

平成24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。）

研究組織				
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	動物レクチンファミリー（ガレクチン）の多様な機能と高次構造解析			
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先	
	中村 隆範	医学部・教授	TEL	087-891-2106
			本人	tnaka@med.kagawa-u.ac.jp
			e-mail 秘書等	nonodera@med.kagawa-u.ac.jp
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等	
	小川 崇	医学部・助教	アフリカツメガエルガレクチンの発現・機能解析	
	野中 康宏	医学部・助教	ヒトガレクチン-9のNMR解析	

平成24年度研究成果概要

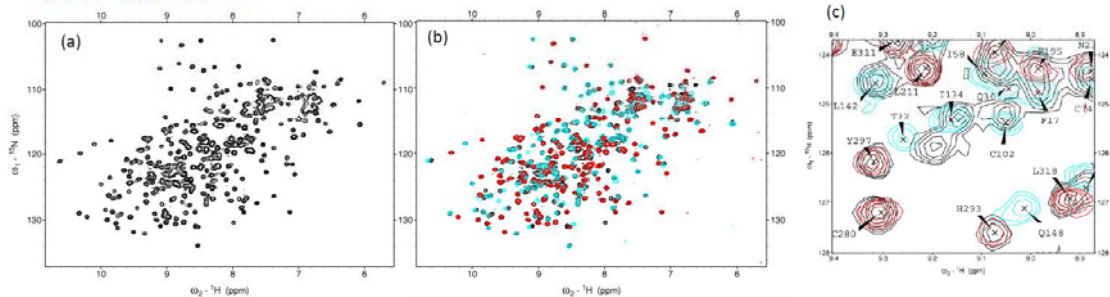
研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

平成22年度より、 β -ガラクトシドを特異的に認識する動物レクチンファミリー(ガレクチン)の多様な機能と高次構造解析を、ツメガエルとヒトガレクチンを対象に実施している。平成24年度の成果として、

- (1) 昨年度までに、ヒトガレクチン4相同物であるIIa,IIb(共に2つの糖鎖認識ドメイン:CRDを持つタンデムリピート型ガレクチン)について、各糖認識ドメインのリコンビナントタンパク質を調製し、その糖結合特異性解析を糖鎖医工学研究センターとの共同研究により実施した。糖鎖アレイ解析ではXGal-IIaのN-CRDはGalNAc β 1-3GalNAcに強い親和性を示すユニークな特異性を示し、ヒトGal9のN-CRDとの類似性が考えられた。一方XGal-IIaのC-CRDはアジアロ糖タンパク質に最も強い親和性を示し、ケラタン硫酸とも強く結合することからヒトGal3との類似性が考えられた。XGal-IIbのN-CRD,C-CRDについてはXGal-IIaのCRDとほぼ同等の結果が得られた。これらはいずれもヒトガレクチン4の糖鎖結合性とは大きく異なる。そこで、アフリカツメガエルと同じピパ科に属するネッタイツメガエルを用いてヒトガレクチン4相同物のクローニングを試みた。その結果、ネッタイツメガエルではアフリカツメガエルと異なりガレクチン4相同物は1種類のみであることが明らかになった。ヒトのガレクチン4も1種類であるため、ガレクチン4の個体レベルでの機能解析に適していると考えられる。また、ガレクチン4相同物の組織分布をRT-PCRで調べたところ、ガレクチン4相同物は腸に多く発現していることが明らかになり、これらの内容を学会で発表した(学会発表1)。現在、ネッタイツメガエルガレクチン4の糖結合特異性を調べることを予定しており、消化管におけるガレクチン4の機能を多方面から明らかにすることを検討中である。
- (2) ガレクチン-9 NCRDの同位体標識サンプルを作製し、NMRシグナルを帰属した。ラクトース結合実験を行ったところ、NMRシグナルに変化があったアミノ酸は、結晶構造の糖結合部位に集中していた。結晶構造で見られる糖の結合が水溶液中でも保たれていることが示された。ガレクチン-9 Null-3T(全長ガレクチン-9の安定性および可溶性を高めた変異体)の二次元NMRスペクトルを測定し(図a)、NCRD、CCRDのスペクトルと比較した(図b)。CCRD由来のシグナルの出現位置は、全長とCCRD単体の間でほとんど違いが見られなかった。一方NCRDでは、リンカーが存在する部位の近辺のアミノ酸にシグナルの動きが見られたが、その他は全体的によく一致した(図c)。ガレクチン-9の両ドメインは溶液中で互いに相互作用せず、ドメイン単体試料の場合とほぼ同じ状態で存在することが示唆された(学会発表2&3)。

ガレクチン-9の ^1H - ^{15}N 二次元NMRスペクトル

黒: ガレクチン-9 Null-3T
青: ガレクチン-9 NCRD
赤: ガレクチン-9 CCRD-3T



今後の研究計画

平成24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。

- (1) ネットアイツメガエルガレクチンファミリーの遺伝子クローニングを行い、アフリカツメガエルガレクチンや他種のガレクチンと比較し、*in vitro*での機能の解析を試みる。また、ネットアイツメガエル各組織におけるガレクチンファミリーの分布を、ガレクチンに対する抗体を作成することにより明らかにする。また、ネットアイツメガエルは全ゲノムが明らかにされている唯一の両生類で、アフリカツメガエルと異なり2倍体である。遺伝子ノックアウトの実績もあるため、遺伝子ノックアウトを用いた個体レベルでのガレクチンの機能解析ができる可能性があるため、検討を開始する。また、共同研究の実績（原著論文3）を踏まえて、ヒトガレクチン4についても、各種ヒト消化管由来細胞を用いて機能解析を実施する。
- (2) これまでのガレクチン-9 NCRD、CCRDのガレクチン-9、ガレクチン-9の全長と構造特性について総括するとともに、共同研究の実績（原著論文2）を踏まえて、ガレクチン-9と細胞内標的候補分子との分子間相互作用の解析を実施する。同時に、ガレクチン-8のNMRによる構造解析や細胞内標的分子の同定・解析なども開始する。

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24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) Nonaka Y, Ogawa T, Oomizu S, Nakakita S, Nishi N, Kamitori S, Hirashima M, Nakamura T.* (2013) Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. *J Biochem.* In press.

(2) Itoh A, Fukata Y, Miyanaka H, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Nishi N.* (2013) Optimization of the inter-domain structure of galectin-9 for recombinant production. □*Glycobiology.* In press.

(3) Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosugi N, Yamashiro C, Hata T, Takegami T, Mogami H, Yamaguchi K, Nakamura T, Otani H, Hatta T, Shoji H. * (2012) Expression pattern of Galectin 4 in rat placentation. *Placenta.* **33**:885-7.

[2] 著書

該当なし

[3] 招待講演

該当なし

[4] 学会発表(○は発表者)

(1) ○小川崇, 東海林博樹, 野中康宏, 舘野浩章, 平林淳, 西望, 中村隆範「ツメガエル消化管及びヒト大腸がん細胞におけるガレクチン4の発現及び機能解析」第85回日本生化学会大会 2012年12月(福岡)

(2) ○野中康宏, 小川崇, 大水総一, 中北慎一, 神鳥成弘, 西望, 平島光臣, 中村隆範「免疫調節蛋白質ガレクチン-9のNMRを用いた解析」第11回四国免疫フォーラム 2012年6月(高知)

(3) ○野中康宏, 小川崇, 大水総一, 中北慎一, 神鳥成弘, 西望, 平島光臣, 中村隆範「タンデムリピート型ガレクチン-9の二つの糖結合ドメインについてのNMRを用いた解析」第85回日本生化学会 2012年12月(福岡)

[5] 産業財産権(特許等)

該当なし

[6] その他(プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等)

該当なし