

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20563

研究課題名（和文）膵液糖タンパク質GP2のN型糖鎖と細菌レクチンFimHとの構造-親和性相関

研究課題名（英文）Structure-affinity relationship between the N-glycan of pancreatic glycoprotein GP2 and bacterial lectin FimH

研究代表者

西尾 俊亮（NISHIO, Shunsuke）

福島大学・食農学類附属発酵醸造研究所・特任講師

研究者番号：20825880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：Glycoprotein 2 (GP2) は腸管の炎症に応じて分泌され、腸内細菌の線毛タンパク質 FimHへ結合することで菌の腸上皮細胞への定着を阻害する。その結合は、GP2が持つハイマンノース型糖鎖を介したものと推定されるが、その実態は不明であった。ヒトおよびマウスのGP2を、哺乳類細胞を用いて発現・精製し、FimHとの結合をバイオレイヤー干渉法により解析した。ヒトGP2とFimHとの結合において、ハイマンノース型糖鎖付加ドメインに加えて、新規糖鎖付加領域が存在することが示唆された。一方、マウスGP2は哺乳類細胞を用いた発現では目的の糖鎖が付加せず、結合も見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FimHと特異的に結合する糖は感染防御に対する治療法の一つとなりうる。本研究によって確立されたGP2とFimHとの定量的な結合解析は、FimHと糖鎖の結合のみに焦点を当てたこれまでの糖の探索方法に比べ、より生体での反応を模倣した、高機能な糖および糖含有食品を見出すことが可能となる。これは、農学から医学にわたる広範な分野への波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Glycoprotein 2 (GP2) is a secreted protein in response to intestinal inflammation and prevents bacterial colonization of intestinal epithelial cells. GP2 binds to the bacterial fimbria protein FimH. FimH-GP2 interaction is presumed to be mediated by the high mannose N-glycans of GP2, although the actual binding mode is unknown. Human and mouse GP2 were expressed and purified using mammalian cells, and their binding to FimH was measured by biolayer interferometry. Human GP2 contains a novel glycan-attached site where FimH binds in addition to a known high mannose N-glycan binding domain. In contrast, the mouse GP2 expressed in mammalian cells did not have high mannose N-glycans, and there was no binding to FimH.

研究分野：生化学

キーワード：GP2 FimH 腸内細菌 レクチン バイオレイヤー干渉法 ハイマンノース型糖鎖

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管管腔は体の外側に位置し、私達が摂取した食べ物や外来のウイルス、病原菌に曝露されている。さらに、私達は約100兆個にもなる常在腸内細菌と共生している。多種多様な外来異物と接する腸管は、粘膜バリアによって腸管組織とそれらを隔離している。小腸の粘膜バリアは、上皮細胞層、ムチン層および分泌された抗菌ペプチドで形成されるのに対し、大腸のそれは小腸より厚い2層のムチン層で形成される。栄養不良などでムチン層が薄くなると、腸内細菌が腸上皮細胞表面へ移行し、日和見感染や免疫反応による腸管炎症が誘発される。しかし、腸管には炎症を抑制的に制御する仕組みがあり、その一つが Glycoprotein 2 (GP2) の分泌である。

分泌された GP2 は、腸内細菌の線毛タンパク質 Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin (FimH) と結合し、腸内細菌の定着を阻害する。GP2 と FimH との結合は、GP2 が持つハイマンノース型糖鎖と FimH のレクチンドメインとの間で起こると推定されている。これは、GP2 と細菌との結合実験の結果および GP2 の構造ホモログタンパク質で、尿路感染症において細菌の定着を抑制する Uromodulin (UMOD) に関する研究成果にもとづいている。

本研究の代表者を含むグループは、ヒト GP2 のハイマンノース型糖鎖が付加されるデコイドドメイン (D10C ドメイン) の結晶構造を明らかにし、D10C ドメインと FimH との結合を示した [Stisiapanava et al., (2022). PMID 35273390]。UMOD の D10C ドメインと比較すると、ハイマンノース型糖鎖が付加すると考えられる残基付近に構造的差異が見られ、また、培養細胞を用いた組換えタンパク質調製においても付加する糖鎖の種類に違いが見られた。このことから、UMOD と GP2 は糖鎖を介して FimH と結合するという点は共通であるものの、その結合様式は必ずしも同一ではないことが考えられた。

### 2. 研究の目的

腸管の炎症は、腸内細菌叢の多様性を低下させる。多様性の低下 (dysbiosis) は、炎症を悪化させるため速やかに是正しなければならない。FimH に着目した研究の多くは、糖との結合に関するものであり [Krammer et al., (2023). PMID 36944399 など]、生体側のタンパク質 (GP2 や UMOD) との直接相互作用を見たものは少ない。

本研究は、腸管の炎症抑制機構における細胞-細菌間の特異的相互認識機構に着目し、GP2 の持つ糖鎖構造と FimH に対する結合能を定量的に解析し、タンパク質および糖鎖レベルでの構造-親和性相関を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞を用いた組換えタンパク質の発現および糖鎖構造の確認

ヒトの GP2 cDNA は膵臓 cDNA プールから PCR で増幅し、SLiCE 法により哺乳類細胞発現用ベクター-pLJ6 へ挿入した。マウス Gp2 cDNA は全長を含むプラスミドから増幅し、pLJ6 へ挿入した。それぞれの発現コンストラクトは、branched PEI を用いてヒト HEK293T 細胞あるいはハムスター CHO 細胞に一過的に導入した。培養上清への目的タンパク質の分泌は、His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット解析により評価した。分泌が確認された組換えタンパク質は、Ni-NTA ビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、PNGase F と Endo H を用いた糖鎖除去実験に供した。

FimH のレクチンドメイン (FimH<sub>L</sub>) cDNA は、Genscript に合成を依頼し、pET21b へ挿入した。構築したコンストラクトを大腸菌 BL21 へトランスフォーメーションし、組換えタンパク質を発現させた。ペリプラズム画分から目的タンパク質を抽出後、Ni-NTA ビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。His タグを除去するために、HRV3C プロテアーゼによりタグ配列を切断後、再度 Ni-NTA ビーズと反応させた。

#### (2) 組換え GP2 と FimH との結合解析

組換え GP2 タンパク質と FimH<sub>L</sub> タンパク質との結合は、Octet を用いたバイオレイヤー干渉法 (BLI) により測定した。リガンドは Ni-NTA あるいは抗 His タグ抗体を含むバイオセンサーに組換え GP2 タンパク質を固相化したものを、アナライトは FimH<sub>L</sub> タンパク質を段階的に希釈したものをを用いた。アナライトとの結合を 5 分間、解離を 5 分間と設定し、BLI シグナルの変化を測定した。

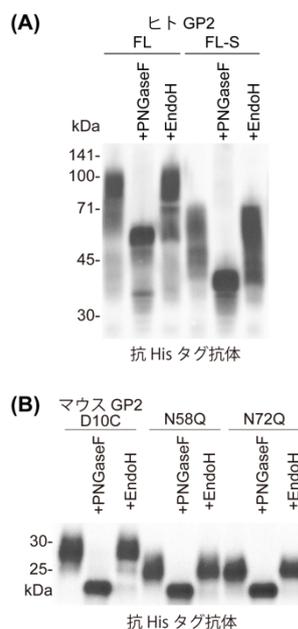
## 4. 研究成果

### (1) 組み換えタンパク質の発現・糖鎖構造

ヒト臍臓から *GP2* cDNA をクローニングしたところ、2種類のアイソフォームを得た。これら (isoform 1 および 2) は、D10C ドメインに相当する Exon が含まれるかどうかの違いであった。D10C ドメインを含む isoform 1 をヒト GP2 FL、含まない isoform 2 を FL-S と呼び、本研究に用いた。CHO 細胞を用いて発現、精製した組換えタンパク質が持つ糖鎖を、酵素処理によるタンパク質バンドのシフトで解析した。PNGase F および Endo H 処理を行ったところ、いずれの酵素でも目的タンパク質のシフトが観察され、FimH が認識するハイマンノース型糖鎖 (Endo H 感受性) が付加されていることを確認した (図 1A)。興味深いことに、D10C ドメインを持たない FL-S タンパク質でも Endo H によるシフトが見られ、D10C ドメイン以外にもハイマンノース型糖鎖が存在することが示唆された。

マウス GP2 は全長の発現量が少なかったため、D10C ドメインを組換えタンパク質として発現、精製した。D10C ドメインにある 2ヶ所の *N*-結合型糖鎖付加サイトを置換した変異体 (N58Q および N72Q) も用意し、糖鎖解析を行った。マウス GP2 D10C 組換えタンパク質は、PNGase F 処理によるシフトが見られたが、Endo H 処理ではほとんど変化しなかった (図 1B)。

本研究では、マウス GP2 にハイマンノース型糖鎖がほとんど付加しなかった理由は判明しなかったが、全長と D10C ドメインのみを発現させた場合で細胞内でのフォールディング速度が異なっていたことが影響すると推定された。今後は、マウス GP2 も全長タンパク質をよく発現する系を構築し、改めて糖鎖構造の比較解析を行う予定である。

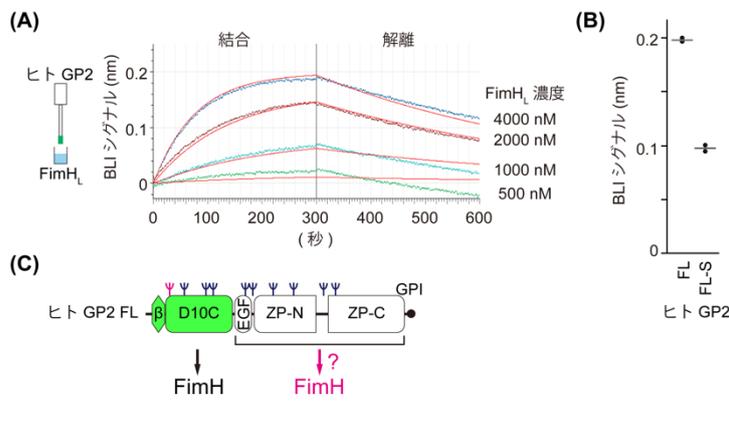


**図 1 組換え GP2 タンパク質の発現**  
マウス GP2 D10C ドメイン (A)、ヒト GP2 FL および FL-S (B) の組換えタンパク質を哺乳類細胞で発現し、糖鎖構造を解析した。

### (2) BLI による GP2-FimH 相互作用解析

組換えヒト GP2 タンパク質 (FL および FL-S) と FimH<sub>L</sub> との結合は、Octet を用いて測定した。ヒト GP2 FL タンパク質と FimH<sub>L</sub> との結合は、FimH<sub>L</sub> の濃度が 0.5 から 4 μM の間において検出可能であることを示した (図 2A)。この実験条件での最大濃度である 4 μM の FimH<sub>L</sub> をアナライトとして、FL および FL-S に対する結合を測定した。その結果、D10C ドメインを含まない FL-S では結合が見られないという予想に反して、FL および FL-S のいずれも FimH<sub>L</sub> と結合することが示された (図 2B)。BLI シグナルから FimH<sub>L</sub> の結合量を求めると、FL-S に対する FimH<sub>L</sub> の結合量は FL に対するものの半分であった。FL-S において Endo H 処理によるバンドシフトが見られたことを考慮すると、ヒト GP2 は、D10C ドメイン以外に FimH に対する未知のデコイ領域を持つことが示唆された (図 2C)。

GP2 と FimH の結合比はこれまで報告されていないが、GP2 の構造ホモログである UMOD の FimH との結合比は 2 つの可能性が示唆されている。Cryo-TEM あるいは Cryo-EM を用いた UMOD-FimH 繊維構造の結果から、1 分子の UMOD に対して 2 分子 [Weiss et al., (2020). PMID 32616672] あるいは 1 分子 [Stisiapanava et al., (2022). PMID 35273390] の FimH が結合すると報告されている。本研究における GP2 の新規デコイ領域の発見は、FimH が 2 分子結合するという結果を支持するものであった。今後は、新規デコイ領域の同定をすすめ、結合比を算出することで、細菌防御機構における UMOD との共通性を明らかにする予定である。



**図 2 GP2 と FimH の相互作用解析**

- (A) バイオレイヤー干渉法による、様々な濃度の FimH<sub>L</sub> タンパク質とヒト GP2 FL タンパク質との結合解析。
- (B) ヒト GP2 FL および FL-S タンパク質と 4 μM FimH<sub>L</sub> タンパク質との結合解析。
- (C) ヒト GP2 タンパク質の模式図と予想される FimH 結合領域。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------