

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	組換え蛋白質生産に向けたガレクチン9のドメイン間構造の最適化				
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	TEL	本人	nnishi@med.kagawa-u.ac.jp
			e-mail	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	ガレクチン変異体発現用ベクターの作製 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 2 4 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。

ガレクチン 9 (Gal-9) は、T 細胞の分化やホメオスタシス、あるいは自然免疫に対する作用を通して、免疫システムの破綻を修正する機能を持つことが知られている。このような免疫調節機能は、様々な疾患、特に自己免疫疾患、アレルギーなどに対する治療薬として Gal-9 を利用できる可能性を示している。野生型 Gal-9 はプロテアーゼ感受性が高いため、構造改変 (リンカーペプチドの除去) を行った結果、高いプロテアーゼ耐性を持つ改変体 (安定化 Gal-9) が得られた。しかし、安定化 Gal-9 には 2 つの問題点 (低溶解性と組換え蛋白質の低収量) が残っており、組換え蛋白質の量産を行うためには、これらの問題を解決する必要がある。安定化 Gal-9 の 2 つの糖鎖結合ドメインの間には、リンカーペプチドと考えられる約 20 アミノ酸の領域が残存している (図 1)。今回、この領域の改変を行い、安定化 Gal-9 の可溶性と収量に対する効果を検討した。

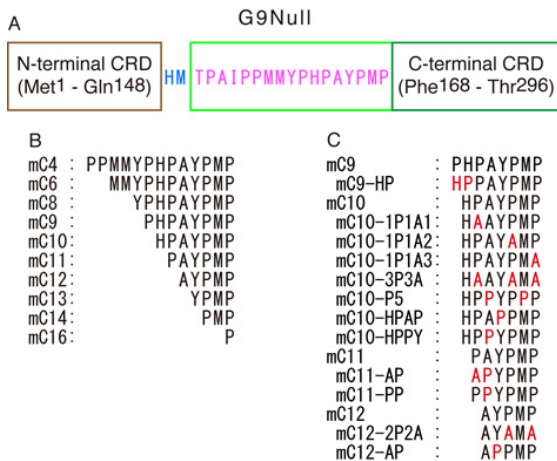


図 1 安定化ガレクチン 9 の模式図と Gal-9 改変体のリンカー構造

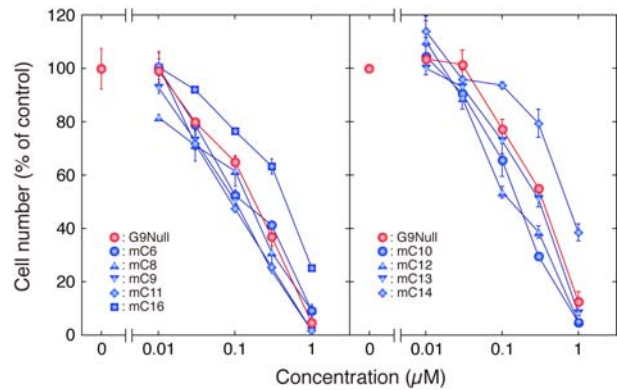


図 2 Jurkat 細胞に対する Gal-9 改変体の細胞死誘導作用

ドメイン間領域のアミノ酸残基を、N-末端側から順次削除した改変体を作製した結果、8-13 残基削除した改変体において、活性の低下を伴うことなく (図 2)、可溶性と収量の向上が認められた (図 3)。さらに、これらの改変体について、この領域のプロリン残基に注目してアミノ酸置換体を作製した。アミノ酸置換体の中で、プロリン残基の数を減らしたものはすべて溶解度が低下し、特に、最も C-末端側に存在するプロリン残基の影響が大きかった。一方、プロリン残基の位置を変更した置換体では、溶解度・収量が最大で 5 倍以上増加したものが得られた (図 4)。これらの改変体、特に mC10-HPPY (ssGal-9) は、生産型ガレクチン 9 の候補として優れた性質を備えていると考えられる。

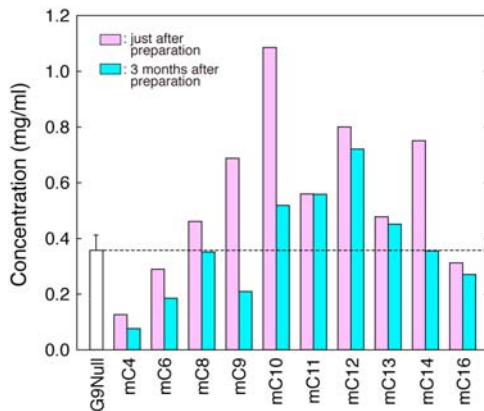


図 3 Gal-9 改変体 (図 1 の B シリーズ) の可溶性

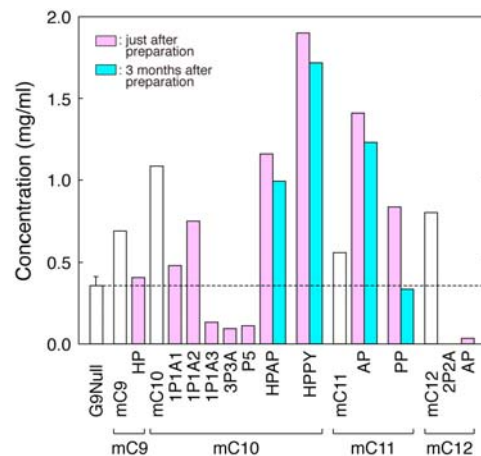


図 4 Gal-9 改変体 (図 1 の C シリーズ) の可溶性

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。

ssGal-9 の *in vitro* における生理活性は、天然型 Gal-9 および安定化ガレクチン9 (G9Null) と同等あるいはそれ以上であった。三者は、糖鎖結合ドメイン (N-末端側と C-末端側の両方) に関しては違いがないことから、*in vivo* における生理活性についても、質的な差は殆どないと考えられる。しかし、治療効果に大きな影響を与える生体内における動態 (ADME: 吸収、分布、代謝、排泄) については、動物実験による G9Null との比較を行う必要がある。また、平成25年度に、ガレクチン9 と別種の蛋白質の機能ドメインから構成される融合蛋白質を作製する。これは、平成23年度に行った、JST の研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP FS ステージ) の成果を発展させるものであり、ガレクチン9 部分として ssGal-9 を用いる予定である。

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, SI, Nishi, N, Kamitori, S, Hirashima, M and Nakamura, T*. Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. J Biochem. (2013) in press
2. Oomizu, S, Arikawa, T, Niki, T, Kadowaki, T, Ueno, M, Nishi, N, Yamauchi, A, Hattori, T, Masaki, T and Hirashima, M*. Cell surface galectin-9 expressing th cells regulate th17 and foxp3(+) treg development by galectin-9 secretion. PLoS One. (2012) 7: e48574.
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 and Shoji, H*. Expression pattern of Galectin 4 in rat placentation. Placenta. (2012) 33: 885-887.
4. Yoshida, H, Yamashita, S, Teraoka, M, Itoh, A, Nakakita, S, Nishi, N and Kamitori, S. X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-8 with two carbohydrate recognition domains. FEBS J. (2012) 279: 3937-3951.
5. Wiersma, VR, de Bruyn, M, van Ginkel, RJ, Sgar, E, Hirashima, M, Niki, T, Nishi, N, Samplonius, DF, Helfrich, W and Bremer, E*. The Glycan-binding protein galectin-9 has direct apoptotic activity toward melanoma cells. J Invest Dermatol. (2012) 132: 2302-2305
6. Oomizu, S, Arikawa, T, Niki, T, Kadowaki, T, Ueno, M, Nishi, N, Yamauchi, A and Hirashima, M*. Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner. Clin Immunol. (2012) 143: 51-58.

[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. ○伊藤愛子, 中北愼一, 中北ゆかり, 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 結合性糖鎖の同定とその構造解析」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 (福岡)
2. ○深田陽子, 伊藤愛子, 中村隆範, 西 望 「生産型ガレクチン9: 組換え蛋白質生産に向けたドメイン間構造の最適化」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 (福岡)
3. ○野中康宏, 小川崇, 大水総一, 中北愼一, 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 2 つの糖結合ドメインについての NMR を用いた解析」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 (福岡)
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, 「ツメガエル消化管およびヒト大腸がん細胞におけるガレクチン-4 の発現および機能解析」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 (福岡)

[5] 産業財産権 (特許等)

特願 2012-254349 (平成24年11月20日): 「ガレクチン9の改変タンパク質」
発明者: 西 望, 伊藤愛子; 出願人: 国立大学法人香川大学

[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