

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26790026

研究課題名(和文) ガレクチンネットワークによるAGE代謝制御機構の解明と診断への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the AGE metabolic machinery using galectin network and its application to diagnosis

研究代表者

宮西 伸光 (MIYANISHI, Nobumitsu)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：80372720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ガレクチン3は、ガラクトシドのほかにAGEと相互作用することが示唆されていたがその詳細は不明であった。本研究ではガレクチン3が単独でAGEを認識する際のAGEの構造と親和性特性の詳細を明らかにし、さらにガレクチンファミリーの各種AGEに対する詳細な親和性特性を明らかにした。これらの分子間の親和性の差を利用したガレクチンネットワークの存在から、AGEの代謝制御が可能である事を明らかにした。また、これらのガレクチン群を用いたAGEバイオセンシングにおける前処理法を確立した。本研究の進展により各AGE群と関連性の高い疾患の診断におけるガレクチンネットワークを介した応用展開の基盤が形成された。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end-products (AGEs) are known as one of the factors that various lifestyle diseases. However, there was no convenient method of measuring each AGEs and their relative quantity. Galectins are  $\beta$ -galactoside-binding lectins that are found in various animals. Among the galectin family, galectin-3 has been reported as a receptor for AGEs, though there have not been any detail about these interactions. In this study, we confirmed that galectin-3 recognizes only a few types of AGEs, and we also confirmed that other galectins recognized some AGEs and those affinity characteristics. On the basis of these results, we constructed the protobiosensor based on the metabolism control system of AGEs using galectin network. The amount of AGEs in blood and tissue reflects a lifestyle diseases at about a month ago. Therefore, it was suggested that the constructed protobiosensor could predict of the comprehensive risk of lifestyle diseases inducing concomitant diseases.

研究分野：糖鎖生物学、糖進化

キーワード：相互作用 ガレクチン バイオセンサ

### 1. 研究開始当初の背景

ガレクチンは、 $\beta$ -ガラクトシドに親和性を示す動物レクチンであり、その一次配列上に特有の保存された領域（糖鎖認識ドメイン、Carbohydrate Recognition Domain: CRD）を有したガレクチンファミリーとして定義されている。図1に示す様に、ガレクチンはその分子構造からプロト型、キメラ型、タンデムリピート型の3種類に分類される。

ガレクチンは白血球や血管内皮細胞、胸腺上皮細胞など、免疫に深く関わっている細胞に発現しており、ガレクチンと免疫にかかわる様々な論文が報告されている。

我々はこれまでに、バイオセンシング技術の開発と、糖質関連分子における分子間相互作用に関する研究に取り組んできた。特に、ガレクチン-9の分子間相互作用に関しては、ガレクチン-9の分子同士が複合体を形成する事を初めて明らかにし、さらに、ガレクチン-9が、ガレクチン-3やガレクチン-8などの分子形態が異なるガレクチンとも相互作用することを初めて明らかにした。これらの一連の研究において、「ガレクチンファミリーが、生体内においてガレクチンネットワークを形成することによって、免疫をはじめとする生体防御や生体内における異物の選別などの制御機構に重要な役割を果たしている」ことが強く示唆されていた。

一方、ガレクチンファミリーのうち、ガレクチン-3は唯一“キメラ型”の分子形態を持つガレクチンであり（図1）、C-末端アミノ

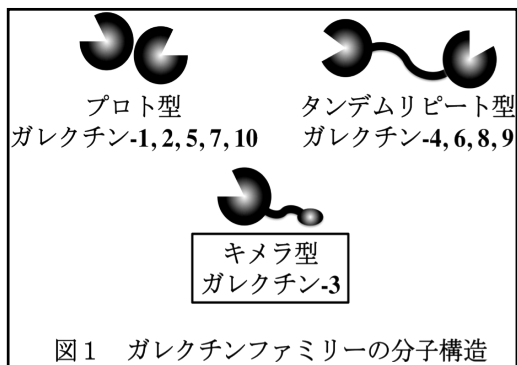


図1 ガレクチンファミリーの分子構造

ノ酸領域のCRDのほかに、N-末端アミノ酸領域に“プロリン/グリシン/チロシン含有量の高い繰り返し領域を持つ特徴的な構造を有している。ガレクチン-3の機能的特徴の一つとして、AGE受容体としての機能がある。ガレクチン-3は細胞膜のOST-48と細胞質の80K-Hの2つの分子と受容体複合体を形成し、OST-48とガレクチン-3の複合体はリガンドとして機能し、80K-Hはこのリガンド複合体に細胞内から結合し、細胞内シグナル伝達に機能していると考えられているが、その詳細は不明である。また、ガレクチン-3分子単独でのAGEとの親和性に関する詳細な解析はされておらず、さらにガレクチンのネットワーク形成と関連性が高いと予測されるAGEとの関わりについても全く不明であった。つまり、この事が“AGEと関連性の

深い重篤な疾病解明“の大きな障害となっていた。

### 2. 研究の目的

本研究の主題は、ガレクチンネットワークによるAGE代謝制御機構の解明およびAGE関連疾患の克服をめざした新規診断法の開発である。ガレクチンネットワークとAGE代謝制御機構の全貌の解明を行うために、様々な分子形態を有するガレクチン群と各種糖鎖群を配置したマイクロチップを作成し、AGE代謝に深く関与しているレクチンや糖鎖の網羅的相互作用解析を展開する。さらにガレクチンネットワークを介したAGE群の詳細な挙動解析を指標としたAGE関連疾患診断用バイオセンサチップの開発を行う。AGEは過去1~2か月の食生活や生活習慣を反映することから“過去を見る”ことができる世界で初めてのバイオセンサを開発する。

### 3. 研究の方法

本研究では、大きく2つの点に焦点を置いた研究を展開する。1つめとして、様々な構造を有するAGE群とガレクチン-3との親和性及び特異性解析および、ガレクチン-1、-3、-4、-8、-9を中心としたガレクチンネットワークの形成とAGE代謝制御機構との関連性の解析を行う。ガレクチン-9とガレクチン-1、-3、-8、-9との相互作用については、我々はその現象を報告していることから（引用文献）、本研究計画では、さらに“ガレクチンネットワーク”形成とAGE代謝制御機構における関連性、さらには受容体複合体形成と病態との関連性について解析するとともに、解析に重要な糖結合特異性を有するレクチンの検索についても行う。2つ目として、ガレクチンファミリーを用いたマイクロチップを構築し、各種AGE関連疾患モデルを用いたAGE関連疾患に関わる因子の挙動解析を行うとともに診断への実用的な応用展開・評価システム構築の可能性について検討した。

### 4. 研究成果

これまでの研究において、ガレクチン3が各種AGEのうちカルボキシエチルリジン-AGEと強い相互作用を有する事を明らかにした。そこで、さらに様々なAGEとガレクチン3との相互作用解析を行った結果、ガレクチン3はグリセロールアルデヒド-AGEに対しても強い相互作用を示す事が明らかとなった。また、ガレクチン3はメチルグリオキサール-AGEや、グリコールアルデヒド-AGEとは相互作用を示さなかった（図2）。この結果から、ガレクチン3は、特定の構造を特異的に認識している事が明らかとなった。次に、ガレクチン3のタンパク質構造のどの領域がAGE認識に関与しているかを解析するために、ガレクチン3のCRD単独でAGEと相互

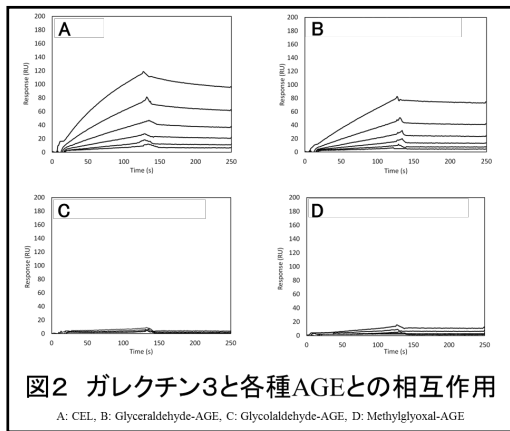


図2 ガレクチン3と各種AGEとの相互作用

A: CEL, B: Glyceraldehyde-AGE, C: Glycolaldehyde-AGE, D: Methylglyoxal-AGE

作用させた。結果、親和性はやや低下したが、各 AGE との結合特異性に顕著な差は確認されなかった。このことから、ガレクチン3の AGE 認識機構にはガレクチン分子中の CRD が関与していることが明らかとなった。しかし、ガレクチン3が本来有しているガラクトシド認識と AGE 認識には結合特性や親和力に明らかな違いがあることから、ガレクチン3の CRD の構造変化に伴うことによる、新たな AGE 相互作用領域の存在が示唆された。

一方、ガレクチン3が AGE のどの領域を選択的に認識しているかについては、グリセロアルデヒド-AGE やグリコールアルデヒド-AGE の糖化領域であるグリセロアルデヒドおよびメチルグリオキサールとガレクチン3との相互作用解析を行った結果、ガレクチン3はグリセロアルデヒド-AGE 以外の分子には全く相互作用を示さなかった(図3)。

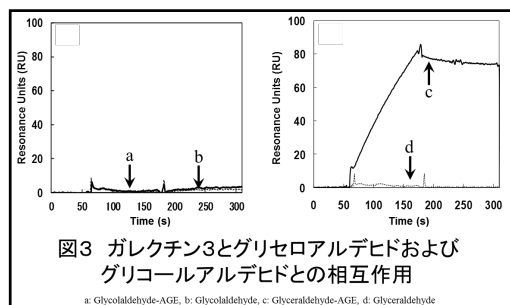


図3 ガレクチン3とグリセロアルデヒドおよびグリコールアルデヒドとの相互作用

a: Glyceraldehyde-AGE, b: Glycolaldehyde, c: Glyceraldehyde-AGE, d: Glyceraldehyde

グリセロアルデヒド-AGE やグリコールアルデヒド-AGE のそれぞれの糖化領域であるグリセロアルデヒドならびにメチルグリオキサールは、どちらも炭素数が3であるものの、ケト基や水酸基の数などの構造が大きく異なることから、ガレクチン3はこの構造の違いを厳密に認識している事が明らかとなった。さらにガレクチン3はグリセロアルデヒド-AGE との相互作用解析の結果から、AGE の糖化領域とタンパク質領域の両方を認識していることが本研究で初めて示された。

ガレクチンは図1に示したように、分子形態の特徴から3系統に分類されるファミリーを形成している。我々はガレクチンファミリーの個々の分子結合特性を介したガレクチンネットワークの形成が、免疫をはじめとする生体防御や生体内における異物の選別などの制御機構に重要な役割を果たしてい

ると考えており、この事から様々な AGE がガレクチンファミリーのそれぞれの分子に認識される可能性が考えられた。そこで、様々なガレクチンを配置したマイクロチップを用いて AGE の分子認識について解析を行った。この結果、AGE 群はガレクチン3以外のガレクチンにも親和性を示すことが初めて明らかとなった。ガレクチン1やガレクチン4はAGE群に殆ど認識されなかった。メチルグリオキサール-AGE はガレクチン8にのみ認識される特徴的な親和性が確認されたため、ガレクチン8は他のガレクチン群とは異なる AGE 排除機構に関与している事が考えられた。ガレクチン3が認識するカルボキシエチルリジン-AGE に対し、ガレクチン9はガレクチン3よりもさらに強い結合で認識する事が明らかとなった(図4)。この

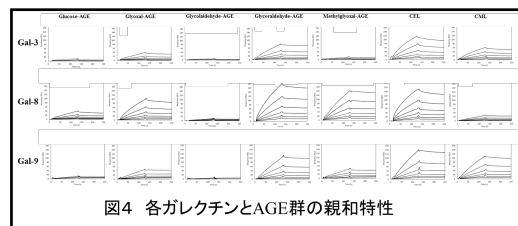


図4 各ガレクチンとAGE群の親和特性

事から、ガレクチン3とガレクチン9はガレクチンネットワークを構築する事で競合的に AGE 排除機構を制御している事が考えられた。AGE 群と各ガレクチンとの親和性にはそれぞれ特徴的な親和性があることが明らかとなり、これらのガレクチン群と AGE 群との親和特異性のパターンを示すことで、これまでに AGE 群が原因とする種々の生活習慣関連疾患とそれらの新しい形のモニタリングの可能性が示された。

AGE のモニタリングチップ構築に向けた最終段階として、開発に最も重要な項目の一つに前処理法の確立がある。特にバイオセンシングにおける前処理法の確立は、センサ素子として採用される生体分子の性能を最大限に発揮させるため重要となる。そこで本研究の最終段階として保存液を用いた添加検出試験を行い、バイオセンシングチップの実用化に向けた前処理法について検討した。市販綿羊保存血液を試料とし、これに CEL を混合した。遠心分離後の上清に HBS-EP+buffer および Ficoll-Paque を添加し、再び遠心分離を行い、上清回収し、これを測定用試料とした。また、保存血液に CEL を添加後、遠心分離のみを行った試料についても測定を行った。AGE 測定用バイオチップは添加検出試験用としてセンサ素子にガレクチン3のみを用いて測定した。測定の前処理法として最も重視される事の一つにベッドサイドで容易に簡便に行う事ができる事がある。そこで前処理時に行う遠心分離は回転数を低く設定し、温度も室温を想定した 20 に設定した。これらの前処理条件にて前処理を行った試料を AGE 測定用バイオチップで測定した結果を図5に示す。アジアロフェツインは、ガレクチン3と相互作用する糖タンパク質で

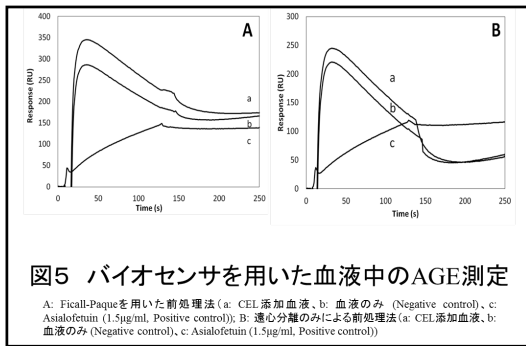


図5 バイオセンサを用いた血液中のAGE測定

A: Ficall-Paqueを用いた前処理法 (a: CEL添加血液, b: 血液のみ (Negative control), c: Asialofetuin (1.5µg/ml, Positive control)); B: 遠心分離のみによる前処理法 (a: CEL添加血液, b: 血液のみ (Negative control), c: Asialofetuin (1.5µg/ml, Positive control))

あり、図5のAおよびBの両方に示した。図5Aは前処理にFicall-Paqueを用いた結果であり、図5Bは遠心分離のみによる前処理結果を示している。両方の前処理の結果において、CELを添加した血液とCELを添加していない血液との比較では明確な差が確認され、CELの添加によるセンサ応答の大幅な増強が確認された。このことからAGE測定用バイオセンサによるAGE測定の前処理にはFicall-Paqueの有無に関わらず、簡便な遠心分離が有効であることが明らかとなった。本研究により開発してきたガレクチンファミリーとAGE群の特異的親和性を総合的に評価することによる食生活改善に向けた生活習慣モニタリング用高感度バイオセンサ（AGE測定用バイオセンサ）は医療現場やベッドサイドで実際に使用することを視野に入れており、簡便な前処理法は実用化に向けた本センサの開発に極めて有効である。研究は、新規バイオセンサの開発から前処理法の開発までを2年間で行う事ができ、本研究の進展により、各AGE群と関連性の高い疾患の診断におけるガレクチンネットワークを介した応用展開の基盤が形成された。

#### <引用文献>

**N. Miyanishi**, N. Nishi, H. Abe, Y. Kashio, R. Shinonaga, S. Nakakita, W. Sumiyoshi, A. Yamauchi, T. Nakamura, M. Hirashima, J. Hirabayashi, "Carbohydrate-recognition domains of galectin-9 are involved in intermolecular interaction with galectin-9 itself and other members of the galectin family" *Glycobiology*, Vol. 17, No. 4, 2007, pp 423-432.

#### 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5件)

##### 原著論文

Risa Horiuchi, Naoki Hirotsu, **Nobumitsu Miyanishi**, Comparative analysis of N-glycans in the ungerminated and germinated stages of *Oryza sativa*, *Carbohydrate Research*, 418, 2015, December, pp1-8. (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2015.09.008>

Wataru Sumiyoshi, **Nobumitsu Miyanishi**,

Shin-ichi Nakakita, Shoko Tsutsui, Keita Yamada, Yukari Nakakita, Shin Yoshioka, Masakatsu Asao, Jun Hirabayashi, An alternative strategy for structural gluconomics using beta-gluco-oligosaccharides from the brown algae *Ecklonia stolonifera* as models, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber*, 5, 2015, April, pp137-145. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.03.002>

**宮西 伸光**, 中北 慎一、住吉 渉、大熊 廣一、平林 淳、「糖質のバイオセンサで生命を垣間見る」科学と工業、査読無、Vol. 88 (5)、2014年7月、pp. 1 - 7.

堀内 里紗、**宮西 伸光**、産学連携による機能性食品開発事例と食品健康関連分野における新評価法開発、食品と開発、査読無、2014年5月、pp. 84 - 85.

**宮西 伸光**、バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発、技術情報協会、査読無、第9章2節、2014年3月、pp. 344 - 347.

#### [学会発表](計8件)

堀内 里紗、遠坂 翼、廣津 直樹、館野 浩章、平林 淳、**宮西 伸光**：イネ (*Oryza sativa*) 由来レクチンの精製及び性状解析、第64回日本応用糖質科学会大会、2015年9月16日 - 9月18日、奈良春日野国際フォーラム 薨~I・RA・KA~ (奈良県奈良市)

堀内 里紗、遠坂 翼、廣津 直樹、**宮西 伸光**：イネ初期生長時における部位特異的糖鎖の挙動、第34回日本糖質学会年会、2015年7月31日 - 8月2日、東京大学安田講堂 (東京都文京区)

脇坂 卓実、堀内 里紗、根建 拓、**宮西 伸光**：高血糖状態におけるマウス大腿筋由来C2C12細胞の糖鎖構造解析、第34回日本糖質学会年会、2015年7月31日 - 8月2日、東京大学安田講堂 (東京都文京区)

金児 賢樹、木村 幸樹、佐藤 駿、落合 郁未、近藤 洋介、小田 達也、**宮西 伸光**、ツノロウカイガラムシ (*Ceroplastes ceriferus*) 由来赤血球凝集及び溶血活性物質の特性解析、第34回日本糖質学会年会、2015年7月31日 - 8月2日、東京大学安田講堂 (東京都文京区)

金児 聡樹、落合 郁未、佐藤 駿、木村 幸樹、小田 達也、**宮西 伸光**：Ceroplastes ceriferus 由来の毒タンパク質の精製と特性解析、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日 - 10月18日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

金児 賢樹、佐藤 駿、星野尾 麻子、  
**宮西 伸光**：表面プラズモン共鳴による  
AGEs とガレクチンの相互作用解析、第 33 回  
日本糖質学会大会、2014 年 8 月 10 日 - 8 月  
12 日、名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)

遠坂 翼、堀内 里紗、廣津 直樹、**宮  
西 伸光**：コメ種子由来レクチンの特性解  
析、第 33 回日本糖質学会大会、2014 年 8  
月 10 日 - 8 月 12 日、名古屋大学豊田講堂  
(愛知県名古屋市)

川嶋 賢一、藤野 耕太郎、小倉 有里  
奈、**宮西 伸光**、根建 拓：PC12 細胞に  
おけるグルコース枯渇依存的な Sortilin 発現  
制御、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014  
年 3 月 27 日 - 3 月 30 日、明治大学生田キャン  
パス(神奈川県川崎市)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：カイガラムシ由来のポリペプチド  
発明者：**宮西伸光**、金児賢樹  
権利者：東洋大学  
種類：特許願  
番号：2014-179175  
出願年月日：2014 年 9 月 3 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.toyo.ac.jp/site/dfls/miyanishi.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

宮西 伸光 (MIYANISHI, Nobumitsu)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：80372720