

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：35408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790101

研究課題名(和文) 新規高マンノース結合性レクチンによる抗ウイルス、抗菌、抗腫瘍活性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of anti-viral and anti-cancer activity of novel high mannose-binding lectins

研究代表者

佐藤 雄一郎 (Sato, Yuichiro)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60416427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1レクチン(PFL)の遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させたリコンビナントレクチンの糖鎖結合性および生物活性を調べた。PFLは高マンノース型糖鎖の分岐構造を特異的に認識し、インフルエンザウイルスの表面に存在するHA糖タンパク質に直接結合することで、顕著なウイルス感染阻害活性を示した。また、PFLは、がん細胞の表面に存在するインテグリン/EGFRに糖鎖を介して結合し、同分子の内在化をトリガーとするオートファジー性がん細胞死を誘導する新規の抗がんメカニズムを示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Bacterial lectin (PFL) was cloned, expressed in *Escherichia coli* and purified. Glycan array screening has revealed that PFL preferentially recognizes high mannose glycans with alpha1-3 Man that was highly exposed at the D2 position. PFL showed a potent anti-influenza virus activity by inhibiting the virus entry into cells via interaction with virus surface glycoprotein HA. Furthermore, PFL showed cytotoxicity against human gastric cancer MKN28 cells. Upon treatment with exogenous PFL, both integrin alpha2 and EGFR on the cell surface were internalized to the cytoplasm and accumulated to perinuclear region, together with the bound PFL. As the results of integrin/EGFR accumulation in cytoplasm, autophagic cell death was induced. This is a novel anti-cancer mechanism induced by the lectin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、生物系薬学

キーワード：レクチン 抗ウイルス活性 抗がん活性 オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、タンパク質の半数以上に付加されており、感染、癌、免疫、発生、分化など多岐の生命現象に関わっている。糖鎖の異常は様々な疾患と関わっており、糖鎖をターゲットとした医薬品開発に関心がもたれている。また、ウイルスを始めとする病原体の中には表層糖タンパク質に高マンノース糖鎖を特徴的に有しているものも多数存在していることから、それら病原体糖鎖も潜在的な医薬品の標的分子になり得ると考えられた。最近、藻類や細菌類などの下等生物間にまたがる新規の高マンノース糖鎖結合性レクチンファミリーが存在することが明らかとなり、厳密でユニークな糖鎖結合性から、ウイルス性疾患などの難治性疾患に対する予防・治療薬の候補物質として注目されている。また、本ファミリーに属する一部の藻類レクチンには顕著ながん細胞増殖抑制活性が認められている。

### 2. 研究の目的

本研究は、抗ウイルスや抗がん活性など有用な生理活性を示す新規の高マンノース糖鎖結合性多機能レクチンを中心に、その構造および機能解析を主たる目的とし、インフルエンザや HIV をはじめとするウイルス感染予防薬、クラミジアをはじめとする性感染症予防薬、さらにはがん予防医薬品の開発に資するための基盤的研究を行うこととした。対象とする病原体は、いずれも細胞への感染に関与する蛋白質部位に高マンノース型糖鎖を有していることから、本レクチンファミリーが感染阻害剤として働く可能性が高く、予防薬開発への展開が開かれることが期待された。

### 3. 研究の方法

#### (1)レクチン遺伝子のクローニングおよび大量発現系の構築

*P. fluorescens* の培養液より菌体を回収し、ゲノム DNA を単離した。データベース中のゲノム配列を基にレクチン遺伝子に対応するプライマーを構築し、PCR により同遺伝子を増幅し、TOPO クローニングシステムによりクローニングを行った。目的遺伝子を発現ベクターに連結後、クローンのスクリーニングを行い、得られたプラスミドを発現用宿主大腸菌に形質転換した。続いて、大量培養を行い、IPTG による誘導によりレクチン蛋白質を発現させた。菌体の抽出液より、ゲル濾過などを用いてレクチンを電気泳動で単一なレベルまで精製した。

#### (2)レクチンの糖鎖結合性試験 (グリカンアレイ)

PFL と命名された精製レクチンの糖鎖結合性は、Alexa Fluor 488 標識レクチンを用い Consortium for Functional Glycomics (CFG) のグリカンアレイにより調べた。本アレイ解析では、610 種の糖鎖を対象とした糖鎖ア

レイ ver5.0 を用いた。

#### (3)PFL のインフルエンザウイルスに対する効果

PFL の抗インフルエンザウイルス活性は、各種インフルエンザウイルス株 (H3N2, H1N1) を使い、MDCK 細胞に対する細胞障害 (cytopathic effect: CPE) 抑制効果により調べた。抗ウイルス活性は、ニュートラルレッドの取り込み試験により行い、50% ウイルス感染阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) を算出した。さらに、PFL によるウイルス感染阻害効果を免疫蛍光染色法により調べた。また、PFL およびインフルエンザウイルスエンベロープ糖タンパク質 (HA) の結合試験を ELISA アッセイにより測定した。

#### (4)レクチンのクラミジア トラコマチスに対する効果

PFL のクラミジアに対する効果は、クラミジアの標準測定法である MIC 測定法ならびに MLC 測定法に準拠して行った。感染細胞として HeLa229 細胞を用い、PFL 存在下で培養し、クラミジア封入体形成抑制を示す最小レクチン濃度を調べた。

#### (5)PFL の *in vitro* におけるがん細胞に対する効果

*in vitro* におけるレクチンのがん細胞に対する効果は、MKN28 細胞をはじめとする胃がん細胞系列に対する細胞増殖抑制能を MTT アッセイにより調べた。

#### (6)がん細胞における PFL 標的分子の単離と同定

ビオチン化 PFL を MKN28 細胞に作用させた後、細胞を溶解し、アビジンビーズを用いて PFL のターゲットとなる細胞表面のレセプター分子を沈澱させた。電気泳動後、PFL により特異的に検出されたバンドについてトリプシンでゲル内消化を行い、MALDI-TOF MS を用いるペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法により、標的分子を同定した。

#### (7)PFL のインテグリン 2 および EGFR の細胞内局在性に及ぼす影響

上記実験 (6) の PMF 法により、PFL の標的分子としてインテグリン 2 および EGF レセプター (EGFR) が同定された。そこで、Alexa488 標識 PFL を用いて、MKN28 細胞におけるインテグリン 2 および EGFR の細胞内局在性に及ぼす影響を免疫蛍光染色法により調べた。

#### (8)PFL 処理 MKN28 細胞におけるオートファジー関連タンパク質の発現変動

上記 (7) の実験より、PFL により細胞表面から細胞内に局在変化を起こした EGFR が時間経過とともに分解されたことから、PFL がオートファジーを誘導する可能性が示唆された。そこで、PFL 処理した MKN28 細胞におけるオートファジー関連因子の発現変動をウェスタンブロットにより調べた。

#### (9)PFL の *in vivo* における抗腫瘍効果

培養した MKN28-EGFP 細胞 (EGFP 発現胃がん細胞) を  $1.0 \times 10^6$  cells/body の条件で、6 週

齢マウスの右わき腹皮下に移植した。マウスは、コントロール群およびレクチン群に分け、レクチン群には、がん細胞移植後、4日後から3日間隔で3回、腫瘍部位に直接レクチンを投与した。腫瘍の成長は Xenogen-IVIS システムにより、region of interest の発光量 (photon count) をリアルタイムでモニターした。

#### 4. 研究成果

本研究では、まず細菌 *P. fluorescens* Pf0-1 由来レクチン (PFL) の遺伝子をクローニングし、大腸菌での発現ならびにレクチンタンパク質の精製を行った。精製レクチンは、ゲル濾過により培養液 1L あたり 240 mg の高収量で得られた。精製レクチンの分子量は MALDI-TOF MS により 13881.1 と測定され、アミノ酸配列より推定される分子量とよく一致した。得られたレクチン PFL の糖鎖結合性は 610 種糖鎖を対象としたグリカンアレイ解析により調べたところ、6 種の高マンノース型糖鎖のみと特異的に結合することがわかった。また、本レクチンは単糖結合性を示さず、共通して高マンノース型糖鎖の D2 アームの 1-3Man を中心とする分岐構造を特異的に認識するとともに、還元末端側の GlcNAc 構造も結合に寄与することが明らかとなった。この糖鎖結合性は、PFL と同じレクチンファミリーに属する抗 HIV 藻類レクチンの OAA や ESA-2 などと同様であった。PFL の抗インフルエンザウイルス活性を調べたところ、各種インフルエンザウイルス亜型に対しナノモルオーダー ( $EC_{50}=5-20$  nM 程度) で顕著な感染阻害活性を示した。ELISA 解析により、PFL はインフルエンザウイルス HA 糖タンパク質に高マンノース型糖鎖を介して直接結合することが明らかとなった。また、レクチン存在下の宿主細胞においては、ウイルス抗原が細胞内に検出されないことから、レクチンが entry inhibitor として働くことが判明した。

一方、PFL のクラミジア感染における影響を調べたが顕著な感染阻害活性は観察されなかった。

本レクチンのがん細胞に対する影響を調べたところ、胃がん由来 MKN28 細胞および GCIY 細胞などのがん細胞に対して  $EC_{50} = 1 \mu\text{M}$  程度で細胞増殖抑制活性を示すことがわかった。また、PFL 処理したがん細胞では、細胞接着障害による培養器からの剥離が特徴的に観察された。この PFL の抗がん作用の分子機構を明らかにするため、まず MKN28 細胞上における PFL の標的分子について、MALDI-TOF MS によるペプチドマスフィンガープリンティング法により調べたところ、細胞接着に関わるインテグリン 2 分子が同定された。そこで Alexa488 により標識した PFL 分子を用いて、PFL 処理 MKN28 細胞におけるインテグリン 2 の挙動を調べたところ、通常細胞表面に存在するインテグリン 2 は PFL 処理

後、速やかに細胞内へと局在変化を起こすこと、また PFL はインテグリンと共に細胞内に取り込まれた後、細胞核周辺に共局在することがわかった。また、PFL によるインテグリンの内在化は、高マンノース糖鎖含有の糖タンパク質により阻害されることから、PFL は高マンノース型糖鎖を介してインテグリンに結合することが示された。PFL 処理によるインテグリン 2 の内在化に伴い、通常コラーゲン I および などの細胞外マトリックス (ECM) に強く結合する MKN28 細胞の ECM 接着性は完全に失われた。一方、正常肝細胞 ACBR1 3716 の PFL に対する感受性はこれらの胃がん細胞よりも低く、PFL 処理におけるインテグリン 2 の局在変化も観察されなかった。さらに、PFL と結合する MKN28 細胞表面レセプター分子として EGF レセプター (EGFR) を同定した。興味深いことに、EGFR は、インテグリン 2 と同様に PFL により細胞表面から細胞内へと局在変化を起こすこと、さらには内在化された EGFR は、時間経過とともにタンパク質レベルが減少することがわかった。そこで次に、タンパク質などのバルク分解系であるオートファジーが PFL の誘導するがん細胞死に関与するか否かを調べた。その結果、PFL 処理 MKN28 細胞において Beclin-1、Atg3、Atg5、Atg9、Atg12、LC3II などのオートファジー関連因子の発現が経時的に増加したことより、インテグリン/EGFR の内在化にともなうオートファジー系の亢進が確認された。他方、PFL 処理がん細胞において各種活性型カスパーゼの発現量は極めて低いことから、オートファジーが本細胞死の主たる要因であると推測された。

PFL の *in vivo* 抗腫瘍活性は、MKN28-EGFP 細胞 (EGFP 発現胃がん細胞) をマウス皮下に移植したモデルマウスを用いて検討した。PFL を腫瘍部位に直接投与し、腫瘍の成長を *in vivo* イメージングシステムによりモニターしたところ、PFL は有意に腫瘍の増殖を抑制することが明らかとなった。

以上、本研究では、新規高マンノース糖鎖結合性レクチン PFL が、インフルエンザウイルスエンベロープ糖タンパク質 HA に直接結合し、ウイルスの宿主細胞への侵入を阻止することにより強力な抗ウイルス活性を示すことを明らかにした。また、同レクチンが胃がん由来 MKN28 細胞の表面に存在するインテグリン/EGFR に糖鎖を介して直接相互作用し、両分子の内在化を引き起こすこと、さらにはそれら蛋白質の細胞内蓄積をトリガーとしたオートファジー性細胞死を誘導することを明らかにした。この抗がんメカニズムは、これまでに報告例がなく、インテグリン/EGFR の細胞内トラフィッキングとオートファゴソーム形成の分子機構の詳細など、さらなるメカニズムの解析が必要と考えられる。PFL の抗がん作用は、オートファジー細胞死の誘導が主たる要因であることから、アポトーシスを作用機序とする既存抗がん剤に不

応であるがんに対しても有効に作用する可能性がある。本研究は、新規高マンノース型糖鎖結合性レクチンをがん予防あるいは治療医薬品の開発に資するための基盤的研究であり、本研究の成果によりがん予防・治療薬開発への展望が開かれることが期待される。

#### 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2件)

Kinjiro Morimoto, Yuichiro Sato: Expression shifts of host genes in early stage of virus infection or lectin binding. Journal of Yasuda Women's University, 42, (2014) 査読無

Yuichiro Sato, Kinjiro Morimoto, Takanori Kubo, Kazuyoshi Yanagihara and Toshio Seyama: High mannose binding lectin PFL from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 promotes cell death of gastric cancer cell MKN28 via interaction with  $\alpha$ 2-integrin. PLoS ONE 7(9), e45922 (2012) 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0045922

[学会発表](計2件)

佐藤雄一郎, 久保貴紀, 浅田真未, 石田唯, 宇川早紀, 後藤瞳実, 森本金次郎, 瀬山敏雄: 細菌レクチン(PFL)により誘導されるアノキス様がん細胞死とオートファジーの関係 第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(松山) H25.10.27

佐藤雄一郎, 森本金次郎, 久保貴紀, 柳原五吉, 瀬山敏雄: 細菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 由来レクチン(PFL)の抗ウイルス、抗がん作用の分子機構、第85回日本生化学会大会(福岡) H24.12.16

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 雄一郎 (SATO, Yuichiro)

安田女子大学薬学部 講師

研究者番号: 60416427