

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770138

研究課題名(和文)糖鎖による細胞表面生体分子の機能の調節・制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulation/control mechanisms in glycan-mediated functions of cell-surface biomolecules.

研究代表者

梅谷内 晶(Togayachi, Akira)

独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖創薬技術研究センター・主任研究員

研究者番号：60392635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖転移酵素遺伝子の欠損マウスは、多様な生物機能の異常を認める。そのメカニズムを解析する上で、糖転移酵素が標的とする糖タンパク質(糖鎖キャリア分子)を同定することは重要である。本研究ではポリラクトサミン糖鎖に着目し、グライコプロテオミクス技術によるポリラクトサミン糖鎖キャリア分子の同定を試みた。ポリラクトサミン糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いて糖ペプチドを捕集し、これらの比較グライコプロテオーム解析を行うことにより、標的糖タンパク質候補を同定した。バイオインフォマティクス解析により、得られたキャリア分子群についての傾向性を見たところ、それらの分子性状に共通した特徴および傾向が見出された。

研究成果の概要(英文)：Glycosyltransferase gene-deficient mice show various abnormalities in biological functions. To analyze the mechanism, it is important to identify the glycoproteins targeted by the glycosyltransferases (glycan carrier molecules). In this study, we focused on polylectosamine glycans and identified the carrier molecules of polylectosaminoglycans using glycoproteomics technology. Glycopeptides were captured with the lectins specifically bind to polylectosamine glycans. Comparative glycoproteome analysis of the captured glycopeptides identified the target glycoprotein candidates. Bioinformatics analysis of the obtained carrier molecules found common characteristics and tendency in the molecular nature.

研究分野：糖鎖生物学・細胞生物学・生化学

キーワード：糖鎖 ポリラクトサミン 糖転移酵素 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 糖タンパク質 グラ
イコプロテオミクス解析 免疫系

1. 研究開始当初の背景

糖鎖付加は生物における主要な翻訳後修飾である。細胞表面の糖タンパク質・糖脂質は、細胞間あるいはタンパク質間の相互作用などに関与している。免疫細胞の分化や活性化では、細胞表面糖鎖が変化することも知られており、糖鎖は多くの重要な生命現象や疾患に関与していると考えられている。しかし、今までは糖鎖構造あるいはそのキャリア分子を同定する技術が不十分であったこともあって、糖鎖機能の解明はあまり進んでいなかったのが現状である。一部の糖鎖に関しては機能が知られているが、糖鎖改変マウス・細胞株などの表現型から、個別分子上の糖鎖解析をするに留まっており、生物学（糖鎖機能）と絡めた網羅的なグライコプロテオミクス解析などが行われた例は少ない。また、実際の生体内で合成される糖鎖がどのようなキャリア分子の上に存在しているのかを糖鎖遺伝子ノックアウトマウスを用いて網羅的に解析した例はほとんど無く、グライコプロテオミクス技術による解析により、生体内の糖鎖合成に関する新たな知見が得られるとともに、基幹糖鎖構造であるポリラクトサミン糖鎖の重要な生物学的・基礎医学的な知見が得られると考えられた。

本研究の対象であるポリラクトサミン（ポリ-N-アセチルラクトサミン）糖鎖構造は、ガラクトース（Gal）と N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）の2つの単糖が β 1-4結合した N-アセチルラクトサミンの繰り返し構造から成り、糖タンパク質（N-結合型、O-結合型糖鎖）あるいは糖脂質などに存在する。ポリラクトサミン構造自体が、ガレクチンのような内在性レクチンのリガンドとして直接的に機能する一方、そのポリラクトサミン上には種々の機能性糖鎖抗原を担う事で、多岐にわたる機能をもつと考えられている。そこで、本研究では、これらを明らかにすることを目的として、ポリラクトサミン糖鎖ノック

アウト（KO）マウスである *B3gnt2*^{-/-}マウスを用いてグライコプロテオミクス解析を行い、そのキャリア分子の同定と生物機能との関連についての考察を行うこととした。

2. 研究の目的

糖転移酵素遺伝子を欠損したモデル動物（マウス）は、多様な生物機能（表現型）の異常を認める。その為、種々の糖転移酵素の標的タンパク質を同定することは生体内における糖鎖の機能を理解する上で重要な情報である。

本課題では、基幹的糖鎖構造の一つであるポリラクトサミン糖鎖合成に関与する糖転移酵素： β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 2 (β 3GnT2) 遺伝子ノックアウトマウス (*B3gnt2*^{-/-}マウス) の細胞・組織を用いて、各種解析をすることによって、生合成されるポリラクトサミン糖鎖の標的分子と機能の解明を試みるものである。ポリラクトサミン糖鎖の発現に関する基礎的な知見に関しては、未だ不足していると考えられるため、まず始めにポリラクトサミン糖鎖のキャリア分子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

本課題では、基幹的糖鎖構造の一つであるポリラクトサミン糖鎖合成に関与する糖転移酵素、 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 2 (β 3GnT2) 遺伝子ノックアウトマウス (*B3gnt2*^{-/-}マウス) と野生型(WT)マウスから、それぞれ糖鎖キャリア分子（糖ペプチド）をポリラクトサミン糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いて捕集し、これらの比較グライコプロテオーム解析を行うことにより、 β 3GnT2 に特異的な標的タンパク質の大規模同定を進めた（図1）。

Identification strategy of N-linked polylectosamine-carrier molecules

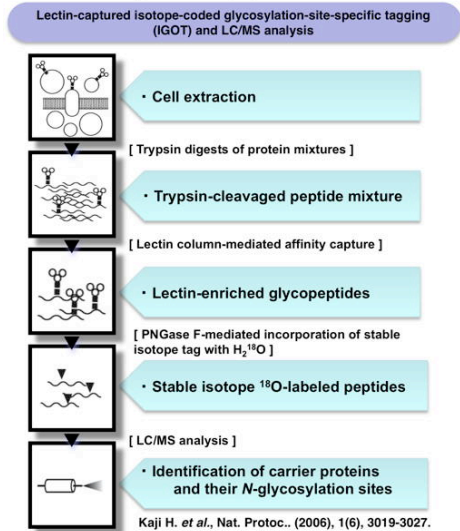


図 1: グライコпротеオーム解析による糖鎖キャリア糖タンパク質分子同定の流れ

ポリラクトサミン糖鎖のキャリア糖タンパク質を効率的に捕集するために、レクチンアフィニティーによる捕集の系の構築を行った。まず、ポリラクトサミン糖鎖に結合するレクチンを選択し、これを用いてアフィニティーカラムを作製した。野生型及び *B3gnt2*^{-/-}マウスの臓器（脾臓）より糖タンパク質画分を抽出し、そこからタンパク質分解酵素処理により糖ペプチドを調製した。得られた糖ペプチド画分をレクチンアフィニティーカラムに供し、濃縮・精製を行った。グライコпротеオミクス技術の一つである、IGOT (Isotope-coded Glycosylation site-specific Tagging) 法 (Kaji *et al.* 2003 Nat Biotechnol.) によって、溶出画分の糖ペプチドを標識した後、LC/MS ショットガン法（質量分析解析）によってペプチド配列を同定し、糖タンパク質分子のリストを作製した。また、得られたキャリア分子候補の情報を、バイオインフォマティクス技術 (KeyMolnet: 株式会社 KM データ製 等) による分子の局在、性状解析を行い、その傾向性などを解析した。この候補分子について、生化学的に解析を行い、一部検証を行った。

4. 研究成果

まず始めに、ポリラクトサミン糖鎖のキャリア糖タンパク質を効率的に捕集するための、レクチンアフィニティーによる捕集系の構築を行った。まず、ポリラクトサミン糖鎖に結合するレクチンを選択し、これを用いてアフィニティーカラムを作製した。まずは、このカラムに細胞株(ヒト細胞株 HL-60 細胞)の細胞抽出物を通した後に溶出した。当該の溶出物をレクチンブロットで確認したところ、ポリラクトサミン糖鎖を含む糖鎖構造を有する糖タンパク質群が濃縮されていると考えられた。また、系の最適化を進めて確認を行った。

ある程度の最適化が計れたと思われたため、次に野生型マウス B 細胞を用いて実際の同定作業を行った。まず、野生型マウス B 細胞由来糖ペプチド IGOT-LC/MS 法によって解析した結果、50 以上の糖タンパク質分子を同定した。同定された分子の中には、文献上ポリラクトサミン糖鎖を持つとされているものが複数リストアップされていることを確認した (図 2)。例えば、CD44 分子などはその分子上の糖鎖構造上にポリラクトサミンを有するということが報告されている。

02709495	CD44 antigen precursor
0213105678	lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor
021328482	tetraspanin 21
021491476	nitric oxide synthase 2, inducible B, cytosolic isoform precursor
0214978070	poliovirus protein 2C, 2C protein B, isoform 2
021703488	iodium/iodine symporter 2
024024084	integrin beta-1 precursor
024811710	16 kDa glycoprotein gp130/IL6ST
021500251	low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform A
020540486	CD44 antigen, isoform 6 precursor CD44
02111007447	integrin beta-2 precursor
02114228314	transferrin-type 1 protein-protein phosphatase 2, isoform 2 precursor
02117340544	CD44 antigen precursor
021204988	serotonergic vesicular transporter 1, isoform 2
021320308	11-2 class 1 histocompatibility antigen, H-102B alpha chain, isoform 1 precursor
02148247179	lymphocyte antigen 75 precursor
02148104786	high affinity calcitonin receptor-like receptor 1
021474403	CD-type lectin domain family 2, member D5
0217080884	iodium/iodine symporter, isoform B, isoform 1 precursor
021920900	cell cycle control protein 50A
020000000	receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta, isoform 1
021311070	lysozyme (rich with EGF-like domain) protein B precursor
0213027270	M2 cell-surface antigen heavy chain, isoform B
0213027222	protein-unc-52, isoform B1, isoform A
020210788	150 kDa isoform 1, isoform 1 precursor
021708070	iodium/iodine symporter 10
020882401	iodium/iodine symporter 7 precursor
020121704	phospholipase D4
021704202	CD44 antigen, isoform 1
024915888	heparin sulfate 1 precursor (CD44)
024917112	heparin sulfate antigen (CD44)
024921718	CD44 antigen, isoform 1
024900070	iodium/iodine symporter 2 precursor
024900000	CD44 antigen
024917182	low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor 2, isoform 2
021262170	urokinase plasminogen activator surface receptor precursor
021020000	glycocalyx-associated cell adhesion molecule isoform 1 precursor
020719298	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, isoform 1, precursor
020719303	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, isoform 1, precursor
024900044	autotaxin

**細胞表面受容体
CD抗原
トランスポーター分子 他**

図 2: 同定されたキャリア糖タンパク質候補分子群

さらにポリラクトサミン糖鎖キャリア分子を同定するために、野生型マウスの脾臓細胞を用いて、同様の解析を進めた。以上の解析より、野生型マウス B 細胞や脾臓細胞の細胞抽出物から 270 以上のポリラクトサミン糖鎖キャリアタンパク質候補分子を同定した。また、同定されたこれらの分子がポリラクトサミン糖鎖欠損を含むかどうかについて、一部糖タンパク質分子を Western blot 法によって解析した結果、ポリラクトサミン糖鎖欠損に伴うと考えられる分子量の減少を認めた (図 3)。

図 3 : Western blot 法によるキャリア分子の検証の一例 (分子量の減少を認める)

得られたキャリア分子群の情報 (リスト) から、KeyMolnet および DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) 等による Gene Ontology 解析 (分子の局在・性状解析、ネットワーク解析) によって傾向性を見たところ、約 7 割の分子は膜タンパク質であり、受容体分子・細胞接着に関与する分子が多く含まれていた (図 4)。

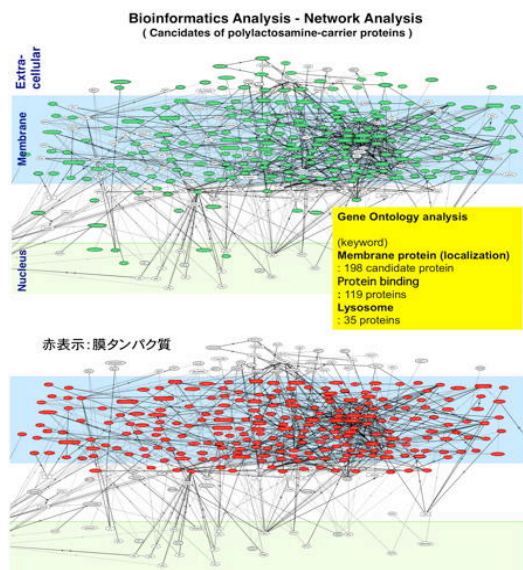


図 4 : Gene Ontology 解析に基づく分子ネットワーク解析の結果

そこで、野生型マウスと *B3gnt2*^{-/-}マウスの脾臓細胞由来膜タンパク質画分を用いて、2 次元電気泳動による比較解析での検討を行った結果、多くのタンパク質のバンド位置の差が認められた。このことからポリラクトサミン糖鎖はその多くが細胞膜表面の糖タンパク質上に結合している可能性が高いことが考えられた。(図 5)。

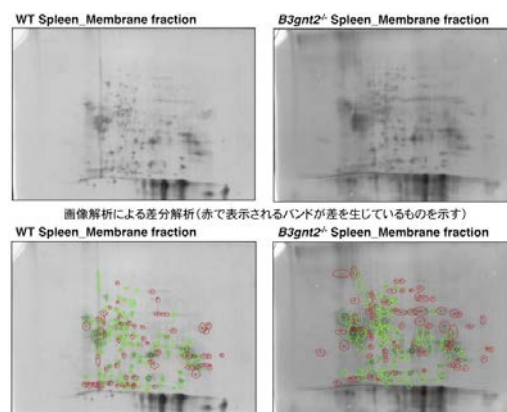


図 5 : 膜タンパク質画分の 2 次元電気泳動による比較解析

以上、本研究課題では、 β 3GnT2 酵素に特異的な標的タンパク質をグライコプロテオーム技術で同定するための解析手法を確立した。今後はより多くのサンプルを解析する事で、標的タンパク質 (ポリラクトサミン糖鎖キャリア) 分子の共通した特徴や傾向がより詳細に明らかになると考えられる。将来において、特定のタンパク質に対してポリラクトサミン糖鎖が選択的に付加されるメカニズムと機能の解明が進むと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kashiwazaki H, Kakizaki M, Ikehara Y, Togayachi A, Narimatsu H, Watanabe R. Mice lacking α 1,3-fucosyltransferase 9 exhibit modulation of in vivo immune responses against pathogens. *Pathol Int.* 64. pp.199-208. 2014. 査読有. DOI: 10.1111/pin.12159.

2. Akiyoshi S, Nomura KH, Dejima K, Murata D, Matsuda A, Kanaki N, Takagi T, Mihara H, Nagaishi T, Furukawa S, Ando KG, Yoshina S, Mitani S, Togayachi A, Suzuki Y, Shikanai T, Narimatsu H, Nomura K. RNAi screening of human glycogene orthologs in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the construction of the *C. elegans* glycogene database (CGGDB). *Glycobiology* 25. pp.8-20. 2014. 査読有.

DOI: 10.1093/glycob/cwu080.

3. Kumar A, Torii T, Ishino Y, Muraoka D, Yoshimura T, Togayachi A, Narimatsu H, Ikenaka K, Hitoshi S. The Lewis X-related α 1,3-Fucosyltransferase, Fut10, is Required for the Maintenance of Stem Cell Populations. *J Biol Chem.* 288. pp.28859-28868. 2013. 査読有.

DOI: 10.1074/jbc.M113.469403.a.

4. Togayachi A, Narimatsu H. Function analysis of β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferases and regulation of immunological function by polylectosamine. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* 24. pp.137. 2012. 査読有. DOI: 10.4052/tigg.24.95.

[学会発表] (計7件)

1. 野呂絵里花、榎谷内晶、佐藤隆、富岡あづさ、藤田弥佳、助川昌子、鈴木奈美、梶裕之、成松久. α 1,3-フコース転移酵素9ノックアウトマウスを用いた糖鎖および糖タンパク質の網羅的な解析. 日本プロテオーム学会2014年会. 2014/7/17-18. つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

2. Noro E, Togayachi A, Sato T, Tomioka A, Fujita M, Sukegawa M, Suzuki N, Kaji H, Narimatsu H. Comprehensive identification of glycoproteins carrying Lewis x and site-specific glycan alteration in Fut9

knockout mice. HUP0 13th World Congress. 2014/10/5-8. (Madrid, Spain)

3. 野呂絵里花、榎谷内晶、佐藤隆、富岡あづさ、藤田弥佳、助川昌子、鈴木奈美、梶裕之、成松久. α 1,3-フコース転移酵素9ノックアウトマウスを用いた糖鎖および糖タンパク質の網羅的な解析. 第87回日本生化学会大会. 2014/10/15-18. 国立京都国際会館 (京都府京都市)

4. Noro E, Togayachi A, Sato T, Tomioka A, Fujita M, Sukegawa M, Suzuki N, Kaji H, Narimatsu H. Comprehensive identification of glycoproteins carrying Lewis x and site-specific glycan alteration in Fut9 knockout mice. The 6th ACGG conference. 2014/12/12. Hyderabad (India)

5. Togayachi A, Ocho M., Kaji H, Kuno A., Iio E., Sogabe M., Tanaka Y., Ikehara Y., Mizokami M., and Narimatsu H.

Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker for Hepatitis Virus Infection-associated Chronic Liver Disease. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop. 2014/4/19-20. Academia Sinica (Taipei, Taiwan)

6. 榎谷内晶. ポリラクトサミン糖鎖が制御する細胞表層分子機能. 日本生化学会大会シンポジウム 糖鎖フィールド. 2013/9/13. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

7. Togayachi A, Sato T., Ikehara Y., and Narimatsu H. Biological function of polylectosamine chains on cell surface in immune system. 日本組織培養学会 (国際学会: JTCA 2013) . 2013/5/30. 産業技術総合研究所つくばセンター (茨城県つくば市)

[図書] (計8件)

1. Togayachi A. Springer 社. Glycoscience: Biology and Medicine: Polylectosamine and immunity. 2014年. pp.691-698.

2. Angata K, Sato T, Togayachi A, Narimatsu H. Springer 社. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2nd Ed) : β 1,3-*N*-acetylgalactosaminyltransferase 2 (*B3GALNT2*). 2014 年. Vol.1. pp. 439-445.
3. Togayachi A. Narimatsu H. Springer 社. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2nd Ed) : UDP-Gal ; β -GlcNAc β 1,3-galactosyltransferase 5 (*B3GALT5*). 2014 年. Vol.1. pp. 89-100.
4. Togayachi A. Narimatsu H. Springer 社. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2nd Ed) : UDP-GlcNAc ; β -Gal β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 2 (*B3GNT2*). 2014 年. Vol.1. pp. 283-294,
5. Togayachi A. Narimatsu H. Springer 社. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2nd Ed) : UDP-GlcNAc ; β -Gal β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 4 (*B3GNT4*). 2014 年. Vol.1. pp. 303-310.
6. Togayachi A. Narimatsu H. Springer 社. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2nd Ed) : UDP-GlcNAc ; β -Gal β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 5 (*B3GNT5*). 2014 年. Vol.1. pp. 311-320.
7. Togayachi A. Narimatsu H. Springer 社. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2nd Ed) : UDP-GlcNAc ; β -Gal β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 6 (*B3GNT6*). 2014 年. Vol.1. pp. 321-330.
8. Togayachi A. Narimatsu H. Springer 社. Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes (2nd Ed) : UDP-GlcNAc ; β -Gal β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 8 (*B3GNT8*). 2014 年. Vol.1. pp. 337-346.

[産業財産権]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎谷内 晶 (TOGAYACHI, Akira)

産業技術総合研究所・糖鎖創薬技術研究セン

ター・標的糖鎖探索チーム・主任研究員

研究者番号 : 60392635

(2) 連携研究者

梶 裕之 (KAJI, Hiroyuki)

産業技術総合研究所・糖鎖創薬技術研究セン

ター・標的糖鎖探索チーム・研究チーム長

研究者番号 : 80214302