

論文内容の要旨

論文題目

簡便なレクチン-糖鎖間相互作用解析方法の確立およびその応用

氏名 河崎徳人

【はじめに】

レクチンは糖鎖を認識するタンパク質群である。レクチンは特異性をもって糖鎖に結合し、その結合は細胞内での新生糖タンパク質の品質管理、細胞外における細胞間接着、細胞の移動など様々な生命現象に関与する。したがってレクチンが関与する生命現象を理解するために、レクチンの糖結合特異性を明らかにしなければならない。

ヒトゲノムが解読され、既知のレクチンとの相同性から、糖結合活性を有するタンパク質（新規レクチン）は数多く存在すると推定されており、新規レクチンをスクリーニングするための簡便な方法が求められている。そこで本研究では新規レクチンをスクリーニングするための簡便なレクチン-糖鎖間相互作用解析方法を確立し、それを利用してレクチンの糖結合特異性を決定することを目的とした。

【細胞表面糖鎖と多価にしたレクチンを用いる相互作用解析方法】

序論

多量体化したレクチンをプローブとして、細胞表面糖鎖をリガンドとする相互作用解析方法を確立した。細胞表面には様々な糖鎖が発現しており、細胞表面糖鎖は培養細胞株間で異なっている。そこで、様々な細胞株を糖鎖リガンドに利用しようと考えた。この方法では、細胞表面糖鎖を利用することで糖鎖リガンド調製の手間を省くことができ、糖鎖が細胞表面に複数あるため、レクチンを多価にすることによって見かけ上、糖鎖への親和性を上げることができる。リガンドとしてある特定の糖鎖構造を持っている糖鎖合成不全細胞株を利用することもできる。さらに、糖鎖合成阻害剤で細胞表面糖鎖を改変することもできる。

結果および考察

高マンノース型糖鎖特異的レクチン VIP36 をモデルにして、細胞表面糖鎖と多価にしたレクチンを用いるレクチン-糖鎖間相互作用解析方法の有効性を検討した。大腸菌発現系で作製した可溶性 VIP36 組換えタンパク質 (sVIP36) をフィコエリスリン (PE) 標識 streptavidin (SA-PE) を介して多量体にし、糖鎖合成阻害剤 deoxymannojirimycin (DMJ)、kifnensine (KIF)、swainsonine (SW) で処理したヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLaS3 との結合をフローサイトメトリーによって解析した。図 1 に示すように DMJ、KIF で細胞を処理すると、*N*-結合型糖鎖のプロセッシングは高マンノース型で停止する (図 1)。一方、SW で細胞を処理すると *N*-結合型糖鎖のプロセッシングは混成型で停止する (図 1)。

VIP36-SA-PE と DMJ 処理した HeLaS3 細胞との結合をフローサイトメトリーで解析した (図 2)。その結果、VIP36-SA-PE は DMJ、KIF 処理した細胞に Ca^{2+} の存在下で結合し、薬剤処理していない細胞や SW 処理した細胞には結合しなかった (図 2A)。このことから、VIP36-SA-PE は DMJ、KIF 処理によって細胞表面における発現が増加した高マンノース型糖鎖に結合し、その結合は Ca^{2+} 依存的であることが示唆された。

次に、VIP36-SA-PE と DMJ 処理した細胞との結合が高マンノース型糖鎖を介していることを証明するために、高マンノース型糖鎖を切断する酵素 endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H (Endo H) で処理した細胞と VIP36-SA-PE との結合を調べた。その結果、VIP36-SA-PE は Endo H 処理した細胞にほとんど結合しなかった (図 2B)。このことから、VIP36-SA-PE は細胞表面の高マンノース型糖鎖に結合していることが強く示唆された。以上の実験から、細胞表面糖鎖と多価にしたレクチンを用いる方法によってレクチン-糖鎖間相互作用を検出できることが明らかになった。

この実験系を利用して VIP36-SA-PE と DMJ 処理した細胞との結合がどのような高マンノース型糖鎖で阻害されるかを調べた。そのためにいくつかの高マンノース型糖鎖誘導体を用意した (図 3A)。結合阻害実験の結果、VIP36-SA-PE と DMJ 処理した細胞との結合は、グルコシル化された高マンノース型糖鎖よりも脱グルコシル化した高マンノース型糖鎖により強く阻害された (図 3B)。マンノースの数の違いは阻害の強さにあまり影響しなかった。このことから、VIP36 はグルコースの有無を識別し、脱グルコシル化した高マンノース型糖鎖により強く結合することが示唆された。

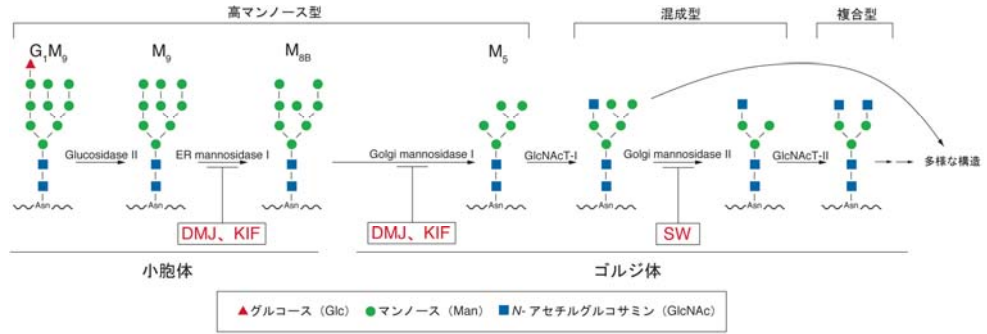


図 1 *N*-結合型糖鎖のプロセッシングおよび糖鎖合成阻害剤の作用点
Deoxymannojirimycin (DMJ)、kifnensine (KIF) は ER mannosidase I、Golgi mannosidase I を阻害する。GlcNAcT-I は G_1M_9 、 M_9 、 M_{9B} に作用できず、*N*-結合型糖鎖の構造は高マンノース型で止まる。Swainsonine (SW) は Golgi mannosidase II を阻害する。GlcNAcT-II は M_5 に作用できず、*N*-結合型糖鎖の構造は混成型で止まる。

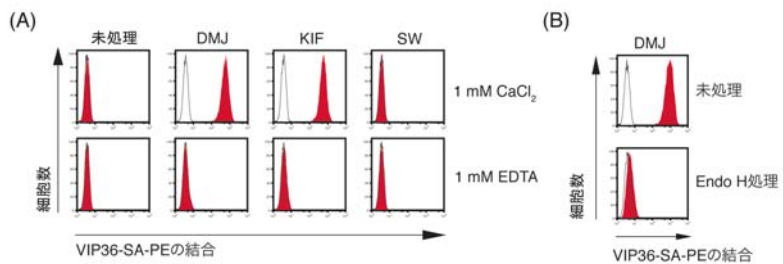


図 2 VIP36-SA-PE と糖鎖合成阻害剤で処理した HeLaS3 細胞との結合解析
(A) HeLaS3 細胞を 1 mM DMJ、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KIF、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SW の存在下で 24 時間培養した。細胞を回収し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の VIP36-SA-PE (赤いヒストグラム)、または SA-PE (ネガティブコントロール、黒い実線) で染色した。(B) HeLaS3 細胞を 1 mM DMJ の存在下で 24 時間培養した。細胞を回収し、終濃度 1.0×10^4 U/ml で Endo H を加え、37°C で 1 時間反応させた。その後、細胞を洗浄し、(A) と同様に細胞を染色した。独立した 3 回の実験において同じ傾向を示していた。

結論

本研究では、細胞内レクチン VIP36 をモデルとして細胞表面糖鎖と多価にしたレクチンを用いるレクチン-糖鎖間相互作用解析方法を確立し、それまで不明であった VIP36 の詳細な糖結合特異性を決定した。

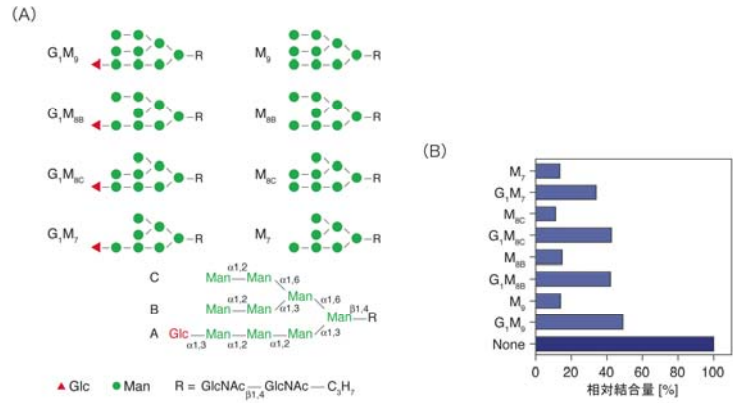


図3 VIP36は糖グルコシル化した高マンノース型糖鎖を好んで認識する。(A) VIP36の結合阻害実験に用いた高マンノース型糖鎖誘導体の構造を示す。還元末端はプロピル基になっている。3つの分枝をそれぞれA、B、Cアームと称する。(B) 10 μg/mlのVIP36-SA-PEと終濃度5 mg/mlで高マンノース型糖鎖誘導体を混合し、25°Cで1時間静置した。その後、細胞を染色した。単糖の存在下でのVIP36-SAの結合は単糖の非存在下での結合を100とし、標準化した。独立して2回行った実験の平均値を示す。

【レポーターアッセイを用いる相互作用解析方法】

序論

細胞表面にレクチン分子を発現したレポーター細胞を用いるレポーターアッセイを確立し(図4)、新規レクチンの同定を試みた。細胞表面のレクチンが多価の糖鎖リガンドと結合し、架橋されると、レポーター分子のCD3ζ領域にある immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) がリン酸化され、シグナルが伝達される。シグナルは最終的にβ-ガラクトシダーゼの産生を誘導するため、レポーター細胞を糖鎖リガンドと共培養後にβ-ガラクトシダーゼ活性を測定することでレクチンと糖鎖との結合を検出することができる(図4B)。レポーターアッセイを利用する方法は組換えタンパク質の精製が不要であり、複数のレクチン候補遺伝子を一度にスクリーニングできる。

結果および考察

マンノース (Man)、フコース (Fuc) 特異的レクチン Dectin-2 をモデルレクチンとしてレポーターアッセイの有効性を検討した。

Dectin-2 発現レポーター細胞を樹立し、様々

な糖鎖リガンドを用いてレポーターアッセイを行った。多価の糖鎖リガンドである単糖-ポリアクリルアミドを用いたレポーターアッセイの結果、Dectin-2 レポーター細胞は多価の糖鎖リガンドである Man、Fuc に反応し、Gal、Glc など他の単糖には反応しなかった。また、DMJ 処理した CHO-K1 細胞に反応した。これらの結果からレポーターアッセイによって、レクチン-糖鎖間相互作用が検出できることがわかった。

レポーターアッセイを用いて新規レクチンの同定を試みた。レクチン候補分子として LCCL ドメインを持つタンパク質に注目した。LCCL ドメインはリポ多糖 (LPS) 結合タンパク質であるカプトガニの生体防御因子 factor C に見いだされるドメインである。ヒトゲノム上には LCCL ドメインを持つ遺伝子は6個ある。LCCL ドメインを持つタンパク質を発現するレポーター細胞を樹立し、様々な糖鎖リガンドを用いてレポーターアッセイを行った。レクチン候補分子の一つ Cochlin は細胞外マトリックスの構成成分であることが報告されていた。そこで、他の構成成分に結合するかを調べた結果、Cochlin 発現レポーター細胞はグ

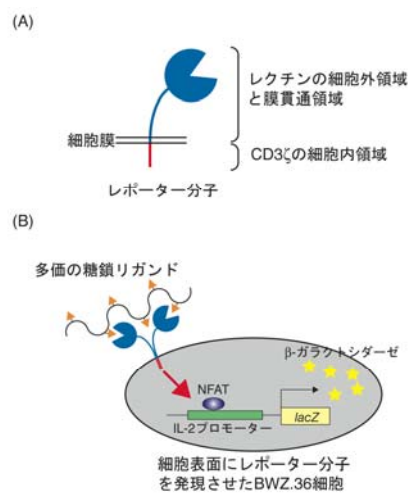


図4 本研究で確立したレポーターアッセイの原理

(A) レクチンの細胞外領域とCD3ζの細胞内領域を持つレポーター分子。(B) 細胞表面にレポーター分子を発現するBWZ.36細胞を樹立する。多価の糖鎖リガンドとの結合によってレポーター分子同士が架橋され、CD3ζからのシグナルが伝達される。BWZ.36細胞にはIL-2プロモーター配列の下流にβ-ガラクトシダーゼの遺伝子であるlacZを持つDNA断片が挿入されており、転写因子NFATによって細胞内にβ-ガラクトシダーゼが産生される。多価の糖鎖リガンドと細胞を共培養後に、細胞を溶解させその溶解液のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定することでレクチンと糖鎖との結合を検出できる。

リコサミノグリカン (GAG) を BSA に結合させた人口糖タンパク質 GAG-BSA に反応した。そこで他の分子に関して、GAG-BSA をリガンドにしたレポーターアッセイを行った。その結果 Vitrin、CRISPLD1、CRISPLD2 発現レポーター細胞はいくつかの GAG に反応し、DCBLD1、DCBLD2 発現レポーター細胞は反応しなかった (表 1)。このことから、LCCL ドメインを持つ分子の一部が GAG に結合することが示唆された。

レポーターアッセイの結果が正しいことを既存のレクチン-糖鎖間相互作用解析方法によって確認するために、Cochlin、Vitrin、CRISPLD2 のヒト IgG-Fc との融合タンパク質を作製し、プレートに固相化した GAG との結合を解析した。その結果、Cochlin、Vitrin、CRISPLD2-Fc 融合タンパク質はいくつかの GAG に結合した。結合特異性はレポーターアッセイと同じ傾向であった (表 1)。以上の結果から、Cochlin、Vitrin、CRISPLD1、CRISPLD2 は GAG に結合することが明らかになった。

糖結合特異性に関しては、Cochlin、Vitrin、CRISPLD1、CRISPLD2 と GAG との結合には GAG の硫酸化が必須であること、Cochlin、Vitrin、CRISPLD1、CRISPLD2 はデルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンに共通する構成単糖であるイズロン酸を好んで認識することが示唆された。

結論

本研究では、Dectin-2 をモデルとしてレポーターアッセイを用いたレクチン-糖鎖間相互作用解析方法を確立し、新規レクチンの同定を試みた。その結果、レポーターアッセイを利用して LCCL ドメインを持つタンパク質の一部が GAG に結合することを明らかにした。

【おわりに】

本研究では、新規レクチンをスクリーニングするための簡便な方法を二つ確立し、それらを用いてレクチンの糖結合特異性を決定した。今後、本研究で確立したレクチン-糖鎖間相互作用解析方法によって新規レクチンが同定され、糖結合特異性が決定されることが期待される。

新規レクチンの糖結合特異性を明らかにすることで糖結合特異性に注目したレクチンの機能解析を行うことができる。糖に結合できない変異体を発現させた場合、またはリガンドである糖鎖構造をなくした場合の表現型を解析することで、レクチンの機能、さらには糖鎖が関与する生命現象をより深く理解することができるだろう。

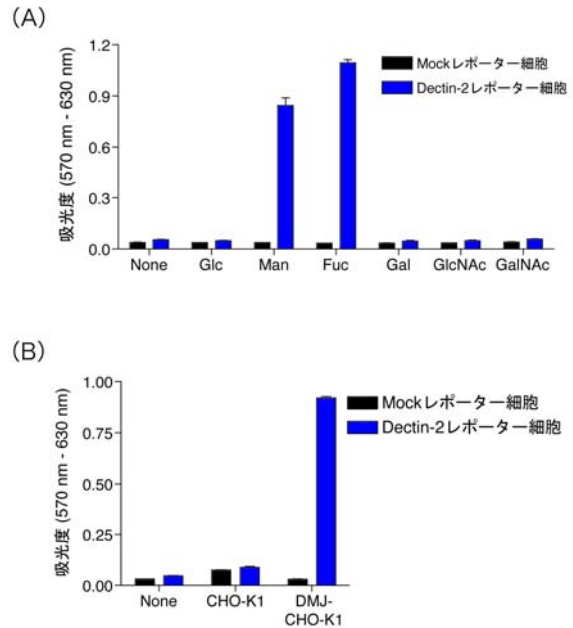


図5 Dectin-2 レポーター細胞と種々の糖鎖リガンドとの反応 (A) Dectin-2 レポーター細胞または Mock レポーター細胞を 10 μ g/ml の種々の単糖-ポリアクリルアミドを固相化してあるプレートで培養した。細胞を培養後、洗浄し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。(B) Dectin-2 レポーター細胞または Mock レポーター細胞を CHO-K1 細胞または 1 mM DMJ の存在下で 24 時間培養した CHO-K1 細胞 (DMJ-CHO-K1) と共培養した。細胞を培養後、洗浄し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。3 重測定の実験値および標準誤差を示す。Glc はグルコース、Man はマンノース、Fuc はフコース、Gal はガラクトース、GlcNAc は N-アセチルグルコサミン、GalNAc は N-アセチルガラクトサミンを示す。

表 1 LCCL ドメインを持つ分子のスクリーニング結果

| | GAG 結合活性 | レポーターアッセイ | ELISA |
|----------|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Cochlin | ○ | Hep > DS > HS | Hep > DS |
| Vitrin | ○ | Hep | Hep > HS > DS > CS-C |
| CRISPLD1 | ○ | Hep > DS, HS > CS-A | — |
| CRISPLD2 | ○ | Hep > DS > HS > CS-A > CS-C > LPS | Hep > DS > HS > CS-A > CS-C > LPS |
| DCBLD1 | × | — | — |
| DCBLD2 | × | — | — |

レポーターアッセイおよび ELISA の結果を示す。GAG 結合活性が検出できたものは○、できなかったものは×で示す。GAG 結合特異性を左から結合が強い順に示す。CS-A はコンドロイチン硫酸 A、CS-C はコンドロイチン硫酸 C、DS はデルマタン硫酸、HS はヘパラン硫酸、Hep はヘパリン、LPS はリポ多糖をそれぞれ示す。