD22 について、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて多量体成分を分離し、最終精製標品とした。この標品は凝集しやすく、数 mg/ml 以上の高濃度に濃縮することができなかつたため、1 mg/ml に調整し結晶化実験を行った。

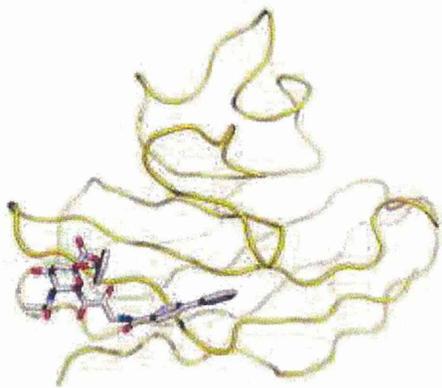
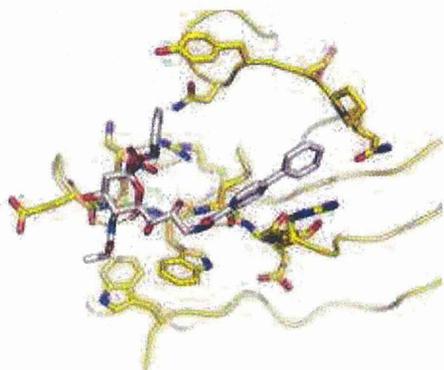


図 4. CD22 と阻害剤の予測構造 (上段) CD22 リガンド結合ドメインと、阻害剤の複合体構造を予測したもの。(下段) 予測される阻害剤結合部位の詳細。



以上のすべての最終精製標品について、結晶化条件の探索を広範囲に行ったが、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未だ得られていない。

3) ホモロジーモデリングによる構造予測

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。これをもとに CD22 阻害剤候補分子との結合様式も予測した (図 4)。予測モデルより、シアル酸の 3 位に negative charge の置換基を導入すること、あるいはビフェニル基の 2 位または 3 位に極性置換基を導入することで、CD22 との間の水素結合を増や

し、より安定な結合様式を実現する可能性が示され、さらなる阻害剤改良へ向けた知見を提供した。

D. 考察

大腸菌での発現系構築に当たり、CD22 のリガンド結合ドメインに MBP を融合させることにより可溶性画分に大量に発現させることができたが、粗精製中に起こる非特異的な多量体形成が、結晶化に適した均一な精製標品を得ることを困難にしている。これはシアル酸構成要素の Neu5Ac を添加することで一定程度抑制することができ、また CD22 より切断後の MBP は電気泳動で単一のバンドを形成することから、CD22 部分のフォールドが不完全なため、CD22 部分で非特異的な分子接触を起こしているものと考えられる。これを回避するため、Neu5Ac の添加に加え、糖鎖修飾を受けると推測される Asn 残基 4 つをすべて Asp 残基に変異させ、分子表面の電荷を大きく変化させることを試みたところ、電気泳動で単一のバンドを示す画分を分離することができた。またこの画分は、濃縮しても多量体形成が起きにくく、結晶化に非常に有利であると考えられた。しかしながら、結晶化実験では 30 mg/ml 程度以上と非常に高濃度に濃縮した状態でないと、結晶化の兆候を示す沈殿やアモルファス状の凝集体の生成が起きず、MBP の非常に可溶性の高い性質が結晶化の際には不利に働いているものと推測された。高濃度での結晶化実験をより広範な条件で行うには、これまで以上の高収量で最終標品を得ることが必要であり、発現、精製条件のさらなる改良が必要である。また、MBP 部位を切断した CD22 標品については、結晶化標品に少量の二量体成分の混入があり、これを効率的に取り除くための条件検討が必要であると考えられる。

リフォールディング法により得た標品については、結晶化のための濃縮中に凝集しやすく、一般的に結晶化が行われている濃度領域の下限に近い 1 mg/ml 程度までしか濃縮が行えなかった。またリフォールディング中に誤った disulfide 結合による多量体形成が多発しているため、共存塩や、酸化剤と還元剤

の最適な比率などの諸条件をさらに最適化する必要がある。糖鎖修飾の予想される Asn 残基 4 つをすべて Asp 残基に変異させたコンストラクトでリフォールディングを行うことも検討する必要があると思われる。

CD22 リガンド結合ドメインは Ig 様ドメインに分類されるが、分子中心に位置しフォールディングに重要と考えられているトリプトファン残基が CD22 では欠失している。また、シアル酸を認識する受容体ファミリー内での比較においても、ループ領域に挿入や欠失配列が存在し、ホモロジーモデリングを行うに当たり決定的に重要なアミノ酸配列アライメントが正確に作成しにくい状況にある。従って、現在得ている CD22 の予測構造はその精度に限界があるものと認識しているが、一定の構造を取りにくいと思われるループ領域の存在が予想されるなど、結晶化実験に適した均一な構造をとる標品を得るうえで一定の示唆を与えるものと考えられる。このループ領域は、CD22 阻害剤の結合領域とは直接的に関与しない部位と思われるため、一定の構造をとりやすくするための点変異の導入や、CD22 阻害剤とは異なる添加剤の探索などが必要であると考えられる。

E. 結論

MBP 融合 CD22 リガンド結合ドメインについて、大腸菌を用いた大量発現系を構築し、Neu5Ac 存在下での発現、精製により結晶化実験が可能な精製標品を得た。また、同コンストラクトで糖鎖修飾を受けると推測される Asn 残基 4 つをすべて Asp 残基に変異させたものについて、より均一で結晶化に適していると思われる標品を得た。さらに MBP を融合させない CD22 リガンド結合ドメインについて、リフォールディング法により精製標品を得た。いずれの標品も CD22 部分のフォールドをより完全に作る条件をさらに探索する必要があると考えられた。

ホモロジーモデリングの手法により 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、

阻害剤改良、発現系改良のための知見を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, M., Onogi, H., Kii, I., Yoshida, S., Iida, K., Sakai, H., Abe, M., Tsubota, T., Ito, N., Hosoya, T. and Hagiwara, M. (2014): CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. *J. Clin. Invest.* 124: 3479-3488.

2. 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.

2. 学会発表

(国際学会)

1. 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.

2. Ikura, T. and Ito, N.: How do peptidyl-prolyl isomerases rescue tau protein from aggregating?. International Biophysics Congress (IUPAB). August 4, 2014. Brisbane.

(国内学会)

1. 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

2. 伊倉貞吉、伊藤暢聡「タウタンパク質の脱リン酸化における Pin1 と PP2A の協同性の分子機構」第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 26 日、横浜
3. 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内における酸素解離過程」第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 27 日、横浜
4. 品川健朗、沼本修孝、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年会、2014 年 9 月 25 日、札幌
5. 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内での oxy 型から deoxy 型への移行」第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25 日、札幌
6. 伊倉貞吉、伊藤暢聡「Pin1 のプロリン異性化活性とタウタンパク質に対する凝集抑制活性との関係」第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 26 日、札幌
7. 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解離に伴う構造変化」日本結晶学会 2014 年度年会、2014 年 11 月 1-3 日、東京

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するものなし

CD22阻害化合物の設計及び合成

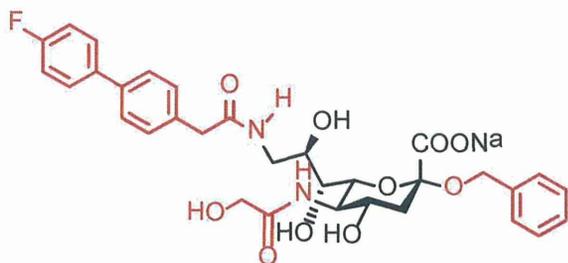
研究分担者 石田 秀治 岐阜大学応用生物科学部・教授

研究要旨

CD22 のリガンドに対する有機合成化学的アプローチに取り組み、リード化合物からの合成展開により構造活性相関を更に発展させて高親和性リガンドの設計に有益な知見を得た。一方でリード化合物をモチーフとした分子プローブの開発も行い、CD22 の活性発現機構の解明や CD22 の精製に有用なプローブの開発に成功した。

A. 研究目的

Siglec-2(CD22)はB細胞膜上に存在する膜貫通型タンパク質であり、同一細胞上の α 2,6-シアリルガラクトースと特異的に相互作用することで免疫機能を抑制する。この機能に着目した当研究室では、Siglec-2 と相互作用する糖鎖リガンドは Siglec-2 の機能を阻害によって免疫機能を活性化すると考え、種々の Siglec-2 高親和性リガンドを合成してきた。最近、これらの高親和性リガンドがワクチンのアジュバントとして機能する事が見出された。既存のアジュバントは、自然免疫の受容体やシグナル伝達経路を介して免疫機能を増強するため、副作用として炎症を誘導する可能性がある。一方、Siglec-2 高親和性リガンドはB細胞を直接活性化して免疫機能を増強させるため、炎症を誘導しない新しいアジュバントとなり得る。これまでに合成された化合物の中でも、GSC-780 (下図) は最も優れたアジュバント活



性を有しており、そこで、本研究では、まず GSC-780 の構造展開により、アジュバント活性を増強させる

ことを目的とした。

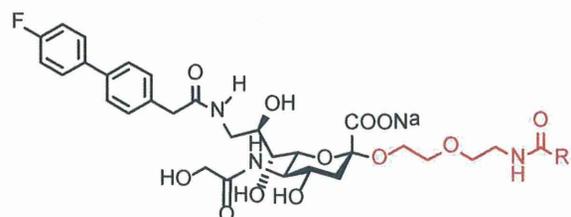
また CD22 の活性発現メカニズムの解明や CD22 の精製に有用なプローブの開発にも取り組んだ。

B. 研究方法および結果

(1) 分子設計

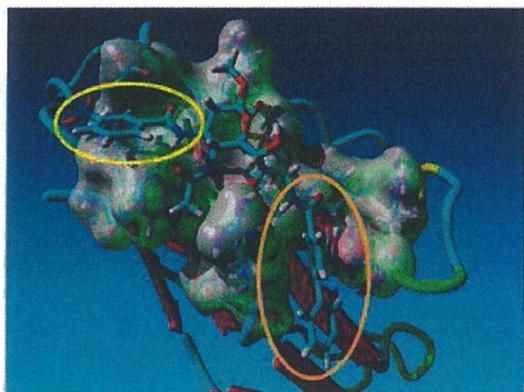
本研究では、この GSC-780 を基に種々の類縁体を合成し、その Siglec-2 阻害活性、B細胞増殖活性及びアジュバント活性を調べることにした。

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-ピ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 (下図) の合成を目指した。



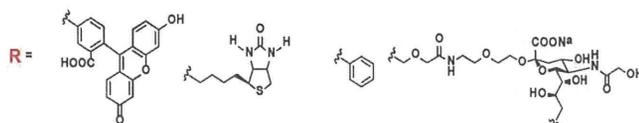
このアグリコンを選択した理由は、アミノジエチレングリコール基の親水性により水溶性を向上させることと、アミノ基の高反応性を利用して合成終盤での種々の置換基導入を簡便化することを期待したことにある。これまでの研究から、阻害剤に含まれる芳香環の疎水性により、水溶性が下がり、活性が低下する結果が得られていた。そのため、親水性のアグリコンを導入することで水溶性を向上させることは意義深い。また、合成終盤でアグリコンへの置換基導入が可能になることにより、蛍光色素やビオチンを導入した活性発現の機能解明のためのプローブの合成展開が容易になる他、二量化や多量化が可能となる利点がある。

一方、近年 Kelm¹らは Siglec-1 の構造を基に、Siglec-2 とシアル酸誘導体が相互作用した複合体のホモロジーモデリングを行った (下図)。

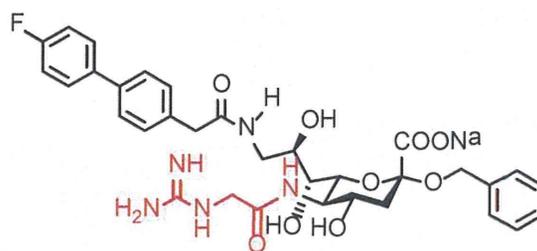


この構造では、Siglec-2 内のトリプトファンとアルギニンがシアル酸の 5 位を挟んで存在しており、このトリプトファンやアルギニンと相互作用できる置換基をシアル酸 5 位に導入できれば、Siglec-2 との相互作用を増強できるのではないかと考えた。そこで本研究では、トリプトファンのインドール骨格とカチオン- π 相互作用できるグアニジル基をシアル酸 5 位へ導入し、グアニジル基の位置が異なる種々

¹ S. Kelm, P. Madge, T. Islam, R. Bennett, H. Koliwer-Brandl, M. Waespy, M. Itzstein, T. Haselhorst, *Angew. Chem. Int. ed.* **2013**, *13*, 3616-3620.

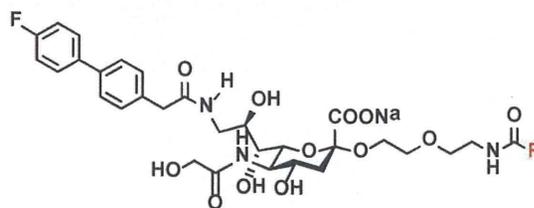


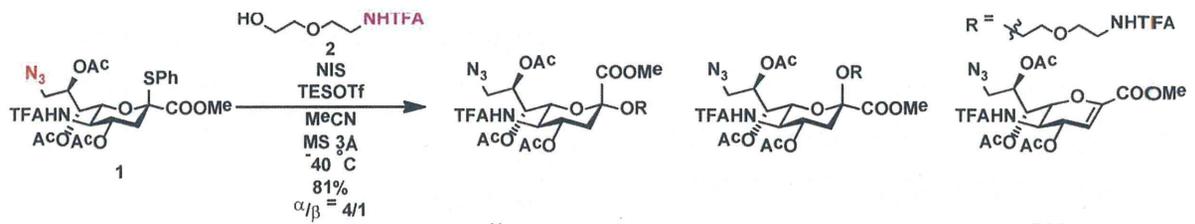
の 5 位変換型 GSC-780 類縁体 (下図) を合成することで、より強力なアジュバントの開発を目指した。



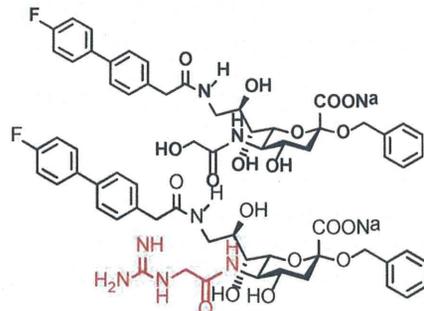
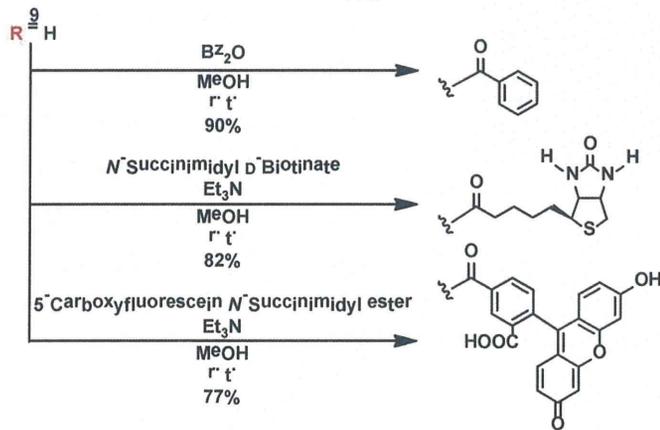
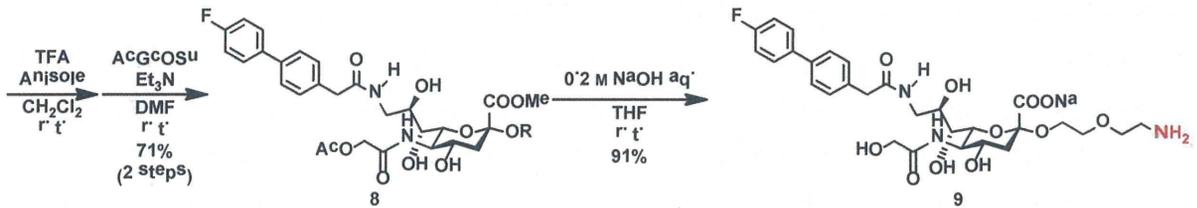
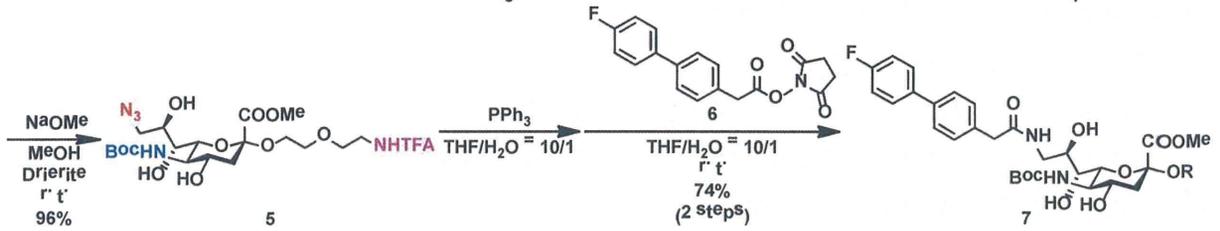
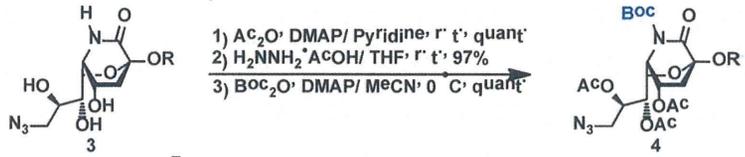
(2) アグリコンにアミノジエチレングリコール基を導入した類縁体の合成

上述の様に、アグリコンをアミノジエチレングリコール基に変換することで、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が簡便に行えることが期待される。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 (下図) 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、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。





1) NaOMe/ MeOH/ Drierite, reflux
 2) TFAOMe/ Et₃N/ MeOH, r' t', 70% (2 steps)



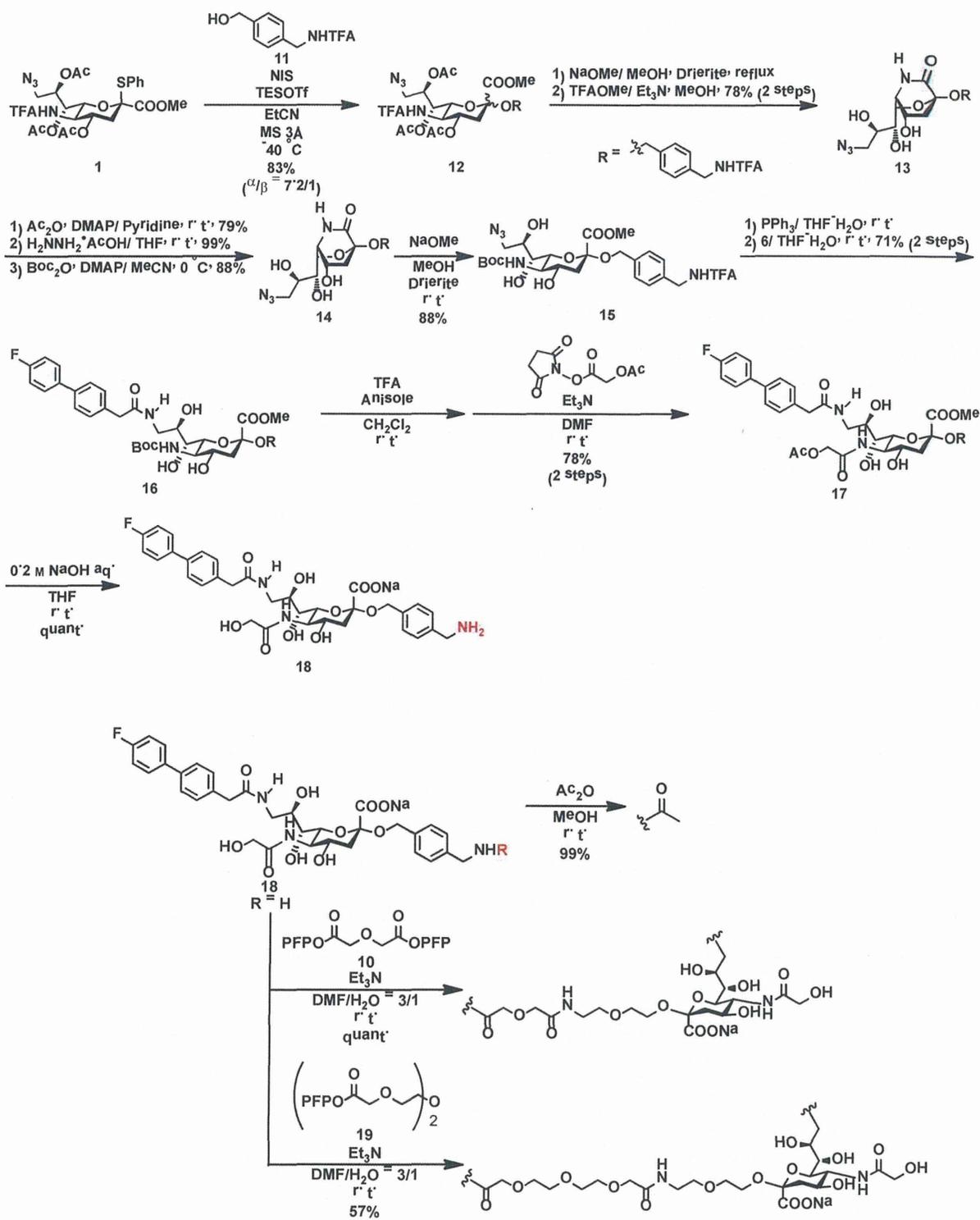
初めに、ドナー1と2-(2-Trifluoroethoxy)ethanol 2をアセトニトリル中、MS 3Å存在下-40° CでNISとTESOTfと反応させることで、グリコシドを収率81% (□/□=4/1)で得た。次に、MeOH溶媒中で、28% NaOMeを作用させ、還流下でラクタム化反応を行った後、得られた混合物にTFAOMe及びTEAを作用させて、遊離となったアグリコン末端のアミノ基をTFA化し、二段階収率70%でラクタム体3を得た。予想通り、ラクタム体3と□体及び2,3-ene体は極性差の違いにより容易にシリカゲルカラムで分離できた。続いて、Pyridine溶媒中で、Ac₂OとDMAPを用いて行い、定量的にAc化した後、THF溶媒中でH₂NNH₂・AcOHと反応させ、選択的脱*N*-Ac化を収率97%で行った。続いて、MeCN溶媒中Boc₂OとDMAPを0° Cで作用させることで*N*-Boc化し、定量的に4を得た。続いて、得られた*N*-Boc体4のラクタム開環反応をMeOH溶媒中、28% NaOMeを用いて行い、収率96%で化合物5を合成した。次に、得られた5のアジド基をTHF/H₂O = 10/1溶媒中、PPh₃と反応させることで還元した後、ビフェニルユニット6と反応させることで二段階収率74%にて9位ビフェニル体7を得た。続いて、CH₂Cl₂溶媒中、7にTFAとAnisoleを作用させて脱Boc化した後、DMF溶媒中でAcGcOSu及びTEAを作用させ、5位AcGc体8を二段階収率71%で得た。その後、THF溶媒中、得られた8を0.2M NaOH水溶液と反応させ、Ac基とTFA基の除去及びメチルエステルの加水分解をすることで、収率91%で共通中間体9を得ることができた。このように、合成計画で予定していた異なる三つのアミド化を段階的に行い、目的物を合成することができた。続いて合成した共通中間体9を用いて、種々の類縁体の合成を行った。

蛍光色素体の合成では、MeOH溶媒中でアミン体9に5-Carboxyfluorescein *N*-succinimidyl esterと

TEAを作用させ目的とする蛍光色素体を合成した。次に、MeOH溶媒中で9に*N*-succinimidyl ester D-biotinateとTEAを用い、82%と良好な収率にてビオチン体を得た。二量体の合成は、9をDMF/H₂O = 3/1溶媒中、活性エステル体10及びTEAと反応させることで行った。96%と高い収率で二量体を得ることができた。また、ベンゾイル体はMeOH溶媒中、9にBz₂Oを用いて90%という高収率で合成することができた。合成したGSC-780類縁体はいずれも水に可溶であったため、当初の目的であるアミノジエチレングリコール基導入による水溶性の向上を達成することができた。

(3) アグリコンに4-アミノメチルベンジル基を導入した類縁体の合成

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ことと期待した。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。それぞれの類縁体を合成する理由は、アセチル体に関しては、アミノ基の置換基の中で最小となる置換基を導入することで、末端アミノ基の修飾が活性にどのような影響を及ぼすかを検証するためである。二量体については、長さの異なるリンカーを有する二量体の溶解性及び活性を比較するためであり、また、Ac体導入による活性の影響が小さい場合、二量化により活性を増強できると見込んだためである。



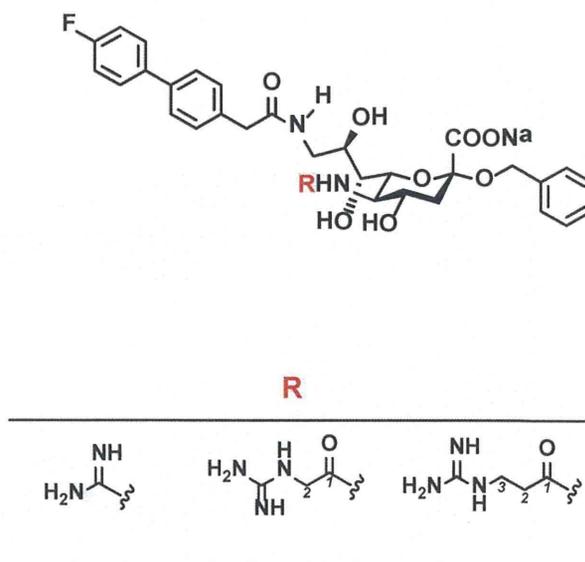
初めに、シアル酸ドナー1と4-トリフルオロアセトアミドメチルベンジルアルコール 11 をプロピオニトリル溶媒中、MS 3Å 存在下-40° CでNISとTESOTfと反応することにより、化合物 12 を収率 83% (□/□ = 7.2/1) で得た。このグリコシル化後の反応は、前述のジエチレングリコール型類縁体と同様の合成経路及び反応条件を用いて行った。まず、12 を還流下でラクタム化した後、得られた混合物のアグリコンの末端アミノ基をTFA化し、二段階収率 78% で 13 を得た。この基質においても、グリコシル化で得られた混合物をラクタム化することで、□グリコシドを容易に単離することができた。続いて、得られたラクタム体 13 を Ac 化した後、選択的脱 *N*-Ac 化を行った。次に、ラクタムの開環に向けて Boc 化を収率 88% で行った後に、得られた Boc 体 14 をラクタム開環反応に供し、収率 88% で化合物 15 へと導いた。この際、アミノジエチレングリコール型と同様の理由で、アグリコンの TFA 基がアミノ基となった副生成物をわずかに得た。次に、得られた 15 の 9 位アジド基を還元した後、ビフェニルユニットと反応させ、9 位ビフェニル体 16 を二段階収率 71% で合成した。続いて、16 を酸性条件下で脱 Boc 化し、AcGcOSu を作用させて 5 位へ AcGc 基の導入を行うことで、二段階収率 78% で 5 位 AcGc 体 19 を得た。合成した 19 の保護基を塩基性条件下にて脱離させ、共通中間体 18 を定量的に得た。共通中間体 18 の合成までは、いずれの反応も良好な収率で目的物を合成することに成功した。続いて、得られた共通中間体 18 を用いて種々の GSC-780 類縁体の合成を行った。

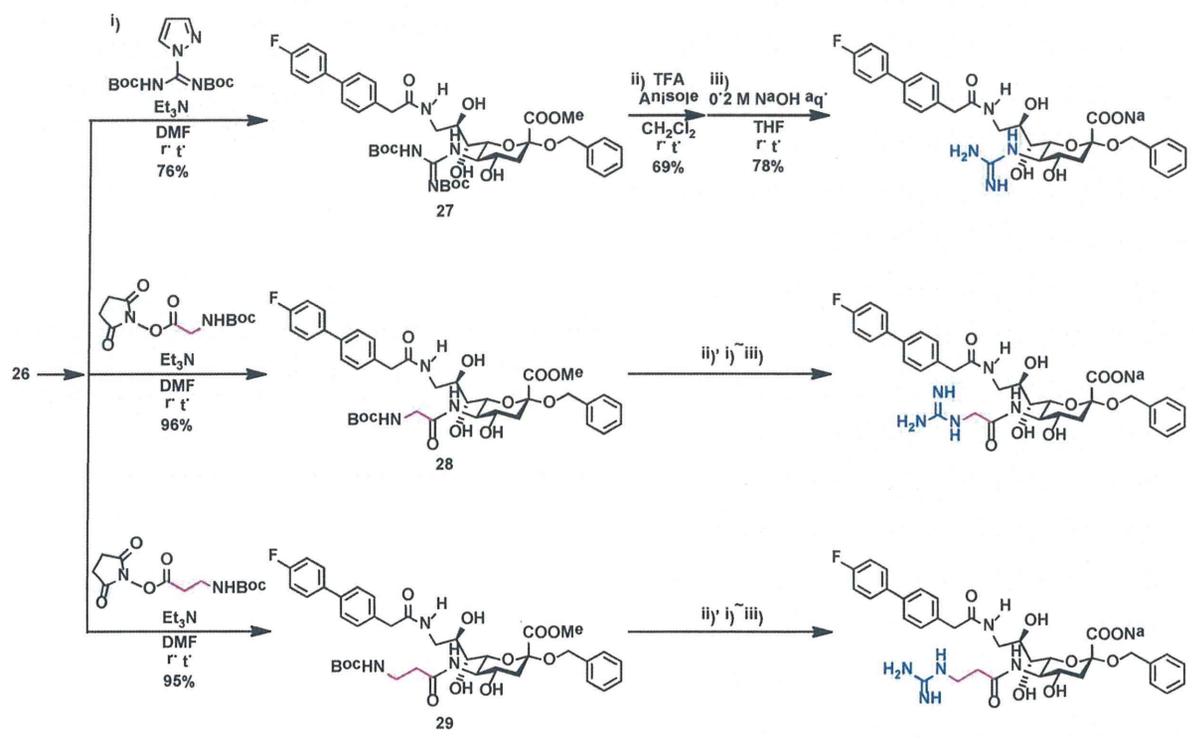
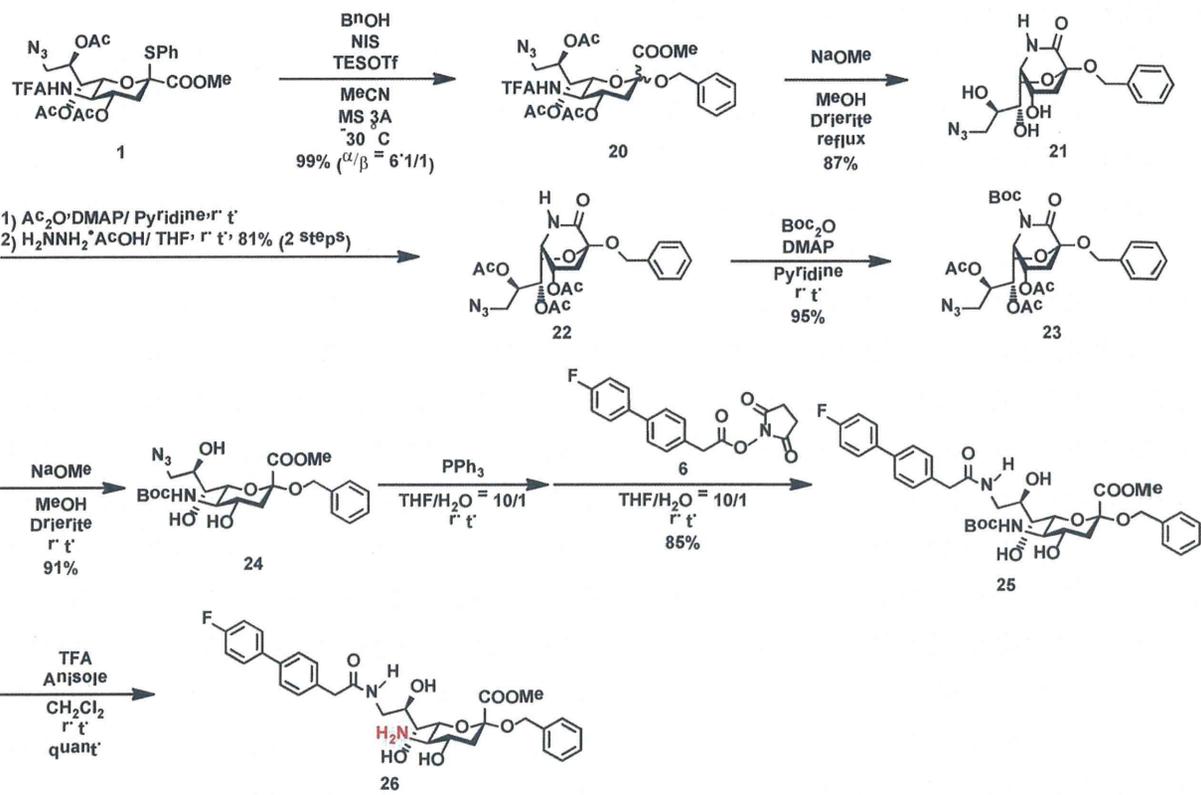
Ac 体は、MeOH 溶媒中、アミン体 17 に Ac₂O を用いることでアグリコン末端のアミノ基を Ac 化することで、収率 99% と高い収率で得ることができた。続いて、二量体の合成では、DMF/H₂O = 3/1 溶媒中、18 を 10 及び TEA と反応させることで、目的とする二量体を定量的に得ることができた。一方、もう一方の二量体は、DMF/H₂O = 3/1 溶媒中、18 に 19 及び TEA を作用させることで合成したが、収率 57% と少し収率が悪かった。その原因は、リンカーの片方に

のみ糖が入った副生成物が多く生成したことにあると考えられる。

(4) 5 位末端にグアニジル基を有する GSC-780 類縁体の合成

分子設計の項で述べた様に、本研究ではトリプトファンとカチオン-□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、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(下図)。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。





シアル酸ドナー1とベンジルアルコールをMeCN溶媒中、MS3Å存在下-30°CでNISとTESOTfと反応させることにより、20を収率99% (□/□ = 6.1/1)で得た。続いて、MeOH溶媒中、20に28% NaOMeを作用させてラクタム化し、収率87%でラクタム体21を単離することができた。得られた21にAc₂OとDMAPを用いてAc化した後に、H₂NNH₂・AcOHと作用させ選択的脱N-Ac化を行うことで、二段階収率81%で22へと導いた。続いて、22をPyridine溶媒中、Boc₂O及びDMAPと反応させてN-Boc化し、収率99%で23を得た。次に、MeOH溶媒中で、得られたBoc体23に28% NaOMeを作用させてラクタムを開環し、収率91%で24を得た。続いて、得られた24のアジド基の還元をTHF/H₂O = 10/1溶媒中、PPh₃と反応させることで行った後、ビフェニルユニット6を作用させることで、9位ビフェニル体25を二段階収率85%で合成した。共通中間体25の合成までは、いずれの反応も高い収率で目的物を得ることができた。次に得られた25を用いて5位グアニジノ型類縁体の合成を行った。

CH₂Cl₂溶媒中、共通中間体25にTFAとAnisoleを作用させ、5位アミノ体26を定量的に得た。続いて、DMF溶媒中にて、N,N'-di-Boc-1H-pyrazole及びTEAと反応させてグアニジル化し、収率96%で5位グアニジル体27を合成した。その後、25の脱Boc化と同条件で27の脱Boc化を行い続いてメチルエステルをTHF溶媒中で0.2M NaOH水溶液を用いて加水分解することで、5位グアニジノ型類縁体を収率76%で得ることができた。

前項の5位グアニジノ型の合成と同様の条件で以下の反応を行った。まず、共通中間体25の脱Boc化を行った後、DMF溶媒中でN-Boc-Gly-OSu及びTEAを作用させることにより、5位へのグリシン基導入を行った。収率は二段階で96%と高い収率で28を得ることができた。得られた5位N-Bocグリシン体28を脱Boc化した。続いて、得られたアミノ基をグアニジル化し、収率97%でグアニジル体を得た。次に、

Boc基を除去し、その後、0.2M NaOH水溶液を作用させてメチルエステルを加水分解することにより、目的とする2-グアニジノアセトアミド型類縁体を収率41%で合成した。

3-グアニジノプロパナミド型類縁体の合成も、同様の手順で行った。共通中間体25を脱Boc化した後、5位へのアラニン基導入を行った。収率は95%と高い収率でN-Bocアラニン体を得ることができた。次に、Boc基を除去した後、グアニジル化を行い、収率79%でグアニジル体へと導いた。続いて、脱Boc化の後、メチルエステルを加水分解し、目的とする3-グアニジノプロパナミド型類縁体を収率76%で合成した。

D 論文発表

(1) Suzuki, T., Makyio, H., Ando, H., Komura, N., Menjo, M., Yamada, Y., Imamura, A., Ishida, H., Wakatsuki, S., Kato, R. and Kiso, M. 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, 2014.

(2) Suzuki, T., Komura, N., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M. A facile method for synthesizing selenoglycosides based on selenium-transfer to glycosyl imidate. *Tetrahedron Lett.* 55, 1920- 1923, 2014.

2. 学会発表

(1) Tamai, H., Takeda, Y., Takashi, M., Ando, H., Ueki, A., Imamura, A., Ishida, H., Kiso, M.: Synthetic study on neuritegenic glycopospholipid CJP-series from comatulida *Comanthus japonica*. 18 (Oral), *Sialoglyco2014*, The Institute for Glycomics, Griffith University at the Gold Coast, Australia, September 6-12, 2014 (Oral).

(2) Ueki, A., Unga, J., Higuchi, Y., Kawakami, S., Ando, H., Ishida, H., Yamashita, F., Hashida, M., Kiso, M., Synthesis and Evaluation of Sialyl Lewis X-coated Liposomes for Drug Delivery System, 48 (Oral) , Sialoglyco2014, The Institute for Glycomics, Griffith University at the Gold Coast, Australia, September 6-12, 2014 (Oral).

E. 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。

CD22 結合化合物の活性評価とメカニズムの解明

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 の種々の誘導体について、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。また、CD22 の糖鎖リガンドを欠損する ST6GalI 欠損 B 細胞を用いて、化合物の作用機序の解明を行った。さらに、GSC780 が免疫記憶を増強し、インフルエンザウイルス HA 抗原とともにマウスに接種することにより感染防御効果を増強した。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。

A. 研究目的

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 α 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。昨年度 CD22 に結合するシアル酸誘導体 GSC780 を抗原とともにマウスに接種すると抗体産生を増強し、アジュバント活性があることが明らかとなった。既存のアジュバントはいずれも先天免疫細胞を活性化することにより免疫応答を増強するため、炎症を誘導することによる副作用が問題となっている。CD22 はもっぱら B 細胞に発現するため CD22 を制御して抗体産生を増強するシアル酸誘導体は、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。

本年度は、より高活性なシアル酸誘導体を開発するために、GSC780 の類縁体の CD22 への反応性や B 細胞活性化、さらに抗体産生の増強作用の測定を行うとともに、CD22 を標的とするシアル酸誘導体が、ワクチンアジュバントとして有用であるかどうかを明らかにする目的で、これらの化合物の

免疫記憶への作用や、ウイルス抗原とともに接種することで感染防御を増強できるかを解析した。

また、CD22 の糖鎖リガンドは B 細胞に多量に発現し、CD22 が同じ細胞の糖鎖リガンド（シスリガンド）と常に結合していることが知られている。シアル酸誘導体の作用メカニズムについて、昨年度これらの化合物が B 細胞のカルシウムイオン濃度を上昇させ、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。シアル酸誘導体が CD22 とシスリガンドの反応を阻害すると想定されるが、この反応阻害の役割を解析するために、CD22 の糖鎖リガンドである α 2,6 シアル酸を欠損する ST6GalI 欠損 B 細胞を用いた解析を行った。

B. 研究方法

CD22Fc の産生

ヒトおよびマウス CD22 のリガンド結合領域を含む N 末端領域とヒト免疫グロブリン IgG の Fc 領域との融合タンパク (hCD22Fc および mCD22Fc) をコードする発現コンストラクトを、糖鎖にシアル付加することのできないシアル酸トランスポーター変異チェーンズハムスター細胞株である Lec2 細胞にトランスフェクトし、安定発現させた細胞株 (Lec2-mCD22Fc, Lec2-hCD22Fc) を京都大学の小堤

研究室、竹松弘准教授に供与を受けた。この細胞を血清添加 μ -MEM 培地 (10 % FCS (ニチレイ)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (SIGMA)、10 μ g/ml ペニシリン-ストレプトマイシン (ナカライ) を添加した μ -MEM (ナカライ)) を用いて 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養を行った。2-3 日培養後、培地を無血清培地 (Hybridoma-SFM Complete DPM (GIBCO、メーカープロトコールに従い調整後、0.2 μ m フィルター (IWAKI) を用いて滅菌)) で 10 日間~2 週間培養を行った。培養後、4 °C、3,500 rpm、5 分間遠心を行い、上清を回収し、2 M NaCl 含有 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0 を十分の一量加え 0.2 μ m のフィルターを通して回収した。この上清を予め 0.2 M NaCl 含有 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0 で平衡化した Protein G SepharoseTM 4 Fast Flow (GE) 充填カラムにかけ、カラムに結合したタンパクを 0.1 M クエン酸緩衝液 pH 3.0 で溶出した。溶出したタンパクは直ちに 1 M トリス塩酸緩衝液 pH 9.0 で中和し、PBS で透析した。

競合 ELISA によるシアル酸誘導体の CD22 への親和性の測定

GSC660 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)。GSC660 をビオチン化した化合物 GSC731 を合成した (Abdu-Allah et al.)。ストレプトアビジン 2.5 μ g (ナカライ) を固層化した ELISA プレートに 4 μ g/ml の GSC731 を加えて室温で 1 時間インキュベーションを行い、洗浄後に、1 % BSA (ナカライ) / PBS を用い室温で 2 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、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、2 時間室温インキュベーションし、洗浄後にブロッキング溶液で 1000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ヒト IgG 抗体 (SouthernBiotech) を加え室温で 1 時間インキュベーションを行った。洗浄後に、アルカリホスファターゼ基質溶液 (Phosphatase substrate, SIGMA) を 0.1 M NaCl / 5 mM MgCl₂ / 0.1 M Tris-

HCl, pH 9.5 で溶解) を加え発色させ、プレートリーダー (Molecular Devices) を用いて 405 nm の吸光度を測定することにより、プレートに結合した CD22Fc を検出し、CD22Fc の GSC731 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)。

マウス B 細胞の精製

野生型 C57BL/6 マウス (三共ラボサービス (株)) 脾細胞を溶血後、抗 CD4 抗体 (RL172.5)、抗 CD8 抗体 (3.115)、抗 CD90 抗体 (Thy1.2, Serptec) と氷上で 30 分間反応させ、洗浄後にウサギ補体 (Cedarlane) と 37 °C で 30 分間インキュベーションすることにより T 細胞を除去した。次いで、Percoll (GE) 密度勾配遠心によりリンパ球分画を分取することにより精製 B 細胞を得た。

B 細胞増殖の測定

精製 B 細胞を、PBS で洗浄して血清を除き、10⁶ 個/ml に調整した。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 2 μ M となるように加え、37 °C で 10 分間反応後、氷上で 5 分間静置して標識した。血清添加 RPMI 培地 (10 % FCS (ニチレイ)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (SIGMA)、10 μ g/ml ペニシリン-ストレプトマイシン (ナカライ) を添加した RPMI1640 (Wako) を用い洗浄後に、10 μ g/ml の抗マウス CD40 抗体 (FGK45) または 10-20 nM の CpG オリゴ (ODN1668、北海道システムサイエンス)、0.5 μ g/ml の LPS (O111, SIGMA) および 50 μ 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。

抗体産生の評価

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 2.5 μ g の鶏卵アルブミン (OVA)、または 0.1 μ g のインフルエンザ split ワク

チン用抗原（第一三共より供与、以下 HA 抗原）を 10~100 μg 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 100 μg の CpG オリゴと共にそれぞれ腹腔内、耳介皮内投与した。2 週間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 抗原特異的抗体価を測定するために、ELISA プレートに OVA または HA 抗原を固相化した。1% BSA を含む PBS で室温で 2 時間ブロッキングしたのちに、1% BSA を含む PBS を用いて希釈した血清サンプルを加え、室温で 2 時間インキュベーションした。その後 ELISA プレートを洗浄し、ブロッキング溶液で 1000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体 (SouthernBiotech) を加え室温で 1 時間インキュベーションを行った。洗浄後に、アルカリホスファターゼ基質溶液を加え発色させ、プレートリーダー (Molecular Devices) を用いて 405 nm の吸光度を測定することにより、HA 抗原特異的 IgG の濃度を測定した。

シアル酸誘導体による記憶応答の検討

8 週令の野生型 C57BL/6 マウス (三共ラボサービス (株)) に 2.5 μg の OVA を 100 μg の GSC718, GSC780, またはコントロールとして溶媒である PBS とともに腹腔内投与した。免疫から 5 週間後に、1 μg の OVA のみを腹腔内投与し、その 1 週間後の血清を回収し、OVA 特異的抗体価を測定した。

細胞内 Ca^{2+} 変化の測定

8-10 週令の CD22 リガンド欠損マウスの一つである μ -2,6 シアリルトランスフェラーゼ (ST6Gal I) 欠損 マウス、ほとんどすべての B 細胞で NP 特異的 BCR を発現する免疫グロブリン導入 QM マウスの脾臓より精製した B 細胞を、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fluo-4 (Invitrogen) 5 μg とともに 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベーションした。細胞を回収して洗浄後、Fluo-4 の蛍光強度をフローサイトメーター (CyAn, Dako) により測定した。測定開始 28 秒後に終濃度 50 μM のシアル酸誘導体および終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗マウス IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch), NP-BSA (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), NP-Dextran (5 ng/ml) を加え、3 分間蛍光強度を測定した。

B 細胞活性化マーカーの測定

8-10 週令の CD22 リガンド欠損マウスの一つである μ -2,6 シアリルトランスフェラーゼ (ST6Gal I) 欠損 マウスの B 細胞の脾臓より精製した B 細胞を、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の anti-CD40 抗体、5 nM の CpG (ODN1668) または 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS (*E. Coli* type0111:B4, SIGMA) の存在下で 48 時間培養を行い、A647 標識抗マウス CD80 抗体 (16-10A1, eBioscience)、FITC 標識抗 CD86 抗体 (GL1, BD)、APC 標識抗 CD40 抗体 (3/23, BD)、FITC 標識抗 I-A/I-E 抗体 (2G9, BD) にて染色し、フローサイトメーター (CyAn, Dako) で蛍光強度を比較した。

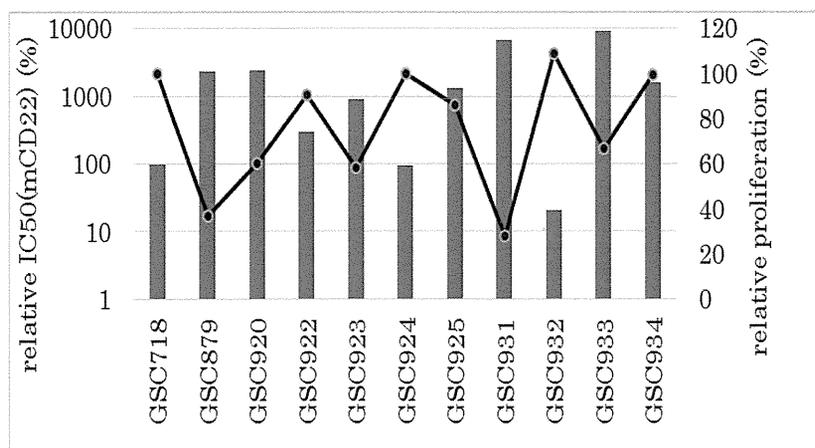


図 1 : 新規合成化合物の CD22 親和性 (棒グラフ) と B 細胞増殖効果 (折線グラフ)

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前述の 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、2週間、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、サンプルを回収した。

ウイルス感染マウス肺の評価

感染したマウスから肺を摘出し、ホルマリンに浸漬後、切片を作製して H&E 染色を行った。肺組織の炎症の程度は、単核球浸潤、気管支上皮過形成、肺実質化生、出血、線維化の各々につきスコア化して評価した（0: absent, 1: minimal, 2: slight, 3: moderate, 4: marked, 5: severe）。また、肺胞洗浄液を 1500 rpm, 5分遠心し、細胞を PBS で洗浄したのちにサイトスピン（Cytospin3, SHANDON）を用いてスライドグラス上に貼り付けた。スライドグラスを十分に乾燥後、メイグリンワルド液（武藤化学）を加え3分後に等量の水で希釈して1分反応させ、水洗してギムザ液（武藤化学、使用時20倍希釈）に20分間浸漬した。十分に水洗して乾燥後、観察を行った。

（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。

C. 研究成果

合成展開したシアル酸誘導体のマウス CD22 への親和性の測定

GSC780 類縁体を 10 個作成し（GSC879, 920, 922~925, 931~934）、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1）。

合成展開したシアル酸誘導体の B 細胞活性化性能測定

精製した C57BL/6 マウス脾臓 B 細胞を CFSE でラベルした後に、GSC780 類縁体と抗 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。GSC718 よりも親和性が低い化合物 GSC879, 920, 923, 931, 933, 934（IC50 が $1\mu\text{M}$ 以上）では B 細胞増殖活性化が顕著に低下していた。一方、GSC718 よりも親和性の高い GSC924 および GSC932 の B 細胞の増殖は GSC718 の同程度であった（図1）。

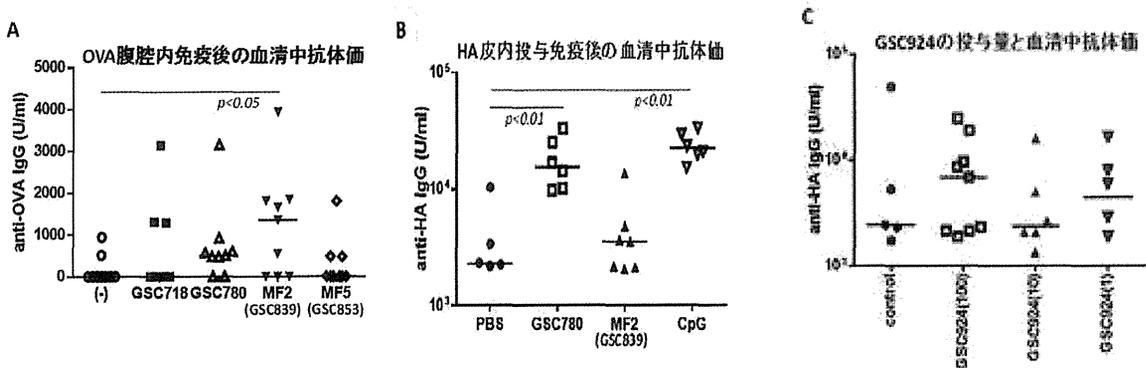


図2：合成シアル酸誘導体のアジュバント効果 A：OVA 腹腔内免疫、B, C：HA 抗原皮内免疫後2週間の血清中抗体価

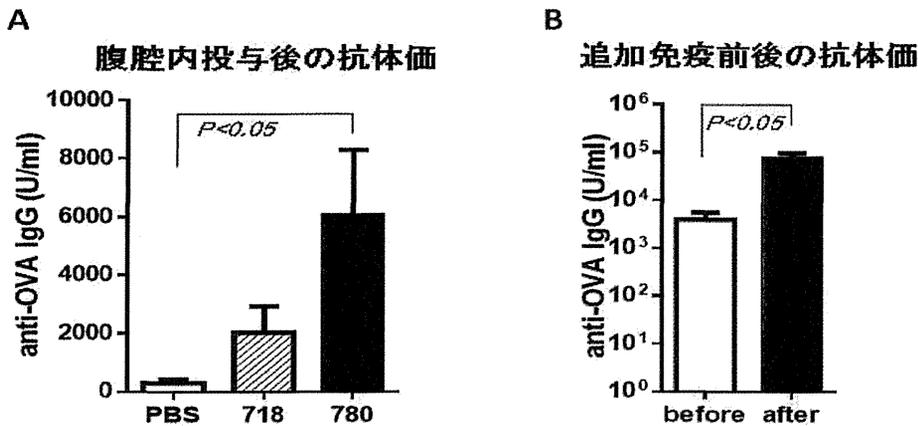


図3：GSC780の記憶応答誘導効果 A：OVA腹腔内免疫後2週間の抗体価、B：GSC780投与マウスへの追加免疫前（白）、後（黒）の血清中抗体価

シアル酸誘導体のアジュバント効果評価

昨年度までに合成されたMF1~MF16の16化合物につき、マウス個体へOVA抗原を経鼻投与し、アジュバント効果の有無をスクリーニングしたところ、MF2（GSC839）とMF5（GSC853）につき、アジュバント作用を示す傾向が認められた。そこで、さらに詳細に調べる目的で、OVA抗原を腹腔内投与して、GSC718、780と同時に比較検討したところ、GSC839が有意に強くアジュバント効果を示していた（図2A）。次に、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た（図2B）。また、同時に比較を行ったCpGオリゴと同等のアジュバント効果を示した。一方で、ダイマーであるGSC924は、投与量を減じてアジュバント効果が維持されていた（図2C）。

シアル酸誘導体による記憶応答の検討

GSC718、GSC780をアジュバントとしてOVAを腹腔内投与したところ、GSC780群で有意なOVA特異的抗体価の上昇が認められた（図3A）。免疫から5週間後に抗原を投与して記憶応答を測定したところ、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（図3B）。

CD22のシグナル制御機構へのシアル酸誘導体の作用

昨年度、GSC718がtonic signalを増強し、BCR架橋時にCD22の機能を増強し、BCRシグナル伝達を負に制御するが、BCR非架橋時のtonic signalを増強し、またTLRリガンドへの応答性を増強することを示した。そこで、CD22リガンド欠損マウスであるST6Gal I欠損マウスB細胞を用いて検討を行った。その結果、ST6Gal I欠損マウス細胞においてTLRリガンドへの応答性が正常マウスに比べて増強しており、GSC718により増強した（図4A、B）。また、カルシウムシグナルの検討においてはBCR架橋時のシグナル伝達へのGSC718の作用が喪失していたが（図4C）、tonic signalのごく弱い増強が認められた（図4D）。

ほとんどすべてのB細胞でNP特異的BCRを発現する免疫グロブリン導入QMマウスのB細胞を用い、NP抗原刺激シグナルに与えるGSC718の影響を検討したところ、GSC718は抗原刺激によるCa濃度上昇についても負に制御していた（図5）。

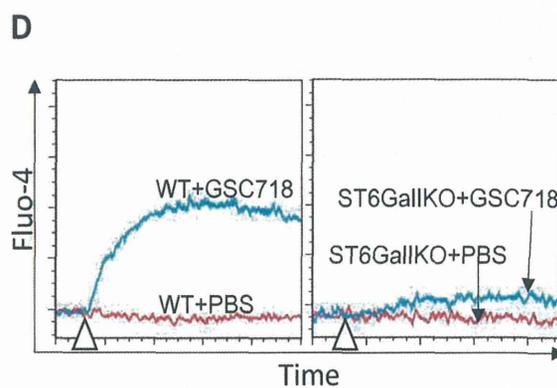
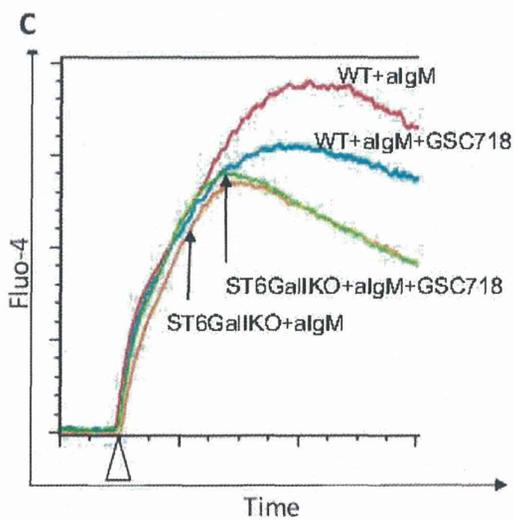
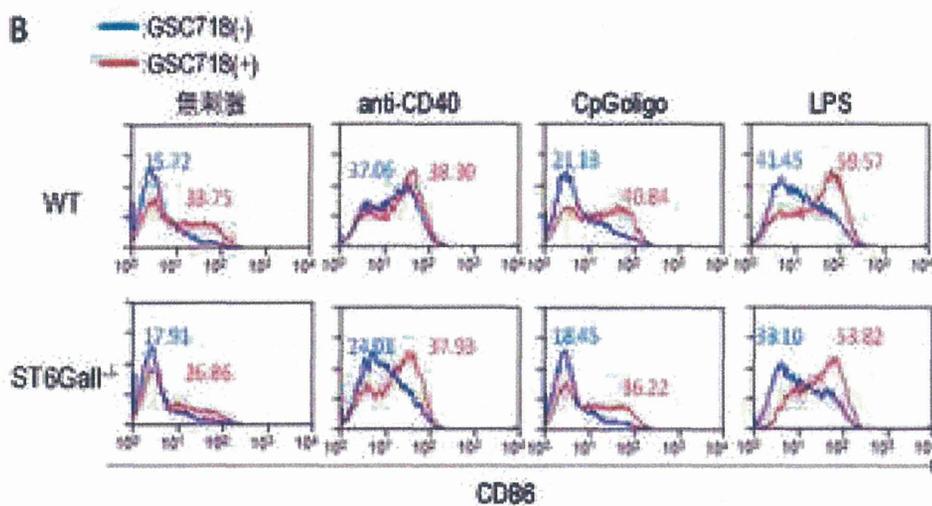
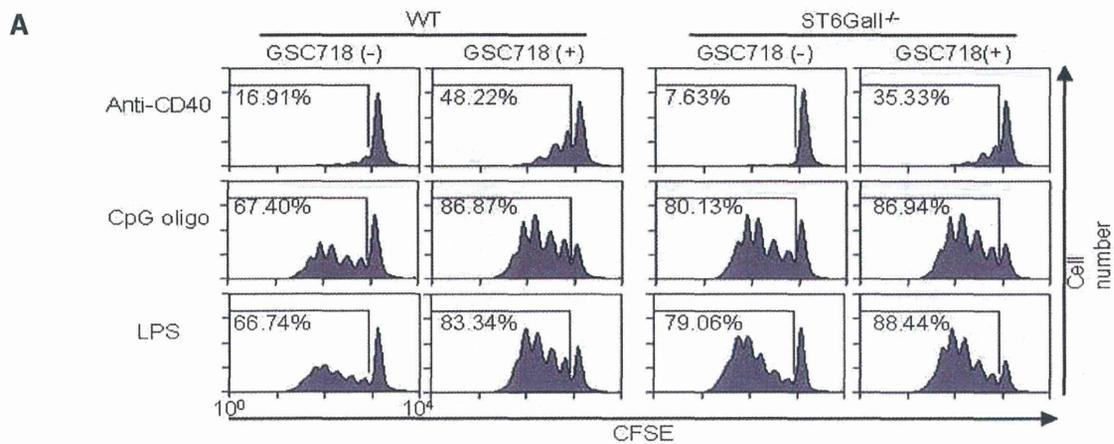


図4: リガンド欠損マウス細胞における作用 A: B細胞増殖、B: 活性化マーカー発現、C、D: BC R架橋時の Ca²⁺シグナル変化。