

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 高感度・高特異性改変レクチンの開発による GAG 鎖および O-GlcNAc 修飾を標的とした創薬探索技術の確立
(英語) Establishment of highly sensitive and specific lectins for GAG and O-GlcNAc in the development of innovative drug discovery technologies

研究開発実施期間: 平成28年9月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 山本一夫
(英語) Kazuo Yamamoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
(英語) Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

本プロジェクトは、ほとんど手付かずの状態にある2種類の糖鎖、即ちグリコサミノグリカン (GAG) 鎖、および細胞質や核内で見られる O-GlcNAc 修飾を研究対象とした提案であり、生化学的な GAG 鎖認識改変レクチンの作成や O-GlcNAc 修飾の分析などは山本らが担当し、細胞レベルでの解析や評価を創価大の西原が、ヒト病理切片を用いた評価等を千葉大の松原、池原が行うという流れで研究を進めた。

まず第一に、GAG 鎖を標的として糖鎖創薬標的分子探索技術の確立について行った。アプローチとしては、未だに適切な抗体やレクチンが存在しない GAG 鎖を識別する改変レクチンレパートリーを取得し、それらクローンに関してその有用性を評価することである。当初、レクチンの糖認識にかかわるループにランダムなアミノ酸で置換したライブラリーを作成し、GAG 鎖に結合するクローンを探索するというアプローチから開始した。その一つは GAG 鎖の一つであるヘパリンにのみ結合するという特異性を持っていたが、レクチンライブラリーの拡大、また構造学的基盤に基づきヘパリン結合モチーフと呼ばれるクラスターした塩基性アミノ酸をさまざまなアミノ酸に置換する変異体の作成により異なる特異性の改変レクチンを取得、また塩基性アミノ酸をランダムなアミノ酸に置換したライブラリーを作成しより効率的にスクリーニングをする方法を試みた。後半では、heparin に特異的に結合するタンパク質から改変レクチンの作成を集中的に行なったが、生体内に投与する際に抗原性が寛容になっている必要性から、植物由来レクチンではなくヒトおよびマウス由来のタンパク質を用いた。このタン

パク質の立体構造解析や二次構造予測、またさまざまな変異体の作成を通して、ドメイン間のループが2箇所あり、これらがそれぞれにGAG鎖との結合に関与していることがわかった。種々の変異体はヘパリンに対する結合力がさまざまであったが、興味深いことに特異性も多様であり、GAG鎖を固相化したELISAによる結合能の比較解析、さらにBiacoreを用いた結合定数の測定などの結果から、ヘパリン特異的な変異体、高硫酸化GAGに特異的なもの、GAG鎖にブロードに結合する変異体などを得ることができた。これら数十の変異体の中から、抗体と遜色ない強い結合力を持ち、異なる特異性をもつ代表的な3つのクローンに関してさまざまな細胞や臨床検体の染色を行った。

前立腺癌はホルモン遮断療法が著効を示すが、その後、去勢抵抗性を獲得し化学療法が効かなくなる。このモデルとしてヒト前立腺癌細胞株C4-2をFBS存在下からホルモンを除去したCSSに培地を変更するとホルモン非依存的に増殖する性質へと変化した。この両者の細胞を2種類のGAG鎖結合性変異体で染色をするとCSS存在下で培養したC4-2細胞で2.5倍ほど結合が上昇する一方で、別の変異体ではほとんど染色されなかった(西原ら)。また、硫酸転移酵素をノックダウンしたC4-2細胞などを作成し染色の減少等を調べることで詳細なGAG結合特異性の推察もなされ、さらにGAG鎖アレイを用いた解析も行った。一方、拡張型心筋症のモデルマウスにおいては、正常心筋細胞は2種類の変異体では染色されず別の変異体で強く染色されるのに対して、再生心筋細胞はいずれにも染色されず、GAG鎖の発現が総じて低下していることが示された(千葉大学池原ら)。これらの所見を過去の知見に照らし合わせると、GAG鎖を介した細胞の増殖・生存シグナルが去勢抵抗性の前立腺癌では亢進していること、また再生心筋細胞ではGAG鎖を介した生存シグナルが伝達されないことを説明するものであり、GAG鎖、さらにはこれらに結合してシグナルを伝える増殖因子等が新たな創薬標的となり得ることを示唆している。これらのGAG鎖からのシグナル伝達モジュールを明らかにすることにより糖鎖創薬標的分子を明らかにできると考え、さらに取得したGAG鎖結合性の改変レクチン等を用いてGAG鎖を介した生存シグナル受容体複合体を明らかにする新たな手法を確立することを行った。当初はBirA(R118G)変異体を用いて検討をしたが、その後、TurboIDという前者よりも数十倍活性が強く動物細胞での発現効率もよいタンパク質の遺伝子を入力することができたため、BirA(R118G)変異体からTurboIDへと変更した。またGAG結合性改変レクチンとの融合タンパク質は分子量が大きく発現効率が悪かったため、TurboIDと改変レクチンを別々に発現・精製し、protein ligationによって融合タンパク質を作成するアプローチに変更した。protein ligationの手法は2つの方法を検討し、一つはinteinというタンパク質スプライシングを行う分子を用いる方法であり、もう一つは、sortase Aという細胞壁を合成する細菌由来の酵素を利用する手法を検討した。前者では、インテイン融合タンパク質で発現したのちMESNAでSH基を介した切断を行ったTurboID分子と、プロテアーゼの切断配列をN末端に付加し、プロテアーゼで切断しN末端Cysをもつ改変レクチンをそれぞれ調製、これを混合し融合タンパク質を作成した。一方後者の方法では、sortase A認識配列をC末端にもつ改変レクチンと、プロテアーゼの切断配列をN末端にもち切断後にGG配列を露出するTurboIDをそれぞれ発現させて調製し混合して融合タンパク質を得る手法を行った。これにより得た融合タンパク質を細胞表面に振りかけ、さらにビオチンを培地に加えることにより、改変レクチンの結合するGAG鎖シグナルモジュールと思われるいくつかのタンパク質をビオチン化する方法を確立した。

一方、細胞質および核内タンパク質の糖修飾で可逆的なO-GlcNAc修飾という翻訳後修飾を標的とする創薬分子の探索についても研究を進め、どのようなアプローチにより創薬へと結びつけるかという一連の道筋を示すことをもう一つのプロジェクトのテーマとした。細胞質あるいは核内に存在するタンパク質のO-GlcNAc修飾に関しては現象としては知られていたものの、その機能等に関してはほとんど研究がなされていない状況である。当初、ES細胞などを用いて高感度のO-GlcNAc修飾タンパク質の同定、核内のO-GlcNAc修飾タンパク質だけを追跡する手法、質量分析計を用いたO-GlcNAc修飾部位残基の特定技術の確立、さらにはこの修飾の中で特に機能との関連する部位を特定する手法を確立した。また特定した部位のO-GlcNAc修飾を特異的に認識する抗体の作製法などを確立し、さまざまなノウハウを提示した(西原、山本ら)。これらの手法を確立するためのモデルとしては、分担研究者の池原らが開発したDox誘導により100%癌が発症するトランスジェニックマウス、およびその

腫瘍から三次元培養により得られた 2 種類の Spheroid 型と tube 型の培養細胞株を用いて O-GlcNAc 修飾タンパク質の解析を行った。この実験系の優れた点はヒト癌と酷似したフェノタイプを示すこと、O-GlcNAc 修飾を変化させることで Tube 型が Spheroid 型に移行するなど相互に可逆性を示すことである。その結果、癌の悪性化に伴うタンパク質の O-GlcNAc 修飾との関連を見出し、この部位特異的な抗 O-GlcNAc 抗体の作出を行ったが、今まで外科手術材料の収集保管を行ってきた資料の中からさまざまな病理組織に関して、この抗体を用いて染色を試みた（松原・池原ら）。その結果、悪性度に比例して染色が強くなり、in vitro の実験結果と一致する結果が得られた。この部位特異的な抗 O-GlcNAc 抗体は細胞外から投与しても細胞内に届けることができないため、新たなアプローチが必要であった。O-GlcNAc 修飾によりタンパク質間相互作用が制御されているため、O-GlcNAc 修飾されたタンパク質と相互作用するタンパク質を明らかにすることを次の目標とした。GAG 鎖を介したシグナルモジュールの探索で用いた手法に倣い、ビオチンリガーゼとの融合タンパク質を細胞内に発現させ、近傍に存在するタンパク質をビオチン化する proximity labeling を用いた。ビオチンリガーゼは O-GlcNAc 修飾タンパク質の N 末端側よりも C 末端側に付加する形が活性が保持されること、また 2 次元電気泳動により多くのタンパク質の同定が可能であること、O-GlcNAc 修飾部位を Ala 置換したものとの比較を行うことにより、O-GlcNAc 修飾依存的に相互作用するスポットを特定・同定することができた。この特定したタンパク質との相互作用を断つ化合物を適切な化合物ライブラリーから見出せば、癌の悪性度を軽減する薬剤に繋がる可能性があると考えられる。このように、漠然と現象としては知られていた O-GlcNAc 修飾ではあるが、このような一連の解析を通して糖鎖創薬標的分子になり得ることを示した点で、有意義な成果が得られたものとする。

This project was a proposal targeting two types of sugar chains, glycosaminoglycan (GAG) chain and O-GlcNAc modification. First, we started with the screening of clones that bind to the GAG chains from engineered plant lectin library. By expanding the lectin library and creating variants that replace clustered basic amino acids with various amino acids, lectin mutants with different GAG-binding specificities were obtained. In the second half, engineered lectins were intensively prepared from human and mouse proteins that specifically bind to heparin. Through structural analysis of this protein, prediction of secondary structure, and creation of various mutants, it was found that there are two loops between domains, each of which is involved in binding to GAG chain. Various mutants specific for heparin, heparin and chondroitin sulfate, or broadly several GAGs were obtained. By using these three clones, various cells and clinical specimens were stained and we evaluated these mutants.

Hormone therapy is highly effective for prostate cancer, but after that, castration resistance is acquired and chemotherapy becomes ineffective. As a model for this, when the medium of human prostate cancer cell line C4-2 is changed from the presence of FBS to CSS from which hormones had been removed, C4-2 cell changes to hormone-independent growth. When both cells were stained with GAG-binding lectin mutants, the binding was increased approximately 2.5 times in C4-2 cells cultured in the presence of CSS. In model mice for dilated cardiomyopathy, normal cardiomyocytes were strongly stained with another GAG-binding lectin mutant however regenerated cardiomyocytes could not be stained with any of these GAG-binding lectin mutants. These findings indicated that GAG-mediated cell growth was enhanced in castration-resistant prostate cancer, and that regenerated cardiomyocytes could not transmit GAG-mediated survival signal. To clarify modules for GAG-mediated signaling, proximity labeling was applied using a fusion protein of biotin ligase and GAG-binding lectin. By adding the fusion protein thus obtained on the cell surface, some proteins involved in GAG-mediated signalling were biotinylated and separated on the gel of two-dimensional gel electrophoresis.

We studied also on research about O-GlcNAcylated proteins. O-GlcNAcylation is reversible modification of GlcNAc on cytoplasmic and nuclear proteins. Initially, identification of highly sensitive O-GlcNAcylated proteins in ES cells, and establishment of a technique for identifying O-GlcNAcylated residues using a mass spectrometer were performed. Furthermore, we also established a method for producing an antibody that specifically recognizes O-GlcNAcylated site. As a

result of staining of various cancer specimens using this antibody, differentiated cancer showed positive in the less differentiated region, and dedifferentiated and poorly differentiated types were strongly stained. As the next goal, we performed proximity labeling in which a fusion protein of biotin ligase was expressed intracellularly and proteins in the vicinity were biotinylated. Several biotinylated proteins were identified by two-dimensional electrophoresis, and spots that interact in an O-GlcNAc modification-dependent manner were identified by comparison with those in which the O-GlcNAc modification site is replaced with Ala. A compound which abrogates the interaction between O-GlcNAcylated protein and its partner could be a drug against cancer. Though the O-GlcNAcylation, which was known as a kind of glycosylation, was shown to be a target molecule for drugs through such a series of analyses.