

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18959

研究課題名(和文) 腸管における糖タンパク質の多様性と機能に関する組織化学的研究

研究課題名(英文) Histochemical study on diversity of fucosylated glycoproteins in the intestinal tract

研究代表者

菅原 大介 (Sugahara, Daisuke)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：00390766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス腸管において糖タンパク質が臓器・組織を構成するどの細胞に発現するか明らかにした。糖鎖およびコアタンパク質が異なる糖タンパク質をそれぞれ区別して発現分布を明らかにするため、特定の糖鎖が付加されたコアタンパク質の同定解析法(グライコプロテオミクス解析)と、免疫組織化学的解析法を活用した。フコシル化糖タンパク質の検討から、レクチンを用いたin situ PLA法による糖タンパク質の発現分布に関する解析が、タンパク質糖鎖修飾の生物学的機能を理解する上で有用であることを示した。また、rBC2LCNレクチンが認識するフコシル化糖鎖が腸管ニッチ細胞に特徴的な発現をすることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A glycan moiety of glycoproteins is functionally linked to various biological processes by modulating protein functions. Thus, characterization of proteins carrying an interested glycan is a key to clarify the glycan role. Distributions of glycans have been investigated in various organs and tissues. However, their carrier proteins are hardly described.

This study focused on fucosylated glycoproteins in mouse intestinal tract due to their functional significance in regulating the intestinal homeostasis. In this study, distributions of several fucosylated glycoproteins were clarified by utilizing in situ Proximity Ligation Assay and carrier protein identification result obtained by glycoproteomic analysis. This study also demonstrated the distinct expression of a fucosylated glycan recognized by rBC2LCN in the intestinal niche cells. These results showed that clarifying the distribution of glycoproteins offers valuable insight into the glycan functions.

研究分野：解剖学

キーワード：糖鎖 レクチン フコシル化糖鎖 糖タンパク質 ニッチ細胞 免疫組織化学 腸管上皮

1. 研究開始当初の背景

糖鎖修飾は、代表的なタンパク質の翻訳後修飾の一つである。近年、タンパク質糖鎖修飾が担う生物学的機能に注目が集まっている。生体内では同一のタンパク質に対し多種多様な糖鎖が付加される。異なる糖鎖が付加されることによりタンパク質の局在や活性などが制御されていることが明らかになってきた(引用文献)。糖タンパク質のタンパク質部分はコアタンパク質と呼ばれる。糖鎖の機能とコアタンパク質は密接に関係し、コアタンパク質が違えば、同じ糖鎖でもその機能が異なると考えられる。よって、糖鎖の機能を理解するためには、コアタンパク質の同定が必須である。

さらに、糖タンパク質を発現する細胞種や細胞の状態の違いにより、同じタンパク質であっても付加糖鎖は異なる。従って、糖鎖修飾の生物学的機能を理解するためには、糖鎖が異なるタンパク質をそれぞれ区別し、

臓器・組織を構成するどの細胞に発現するか、この2点を明らかにすることが必要である。

本研究代表者らを含め、複数の研究グループにより、様々な糖鎖に関して、そのコアタンパク質の同定が精力的に進められてきた(引用文献)。糖タンパク質解析技術の発展により、目的とする糖鎖が、どのタンパク質に付加されているか、高効率に同定することが可能となった。現在、このようなコアタンパク質同定技術を活用し、糖鎖の生物学的機能の理解が進められている。

また、糖鎖を認識・結合するタンパク質であるレクチンを利用した免疫組織化学的手法による検討から、目的とした糖鎖が臓器・組織を構成するどの細胞に発現するか、明らかにされてきた。しかし、その糖鎖がどのタンパク質に付加されているか、多く不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖鎖・コアタンパク質が異なる糖タンパク質をそれぞれ区別した上で、臓器・組織を構成するどの細胞に発現するか、糖タンパク質解析技術および免疫組織化学的手法を活用し、明らかにすることである。

本研究では、腸管の恒常性維持に深く関与するフコシル化糖鎖に着目する。腸管上皮には多様なフコシル化糖鎖が発現し、粘膜バリアとして有害な微生物排除や、適切な腸内細菌叢の形成に深く関与する。さらに、腸管免疫細胞からのシグナルによりその発現が変化し、腸管免疫細胞と腸内細菌のコミュニケーションにおいて重要な役割を担うなど、腸管においてフコシル化糖鎖は多様な機能を担うことがわかってきた。その機能理解のため、コアタンパク質が異なるフコシル化糖タンパク質をそれぞれ区別し、腸管のどの細胞に発現するか明らかにする。

3. 研究の方法

まず、腸管におけるフコシル化糖鎖の発現・分布を明らかにするため、マウス腸管組織から凍結切片を調製し、免疫組織化学染色を実施した。異なる種類のフコシル化糖鎖へ結合する複数のレクチンおよび抗糖鎖抗体を用いて、その発現分布を比較検討した。

次に、目的のフコシル化糖鎖が付加したタンパク質(コアタンパク質)を探索した。レクチンと質量分析装置を利用したグライコプロテオミクス解析法によりコアタンパク質を同定した。すなわち、マウス腸管に発現する目的のフコシル化糖タンパク質を、同糖鎖へ結合するレクチンが結合した磁気ビーズを用いて捕集した。次に高精度かつ高感度な質量分析装置を利用し、捕集したタンパク質を同定した。

さらに、小腸杯細胞に分布するフコシル化糖タンパク質を同定するため、候補の中から同細胞に発現する可能性が高いタンパク質を選別し、目的糖鎖の付加を検証した。フコシル化糖鎖と候補タンパク質の共局在性を二重染色法により検討し、候補をさらに選別した。

以上の検討結果を踏まえ、糖タンパク質としてその分布を検討した。腸管組織切片上で糖鎖・コアタンパク質を区別した上で、目的の糖タンパク質を検出するため、in situ Proximity Ligation Assay (PLA) 法(引用文献)を利用した。in situ PLA法による糖タンパク質の検出には2つのプローブ(レクチンと抗コアタンパク質抗体)を用いた。これらが同一分子に結合した場合のみ、特異的に蛍光シグナルが検出される。共焦点蛍光顕微鏡を用いて、このようなシグナルを検出し、糖タンパク質の分布を明らかにした。in situ PLA法を用いることで信頼性高く、目的とするフコシル化糖タンパク質の分布を明らかにできると期待された。

4. 研究成果

(1) 腸管に発現するフコシル化糖鎖の発現分布

フコシル化糖鎖の発現・分布を明らかにするため、マウス腸管から調製した凍結組織切片において免疫組織化学染色を行った。結合するフコシル化糖鎖が異なる複数のレクチンおよび抗糖鎖抗体を用いて種々のフコシル化糖鎖の発現分布を比較検討した。結果、*Burkholderia cenocepacia* 由来のレクチン rBC2LCN(引用文献)は、UEA-Iなどのフコシル化糖鎖へ結合する他のレクチンとは異なる染色パターンを示すことが分かった。rBC2LCNレクチンがフコシル化糖鎖検出のための新たなプローブとして免疫組織化学的検討に有用であることが分かった。

(2) Fuc 1,2Gal 1,3-構造を非還元末端に有するフコシル化糖鎖のマウス腸管におけ

る発現分布

これまで Fuc 1,2Gal 1,3-構造を非還元末端に有するフコシル化糖鎖に関する検討は十分ではなかった。そこで本研究では同糖鎖に特異的な rBC2LCN レクチンを用いて、マウス腸管での組織分布を詳細に検討することにした。

本研究により rBC2LCN が結合する、末端の 1,3 ガラクトースにフコース残基が 1,2 結合したフコシル化糖鎖は、小腸陰窩底において特異な発現パターンを示すことが明らかになった。さらに、種々の腸管上皮マーカー分子と rBC2LCN の共染色を行った結果、このレクチンは c-Kit 陽性のニッチ細胞に反応していることがわかった。ニッチ細胞は、幹細胞周囲の微小環境（ニッチ）を構成し、幹細胞の増殖・分裂の制御に深く関与する上皮細胞の 1 種である。これまで種々のレクチンにより様々な糖鎖の腸管における発現分布が検討されてきた。しかし、rBC2LCN のように、ニッチ細胞に特徴的な結合パターンを呈するレクチンの報告はなかった。

rBC2LCN の結合性は小腸と大腸で異なった。大腸では分泌顆粒状の構造に反応したが、小腸では rBC2LCN はニッチ細胞のゴルジ領域に反応した。また、ムチンが含まれる杯細胞の分泌顆粒への反応は、大腸では観察されなかったが、小腸では観察された。

このような rBC2LCN の反応性の違いは、rBC2LCN が結合するフコシル化糖鎖の担う機能が、細胞種や腸管の近位 遠位軸に沿って異なることを反映すると考えられた。また、UEA-I や AAL などの他の種類のフコシル化糖鎖に対するレクチンの反応パターンとも異なったことから、これまで明らかにされた他の種類のフコシル化糖鎖とは異なる機能を rBC2LCN が結合するフコシル化糖は担うと考えられた。

(3) 小腸におけるフコシル化糖タンパク質の発現分布の検討

マウス小腸からタンパク質を抽出し、フコシル化糖鎖が付加されているタンパク質の同定を試みた。レクチンを利用したプロテオミクス解析を行った結果、1000 種以上のタンパク質がその候補として同定された。目的とするフコシル化糖鎖とコアタンパク質候補との共有性を実際に二重染色法により検討することで、文献情報とともに、コアタンパク質候補をさらに絞り込んだ。このようにして同定したコアタンパク質に関して、in situ PLA 法による検出を試みた。同時に、特定の糖鎖が付加したコアタンパク質の組織分布を明らかにすることにより、特定の細胞種や分化段階に発現する糖タンパク質を探索した。

小腸は大きく分けて、陰窩と絨毛に分けられる。陰窩は上皮の落ち込んだ部分であり、絨毛は内腔側の突起構造である。陰窩には幹細胞とニッチ細胞の他、分化や成熟度の低い

種々の上皮細胞が存在する。UEA-I レクチンが結合する糖鎖が付加された糖タンパク質である Clca1 (以下、UEA(+)-Clca1、と略する) は in situ PLA 法により絨毛の杯細胞に検出されたが、陰窩の杯細胞では検出されなかった。陰窩の杯細胞において Clca1 が発現することは、通常の抗体染色により確認できた。これらの結果から、陰窩の杯細胞が産生する Clca1 には UEA-I レクチンが結合する糖鎖が付加されていない、と考えられた。以上のように、in situ PLA 法を利用した免疫組織化学的な検討から、UEA(+)-Clca1 は絨毛部分の杯細胞のみが産生することがわかった。

本研究では、杯細胞が産生する他の糖タンパク質に関しても同様にその発現分布を検討した。しかし、UEA(+)-Clca1 の様な、ある細胞種の中での特定の集団のみに発現分布する糖タンパク質は見出されなかった。例えば、UEA(+)-Muc2 や rBC2LCN(+)-Muc2 は、陰窩と絨毛の両方の杯細胞に検出された。また、Clca1 における他のフコシル化糖鎖の付加状況も検討した。rBC2LCN が結合する糖鎖に着目したところ、rBC2LCN(+)-Clca1 が陰窩と絨毛の両方の杯細胞に検出された。

UEA(+)-Clca1 が杯細胞の中での特定の集団のみに発現分布した点から、糖鎖・タンパク質を区別して糖タンパク質を検出することにより、細胞の状態(分化・成熟、活性化など)を記述する新たな組織・細胞マーカーとして糖タンパク質を活用できることを示した。

また、UEA(+)-Clca1 は杯細胞において機能的な重要性を有する糖タンパク質であると考えられた。杯細胞は、陰窩底で幹細胞から生じたのち、陰窩から絨毛へ移動する過程で分化が進み、機能的に成熟する。本検討結果から、Clca1 の糖鎖はこのような杯細胞の分化成熟に伴って変化すると考えられた。UEA(+)-Clca1 は分化が進んだ杯細胞に発現することを明らかにしたことは、糖鎖の生物学的機能を明らかにする上で有益な情報である。本検討結果から、杯細胞の分化プロセスや、分化した杯細胞の機能に Clca1 の糖鎖が関連する可能性が示された。臓器・組織における糖タンパク質の発現分布を明らかにすることにより、細胞の状態や臓器・組織でその細胞が担う役割と、特定のタンパク質に付加される糖鎖の関連があることが示された。今後、杯細胞の分化に着目した解析から、Clca1 に付加される糖鎖が演じる機能が明らかになると期待できる。

小腸凍結組織切片における in situ PLA 法による検出では、偽陽性シグナルが検出された。小腸ではパネート細胞の分泌顆粒や粘膜固有層の血球系細胞の核において、このような偽陽性シグナルが検出された。コアタンパク質に対する 1 次抗体及びレクチンを反応させないネガティブコントロール試料との比較から目的の糖タンパク質に由来した特

異的なシグナルでないことは容易に判断が可能であった。しかし、目的糖タンパク質の局在をより正確に記述するためには、今後、このような偽陽性シグナルを低減させるための検討が必要と考えられた。

(4) まとめ

本研究では、糖タンパク質の発現分布を明らかにするために、特定の糖鎖が付加されたコアタンパク質の同定を目的としたグライコプロテオミクス解析と、組織化学的解析手法である *in situ* PLA 法を活用した。複数の解析手法を組み合わせることで、糖鎖・コアタンパク質が異なる糖タンパク質を区別した上で、目的とした糖タンパク質が組織・臓器を構成するどの細胞に発現するか明らかにすることができた。レクチンを用いた *in situ* PLA 法が、糖タンパク質の免疫組織化学的な検出法として有用であることを示した。さらに、糖鎖の違いやコアタンパク質の異なる糖タンパク質の発現分布を比較することにより、腸管上皮細胞を細胞状態に応じて細密に分別する組織マーカーとして糖タンパク質を活用できる可能性を示した。

腸管を含めた多くの臓器・組織において糖鎖の発現分布に関する報告は多くある。しかし、糖タンパク質としての発現分布はほとんど検討されたことはなかった。糖タンパク質の発現分布を明らかにすることは、糖鎖の生物学的機能の理解に大きく貢献する。あるタンパク質の付加糖鎖と、細胞の状態や臓器・組織においてその細胞が担う特定の役割などとの関連から、その糖鎖が演じる機能の検討を進めることができるようになる。本研究により他の臓器・組織における糖タンパク質の発現分布の検討が進み、糖鎖が担う生物学的機能の理解がさらに進展することが期待される。

また、これまで腸管ニッチ細胞に特徴的な糖鎖は知られていなかった。本研究では、rBC2LCN が認識するフコシル化糖鎖が腸管ニッチ細胞に特徴的な発現することを見出した。そのユニークな発現分布から他のフコシル化糖鎖とは異なる、新たな生物学的機能を有することが示唆された。腸管における様々な状況・環境変化に応じて、ニッチ細胞は幹細胞の増殖や分化を制御する。このフコシル化糖鎖が、このようなニッチ細胞による幹細胞の制御に深く関与することも考えられる。今後、詳細な検討を進める。

腸管の上皮細胞に発現するフコシル化糖鎖はクローン病や癌などの疾病、また微生物感染とも関連する。これらの病態・発病におけるフコシル化糖鎖の役割や、発現分布の変化に関しても検討を進めたい。疾病や感染に伴う糖鎖変化によりコアタンパク質の機能、例えば細胞内局在が変化する可能性がある。しかし、これまでの研究ではフコシル化糖鎖のコアタンパク質に関して情報はほとんど

得られていない。今後、本研究成果を基盤として、実験的腸炎モデルマウスなどをモデルとして利用し、腸管における糖タンパク質の発現分布、特にニッチ細胞における発現分布に注目することで、上皮組織を正常に保つ機構におけるフコシル化糖タンパク質の機能の理解をさらに進める。

<引用文献>

Ohtsubo K et al. *Nat Med.* (2011) 17: 1067 - 1075.

Togayachi A et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2010) 107: 11900 - 11905.

Sugahara D et al. *Sci Rep.* (2012) 2: 680.

Kaji H et al. *J Proteome Res.* (2012) 11: 4553 - 4566.

Steenfott C et al. *Nat Methods.* (2011) 8: 977 - 982.

Fredriksson S et al. *Nat Biotechnol.* (2002) 20: 473 - 477.

Tateno H et al. *J Biol Chem.* (2011) 286: 20345 - 20353.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Daisuke Sugahara, Yuka Kobayashi, Yoshihiro Akimoto, Hayato Kawakami, Mouse intestinal niche cells express a distinct $\{\alpha\}$ 1,2-fucosylated glycan recognized by a lectin from *Burkholderia cenocepacia*, *Glycobiology.* (2017) 27(3): 246 - 253. doi: 10.1093/glycob/cww116 (査読あり)

[学会発表](計7件)

菅原大介, 小林夕香, 秋元義弘, 川上速人, マウス腸管ニッチ細胞に特徴的なフコシル化糖鎖の発現, 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018年

菅原大介, 福富俊之, 小林夕香, 秋元義弘, 川上速人, 腸管ニッチ細胞の新たな分子特性としてのフコシル化糖鎖発現 (Distinct expression of fucosylated glycans is a novel molecular property of intestinal niche cells.), 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017年

菅原大介, 秋元義弘, 川上速人, マウス腸管における Fuc 1,2Gal 1,3-フコシル化糖鎖の発現分布, 第36回日本糖質学会年会, 2017年

菅原大介, 福富俊之, 秋元義弘, 川上速人, マウス腸管ニッチ細胞におけるフコシル化糖鎖発現, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年

菅原大介, 福富俊之, 秋元義弘, 川上速人, マウス腸管上皮細胞を区別する糖鎖関連分子マーカーの探索, 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2016 年

菅原大介, 福富俊之, 秋元義弘, 川上速人, コアタンパク質の多様性に着目した糖タンパク質の免疫組織化学的検出, 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2015 年

菅原大介, 福富俊之, 秋元義弘, 川上速人, マウス腸管上皮恒常性維持におけるフコシル化糖タンパク質の機能探索, 第 34 回日本糖質学会年会, 2015 年

〔その他〕

所属研究室ホームページ

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/anat2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 大介 (Sugahara, Daisuke)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：00390766