

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06974

研究課題名(和文) 新規エラスチン結合タンパク質としてのガレクチン9とその機能

研究課題名(英文) Small leucine-rich repeat proteoglycans associated with mature insoluble elastin serve as binding sites for galectins

研究代表者

西 望(Nishi, Nozomu)

香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号：10145047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ガレクチンファミリーの中で、ガレクチン-9が不溶性エラスチンに対して最も高い親和性を示した。ガレクチン-9が結合するのはエラスチン分子そのものではなく、成熟した不溶性エラスチンに共有結合しているsmall leucine-rich repeat proteins/proteoglycans (SLRPs)ファミリーに属する一群の糖タンパク質、Lumican, Mimecan/Osteoglycin, Prolargin/PRELP, Fibromodulin, Versican、であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We found that mature insoluble elastin is capable of binding Gal-9 and other members of the human galectin family. Lectin blot analysis of a series of commercial water-soluble elastin preparations, PES-(A)～PES-(E), revealed that only PES-(E) contained substances recognized by Gal-9. Gal-9-interacting substances in PES-(E) were affinity-purified, digested with trypsin and then analyzed by reversed-phase HPLC. Peptide fragments derived from five members of the small leucine-rich repeat proteoglycan family, versican, lumican, osteoglycin/mimecan, prolargin and fibromodulin, were identified by N-terminal amino acid sequence analysis. The results indicate that Gal-9 and possibly other galectins recognize glycans attached to small leucine-rich repeat proteoglycans associated with insoluble elastin and also indicate the possibility that mature insoluble elastin serves as an extracellular reservoir for galectins.

研究分野：生化学

キーワード：galectin elastin oligosaccharide SLRPs lumican mimecan prolargin fibromodulin

1. 研究開始当初の背景

動物レクチンファミリーの1つであるヒトガレクチンファミリーは、約10種類の遺伝子で構成され、 α -ガラクトシドに対する結合特異性をその特徴とする。ガレクチンの生理機能として、C型レクチンの場合と同様、主に免疫反応の調節に関する多様な機能が報告されているものの、生体における真の役割については不明な点が多い。特に、タンデムリピート型ガレクチン(分子内に2個の糖鎖結合ドメインを持つ)の研究は、比較的早い時期に発見されたガレクチン1やガレクチン3(ともに1個の糖鎖結合ドメインを持ち、各々プロト型とキメラ型サブタイプに分類される)と比較して遅れていた。私達は、ガレクチンファミリーの中でもタンデムリピート型に属するガレクチン9(Gal-9)を主要な研究対象として多面的な研究を行い、構造、糖鎖結合特異性、腫瘍細胞に対する細胞死誘導作用、免疫細胞に対する作用、治療薬開発、アレルギー、自己免疫疾患における役割と治療効果、などについて報告してきた。これまでGal-9の作用は溶液系(培養細胞の培地への添加など)において調べられてきたが、最近の研究成果は、Gal-9がコラーゲン素材に結合した状態で免疫細胞に作用できることを示している。さらにその後の研究から、Gal-9が結合するのはコラーゲンそのものではなく、主としてコラーゲン標品に混入したエラスチンであることが明らかとなった(未発表データ)。高純度の不溶性エラスチンを使用した結合実験の結果は、ガレクチンファミリーの中でも、特にGal-9がエラスチンに対して高い親和性を持つことを示している。また、不溶性エラスチンを酸加水分解して得られる水溶性エラスチンもGal-9に対する結合性を保持しており、Gal-9固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、Gal-9に親和性を示す成分を精製することができる。コラーゲンと並ぶ「古典的なタンパク質」として知られるエラスチンは、組織(特に動脈、靭帯、肺、皮膚など)の弾性機能に必須の因子である。エラスチン(エラスチン繊維)の特徴は、その弾性に加えて、分子間の高度な架橋構造の形成とこれに伴う不溶性であり、この不溶性がエラスチンの研究を困難にしている原因ともなっている。エラスチンの機能に関しては、弾性タンパク質としての機能以外に、その分解によって生じるペプチドが走化因子として炎症や癌の進行に関わることが報告されている(elastokine)。しかし、不溶性エラスチンに結合する生理活性因子とその機能に関する研究は限られており、細胞外基質におけるエラスチンの役割が十分に解明されているとはいえない。

2. 研究の目的

本研究では、Gal-9が非糖タンパク質であるエラスチンを認識するメカニズムを明らかにするとともに、エラスチン-Gal-9複合体形成がエラスチンの機能に与える影響を検討する。このために以下の点を調べる。(1)エラスチンに対するGal-9の結合特性の解明:エラスチン認識におけるGal-9の2つの糖鎖結合ドメインの役割とGal-9が認識する構造の同定、(2)エラスチンの分解(生理活性を持つエラスチンペプチド/elastokineの生成)に対するGal-9の影響、(3)エラスチン線維形成(in vitroモデル)に対するGal-9の影響、(4)弾性線維に注目したGal-9の組織内局在性の再検討及びGal-9ノックアウト動物組織(動脈、靭帯、肺、皮膚)の病理組織学的検討。このうち(2)と(3)は、既知のエラスチン機能に対するGal-9の影響を調べるものであるが、(4)の結果からエラスチンの新しい生物機能に関する手掛かりが得られた場合は、この機能に関する実験を追加する。

3. 研究の方法

1. Gal-9(安定化Gal-9及び各糖鎖結合ドメインを不活性化した変異体)と他のガレクチンファミリーのメンバー(Gal-1, 3, 8)を用いて、高純度不溶性エラスチンとガレクチンの結合をBinding assayにより定量的に解析し、エラスチンとの相互作用におけるGal-9の2つの糖鎖結合ドメインの寄与、典型的な糖鎖に対する親和性との関連を明らかにする。Gal-9が認識する構造の同定には、不溶性エラスチンを有機酸分解して得られる水溶性エラスチンを使用する。Gal-9固定化カラムでアフィニティー精製した水溶性エラスチンを酵素限定分解し、分解産物から逆相HPLCによってGal-9が親和性を示すペプチドを精製して構造を決定する。成熟したエラスチン分子は、リジン残基間の架橋により他のタンパク質には見られない複雑な構造を形成している。このため、通常の方法(N-末端アミノ酸配列分析)では、親和性を持つペプチドのアミノ酸配列/構造を決定できない可能性がある。その場合、エラスチンに存在する既知の架橋構造(desmosine, isodesmosineなど)を考慮し、質量分析法と核磁気共鳴分光法(NMR)による構造の推定を試みる(NMR解析は連携研究者が担当する)。

2. ノックアウト動物の組織学的/病理組織学的検討から、エラスチン-ガレクチン9複合体に関わる新しい機能に関する手掛かりが得られる可能性を考慮し、初年度にこの検討を始める。ノックアウトマウスは既に作製済みであり、香川大学において維持・繁殖され

ている。ノックアウトマウス及び対照マウスの各種組織のパラフィンブロックが保存されているため、これを用いてGal-9の免疫組織染色とエラスチン染色（膠原線維、筋繊維、弾性線維の識別染色）を行い、必要に応じて新たに採取した組織を利用する（凍結切片の作製など）。

3．現在、不溶性エラスチン、水溶性エラスチンともに、ブタ由来の製品（細胞外基質研究所製）が純度・価格などの面で最も研究に適しており、これまでの実験にもこれらの製品を利用してきた。しかし、ブタエラスチンに関しては、遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも部分的な配列しか報告されていないため、ORF全長のクローニングを行った（DBJ登録済み）。次年度の研究（*in vitro* エラスチン線維形成モデル）において、培養細胞におけるブタエラスチン（ヒトエラスチンも使用）の発現が必要なため、真核細胞用発現ベクターを用いたエラスチン強制発現の予備実験を行う。1．の実験からGal-9が認識するエラスチンの構造が同定された場合（但し、架橋構造が含まれる場合を除く）、当該部位に変異を導入してGal-9に対して親和性を示さないエラスチン変異体を作製する可能性がある。なお、先に述べたアフィニティー精製ペプチドのアミノ酸配列の確認にも、今回クローニングした配列データを利用する。

4．不溶性エラスチンをプロテアーゼで処理し、生成するペプチドを逆相HPLCにより定量的に分析する。ペプチドの同定（アミノ酸配列決定）は、質量分析とN-末端アミノ酸配列分析を組み合わせて行う。生理活性を持つエラスチンペプチドの構造については、すでに多くの報告がある。また、ペプチド混合物を試料として、単球（U937細胞）に対する遊走活性と線維芽細胞（HFL-1細胞）に対する増殖促進活性を測定する。エラスチンペプチドは線維芽細胞におけるMMP-1の発現を促進することが知られているため、増殖促進活性の測定と同時にMMP-1の発現についても検討する。プロテアーゼ処理前に、濃度を変えたGal-9で不溶性エラスチンを処理した場合と無処理の場合を比較して、Gal-9の影響を調べる。Gal-9はMMP-9やMMP-3を結合することが知られているため、エラスチンペプチドの生成に対して、促進あるいは抑制のどちらの方向にも作用する可能性がある。

5．エラスチン（トロポエラスチン）からエラスチン線維が形成される過程を*in vitro*で完全に再現するのは容易ではないが、毛様体色素上皮由来の細胞株を用いる*in vitro*エラスチン線維形成モデルが知られている。ARPE-19細胞はトロポエラスチンを発現していないが、トロポエラスチンを強制発現させることでエラスチン線維

の形成を観察することができる。ARPE-19細胞にブタトロポエラスチン（ヒトトロポエラスチン[クローニング済み]も使用）発現ベクターを導入し、エラスチン線維の形成を定量的に測定（ELISAによるdesmosineの定量）するとともに、抗エラスチン抗体と抗Gal-9抗体を用いてエラスチン線維の免疫蛍光染色を行う（共焦点顕微鏡による観察）。

ARPE-19細胞の培地に濃度を変えたGal-9を添加してその効果を検討する。ARPE-19細胞自身がGal-9を発現しているか否かは不明なため、予めGal-9の発現レベルをウェスタンブロットとELISA（Gal-9のELISAはすでに確立している）により調べ、有意な発現が認められた場合は、Gal-9 siRNAによるノックダウンがエラスチン線維の形成に与える影響も検討する。実験用いるGal-9 siRNAの効果は確認済みである。ARPE-19細胞の培地にGal-9を添加する方法で影響が観察されない場合は、Gal-9発現ベクターの導入による強制発現の効果を検討する。HUVECや線維芽細胞において、インターフェロン刺激によりGal-9の発現が亢進することが知られている。ARPE-19細胞がGal-9を発現している場合は、インターフェロン刺激の効果を利用できる可能性がある。

6．平成27年度にノックアウト動物、対照動物の組織学的/病理組織学的検討が終了していない場合は、引き続き検討を進める。組織学的/病理組織学的検討から、エラスチン（エラスチン-Gal-9複合体）に関するどのような手掛かりが得られるか（あるいは得られないか）は明らかではないため、この点についての研究計画を記述するのは困難である。しかし、これまでに蓄積されたGal-9の機能に関する研究結果を考慮すると、Gal-9が*in vivo*においてもエラスチン（弾性線維）と結合していた場合、弾性線維に対する何らかの免疫反応（例：血管炎症候群に分類される高安動脈炎、側頭動脈炎など）と関連する可能性がある。このような可能性が示唆された場合は、自己免疫疾患モデルマウスの研究によって得られた試料を利用し、自己免疫病態における弾性線維病理学的変化についても検討する。

7．平成27年度の研究結果から、Gal-9が親和性を示すエラスチン由来ペプチドを十分量精製することが可能であることが示された場合、時間的余裕がある場合に限って、Gal-9あるいはGal-9の2つの糖鎖結合ドメインのどちらか一方と、エラスチン由来ペプチドの複合体のX線結晶構造解析を行う予定である。X線結晶構造解析を行う場合は、連携研究者がこれ担当する。なお、Gal-9のX線結晶構造解析の結果はすでに報告している。

4. 研究成果

本研究は、不溶性エラスチンに親和性を示すガレクチン9 (Gal-9)が、非糖タンパク質であるエラスチンを認識する分子メカニズムを明らかにすることを主たる目的としている。本研究結果から、Gal-9 が結合するのはエラスチン分子そのもの(トロポエラスチン、あるいはその架橋反応によって生じる架橋構造)ではなく、成熟した不溶性エラスチンに共有結合している small leucine-rich repeat proteins/proteoglycans (SLRPs)ファミリーに属する一群の糖タンパク質、Lumican, Mibecan/Osteoglycin, Prolargin/PRELP, Fibromodulin, Versican、であることが示された。また、Gal-9 による細胞内情報伝達系の活性化に対して、これら SLRPs (プロテアーゼにより不溶性エラスチンから遊離される SLRPs 由来ペプチド)が影響を与える可能性、あるいはこの逆 (SLRPs 由来ペプチドの作用に対して Gal-9 が影響を与える可能性)を、2種類のヒト T 細胞株 (Jurkat, MOLT-4)を用いて検討したが、明らかな影響は認められなかった。さらに、in vitro で macrophage, dendritic cell に分化することが知られている THP-1, U937 細胞に対する SLRPs 由来ペプチドの効果を検討したが、分化に対して影響を与えなかった。一方、本研究に関連して行った Gal-9 と IgE の相互作用解析から、Gal-9 と IgE の結合において、Gal-9-IgE 糖鎖間と Gal-9-ペプチドバックボーン間の相互作用が共同的に働くことを示す結果が得られた。エラスチンと Gal-9 の結合に関する当初の予想は誤りであったが、これらの研究結果は、IgE 以外の分子に関しても、非糖鎖構造を認識することが Gal-9 の機能発現に繋がる可能性を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Yoshida, H., Nishi, N., Wada, K., Nakamura, T., Hirashima, M., Kuwabara, N., Kato, R., Kamitori, S.
X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-9 having two carbohydrate recognition domains with a metal-binding site
Biochem Biophys Res Commun., 490(4), 2017, 1287-1293, 査読有
2. Itoh, A., Nonaka, Y., Ogawa, T., Nakamura, T., Nishi, N.
Small leucine-rich repeat proteoglycans associated with mature insoluble elastin

serve as binding sites for galectins
Biosci. Biotechnol. Biochem. 81(11), 2017, 2098-2104, 査読有

3. Nakakita, S.-I., Itoh, A., Nakakita, Y., Nonaka, Y., Ogawa, T., Nakamura, T., Nishi, N.
Cooperative interactions of oligosaccharide and peptide moieties of a glycopeptide derived from IgE with galectin-9
J. Biol. Chem. 291, 2016, 968-979, 査読有
4. Fujihara, R., Chiba, Y., Nakagawa, T., Nishi, N., Murakami, R., Matsumoto, K., Kawauchi, M., Yamamoto, T., Ueno, M.
Albumin microvascular leakage in brains with diabetes mellitus
Microsc. Res. Tech. 79, 2016, 833-837, 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. 小川 崇, 東海林博樹, 野中康宏, 舘野浩章, 平林淳, 西望, 中村隆範
ヒト大腸がんおよび正常腸組織におけるガレクチン -4 の発現及び機能解析
第 90 回日本生化学会大会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会/ConBio2017)
2017 年 12 月 06 日 神戸
2. 野中康宏, 小川崇, 吉田裕美, 東海林博樹, 西望, 神鳥成弘, 中村隆範
ガレクチン -1 の糖鎖特異性および多量体構造とアポトーシス誘導活性の相関について
第 90 回日本生化学会大会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会/ConBio2017)
2017 年 12 月 06 日 神戸
3. 伊藤愛子, 中村隆範, 西望
ガレクチン-9 の細胞内移行がタンパク質分解システムに与える影響と細胞死誘導作用の関連
第 90 回日本生化学会大会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会/ConBio2017)
2017 年 12 月 06 日 神戸
4. 西望
ガレクチン9 のリンカー構造改変による組換えタンパク質の安定化と生産性の向上
第 4 回 レクチン利用技術研究会・ワークショップ 2017 年 09 月 東京
5. 野中康宏, 小川崇, 吉田裕美, 東海林博樹, 西望, 神鳥成弘, 中村隆範

ヒトガレクチン-1 とツメガエルガレクチン
-Va の比較による、ガレクチンの構造と機能
についての解析

第 89 回日本生化学会大会 2016 年 09 月 27 日
～ 2016 年 09 月 27 日 仙台国際センター / 東北
大学川内北キャンパス

6. 伊藤 愛子, 中村 隆範, 西 望
エンドサイトーシスによるガレクチン - 9
の細胞内移行と細胞死誘導作用の関連
第 89 回日本生化学会大会 2016 年 09 月 27 日
～ 2016 年 09 月 27 日 仙台国際センター / 東北
大学川内北キャンパス

7. 小川 崇, 東海林博樹, 野中康宏, 舘野浩
章, 平林 淳, 西望, 中村隆範
ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞
におけるガレクチン-4 の発現及び機能解析
第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子
生物学会年会 合同大会 2015 年 12 月 02 日
京都

8. 伊藤愛子, 中北慎一, 中村隆範, 西 望
ガレクチン 9-糖ペプチド相互作用のペプ
チドバックボーンによる増強
第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子
生物学会年会 合同大会 2015 年 12 月 02 日
京都

9. 野中康宏, 小川 崇, 吉田裕美, 東海林博
樹, 西望, 神鳥成弘, 中村隆範
ツメガエル皮膚ガレクチンの構造・機能解析
と galectin-1 との比較
第 15 回日本蛋白質科学会年会 2015 年 06 月
24-26 日 徳島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
[http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~rec/Site/](http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~rec/Site/HOME_M.html)
[HOME_M.html](http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~rec/Site/HOME_M.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
西 望 (NISHI, Nozomu)
香川大学・総合生命科学研究センター・
准教授
研究者番号：10145047

(2) 研究分担者
()
研究者番号：

(3) 連携研究者
野中 康宏 (NONAKA, Yasuhiro)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：50569217

(4) 研究協力者
()