

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06634

研究課題名(和文) ムチンの胃粘膜保護作用におけるガレクチンの役割の解明

研究課題名(英文) Possible roles of galectin-2-mucin interaction in the gastric mucosal barrier

研究代表者

荒田 洋一郎 (Arata, Yoichiro)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：90246017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの胃粘液中のGal-2リガンド候補としてムチンMUC5ACが検出され、MUC5ACのβ-ガラクトシド構造を介して相互作用することが明らかとなった。酸化剤によるGal-2の失活が糖鎖との共存で防げることから、胃内の酸化環境下では、MUC5ACなどの糖鎖との複合体形成やS-ニトロソ化修飾がGal-2の活性維持に必要であると考えられる。免疫組織化学染色により、Gal-2は表層粘液細胞の細胞質、MUC5ACは粘液や表層粘液細胞の粘液顆粒が主要な発現部位であり、Gal-2レクチン染色では粘液顆粒への結合が見られたことから、粘液中へのMUC5AC分泌にGal-2が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃粘膜上皮細胞によって産生される粘液中のムチンは、胃粘膜保護に重要な役割をもつ糖タンパク質である。また、ガレクチンは、β-ガラクトシドをもつ糖鎖構造を特異的に認識する動物レクチンである。胃で高発現し胃粘膜保護に関与するとされるガレクチン-2 (Gal-2) は、ムチンMUC5ACと糖鎖依存的に相互作用し、胃内の酸化環境下では、S-ニトロソ化修飾やMUC5ACなどの糖鎖との複合体形成により活性を維持すると考えられた。本研究結果により、酸化ストレス下における胃粘膜保護の新たな分子メカニズムの一端が明らかとなり、胃関連疾患防止や治療、新薬開発に向けてさらなる解析を進めることが可能になったと考えている。

研究成果の概要(英文)：Mucin MUC5AC was identified as a possible Gal-2 ligand in mouse gastric mucus fraction by affinity chromatography and LC/MS/MS and it was revealed that Gal-2 could interact with MUC5AC in a β-galactoside-dependent manner. In the presence of lactose, Gal-2 retained its activity under oxidative environment. The results indicated that the presence of a carbohydrate ligand as well as prevention of oxidation by S-nitrosylation could contribute towards maintaining Gal-2 activity under oxidative environment in the gastric mucosa. By immunohistochemical study, galectin-2 immunoreaction was mainly found in cytosol of gastric surface mucous cells while MUC5AC immunoreaction was found in mucosal barrier as well as in mucous granules of mucous cells. Lectin histochemical analysis using Gal-2-GFP showed glycans recognized by Gal-2 were expressed in mucous granules of mucous cells. The results suggested that Gal-2 might play a role in the secretion of MUC5AC from surface mucous cells.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ガレクチン Gal-2 ムチン MUC5AC 胃

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃粘膜上皮細胞によって産生される粘液中のムチンは、胃粘膜保護に重要な役割をもつ糖タンパク質である。ムチンは多数の糖鎖が付加された糖タンパク質で、ゲルを形成し、胃酸やペプシン、侵入病原菌などから胃粘膜を保護する重要な防御因子であるが、防御作用の分子メカニズムについては不明な点も多い。胃で分泌される主要なムチンの一つが MUC5AC である。

ガレクチンは、 β -ガラクトシドをもつ糖鎖構造を特異的に認識する動物レクチンであるが、このうち胃で高発現するガレクチン-2 (Gal-2) は胃粘膜保護作用をもつと考えられており、ムチン分子上の糖鎖に結合してムチンを架橋し、複合体を形成することが明らかとなっていた。さらに、組換えタンパク質を用いた実験で、Gal-2 は S-ニトロソ化 (翻訳後修飾の一種) されることにより、酸化ストレス下でもガレクチン活性を維持できることも判明していた。本研究では、Gal-2 と相互作用するムチン分子を明らかにした上で、そのムチン分子との複合体形成を生化学的に解析するとともに、胃粘膜における両分子の発現部位を同定することで、ムチンの胃粘膜保護作用におけるガレクチンの役割を解明することを目指した。さらに、Gal-2 の S-ニトロソ化が胃粘膜保護に貢献する仕組みを解析し、酸化ストレス下における胃粘膜保護の新たな分子メカニズムを提示することで、胃潰瘍・胃癌の予防や治療の基盤となる知見を得ることを目指した。

2. 研究の目的

胃粘膜において、Gal-2 がムチン MUC5AC を架橋して複合体を形成することを示し、分泌されたムチンによる胃粘膜保護作用に Gal-2 がどのように貢献するのか、さらに、S-ニトロソ化された Gal-2 が酸化ストレス下でどのようにムチンとの格子状構造を維持するのか、などムチンの胃粘膜保護における Gal-2 の役割の分子基盤を提示することを目的とした。

3. 研究の方法

ガレクチン-2 (Gal-2) が胃粘液中でムチン MUC5AC と相互作用することで、胃粘膜保護に寄与していること、さらに、Gal-2 の S-ニトロソ化がこの保護作用の維持に重要であることを分子レベルおよび、細胞・組織レベルで解析を試みる。

(1) 大腸菌を用いた Gal-2 組換え体の発現・精製と、胃粘液画分を用いた MUC5AC との相互作用の解析

大腸菌を用いて Gal-2 を組換え体として発現し、この Gal-2 を固定化したアフィニティークラムを用い、胃粘液画分中の Gal-2 リガンド候補を単離・精製する。LC/MS/MS 解析により MUC5AC が同定されたので、胃粘液画分に Gal-2 に特異的に結合できるラクトースを添加して Gal-2 が溶出するか、残存画分に MUC5AC が存在するかなどを検証する。

(2) 酸化ストレス条件下での Gal-2 とリガンド糖との相互作用の解析

過酸化水素添加などで酸化ストレス下においたとき、Gal-2 の活性維持に対する、リガンド糖の共存効果、S-ニトロソ化修飾の効果などを CD スペクトルの測定などにより検証する。

(3) 免疫組織化学的手法による、Gal-2 とムチン MUC5AC の胃粘膜における局在の解析

胃粘膜中での Gal-2 による MUC5AC の架橋と複合体形成について調べるため、Gal-2 とムチン MUC5AC の局在を免疫組織化学的手法により解析する。Gal-2 に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を付加した組換えタンパク質 Gal-2-GFP を用いたレクチンプロット法により、Gal-2 に認識される糖鎖が同じ部位に発現しているかも確認する。

4. 研究成果

マウスの胃粘液画分中の Gal-2 リガンド候補を、組換え Gal-2 を固定化したアフィニティークロマトグラフィーおよび LC/MS/MS で解析したところ、ムチンの一種 MUC5AC がスコア値が高いものとして同定された。ウエスタンプロット等の生化学的解析でも胃粘液画分中に Gal-2 と MUC5AC 両者の存在が確認できた。胃粘液画分に Gal-2 の阻害糖であるラクトースを共存させると Gal-2 が可溶性画分に溶出し、残存画分における MUC5AC の存在が確認できた。この残存画分に組換え体 Gal-2 が結合でき、この結合はラクトース共存により失われるがスクロースではそのようなことは起こらないことから、胃粘液画分中で Gal-2 と MUC5AC が、MUC5AC 上の β -ガラクトシド構造を介して相互作用していることが明らかとなった。

Gal-2 は哺乳類間で高度に保存された 2 つのシステイン残基をもつが、このうち、57 番目のシステイン残基 (Cys57) が Gal-2 の酸化的失活に関与し、Cys57 をメチオニン残基に置換した C57M 変異 Gal-2 では酸化剤共存下でも酸化的失活を免れることが明らかになっている。Gal-2 組換えタンパク質を用い、CD スペクトル測定による解析では、過酸化水素などの酸化剤の添加により Gal-2 は失活して高次構造が崩壊するが、特異的に結合できるラクトース共存下では特徴的なシート構造を保つことでその活性が維持できることが判明した。Cys57 はそのままに、もう一方の 75 番目のシステイン残基 (Cys75) をセリン残基に置換して -SH 基を Cys57 だけにした C75S 変異 Gal-2 では添加過酸化水素の濃度依存的なシート構造の崩壊が CD スペクトル測定で明らかになり、さらに、不溶性の高分子体を形成することが判明した。以上の結果より Cys57 が保護

されることが Gal-2 の活性維持に重要であることが確かめられたが、Gal-2 を Cys57 において S-ニトロソ化修飾することでも、同様な活性維持ができ、また、Cys57 は Gal-2 の糖結合部位近傍に存在することから、胃内の酸化環境下でも、Gal-2 が MUC5AC などの糖鎖と複合体を形成することで Cys57 を介した失活が防がれていると考えられる。

マウスの胃粘膜組織の免疫組織化学染色による解析により、Gal-2 は表層粘液細胞の細胞質、MUC5AC は粘液、および、表層粘液細胞の粘液顆粒が主要な発現部位であることが確認できた。Gal-2 の染色は粘液にもわずかながら見られた。一方、Gal-2-GFP を用いたレクチン染色では、表層粘液細胞の粘液顆粒が染色され、この染色が阻害糖のラクトースの共存下で消失すること、スクロース共存下では染色に変化がないこと、また表層粘液顆粒では MUC5AC の発現も見られることから、Gal-2 が特異的に結合できる糖鎖をもったリガンドが粘液顆粒中に存在し、これが MUC5AC であることが示唆された。以上より、当初の予想のような、粘液中における Gal-2 と MUC5AC による格子形成という物理的な障壁を構成していることが Gal-2 による胃粘膜保護の主要な役割なのではなく、粘液中への MUC5AC の分泌などにおいて、MUC5AC と複合体を形成することができる Gal-2 が関与していることが示唆された。

本研究により、ムチン MUC5AC の胃粘膜保護作用における Gal-2 の関与の分子メカニズムの一端が明らかとなったが、今後の胃関連疾患防止や治療、新薬開発に向けてさらなる解析が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki, T., Saito, R., Oyama, M., Takeuchi, T., Tanaka, T., Natsume, H., Tamura, M., Arata, Y., Hatanaka, T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Galectin-2 has bactericidal effects against <i>Helicobacter pylori</i> in a α -galactoside-dependent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tamura, M., Tanaka, T., Fujii, N., Tanikawa, T., Oka, O., Takeuchi, T., Hatanaka, T., Kishimoto, S., Arata, Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Potential interaction between galectin-2 and MUC5AC in mouse gastric mucus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 356-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi, T. Tamura, M., Ishiwata, K., Hamasaki, M., Hamano, S., Arata, Y., Hatanaka, T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Galectin-2 suppresses nematode development by binding to the invertebrate-specific galactose 1-4fucose glyco-epitope.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 504-512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwz022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamura, M. and Arata, Y.	4. 巻 2132
2. 論文標題 Expression, S-nitrosylation, and measurement of S-nitrosylation ratio of recombinant galectin-2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 55-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0430-4_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田村真由美、田中享、藤井智彦、谷川尚、岡沙織、武内智春、畑中朋美、岸本成史、荒田洋一郎
2. 発表標題 マウスガレクチン-2の胃粘液中のリガンドの同定
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村真由美、田中享、藤井智彦、谷川尚、岡沙織、武内智春、畑中朋美、岸本成史、荒田洋一郎
2. 発表標題 ガレクチン-2はマウス胃粘液由来ムチンMUC5ACと相互作用する
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayumi Tamura, Tomoharu Takeuchi, Tomomi Hatanaka, Yoichiro Arata
2. 発表標題 Possible molecular mechanisms for preventing galectin-2 inactivation under oxidative environment.
3. 学会等名 第25回国際複合糖質シンポジウム (GLYCO XXV) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村真由美、谷川尚、岡沙織、武内智春、畑中朋美、荒田洋一郎
2. 発表標題 ガレクチン-2の酸化的失活からの保護におけるリガンドの役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村真由美、田中享、藤井智彦、谷川尚、岡沙織、武内智春、畑中朋美、岸本成史、荒田洋一郎
2. 発表標題 S-ニトロソ化と酸化により活性制御を受けるガレクチン-2のリガンド候補の探索
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村真由美、藤井智彦、坂倉正義、武内智春、畑中朋美、高橋栄夫、岸本成史、荒田洋一郎
2. 発表標題 ガレクチン-2のS-ニトロソ化部位のLC-MS/MSによる解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村真由美、藤井智彦、坂倉正義、武内智春、畑中朋美、高橋栄夫、岸本成史、荒田洋一郎
2. 発表標題 ガレクチン-2の酸化的失活からの防御に関するS-ニトロソ化部位の同定
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------