

研究紹介

花粉アレルゲンの糖鎖構造特性と糖鎖ポリマーの合成

前田 恵
(農芸化学コース)

Structural Features of Pollen Allergens N-Glycans and Synthesis of Glycopolymer carrying Multivalent N-glycans

Megumi Maeda

(Course of Applied Biochemistry)

Plant complex type N-glycans bearing β 1-2 xylosyl and/or α 1-3 fucosyl residue(s) on the tri-mannosyl core (Man α 1-6 [Man α 1-3]Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc) show strong antigenicity in mammals, so they are called "plant antigenic N-glycans". Recently, Japanese cypress pollen allergen, Cha o3, has been newly reported. The glycoform of Cha o3 is similar to those of major glycoallergens in cedar or cypress pollens (Cry j1 and Jun a1), that is, these three glycoallergens have plant antigenic N-glycans. Thus, it is important to clarify the immunological role of plant antigenic N-glycans in pollinosis. In a previous report, we found that the free plant antigenic N-glycan, Man₃Fuc₁Xyl₁GlcNAc₂ (M3FX) significantly suppressed Japanese cedar pollen allergen (Cry j1)-specific Th2 immune response, such as cell proliferation and IL-4 production *in vitro*, suggesting that M3FX can be used as a lead compound in developing anti-allergic drugs. In order to elucidate the Th2 immunosuppressive function of M3FX, in this study we have developed a new method with hydrophilic partitioning to prepare a large-scale of glycopeptide bearing M3FX (Asn-M3FX) from glycoproteins of *Ginkgo biloba* seeds. Further, we have synthesized a novel glycopolymer carrying multivalent M3FX by a coupling of Asn-M3FX and poly- γ -L-glutamic acid (γ -PGA) using DMT-MM. The resulting glycopolymers were purified by a combination of gel-permeation and RP-HPLC. The incorporation of Asn-M3FX into γ -PGA (mol%) was estimated by amino acid composition analysis. The incorporation rate of Asn-M3FX to γ -PGA was 15.4%, indicating that nearly 800 molecules of Asn-M3FX were incorporated into one molecule of γ -PGA. In future study, we plan to discuss the immunological activities of glycopolymers.

Key words : plant antigenic N-glycans, pollinosis, Th2 immune response, IL-4, glycopolymers

緒言

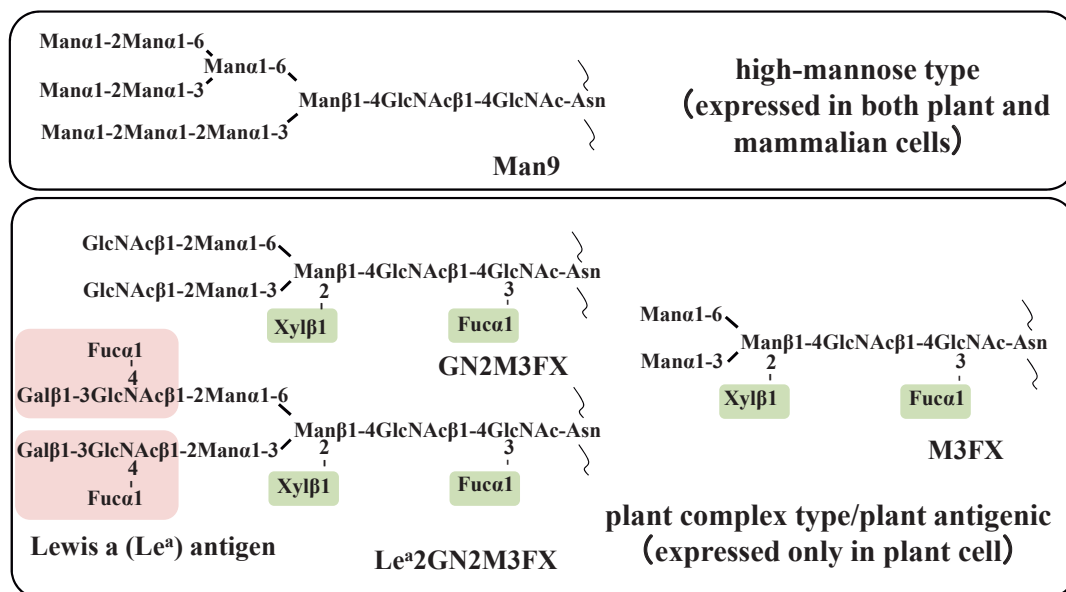
スギやヒノキ花粉アレルゲンの多くはアスパラギン結合型糖鎖 (N-グリカン) を有する糖タンパク質 (グリコアレルゲン) である^{1,2,3}。植物 N-グリカンの構造にはハイマンノース型と植物複合型があり, いずれもトリマンノシルコア (Man α 1-6 [Man α 1-3]Man β 1-4 GlcNAc β 1-4 GlcNAc) 構造を共通コア構造として持つ^{4,5}。図 1 に示したように, ハイマンノース型は 5~9 分子のマンノース残基を含んでいるが, 植物複合型はトリマンノシルコア構造に α 1,3 結合フコース残基と β 1,2 結合キシロース残基を含んでおり, それらの存在が哺乳類に対して強い抗原性を示す事から, 植物抗原性糖鎖とも呼ばれている^{6,7,8,9}。植物抗原性糖鎖にはコア構造 Man₃Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂ (M3FX) の非還元末端側が N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) やルイス a (Le^a) 抗原 (Gal β 1-3 [Fuc α 1-4]GlcNAc β 1-) により修飾された構造 (GN2M3FX, Le^aGN2M3FX など) も存在している^{10,11,12,13,14}。この理由により長い間, グリコアレルゲン上の抗原性糖鎖は IgE のエピトープになるかどうか, という議論が続いていたが, 遊離の植物抗原性糖鎖 M3FX を用いた阻害 ELISA 法により, スギ花粉症患者の IgE はスギ花粉アレルゲン Cry j1 上の植物抗原性糖鎖を主要なエピトープとして認識していない, という結果が得られている¹⁵。また, *in vitro* の培養実験により, 遊離の植物抗原性糖鎖 M3FX は, スギ花粉症患者末梢血由来のスギ花粉アレルゲン Cry j1 特異的な Th2 免疫応答 (細胞増殖および IL-4 産生) を有意に抑制するという結果も得られており, 植物抗原性糖鎖 M3FX が花粉症の抗アレルギー薬剤として用いられる可能性に期待が持たれている¹⁵。そこで本研究では, 植物抗原性糖鎖 M3FX による Th2 免疫応答抑制機構を解明するために, (1) 構造均一な植物抗原性糖鎖 M3FX を有する糖ペプチド (Asn-糖鎖) の多量精製法の確立, (2) 糖鎖を多価に結合している糖鎖ポリマーの合成, (3) その免疫活性解析と糖鎖結合レセプターの同定を試みることを目的としている。本題に入る前に, 最近同定された新しい日本ヒノキ花粉アレルゲン Cha o3 糖鎖の構造解析の結果について, スギ・ヒノキ花粉アレルゲン糖鎖との構造的特徴を比較し紹介する。

スギ・ヒノキ花粉アレルゲン糖鎖の構造的特徴

花粉症における植物抗原性糖鎖の関わりを明らかにするため, これまでに, 日本スギ花粉アレルゲン Cry j1, マウンテンセダールアレルゲン Jun a1, 日本ヒノキ花粉アレ

Received November 1, 2018

Graduate School of Environmental and Life Science,
Okayama University



Asn, asparagine; Man, D-mannose; GlcNAc, N-acetyl-D-glucosamine; Gal, D-galactose; Fuc, L-Fucose; Xyl, D-xylose

Fig. 1 Structural features of high-mannose type and plant complex type N-glycan

Table 1 Comparison of N-glycan structures of cedar pollen allergens (Jun a1 and Cry j1) and cypress pollen allergens (Cha o1 and Cha o3)

Structure of N-glycans	Jun a1 (A)	Jun a1 (B)	Cry j1	Cha o1	Cha o3
GN1M3FX	nd	3%	nd	nd	10%
GN2M3FX	75%	76%	47%	89%	39%
Gal1GN2M3FX	nd	nd	nd	nd	4%
Le ^a 1GN2M3FX	23%	21%	38%	nd	14%
Le ^a 1Gal1GN2M3FX	nd	nd	nd	nd	8%
Le ^a 2GN2M3FX	2%	nd	15%	nd	25%
Man9, Man8, Man7	nd	nd	nd	11%	nd

nd : not detected.

Reference. 14) Osada, T., *et al.* 2017

ルゲン Cha o1 の糖鎖構造を行い、いずれも植物抗原性糖鎖が結合していることを明らかにしている^{11,12,13)}(表1)。近年、新しい日本ヒノキ花粉アレルゲン Cha o3 が同定され、セルラーゼ様のドメインを有する糖タンパク質であることが報告されている¹⁶⁾。そこで当研究室では Cha o3 の糖鎖構造解析を行い、既報のスギ・ヒノキ花粉アレルゲン糖鎖との構造的な相関性を調べた。具体的には、Cha o3 (0.3 mg) をヒドラジン分解し糖鎖を遊離させ、N-アセチル化後、ピリジルアミノ化 (PA 化) により蛍光標識した。PA 化糖鎖は、逆相 HPLC、サイズフラクシオネーション HPLC により精製後、逐次酵素消化法及び ESI-MS、MS/MS 分析により構造解析を行った。その結果、Cha o3 には植物抗原性糖鎖が結合しており、Cry j1、Jun a1、Cha o1 と同様に主要構造は、GlcNAc₂Man₃Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂

(GN2M3FX, 39%) であった。一方で、Cha o1 からは検出されなかった Le^a 抗原含有植物抗原性糖鎖は、Gal₁Fuc₁GlcNAc₂Man₃Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂ (Le^a1GN2M3FX, 14%) および Gal₂Fuc₂GlcNAc₂Man₃Xyl₁Fuc₁GlcNAc₂ (Le^a2GN2M3FX, 25%) が結合しており、Cha o3 糖鎖の構造的特徴は Cry j1 および Jun a1 のそれらと高い相関性を示すことが明らかになった¹⁴⁾(表1)。

構造均一な糖鎖を有する糖ペプチド (Asn-糖鎖) の多量精製法の確立

前述したように、遊離の植物抗原性糖鎖 M3FX はスギ花粉アレルゲン特異的な Th2 免疫応答を抑制する。この抑制機構を解明するためには、構造均一な M3FX を有する糖ペプチド (Asn-糖鎖) を非標識で多量精製する必要

がある。そこで本研究では、新規親水性クロマト法を考案し Asn-M3FX の多量精製を以下の方法に従って行った。これまでに糖タンパク質糖鎖の主要構造が M3FX であることが明らかになっている銀杏種子(1.9 kg) を用い¹⁷⁾、アセトン脱脂粉末(900 g) から可溶性タンパク質を抽出し凍結乾燥品(62 g) を得た。可溶性タンパク質の凍結乾燥品(33 g) は還元カルボキシメチル化を行い、アクチナーゼ消化後、3種類のゲル濾過に供することで糖ペプチドを精製した。糖ペプチドは凍結乾燥後、50% アセトニトリルに溶解し、Shodex Asahipak NH₂P-50 樹脂を用いた親水性クロマトに供し更なる精製を行った。80% アセトニトリルで非吸着画分を洗浄し、次いで0.1% TFA で吸着画分の糖ペプチドを溶出した。最後に0.1 N NH₄OH による溶出を行い3つの画分を得た。アミノ酸組成分析により、0.1% TFA 画分の糖ペプチドは、Asp と GlcNH₂ が1:1.5の比率で検出され、Asn-糖鎖(103 mg) が精製されていることを確認できた。糖鎖構造解析は、Asn-糖鎖をヒドラジン分解、N-アセチル化により N-グリカン調整後、PA 化により蛍光標識を行い、逆相 HPLC、サイズ排阻クロマト HPLC により PA 化糖鎖を精製後、酵素消化、MS、MS/MS 分析にて行った。その結果、Asn-糖鎖の糖鎖構造は、約90% が M3FX であることを確認できた。残りの糖鎖は、M3FX の非還元末端に GlcNAc を1から2残基結合した構造であり、 β -N-Acetylhexosaminidase 消化により、100% M3FX を有する Asn-M3FX を精製することも可能となった。以上の結果から、新規親水性クロマト法を用いることにより、銀杏種子貯蔵タンパク質30 g から約100 mg の Asn-M3FX を精製できた(図2)¹⁸⁾。

glycoproteins (~30 g)

- actinase digestion
- gel filtration

glycopeptides

- hydrophilic partitioning

0.1% TFA Fraction

Asn-M3FX (~100 mg)

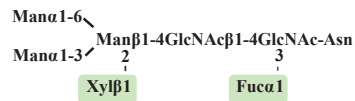


Fig. 2 Yield of Asn-M3FX from glycoproteins of *Ginkgo biloba* seeds

糖鎖ポリマーの合成

M3FX によるスギ花粉アレルゲン特異的な Th2 免疫応答抑制機構を解明するための研究の一環として、糖鎖を多価に結合させた糖鎖ポリマーの作製を試みた。以前から、ネオグリコプロテインを作製する手法として、タンパク質のリジン残基のアミノ基に糖鎖の還元末端アルデヒド基を還元的アミノ化反応により結合させる方法がよく知られている。しかし、本手法はカップリング効率

が非常に低く、また一度反応に用いた糖鎖は還元され、再利用出来ないというデメリットがあった。そこで我々は、糖鎖ポリマーの担体として L 体で構成される生物分解性ポリマーのポリ- γ -L-グルタミン酸 (γ -L-PGA, 平均分子量75万, TOYOBO 社製) を用い、Asn-糖鎖のアミノ基を γ -L-PGA のカルボキシル基に DMT-MM により縮合させ Asn-M3FX を多価に結合させる手法を開発した。合成した糖鎖ポリマーは、ゲルろ過と逆相 HPLC により精製を行った(図3)。 γ -L-PGA への Asn-

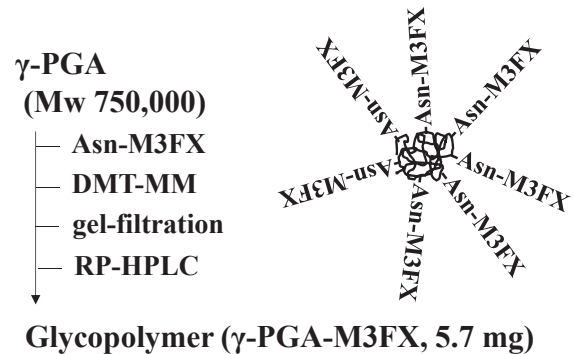


Fig. 3 Synthesis of glycopolymer carrying M3FX

糖鎖の結合率 (mol%) は、アミノ酸組成分析により Asp と Glu のモル比から算出した。植物抗原性糖鎖ポリマーは5.7 mg を合成し精製できた。アミノ酸組成分析により、 γ -L-PGA への Asn-糖鎖の結合率 (mol%) は15.4% であり、 γ -L-PGA の1分子あたり、800分子程度の Asn-M3FX を結合させることに成功した¹⁹⁾(論文投稿準備中)。

免疫活性解析および糖鎖結合レセプターの同定に向けて

近年、抗原提示細胞となる樹状細胞は、細胞表面に様々な糖鎖結合タンパク質を発現しており、中でも C 型レクチン DC-SIGN (dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin) は、外来抗原のフコース残基、マンノース残基、N-アセチルグルコサミン残基を認識し、細胞内取り込みや抗原提示に関わっていることが明らかになってきている^{20, 21, 22)}。そこで、本研究では合成した M3FX 糖鎖ポリマーによる(1)抗原提示細胞の分化 (CD80/CD86 発現) および抗原提示 (HLA-DR 発現) への影響や、(2)スギ花粉アレルゲン特異的 Th2 分化の制御について解析し、植物抗原性糖鎖のコア構造 M3FX が有する Th2 免疫抑制活性のメカニズムを解明することを試みている。また、Le^a 抗原は動物細胞の細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を担っていることから、スギ・ヒノキ花粉アレルゲンの主要糖鎖構造である GN2M3FX および Le^a2M3FX などの植物抗原性糖鎖についても、花粉症の免疫応答に関わっている可能性が考えられる。一方、水草 (オオカナダモやコカナダモなど) やタケノコ可食部の糖タンパク質がスギ・ヒノキ花

粉アレルゲンに多く存在している GN2M3FX および Le^a2M3FX の調製に適していることを明らかにしている^{23,24)}。今後は、当研究室で開発した手法を用いて、スギ・ヒノキ花粉アレルゲンに特徴的な Asn-GN2M3FX や Asn-Le^a2M3FX を多量精製し、それらを多価に結合させた糖鎖ポリマーの合成を行い、それら植物複合型糖鎖の免疫活性解析についても取り組んでいく予定である。

参考文献

- 1) Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T., Shida, T. : Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J Allergy Clin Immunol.* **71**, 77—86 (1983)
- 2) Taniai, M., Ando, S., Usui, M., Kurimoto, M., Sakaguchi, M., Inouye, S., Matuhasi, T. : N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I). *FEBS Lett.* **239**, 329—332 (1988)
- 3) Di Felice, G., Barletta, B., Tinghino, R., Pini, C. : Cupressaceae pollinosis : identification, purification and cloning of relevant allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* **125**, 280—289 (2001)
- 4) Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A.C., Gomord, V., Faye, L. : N-Glycoprotein biosynthesis in plants : recent developments and future trends. *Plant Mol Biol.* **38**, 31—48 (1998)
- 5) Kobata, A. : “Glycoprotein glycan structures,” in *Comprehensive Glycoscience — From Chemistry to Systems Biology*, ed. H. Kamerling (Oxford : Elsevier), **1**, 39—72 (2007)
- 6) Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Chrispeels, M.J., Armentia, A., Salcedo, G., Gomez, L. : Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology.* **6**, 471—477 (1996)
- 7) van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J.P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L., Lerouge, P. : Beta (1,2)-xylose and alpha (1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem.* **275**, 11451—11458 (2000)
- 8) Bardor, M., Faveeuw, C., Fitchette, A.C., Gilbert, D., Galas, L., Trottein, F., Faye, L., Lerouge, P. : Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha (1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology.* **13**, 427—434 (2003)
- 9) Jin, C., Altmann, F., Strasser, R., Mach, L., Schähs, M., Kunert, R., Rademacher, T., Glössl, J., Steinkellner, H. : A plant-derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits. *Glycobiology.* **18**, 235—241 (2008)
- 10) Alisi, C., Afferni, C., Iacovacci, P., Barletta, B., Tinghino, R., Butteroni, C., Puggioni, E.M., Wilson, I.B., Federico, R., Schininà, M.E., Ariano, R., Di Felice, G., Pini, C. : Rapid isolation, characterization, and glycan analysis of Cup a 1, the major allergen of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen. *Allergy.* **56**, 978—984 (2001)
- 11) Kimura, Y., Kamamoto, M., Maeda, M., Okano, M., Yokoyama, M., Kino, K. : Occurrence of Lewis a epitope in N-glycans of a glycoallergen, Jun a 1, from mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen. *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**, 137—144 (2005)
- 12) Maeda, M., Kamamoto, M., Hino, K., Yamamoto, S., Kimura, M., Okano, M., Kimura, Y. : Glycoform analysis of Japanese cedar pollen allergen, Cry j 1. *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**, 1700—1705 (2005)
- 13) Kimura, Y., Kuroki, M., Maeda, M., Okano, M., Yokoyama, M., Kino, K. : Glycoform analysis of Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1 : a comparison of the glycoforms of cedar and cypress pollen allergens. *Biosci Biotechnol Biochem.* **72**, 485—491 (2008)
- 14) Osada, T., Maeda, M., Tanabe, C., Furuta, K., Vavricka, C.J., Sasaki, E., Okano, M., Kimura, Y. : Glycoform of a newly identified pollen allergen, Cha o 3, from *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress, Hinoki). *Carbohydr Res.* **448**, 18—23 (2017)
- 15) Okano, M., Kimura, Y., Kino, K., Michigami, Y., Sakamoto, S., Sugata, Y., Maeda, M., Matsuda, F., Kimura, M., Ogawa, T., Nishizaki, K. : Roles of major oligosaccharides on Cry j 1 in human immunoglobulin E and T cell responses. *Clin Exp Allergy.* **34**, 770—778 (2004)
- 16) Osada, T., Harada, T., Asaka, N., Haruma, T., Kino, K., Sasaki, E., Okano, M., Yamada, A., Utsugi, T. : Identification and gene cloning of a new major allergen Cha o 3 from *Chamaecyparis obtusa* (Japanese cypress) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 911—913 (2016)
- 17) Kimura, Y., Matsuo, S., Takagi, S. : Enzymatic properties of a Ginkgo biloba endo-beta-N-acetylglucosaminidase and N-glycan structures of storage glycoproteins in the seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 253—261 (1998)
- 18) Maeda, M., Takeda, N., Mano, A., Yamanishi, M., Kimura, M., Kimura, Y. : Large-scale preparation of Asn-glycopeptide carrying structurally homologous antigenic N-glycan. *Biosci Biotechnol Biochem.* **77**, 1269—1274 (2013)
- 19) Maeda, M., Takeda, N., Kimura, M., Kimura, Y. : Synthesis of a novel glycopolymer carrying multivalent plant antigenic N-glycans. *Glycoconj. J.* **32**, 276 (2015)
- 20) Cambi A, and Figdor CG. : Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 539—546 (2003)
- 21) van Liempt, E., Bank, C.M., Mehta, P., García-Vallejo, J.J., Kwar, Z.S., Geyer, R., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Kooyk, Yv., van Die, I. : Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett.* **580**, 6123—6131 (2006)
- 22) Hsu, S.C., Chen, C.H., Tsai, S.H., Kawasaki, H., Hung, C.H., Chu, Y.T., Chang, H.W., Zhou, Y., Fu, J., Plunkett, B., Su, S.N., Vieths, S., Lee, R.T., Lee, Y.C., Huang, S.K. : Functional interaction of common allergens and a C-type lectin receptor, dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), on human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 7903—7910 (2010)
- 23) Maeda, M., Tani, M., Yoshiie, T., Vavricka, C.J., Kimura, Y. : Structural features of N-glycans linked to glycoproteins expressed in three kinds of water plants : Predominant occurrence of the plant complex type N-glycans bearing Lewis a epitope. *Carbohydr. Res.* **435**, 50—57 (2016)
- 24) Tanabe, C., Furuta, K., Maeda, M., Kimura, M. : Structural feature of N-glycans of bamboo shoot glycoproteins : useful source of plant antigenic N-glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 1405—1408 (2017)