

平成25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	糖鎖結合タンパク質および糖質関連タンパク質の X 線結晶解析			
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	
			e-mail	本人
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, ツメガエルガレクチンの X 線結晶構造解析	

平成 25 年度研究成果概要

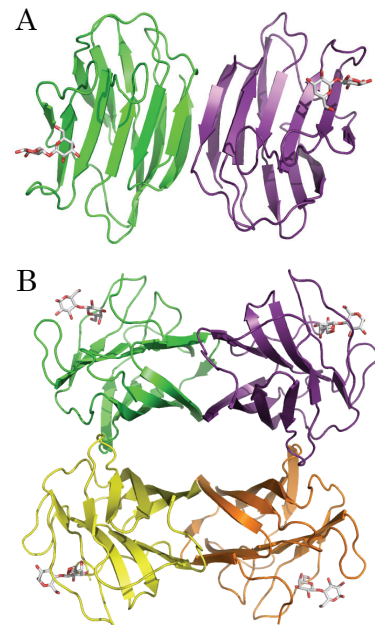
研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

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産総研との共同研究により実施した。その結果、2 つある糖鎖結合ドメインのうち 1 つが GalNAc β 1-3 Gal NAc という特殊な糖鎖に強く結合することを明らかにした。この糖鎖は脊椎動物の消化管に寄生してジアルジア症を引き起こす、*Giardia*（ランブル鞭毛虫）という寄生虫が特徴的に有しており、他種ではほとんど報告が無い。つまり、ガレクチン 4 が *Giardia* に対して天然の抗寄生虫物質として働く可能性や、逆に *Giardia* の感染に利用されている可能性が考えられる（学会発表 1）。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や哺乳類ガレクチン 4 を用いて糖鎖結合性の比較や確認を行い、消化管におけるガレクチン 4 の機能を糖鎖認識の点からも明らかにすることを旨とする。現在までに、ネッタイツメガエルガレクチン 4 のクローニングを終え、大量発現系の構築をおこない、糖鎖結合性を確認する予定である。
- 2) ガレクチン 4 は正常腸組織で強く発現しているが、がん組織においては発現が減少することが知られている。特に、浸潤性の大腸がんではガレクチン 4 の発現がほとんど確認できない。つまり、ガレクチン 4 の発現が大腸がんの抑制に働く可能性が考えられる。そこで、ガレクチン 4 を発現していない大腸がん細胞株にガレクチン 4 を強制発現させた結果、大腸がん細胞の増殖をガレクチン 4 が抑制することを明らかにした。現在、ガレクチン 4 受容体や内部シグナルの同定を試みており、ガレクチン 4 の作用機構を分子レベルで明らかにする予定である。

- 3) ヒトガレクチン-9 の N、C 末端ドメインの全体にわたる構造およびリガンド相互作用についての解析を行う（学会発表 2、3）と共に、新たにアフリカツメガエル由来の 2 種のガレクチン、*xgalectin-V* と *xgalectin-I* について X 線結晶構造解析を行った。*xgalectin-I* は哺乳類 *galectin-1* の相同タンパクであるが、これらと近縁である *xgalectin-V* は発現パターンが全く異なり、皮膚分泌物中に多量に含まれている。従って特有の機能と構造を持つのではないかと考えられた。

本研究で明らかになった両蛋白質の立体構造は、基本的な点では他のガレクチンと一致していた。しかし、*xgalectin-I* が哺乳類 *galectin-1* と同様の 2 量体構造(右図 A)をとるのに対し、*xgalectin-V* は 4 量体構造(右図 B)をとることが分かった。この 4 量体形成は結晶解析以外の実験からも示されたので、結晶化パッキングによるものではないと考えられる。ゲル濾過クロマトグラフィー等から、*xgalectin-V* は溶液中で 2 量体と 4 量体の平衡状態にあることが分かり、この特徴は *xgalectin-V* の生理機能と関連があるのではないかと考えられた。



今後の展望

本事業期間内（平成22－25年度）に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究発展の展望について記載してください。図を挿入してもかまいません。

- 1) ガレクチン4の機能を知るために、ノックアウトマウスの作製が第一に考えられる。しかし、マウスにはガレクチン4とよく似たマウス特有のガレクチン6が同様な分布で発現しているため、ガレクチン4の効果を解析しにくい。そこで、我々はネッタイツメガエルに着目し、ネッタイツメガエル消化管にガレクチン4が多く発現し、ヒト同様ガレクチン6は発現していないことを明らかにした。そこで、ネッタイツメガエルを用いて、TALENを用いたガレクチン4ノックアウトの系を構築し、ガレクチン4の機能や関わる現象を個体レベルで同定することを目指す。
- 2) これまでの研究から、正常腸組織においてガレクチン4の発現が多く見られるが、浸潤性の大腸がんではガレクチン4の発現が著しく減少することが明らかになっている。さらに、ガレクチン4の発現は大腸がん細胞の増殖を抑制することを明らかにしてきた。そこで、ガレクチン4受容体（糖鎖結合性の同定を含む）や内部シグナルの同定を試みることによって、ガレクチン4の作用機構を分子レベルで明らかにする。さらに、ガレクチン4強制発現及び発現抑制大腸がん細胞をヌードマウスに移植し、造腫瘍性、浸潤性等への影響を調べる。
- 3) xgalectin-Vが希な4量体構造を示したことから、2量体構造を有する従来型のxgalectin-Iとの構造と機能相関を、培養細胞などを利用して、増殖、接着誘導、細胞死などを指標に比較解析する。

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。

研究業績

本研究に関連した,平成25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) Fukata Y, Itoh A, Nonaka Y, Ogawa T, Nakamura T, Matsushita O, Nishi N* (2014) Direct cytotoxic effect of galectin-9 localized on collagen matrices on human immune cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**:1892-1901.

(2) Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nakamura T, Hata T, Shoji H. * (2014) Significance of sugar chain recognition by galectins and its involvement in disease-associated glycosylation. □*Congenit. Anom.(Kyoto)* In press.

[2] 著書

[3] 招待講演

[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86回日本生化学会大会 2013年9月(横浜)

2) ○野中康宏, 小川崇, 中北慎一, 西望, 神鳥成弘, 平島光臣, 中村隆範「タンデムリピート型ガレクチン-9のNおよびC末端ドメインの水溶液中での挙動の解析」第13回日本蛋白質科学会年会 2013年6月(鳥取)

3) ○野中康宏, 小川崇, 中北慎一, 西望, 神鳥成弘, 平島光臣, 中村隆範「ガレクチン-9のN, C末端ドメインの構造およびリガンド相互作用についての解析」第86回日本生化学会大会 2013年9月(横浜)

[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)