

《農芸化学奨励賞》

レクチンの構造・機能解析と糖鎖生物学への応用



独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・レクチン応用開発チーム 研究員 舘野浩章

1. はじめに

すべての生物を構成する細胞は、高濃度かつ高密度の糖鎖で被覆されている。糖鎖は分岐構造をもち、かつ単糖の結合順序や結合位置の組合せによって異性体を生じるため、大きな構造的多様性を有する。さらに、発生・分化・疾病等に伴う細胞内外の環境変化に鋭敏に応答し、速やかな構造変化を遂げる。これらの事実は糖鎖が高度な生物情報を担うに適した分子であることを示している。しかし糖鎖単独では情報分子としての役割を果たすことはできない。細胞表面を覆う複雑な糖鎖構造を識別し、生物情報として受信・伝達する分子が「レクチン」であり、発生、老化、感染、炎症、生体防御、癌化、細胞死などさまざまな生命現象に深く関係している。糖鎖だけでなくレクチンもまたすべての生物に存在するタンパク質であり、生体内では糖鎖への結合を介して多様な機能を担っているだけでなく、古くから糖鎖を解析するための生化学試薬として利用されてきた。私はこれまで東北大学、ミシガン大学、スクリプス研究所、独立行政法人産業技術総合研究所と研究する場を移してきたものの、一貫してレクチンの研究を行ってきた。真菌類、植物、魚類、マウス、ヒトなどさまざまな生物に存在するレクチンの単離精製から構造と機能に関する研究を行い、糖鎖科学研究に有用な新規糖鎖認識試薬を開発するとともに、免疫や疾病などに関与するレクチンの機能への理解を深めた。現職の産総研に移ってからは、糖鎖生物学へのレクチンの応用にも研究の展開を図り、レクチンマイクロアレイを用いた生細胞グライコームプロファイリングや糖鎖複合体アレイなどの技術開発を行い、本技術を免疫・感染・再生医療などさまざまな分野への普及・応用を進めている。これまでの研究の流れを図1にまとめた。本受賞講演では、それぞれの研究機関で行ってきた研究をもとに、生命におけるレクチンの機能とレクチン関連技術の各種分野への応用展開についてご紹介したい。

2. ラムノース結合性レクチンファミリーの発見

学位論文では、東北大学大学院農学研究科の村本光二教授のご指導の下、魚類卵に存在する新規レクチンの構造と機能に関する研究を行った。ニジマス卵からラムノースという単糖に特異性を示す極めて珍しい性質もち、かつその構造がこれまでに見つかっているタンパク質ファミリーとは全く異なる新規なタンパク質3種類(STL1, STL2, STL3)を発見した。これらレクチンは、いずれも100アミノ酸残基からなるドメインが2回もしくは3回タンデムに繰り返された類似の構造を有していたが、発現部位や局在はそれぞれのイソレクチンで異なっていた。STL1は雌雄の肝臓特異的に発現し、血中を介して卵巣の卵黄胞に蓄積されていた。一方でSTL2とSTL3は雌特異的タンパク質であり、卵母細胞で発現し、そのまま卵黄胞に蓄積されていた。さらにこれらのレクチンは、大腸菌や枯草菌など、ラムノースをリポ多糖の繰り返し糖に含むグラム陰性細菌に強

く結合して、凝集する活性を有していることがわかった。他の魚類卵をスクリーニングしたところ、このような性質をもつレクチンはサケ科を中心としたさまざまな魚類に存在し、大きなファミリーを形成していることもわかり、魚類の自然免疫において重要な役割をもつと考えられる。このレクチンを構成している新規ドメインは線虫からヒトにまで広く存在していることから、ラムノース結合特異性レクチンは魚類に限定されず、さまざまな生物に高度に保存されたレクチンファミリーである可能性が考えられる。

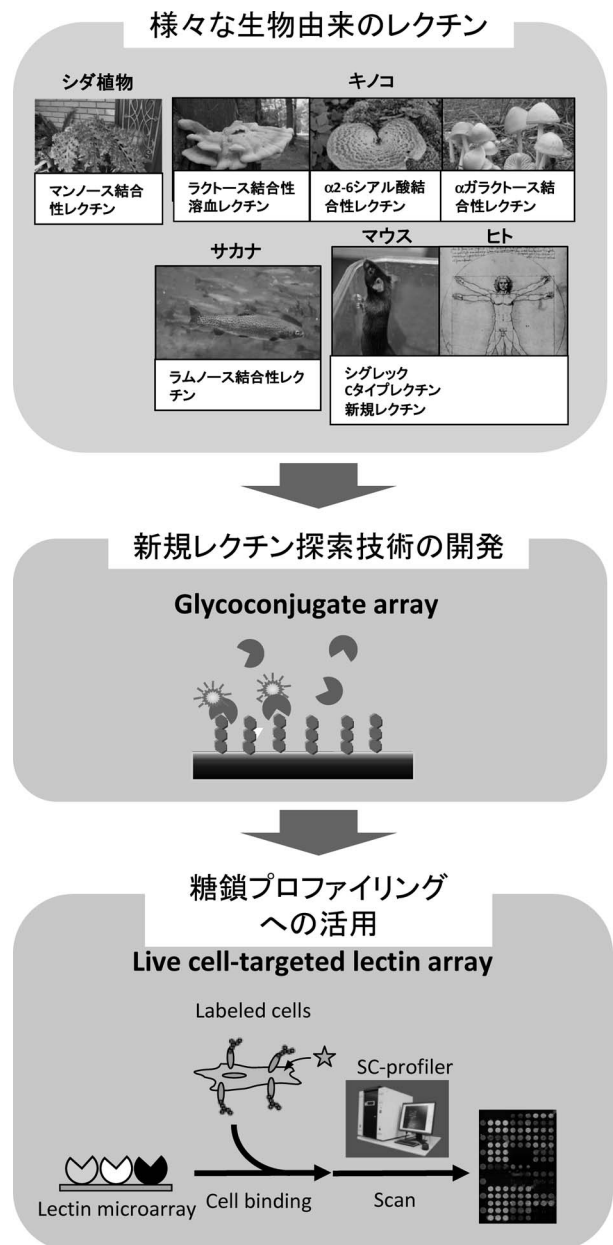


図 1

### 3. シダ植物、真菌類に存在する新規特異性を有するレクチンの発見

学位取得後、2002年4月から2004年3月までの2年間、昔からレクチン研究をリードしてきたミシガン大学医学部のゴールドSTEIN教授の下、生化学試薬として有用な糖鎖プローブの開発を目指した、新しい特異性を有するレクチンの探索を行い、興味深いレクチンを数種発見した。すなわち、シダ植物 (*Phlebodium aureum*) の根茎からはマンノース、グルコースに特異性を示すレクチン (PAL), 真菌 (*Laetiporus sulphureus*) からはラクトースに結合性を示すレクチン (LSL), *Marasmius oreades* と呼ばれる真菌からはブタ移植抗原である Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3 Gal に結合特異性を示す新しいレクチン (MOL), *Polyporus squamosus* と呼ばれる真菌からは  $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 6 シアル酸に非常に強く、選択的に結合する新しいレクチン (PSL) を発見した。これらレクチンの構造を解析したところ、PAL はジャッカリン関連レクチンファミリーに分類される一方で、3種の真菌由来レクチンは R タイプレクチンファミリーに属することがわかった。さらに LSL に関しては赤血球を凝集するだけでなく、溶血活性を有していることも明らかにした。溶血機構について解析を行い、LSL は細胞表面の糖鎖に結合した後、5量体タンパク質を細胞膜に挿入し、小孔を形成することで赤血球を溶血することを明らかにした。

### 4. シグレックの免疫制御機構の解析

2004年4月から2006年10月まで、スクリプス研究所のポールソン教授のもと、シアル酸結合タンパク質 (シグレック) の免疫機能に関する研究を行った。ヒト Siglec-8 とマウス Siglec-F の糖鎖結合特異性を糖鎖アレイと ELISA で詳細に調べた。その結果、ヒト Siglec-8 とマウス Siglec-F はいずれも 6'-sulfo-sLe<sup>x</sup> に選択的に結合することがわかった。ヒト Siglec-8 とマウス Siglec-F は、いずれも好酸球に特異的に発現し、6'-sulfo-sLe<sup>x</sup> を認識することから、これら二つの分子は分子進化的に同等ではないものの、機能的に同等なパラログであることを明らかにした。6'-sulfo-sLe<sup>x</sup> への結合能はヒトやマウス好酸球の生物機能において必須であることが示唆される。

さらに Siglec-F のエンドサイトーシスの機構を CD22 (Siglec2) と比較して詳細に調べ、Siglec-F と CD22 が異なる機構でエンドサイトーシスを媒介することを明らかにした。CD22 はクラスリン依存のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、初期エンドソーム、続いてリサイクリングエンドソームに輸送された。一方、Siglec-F はチロシンモチーフ依存的に細胞内に取り込まれたものの、クラスリン、カベオリン非依存的に細胞内に取り込まれることがわかり、Siglec-F と CD22 は同じシグレックファミリーに属するものの、異なる経路、機構で細胞内に取り込まれることがわかり、これらの分子が免疫系において異なる機能を担っていることが示唆された。

さらに、Siglec-F はリポオリゴ糖に  $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Sia を含有するナイセリア菌 (*Neisseria meningitides*) に結合し、細胞内に取り込むことができることがわかり、自然免疫への関与が示唆された。

### 5. レクチン関連技術開発

2006年10月からは現職である独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・レクチン応用開発チーム (平林 淳チーム長) に移動し、レクチンを用いた糖鎖プロファイリング技術やレクチンの特異性解析技術の開発を行った。先に述べたように細胞は種類や分化段階が異なると劇的に糖鎖構造を変化させる。言い換えると、細胞表面糖鎖構造をプロファイルできれば、細胞の状態や悪性度を識別することが可能となり、細胞の品質管理や糖鎖関連疾患マーカーの探索が可能となる。こうしたなか、生きた細胞を蛍光ラベル化し、レクチンアレイで直接解析する技術、グライコムプロファイリング法を開発した。この方法を用いることにより、細胞表面に存在するすべての複合糖質 (糖タンパク質、糖脂質、グリコサミノグリカン) の糖鎖構造を、細胞を破壊することなしに、生きたまま解析することを可能とした。この方法は哺乳動物細胞だけでなく、細菌や真菌類などさまざまな細胞へも使用可能であり、今後の応用展開が期待できる。

さらに、新規ヒト内在性レクチンを探索するためのシステムとして、糖鎖複合体アレイを開発した。これまでの糖鎖アレイでは、主にモノバレントな糖鎖を固定化していたが、より高感度な糖鎖アレイ開発を目指し、多価糖鎖を固定化した。検出系には洗浄操作なしに弱い結合を観察するためにエバネッセント波励起蛍光検出系を採用した。本技術を用いることにより、レクチンや抗体の特異性の解析が、精製なしに、迅速 (4時間以内)、簡便 (洗浄なし)、高感度 (100 ng 以下) に可能となった。現在このシステムを用いてさまざまな生物に存在する新規レクチンの探索を行っている。

### 6. おわりに

レクチンの機能がほとんど明らかにされていなかったこと、抗体と比べると特異性が曖昧で親和性が劣るなどの理由から、レクチンは機能分子として、またプローブとしても高い評価を得ることはなかった。しかし、レクチンアレイや糖鎖アレイの開発により、今まさにレクチンの時代が到来している。本講演ではレクチン研究の重要性についてお伝えしたい。

**謝 辞** 本農芸化学奨励賞受賞にあたり、ご推薦いただきました岩手大学・平 秀晴先生、ご指導いただきました東北大学・村本光二先生、ミシガン大学・Irwin Goldstein 先生、スクリプス研究所・James Paulson 先生、産総研・平林 淳先生、またこれまで所属した研究室の方々、ご指導・ご協力いただいた方々に心より御礼申し上げます。