

平成22年06月10日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780243

研究課題名（和文）細胞機能における糖鎖認識の役割

研究課題名（英文）Roles of glycan recognition in cellular functions

研究代表者

館野 浩章（TATENO HIROAKI）

独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・研究員

研究者番号：30450670

研究成果の概要（和文）：全ての生物を構成する細胞は糖鎖で覆われている。細胞表面糖鎖の構造を認識して、細胞—細胞間コミュニケーションを媒介している分子がレクチンであり、糖鎖に結合することにより細胞機能に必須の役割を担っている。本研究では、ヒト免疫系において重要な役割を担っているCタイプレクチン4種について、100種類以上の糖鎖に対する定量的相互作用解析を実施した。その結果、これら4種のレクチンの新規糖鎖リガンドを明らかにすることに成功した。最終的には、これらレクチンが病原真菌や腫瘍細胞の認識、糖タンパク質のクリアランスなどに関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：All cells in nature are covered with a dense and complex array of glycans. Cell surface glycans are recognized by lectins, which play important roles in cellular life by mediating cell-cell communication. In this study, four C-type lectins, which have been known to mediate important roles in the immune system, were selected and their quantitative interaction data against more than 100 glycans were obtained. I then successfully found novel glycan ligands of the four lectins. Finally, I demonstrated that these lectins are involved in the recognition of pathogenic fungi and tumor cells, and the clearance of glycoproteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：レクチン、糖鎖、細胞機能、分子認識

1. 研究開始当初の背景
内在性レクチンが糖鎖に結合することにより多様な細胞機能を媒介していることが明

らかになりつつある。内在性レクチンの糖鎖に対する結合親和性は低く、ほとんどの内在性レクチンについて、その詳細な特異性は十

分には理解されていなかった。特に、糖鎖に対する定量的な相互作用情報（解離定数、Kd）はほとんど取得されていなかった。また、ほとんどの内在性レクチンの糖鎖リガンドは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに開発してきたレクチンの特異性解析技術である、糖鎖複合体アレイとフロンタル・アフィニティークロマトグラフィー (FAC) を用いて、内在性レクチンの糖鎖結合特性を詳細に解析することにより、糖鎖リガンドを同定して、最終的にはレクチンと糖鎖の相互作用が媒介する機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

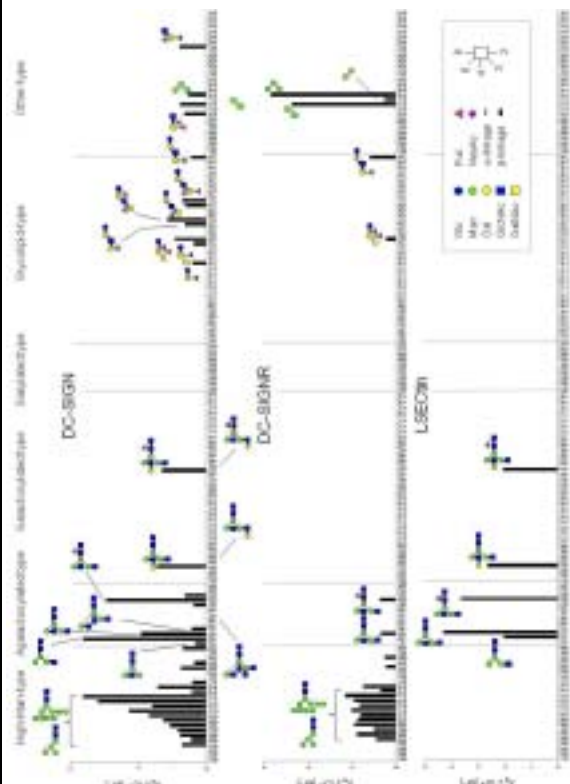
(1) ヒト内在性レクチンの糖鎖結合特異性解析：4種類のCタイプレクチン (DC-SIGN、DCSIGNR、LSECtin、Langerin) の糖鎖結合ドメイン (CRD) をFc融合タンパク質として哺乳動物細胞 (CHO もしくは HEK293T) を用いて発現し、糖鎖複合体アレイで解析した。本方法を用いることにより、レクチンの多価糖鎖に対する結合特異性を、簡便、迅速、高感度に解析することが可能であった。発現したレクチンの糖鎖結合活性と特異性は本方法で確認し、その後の実験に用いた。次に、発現したFc融合タンパク質をProtein A-Sepharoseに固定化して、100種類以上の糖鎖に対する解離定数をFACで算出した。続いて、生理的条件下におけるレクチンの糖鎖結合特異性についても検討を行った。すなわち、糖転移酵素遺伝子をトランスフェクトすることにより糖鎖リガンドをモデル細胞上に発現させ、レクチンの結合性をFACSで解析した。更に、本研究で解析したレクチンは膜タンパク質であるため、全長のレクチンを細胞表面に発現させ、それに対する糖鎖リガンドの結合をFACSで解析した。

(2) 糖鎖リガンド発現細胞の同定：(1)で得られた分子間相互作用情報を基に糖鎖リガンド発現細胞の同定を行った。糖鎖リガンドを合成する糖転移酵素の局在を調べることでレクチンのリガンド局在部位を特定した。更に、レクチンの糖鎖リガンドがその組織に局在しているかどうかについて調べるとともに、レクチン発現細胞がその組織に局在しているかどうか、についての検討も行い、糖鎖リガンド発現細胞の同定を試みた。また、糖鎖リガンドの構造によっては、病原菌がレクチンの標的になっている可能性がある。その場合、病原菌へのレクチンの結合を、FACSや生細胞アレイ等を用いて解析した。

(3) 糖鎖リガンドを介した細胞機能制御：レクチン-糖鎖間相互作用の機能に関する検討も行った。すなわち、レクチンが糖鎖リガンドもしくは糖鎖リガンド発現細胞に結合した後、細胞内に内在化する機能を有するかどうか、に関する検討を行った。

4. 研究成果

(1) DC-SIGN 関連レクチン (DC-SIGN、DC-SIGNR、LSECtin) の定量的相互作用解析：DC-SIGN 関連レクチンの糖鎖結合特異性をFACで解析した。その結果、157種類のピリジルアミノ化 (PA 化) 糖鎖に対する解離定数 (Kd) を算出することに成功した。本解析の結果、従来から知られていたフコースやマンノースに対する結合に加えて、Nアセチルグルコサミンを非還元末端に有するアガラクトN型糖鎖に結合することを明らかにした。

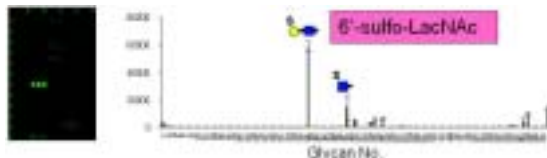


DC-SIGN関連レクチンのフロンタル・アフィニティークロマトグラフィー解析

実際にアガラクトN型糖鎖を有する糖タンパク質に結合して、細胞内に内在化すること、血清中にアガラクトN型糖鎖を有する糖タンパク質が存在すること、などが分かり、これらDC-SIGN関連レクチンが、アガラクトN型糖鎖を有する糖タンパク質のクリアランスに関係していることが示唆された。

(2) Langerinはマンノースと硫酸化糖鎖に結合する二重特異性を獲得した分子である。Langerinはランゲルハンス細胞上に特異的に発現するCタイプレクチンであり、ランゲルハンス細胞の機能において重要な役割

を担っている。Langerin は EPN モチーフを有することから、カルシウム依存的にマンノースに結合特異性を示すと考えられた。Langerin を Fc 融合タンパク質として発現し、糖鎖複合体アレイで解析したところ、マンノース含有糖鎖に加えて、ガラクトース 6 硫酸含有糖鎖に最も強く結合することを見出し



糖鎖複合体アレイによるLangerinの糖鎖結合特異性解析

た。更に、ガラクトース 6 硫酸含有糖鎖の一種であるケラタン硫酸に結合性を示すことを分かった。この硫酸化糖鎖への結合には、マンノースの認識に関与する EPN モチーフに加えて、更に Lys299 と Lys313 が関与していることが分かった。硫酸化 Langerin リガンドの局在を調べたところ、Gal の 6 位に硫酸を転移する活性を有するケラタン硫酸-6-硫酸化酵素 (KS6ST) の mRNA の発現が高い脳や脾臓に局在していた。ケラタン硫酸は脳腫瘍組織で発現が増加することが報告されているが、実際に硫酸化 Langerin リガンドは正常と比較して悪性脳腫瘍組織で増加していた。更に、脳腫瘍組織の間質では Langerin 発現細胞が確認された。以上の結果から、Langerin は脳腫瘍組織特異的糖鎖を認識して何らかの機能を発揮している可能性が示唆された。一方、Langerin は腫瘍関連糖鎖に加え、マンナンで細胞表層を被覆された *Candida* や *Malassezia* などの病原真菌に対しても強い結合活性を有することが分かった。以上の結果から、Langerin は進化の過程で 1 つの CRD を介して、硫酸化糖鎖とマンノースという全く異なる糖鎖に結合する 2 重特異性を獲得した分子であることが分かり、非自己としての腫瘍特異的糖鎖や病原菌特異的糖鎖に結合することにより、ランゲルハンス細胞上で多様な機能に関与している可能性が示された。

(3) まとめ

解析した内在性レクチンはいずれも免疫系において重要な役割を担っていることが明らかになっている。本研究の結果、糖鎖結合特異性の定量的情報を取得するだけでなく、新たな糖鎖結合特性を明らかにし、今後、これらレクチンの機能を理解する上で重要な知見を得ることに成功したといえる。

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 09 件)

①Ramy, T.N., Weerapana, E., Liao, L., Zeng, Y., Tateno, H., Liao, L., Yates, J.R. 3rd, Cravatt, B.F., Paulson, J.C. (2010) In situ trans ligands of CD22 identified by glycan-protein photo-crosslinking enabled proteomics. *Mol. Cell Proteomics*, in press. 査読有

②Tateno, H., Ohnishi, K., Yabe, R., Hayatsu, N., Sato, T., Takeya, M., Narimatsu, H., and Hirabayashi, J. (2010) Dual specificity of Langerin to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain. *J. Biol. Chem.* 285, 6390-6400. 査読有

③Mikami, K., Yamaguchi, D., Tateno, H., Hu, D., Qin, S. Y., Kawasaki, N., Yamada, M., Matsumoto, N., Hirabayashi, J., Ito, Y., Yamamoto, K. (2009) The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation. *Glycobiology* 20, 310-321. 査読有

④Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Tateno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, T. (2009) C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1897-1902. 査読有

⑤Okuyama, S., Nakamura-Tsuruta, S., Tateno, H., Hirabayashi, J., Matsubara, K., Hori, K. (2009) Strict binding specificity of small-sized lectins from the red alga *Hypnea japonica* for core (alpha1-6) fucosylated N-glycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 912-920. 査読有

⑥Mitsunaga, K., Harada-Itadani, J., Shikanai, T., Tateno, H., Ikehara, Y., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., Angata, T.. (2009) Human C21orf63 is a heparin-binding protein. *J. Biochem.* 146, 369-373. 査読有

⑦Tateno, H., Nakamura-Tsuruta, S., and Hirabayashi, J. (2009) Comparative analysis of core fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 19, 527-536. 査読有

⑧Grahm, E. M., Winter, H. C., Tateno, H., Goldstein, I. J., Krenzel, U. (2009) Structural characterization of a lectin from the mushroom *Marasmius oreades* in complex with the blood group B trisaccharide and calcium. **J. Mol. Biol.** 390, 457-466. 査読有

⑨Ebisu, K., Tateno, H., Kuroiwa, H., Kawakami, K., Ikeuchi, M., Hirabayashi, J., Sisido, M., Taki, M. (2009) N-terminal specific point-immobilization of active proteins by the one-pot NEXT-A method. **Chembiochem** 10, 2460-2464. 査読有

[学会発表] (計8件)

①舘野浩章、細胞グライコミクスの推進と内在性レクチン機能解析、第7回糖鎖科学コンソーシアム、2009/12/08、大阪府・豊中市

②Tateno, H., Ohnishi, K., Yabe, R., Hayatsu, N., Sato, T., Takeya, M., Narimatsu, H., and Hirabayashi, J., Langerin recognizes malignant and pathogenic cells through specificity to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain, 2009 Annual Meeting of the Society for Glycobiology, 2009/11/13, USA, San Diego

③岩城隼、舘野浩章、中村-鶴田祥子、内山昇、西望、南澤俊和、小南淳子、中村隆範、平林淳、A consensus rule of galectin-recognition: Comprehensive analysis by frontal affinity chromatography, 1st Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) Conference, 2009年10月30日、つくば

④舘野浩章、Langerinは硫酸化糖鎖とマンノース含有糖鎖への特異性を介して腫瘍細胞と病原真菌に結合する2重特異性を獲得した分子である、第82回生化学会大会、2009/10/24、神戸

⑤Tateno, H., Ohnishi, K., Yabe, R., Hayatsu, N., Sato, T., Takeya, M., Narimatsu, H., and Hirabayashi, J., Langerin recognizes malignant and pathogenic cells through specificity to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain, 日墺二国間セミナー, 2009/09/21, 横浜、湘南国際村

⑥岩城隼、舘野浩章、中村-鶴田祥子、内山昇、西望、南澤俊和、小南淳子、中村隆範、平林淳、Frontal affinity chromatography reveals a common binding rule for galectins, CREST国際シンポジウム「獲得免疫と糖鎖生物学」、2009年03月24日、木更津

⑦矢部力朗、舘野浩章、平林淳、Quantitative analysis of oligosaccharide-binding specificity of DC-SIGN-related lectins reveals their extended specificities to agalactosylated glycans, CREST国際シンポジウム「獲得免疫と糖鎖生物学」、2009年03月23日、木更津

⑧矢部力朗、舘野浩章、平林淳、アガラクト糖タンパク質はDC-SIGN関連レクチンの新たな機能性リガンドである、BMB2008、2008年12月12日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘野 浩章 (TATENO HIROAKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・研究員
研究者番号：30450670

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：