

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370062

研究課題名（和文）新規ヒト内在性レクチン探索と機能解析

研究課題名（英文）Exploring novel human endogenous lectins and their functional analysis

研究代表者

平林 淳（HIRABAYASHI JUN）

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・副研究センター長

研究者番号：40156691

研究成果の概要（和文）：

糖鎖の生体内における機能を知るためにはヒトなどに内在するレクチンの性質を詳しくする必要があります。ゲノムデータベース上に見つかる多くのレクチン候補遺伝子を組み換え体として発現し、その糖特異性を、当該者らが開発した先端糖鎖プロファイリング技術である糖鎖複合体マイクロアレイ、フロントル・アフィニティクロマト分析法によって系統的に解析し、レクチンの生体機能と有用なツールとしての可能性を探った。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate biological functions of glycans, it is essential to make a comprehensive approach to their partner molecules, endogeneous lectins. A considerably large number of lectin candidate molecules are found in the human genome data base. Based on the information it is now possible to produce their recombinant proteins and investigate systematically their sugar-binding properties by means of advanced glyco technologies developed in our group, e.g., glycoconjugate microarray and frontal affinity chromatography. Both of their possible roles in vivo and utilities as tools are studied.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,200,000  | 1,860,000 | 8,060,000  |
| 2010年度 | 4,900,000  | 1,470,000 | 6,370,000  |
| 2011年度 | 3,500,000  | 1,050,000 | 4,550,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,600,000 | 4,380,000 | 18,980,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：レクチン・糖鎖・真菌・免疫

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は直鎖状分子である核酸やタンパク質と異なり分岐構造を持ち、構成要素である単糖の結合順序や結合位置の組み合わせによって多数の異性体が存在するため、大きな構造的多様性が生じる。また、糖鎖は発生・分化・疾患等に伴う細胞内外の環境の変化を鋭敏に反映し、劇的な構造変化を遂げる。言い換えると、糖鎖修飾は高度な生物情報を担

うに適した現象であるといえる。この複雑な構造情報を解読し、細胞機能の制御に関わっているのがレクチンであり、発生、老化、感染、炎症、生体防御、癌化、細胞死など様々な生命現象に深く関係している。従って、糖鎖の持つ情報を生物学的な文脈において理解するためには、ヒト内在性レクチンの網羅的同定と機能解析が必須である。ヒトではこれまでに、C-type, siglecs, galectins, P-type,

R-type、M-type、L-type、calnexin、ficolins、chitinase-like、F-box lectins、intelectins など約 10 種類ほどのファミリーに属するレクチンが同定されているが、全貌把握には至っておらず、個々のレクチンに対する機能解析も、一部を除いては不十分である。また機能解明への手掛かりとなる糖鎖との相互作用データに関しても、解析手法が統一されていないため、系統的な比較がなされていない。これらの理由から、ヒト体内における糖鎖-レクチン間の相互作用、及びそれを介した情報伝達機構は十分に理解されていなかった。バイオインフォマティクスを利用して、ヒトのゲノム配列を対象としたデータマイニングを実行したところ、現在知られているヒト内在性レクチンをはるかに上回る数のレクチン候補遺伝子の存在が示唆された。特に、従来ヒトではレクチンとして認識されていない新規ファミリーが多数存在する事が浮き彫りになっていた。

## 2. 研究の目的

全ての生物を構成する細胞は、例外なく、高密度且つ複雑な糖鎖によって覆われている。その構造は、由来する生物や細胞の種類だけでなく、細胞の状態（分化度、悪性度）によっても劇的に変化し、細胞-細胞間、及び細胞-病原菌間の相互作用を精密に制御している。すべての生物の生命現象と密接に関係している糖鎖を介した細胞間コミュニケーションは、糖鎖に結合する分子であるレクチンによって媒介されている。これまでにヒトでは約 100 種類のレクチンが同定されており、構造的に 10 種類以上のファミリーに分類されているが、申請者らがバイオインフォマティクスを用いてデータマイニングを行った結果、それをはるかに上回る数（～1000 種類）のレクチン候補遺伝子の存在が明らかとなった。そこで本研究では、(1) ヒトゲノムから見出したレクチン候補遺伝子を発現し、糖鎖結合活性をスクリーニングすること、(2) 結合定数を含めた詳細な糖鎖結合特異性を明らかにすること、(3) 結合パートナーの同定を行うこと、により糖鎖機能をより深く理解し、糖鎖をキーワードとした新たな医工学シーズを見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒトではこれまでに約 100 種類のレクチンが同定されているが、バイオインフォマティクスによるスクリーニングの結果、その数を遥かに上回るレクチン候補遺伝子の存在が示唆される。そこで本研究では、(1) これらレクチン候補遺伝子を発現し、糖鎖結合活性をスクリーニングすること、(2) 糖鎖結合活性が認められた新規レクチン候補に関して、更に詳細な糖鎖結合特異性情報を取得すること、(3) 糖鎖結合情報をもとに糖鎖

リガンドを同定することにより、ヒト遺伝子にコードされた新規レクチンを同定し、それらの機能を明らかにすることを目的とした。

レクチン候補遺伝子の糖鎖結合活性の評価に関しては、当該研究チームの独自技術である糖鎖複合体アレイを活用した。糖鎖結合活性が同定された分子については、さらに詳細な特異性をフロントル・アフィニティークロマトグラフィー (FAC) を用いて解析した。得られた特異性情報は公開レクチンデータベース (LADB) に格納した。一方、これらの糖結合活性評価技術はヒト内在性レクチンの解析にとどまらず、糖鎖の生体機能を探るツールとしての外来性レクチンの基礎的解析にも有用であることが知られている。したがって、本研究では関連テーマとして、ヒト内在性レクチンの探索を主テーマとして掲げる傍ら、さまざまなレクチンの機能探索、有用レクチンの開発の観点から上記解析ツールを用いた研究も補完的に行った。さらに、近年技術的進歩がなされた分子進化学による改変レクチンの開発についても一部取り組んだ。

これらの研究から、最終的には、新規内在性レクチン、および外来性の有用レクチン、改変を施したレクチン群の糖結合機能に関する網羅的な解析を進めることで、糖鎖の生体内における機能を解明し、糖鎖が関与するさまざまな生命現象におけるレクチン標的薬の開発等、糖鎖の医療応用へと展開することを試みた。研究開発のイメージを図 1 に示す。

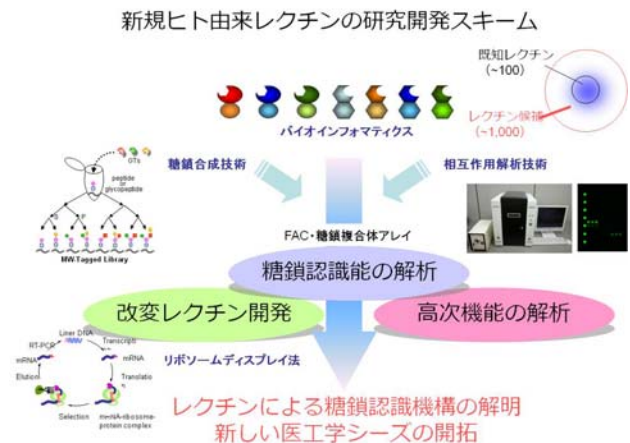


図 1. 研究開発のイメージ図

## 4. 研究成果

バイオインフォマティクスを利用して抽出したレクチン候補分子、計 80 種類の糖鎖結合特異性を糖鎖複合体アレイでスクリーニングした。その結果、ジャカリン家系に属しマンノースに結合特異性を示す新規レクチン (ZG16) を発見した。本レクチンの糖鎖結合特異性と親和性を、糖鎖複合体アレイとフロントル・アフィニティークロマトグラフィー

一(FAC)で解析した結果、高密度マンノースに特異的に結合することが示され、細胞表面にマンノースを高密度に提示する各種真菌に結合することが分かった。本レクチン遺伝子は肝臓、膵臓、小腸で発現していることがわかった。モノクローナル・ポリクローナル抗体を作製し本レクチンの組織分布を調べてみると、上部から下部に至る消化器系の外分泌系の細胞に局在していることがわかった(図2)。以上のことから、本レクチンは、真菌に対して何らかの機能を有することが予想された(論文成果②)。

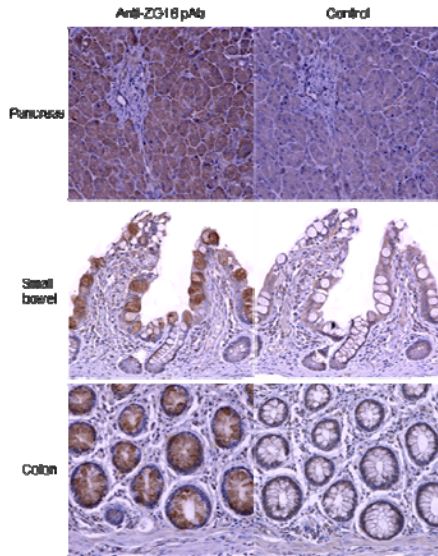


図2. ZG16の組織分布を示す抗体染色像上から膵臓、小腸、結腸

これに先立ち、ヒトのランゲルハンス細胞に特異的に発現するC型レクチン、ランゲリンの機能解析を行い、本レクチンが硫酸化ガラクトースと微生物由来高マンノース構造に対し二重の糖特異性を持つことを初めて示した(論文③)。ランゲリンは神経系のがんにおいて硫酸化ガラクトースに結合する一方で、カンジダやマラセチアなどの病原性真菌類のポリマンノース構造への結合を介したことから、本レクチン分子が生体防御に関与している可能性が示された。

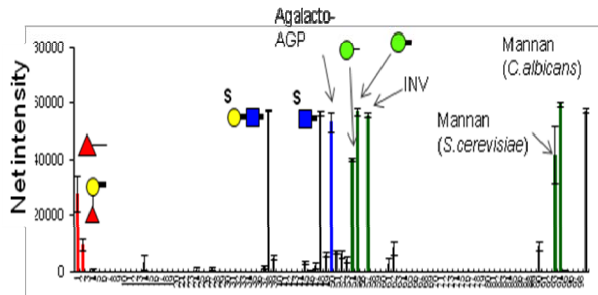


図3. 糖鎖複合体アレイによるランゲリンの糖特異性の解析

さらに、同じC型レクチンファミリーに属するDC-SIGNと呼ばれるヒト内在性レクチンに配列相同性を示すレクチン2種(DC-SIGNR、LSECTin)について解析を行い、これらが共通してN-結合型糖鎖のアガラクト型構造に神話性を示すことを見出し、従来言われていた先天免疫のみならず、内在性リガンドを介した糖鎖認識の可能性を提示した(論文④)。

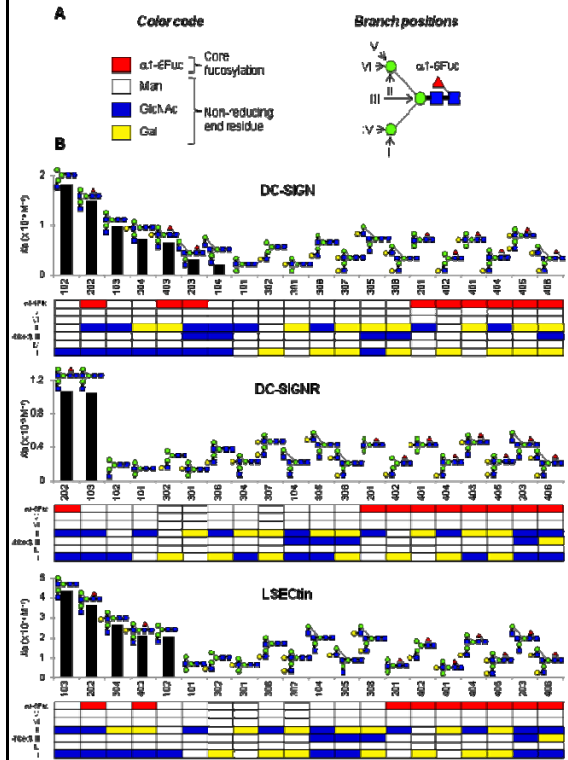


Fig. 3 Yabe R et al.

図4. DC-SIGN 関連レクチンの FAC による糖特異性解析結果

一方、既知レクチンではあるが、 $\beta$ ガラクトシドに対し進化的に保存された結合活性を示すガレクチンの詳細な特異性解析から、本レクチンファミリーの結合に関する統一した「Gal $\beta$ -(cyn)-gauche」則を見出した(論文⑤)。このコンセンサス則(図4参照)は最近キノコで見つかったガレクチンが予想外の糖鎖構造(Gal $\beta$ 1-4L-Fuc)という二糖に対し結合する事実をも説明することも可能であり、今後ガレクチンの阻害剤開発原理にもヒントを与えるものと考えられる。

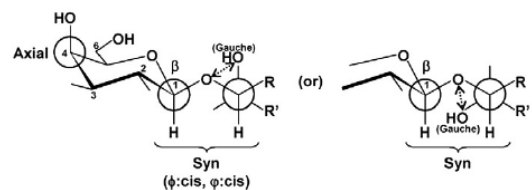


図5. 「Gal $\beta$ -(cyn)gauche-則」：ガレクチンが結合可能な二糖構造

以上、ゲノム情報に基づくヒト内在性レクチンの機能解析と並んで、各種レクチンの糖鎖特異性解析、機能解析を多くの共同研究パートナーとともにいった。解析には上述のFACや糖鎖複合体アレイを活用し、迅速、簡便、かつ高感度、高精度に糖鎖・レクチン間相互作用の測定を行った。また、本研究において、新規レクチン開発に向けた新たなアプローチとして分子進化学による解析を行い、一部ではあるが親分子には無い糖特異性の創出に成功した(論文①)。

#### 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 14 件)

- ① Hu D, Tateno H, Kuno A, Yabe R, Hirabayashi J. Directed evolution of lectins with a sugar-binding specificity for 6-sulfo-galactose. *J Biol Chem*. 査読有. 2012, in press. DOI: 10.1074/jbc.M112.351965
- ② Tateno H, Yabe R, Sato T, Shibasaki A, Shikanai T, Gono T, Narimatsu H, Hirabayashi J. Human ZG16p recognizes pathogenic fungi through non-self polyvalent mannose in the digestive system. *Glycobiology*. 査読有. 2012, 22(2), 210-20. DOI: 10.1093/glycob/cwr130
- ③ Iwaki J, Tateno H, Nishi N, Minamisawa T, Nakamura-Tsuruta S, Itakura Y, Kominami J, Urashima T, Nakamura T, Hirabayashi J. The Gal $\beta$ -(syn)-gauche configuration is required for galectin-recognition disaccharides. *Biochim Biophys Acta*. 査読有. 2011 Jul;1810(7):643-51. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.04.001
- ④ Tateno H, Ohnishi K, Yabe R, Hayatsu N, Sato T, Takeya M, Narimatsu H, Hirabayashi J. Dual specificity of Langerin to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain. *J Biol Chem*. 査読有. 2010, 285(9), 6390-400. DOI: 10.1074/jbc.M109.041863
- ⑤ Yabe R, Tateno H, Hirabayashi J. Frontal affinity chromatography analysis of constructs of DC-SIGN, DC-SIGNR and LSECtin extend evidence for affinity to agalactosylated N-glycans. *FEBS J*. 査読有. 2010, 277(19), 4010-26. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07792.x.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 平林 淳、レクチン工学のすすめ、GlycoTOKYO 2011 シンポジウム、12/9、2011、和光 (招待)
- ② Hirabayashi J. Lectin-based structural glycomics: development of lectin microarray. 17th International Symposium and Exhibit on

Liquid Phase Separation and Capillary Electro-separation Techniques, Aug. 31st, 2010, Baltimore, USA (招待)

- ③ Hirabayashi J. Further advancement in lectin microarray: how many lectins are necessary for cell typing? Sialoglyco 2010, Aug. 21-26, 2010, Potsdam, Germany (招待)
- ④ Tateno H. Human ZG16 recognizes pathogenic fungi through specific recognition of non-self polyvalent mannose in the intestinal tract (英語) GlycoT2010, 7/30-8/1, 2010, Tokyo
- ⑤ Hirabayashi J. Medical application of lectin microarray: a powerful technology for differential glycan profiling. The 28th NAITO Conference on Glycan Expression and Regulation [I], July 27-30, 2010, Shonan Village Center, Japan (招待)
- ⑥ Tateno H. Human ZG16 is a novel member of mannose-specific Jacalin-related lectins, which recognizes pathogenic fungi in the intestinal tract (英語) 第 28 回内藤コンファレンス、7/27-30, 2010、湘南国際村
- ⑦ Hirabayashi J. Cellular glycomics: a bridge over functional genomics and system biology (英語) 日本分子生物学会 (MBSJ2009)、12/9、2009、横浜 (招待)
- ⑧ 館野浩章、細胞グライコーム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シンポジウム、12/7-8、2009、千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- ⑨ Tateno H, Yabe R, Sato T, Narimatsu H, 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, 11/12-15, 2009, San Diego
- ⑩ 館野浩章、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、10/24、2009、神戸
- ⑪ Hirabayashi J. A strategy for creation of artificial lectins based on the possible scenario on the origin and evolution of saccharides (英語) 第 82 日本生化学会年会、10/23、2009、神戸
- ⑫ 館野浩章、Langerin recognizes malignant and pathogenic cells through specificity to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain (英語) 日墺二国間セミナー、10/14、2009、湘南国際村

[その他]

LjDB: レクチンフロンティアデータベース  
これまで当該研究グループが独自、ないし共同研究によって解析した数百種に上るレクチンの特異性解析結果 (FAC による) をまと

めた公開サイト：  
<http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/glycodb/LectinSearch>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平林 淳 (HIRABAYASHI JUN)  
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・  
副研究センター長  
研究者番号：40156691

### (2) 研究分担者

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