

平成23年度特別経費（プロジェクト分）  
「香川グライコリソース（希少糖・ヒト型糖鎖）を用いたナノ糖質生命科学研究推進事業」  
研究グループ別研究成果報告書

（本報告書は、必要に応じてホームページ上で公開しますので、知的財産に関連する記述等については注意してください。）

<b>研究組織</b>					
研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。					
研究課題名	マスト細胞の脱顆粒調節における IgE 糖鎖の役割: ガレクチン9 結合性糖鎖の解析				
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先		
	西 望	総合生命科学研究センター・准教授	e-mail	本人	nnishi@med.kagawa-u.ac.jp
				秘書等	
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等		
	伊藤 愛子	総合生命科学研究センター・研究員	組換えタンパク質の発現・精製 ガレクチンの機能解析		

## 平成 23 年度研究成果概要

研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

動物レクチンファミリーの1つであるガレクチンファミリーに属するガレクチン9 (Gal-9) については、自然免疫と獲得免疫の両面で働く免疫機能調節因子であることを示すデータが蓄積している。これまでに Gal-9 の標的分子として、Tim-3, CD44, EB virus LMP-1, Protein disulfide isomerase, GLUT2, Forssman glycosphingolipid, IgE が見出され、Gal-9 による Th1 細胞のアポトーシス誘導 (Tim-3)、リンパ球の浸潤阻害 (CD44)、マスト細胞の脱顆粒抑制 (IgE) などに関わることが明らかにされている。しかし、100 種類を越えるモデル糖鎖に対する Gal-9 の結合特異性がすでに知られている一方で、これら標的分子上に存在する機能性糖鎖 (Gal-9 の作用発現に必須な糖鎖) に関する情報は限られている。

Gal-9 と IgE 糖鎖の結合は、IgE-抗原複合体の形成を阻害し、結果的にマスト細胞の脱顆粒を抑制する。Gal-9 が認識する IgE の機能性糖鎖の同定を目標として、マウスモノクローナル IgE (TIB-141) を用いた検討を行った。その結果、(1) cDNA の解析結果から、TIB-141 の H 鎖には 9 カ所の N-結合型糖鎖付加部位が存在することが示された (図 1)。(2) ヒトおよびマウス Gal-9 は、TIB-141 + antigen による RBL-2H3 細胞の脱顆粒を抑制し、その効果はラクトースにより阻害された。(3) 還元アルキル化した TIB-141 をリシルエンドペプチダーゼで処理後、逆相 HPLC 分析を行うと、マイナーピークを含めて約 40 のピーク (主要ピーク: P1~P23) に分離された。一方、同じ標品を Gal-9 固定化カラムによりアフィニティー精製した試料には、9つのピーク (P4, P13, P16~P19, P21~P23) に一致する成分が含まれ (図 2)、残りはカラム非結合画分に回収された。これらの成分の中で P23 が Gal-9 の作用を阻害したが、他のピークに活性は検出されなかった (図 3)。

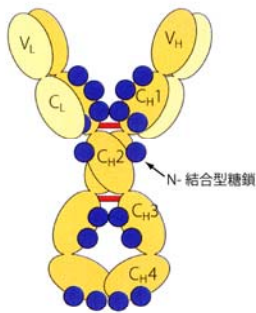


図 1 TIB-141 の模式構造

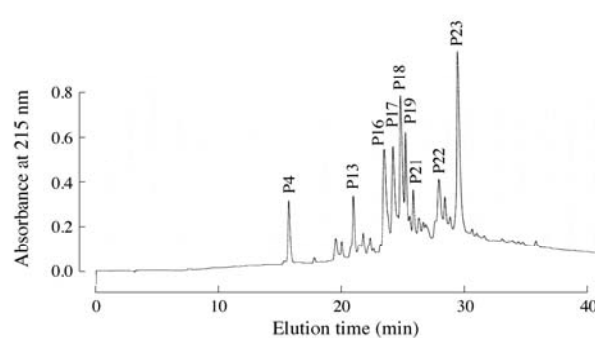


図 2 アフィニティー精製した TIB-141 消化物の逆相 HPLC

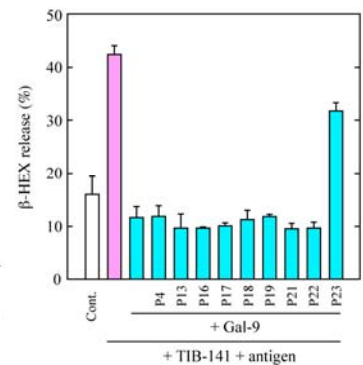


図 3 Gal-9 の脱顆粒抑制活性に対する逆相 HPLC ピーク画分の効果

(4) P23 画分について、N-glycanase 処理前後での N-末端アミノ酸配列の決定と MALDI-TOF MS 分析を行った結果、P23 は CH1 ドメインの C-末端側およそ 1/4 と CH2 ドメインの N-末端側を含むペプチド (HLysC-13; CH1 の 3 カ所の N-結合型糖鎖付加部位を含む) であることが分かった。これらの結果は、CH1 ドメインに存在する N-結合型糖鎖が Gal-9 の作用発現に重要な役割を果たしている可能性を示している。これらの研究成果は、第 84 回日本生化学会大会 (研究業績[4], No.2) にて発表した。



図 4 HLysC-13 のアミノ酸配列 ↓: トリプシン切断部位 #: N 結合型糖鎖付加部位

### 今後の研究計画

平成 23 年度に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究計画について具体的に記載してください。図を挿入してもかまいません。

平成 23 年度研究成果から、P23 (HLysC-13)に存在する 3 カ所の N-結合型糖鎖付加部位に結合した糖鎖が、Gal-9 との相互作用に重要であることが明らかとなった。一般的に、レクチンの糖鎖結合特異性は比較的 low、Gal-9 も例外ではないことから、Gal-9 の作用を特定の IgE 糖鎖と関連付けることが困難な可能性がある。しかし、平成 23 年度研究成果は特異的な役割を担う「機能性糖鎖」の存在を示唆しており、今後、以下の点を明らかにすることを目指す。

- (1) HLysC-13 (Gal-9 の作用を阻害する活性を持つ TIB-141 の H 鎖由来ペプチド) に存在する 3 カ所の N-結合型糖鎖付加部位について、Gal-9 が特定の部位に結合した糖鎖と相互作用するのか、あるいは、複数の部位に結合した糖鎖が協同的に働いて Gal-9 結合部位を形成するのかを明らかにする (機能性糖鎖付加部位の特定)。HLysC-13 の内部には 3 つの Arg 残基が存在する (図 4 参照)。トリプシンにより完全に切断された場合、最初のペプチド (HLysC-13-T1) に 2 カ所、3 番目のペプチド (HLysC-13-T3) に 1 カ所の糖鎖付加部位が含まれる (2 番目の切断部位は Arg-Pro 配列のため切断されにくい可能性があるが、この場合は HLysC-13-T2+T3 が生成する)。トリプシン処理後、逆相 HPLC で HLysC-13-T1 と HLysC-13-T3 を分離する。この段階で 2 つのペプチドの活性を比較し、何れか一方に活性が回収されるか否かを調べる。HLysC-13-T3 のみに活性が認められた場合は、機能性糖鎖付加部位が決定するが、それ以外の場合は他のプロテアーゼを用いた検討を行う。
- (2) 前述の糖鎖付加部位 (3 カ所) に結合している糖鎖の構造を個別に決定し、TIB-141 分子全体に存在する N-結合型糖鎖のレパートリーと比較する (機能性糖鎖の構造決定)。また、HLysC-13 以外の TIB-141 由来糖ペプチドについても結合糖鎖の構造を決定し、マウス IgE における糖鎖付加部位と糖鎖構造の関連性を検討する。
- (3) TIB-141 以外のマウスモノクローナル IgE (1 種類) とヒトモノクローナル IgE (2 種類) を対象として同様の解析を行い、TIB-141 に関して得られた結果の普遍性を検討する。

### 特記すべき事項

本研究に関する受賞 (学生対象の賞も含む)・プレスリリース・大型外部資金獲得につながった等、特記すべき事項があれば記述してください (ささいなことでもかまいません)。本欄は必須ではありませんので、「該当なし。」でも可ですが、できるだけ記載してください。

該当なし

## 研究業績

本研究に関連した、平成 23 年度中の発表した、[1] 査読がある原著論文 (Corresponding Author には\*印を付す。), [2] 著書, [3] 招待講演, [4] 学会発表 (発表者には○印), [5] 産業財産権 (特許等), [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等) を通し番号を付して記入してください。本事業の参加者にはアンダーラインを引いてください。記入欄が足りない場合は、用紙を追加してください。

### [1] 査読がある原著論文

1. Ueno M\*, Nakagawa T, Nagai Y, Nishi N, Kusaka T, Kanenishi K, Onodera M, Hosomi N, Huang CL, Yokomise H, Tomimoto H & Sakamoto H. The expression of CD36 in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (2011) 37: 727-737
2. Iwaki J, Tateno H, Nishi N, Minamisawa T, Nakamura-Tsuruta S, Itakura Y, Kominami J, Urashima T, Nakamura T & Hirabayashi J\*. The Gal b-(syn)-gauche configuration is required for galectin-recognition disaccharides. *Biochim Biophys Acta.* (2011) 1810: 643-651
3. Oomizu S, Arikawa T, Niki T, Kadowaki T, Ueno M, Nishi N, Yamauchi A & Hirashima M\*. Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. *Clin Immunol.* (2012) in press

### [2] 著書

岡田雅人/宮崎香 [編] 羊土社 (2011 年 10 月)

無敵のバイオテクニカルシリーズ 改訂第 4 版 タンパク質実験ノート (上)

「バッファの調製法」 西 望

「タンパク質の安定化」 西 望

### [3] 招待講演

該当なし

### [4] 学会発表(○は発表者)

1. ○東海林博樹, 島村英理子, 石垣靖人, 西 望, 中村隆範, 島田ひろき, 八田稔久 「ラット胎盤由来細胞株Rcho-1 におけるガレクチンファミリーの発現」第51回日本先天異常学会 2011年7月 (東京)
2. ○伊藤愛子, 宮中宏, 中村隆範, 西 望 「マスト細胞の脱顆粒調節における IgE 糖鎖の役割: ガレクチン 9 結合性糖鎖の解析」第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 (京都)
3. ○野中康宏, 小川崇, 大水総一, 中北慎一, 神鳥成弘, 西 望, 中村隆範, 「タンデムリピート型ガレクチン 9 の C 末側糖鎖認識ドメインの役割について」第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 (京都)
4. ○小川崇, 東海林博樹, 野中康宏, 館野浩章, 平林淳, 西 望, 中村隆範, 「アフリカツメガエル消化管におけるガレクチンファミリーの発現解析」第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 (京都)
5. ○大水総一, 有川智博, 仁木敏朗, 門脇 健, 西 望, 山内清明, 平島光臣 「Tr1 細胞から放出される IL-10 でなくガレクチン 9 が Th17 細胞の分化を抑制する」 第 40 回日本免疫学会 学術集会, 2011 年 11 月 (千葉)

### [5] 産業財産権 (特許等)

特願 2011-108650 (平成 23 年 5 月 13 日): 「成長因子アンカーリング型骨移植材料」

【発明者】内田健太郎, 成瀬康治, 高相晶士, 美間健彦, 松下治, 原口高志, 西 望

### [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等)

Glycoscience Protocol Online Database (GlycoPOD) (<http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolListShow.action>)

"Expression and purification of recombinant human galectin-9", Nishi N and Nakamura T

"Assay method for the antiproliferative activity of human galectin-9", Nishi N and Nakamura T