

## 高感度レクチンスクリーニングシステム・エバネッセント波励起 蛍光型糖鎖複合体アレイの開発

舘野浩章

全ての生物を構成する細胞の最外層は高密度の糖鎖で覆われている。糖鎖は物理的に細胞を保護しているだけでなく、細胞同士の情報交換を媒介するシグナル分子としての機能を有する。その糖鎖暗号を解読している主要な分子がレクチンである。レクチンとは進化的に保存された糖鎖結合ドメイン(CRD)を介して糖鎖に結合するタンパク質である。レクチンは1888年、ロシアのHermann Stillmarkによって、トウゴマの実の抽出物から発見されたのが最初であり、その後、様々な生物からレクチンが発見され、現在ではヒトからウイルスまで全ての生物に存在していることが報告されている。これまでに報告されているレクチンをCRDの構造類似性で分類してみると、少なくとも40種類以上のレクチンファミリーが存在しているようである(舘野ら、未発表)。糖鎖に結合することにより、感染、免疫、発生、分化など様々な生命現象に関係している。インフルエンザやノロウイルスの感染は、ウイルス表面に発現しているレクチン様分子がヒト細胞に結合することにより開始される。ヒトの免疫細胞上に発現しているレクチンは、バクテリアや真菌表面の糖鎖を非自己として識別し、免疫応答を誘導する。シアル酸結合性レクチン・シグレックの1種であるB細胞リセプターCD22は、同じ細胞上に発現する $\alpha$ 2-6結合シアル酸に結合することにより、B細胞の活性化制御に関係している。レクチンはまた、糖鎖に特異的に結合するという特性から、糖鎖解析のための道具として古くから活用されてきた。最近では異なる特異性を有する複数のレクチンを同一基板上に固定化した糖鎖プロファイラー・レクチンマイクロアレイの開発により、糖鎖プロファイリングのためのレクチンの有用性は今後益々高まるだろう。レクチンはまた、疾患マーカーに対するプローブとしても有効であり、代表例として肝細胞癌のマーカーであるAFP-L3のプローブとしてレンズ豆レクチン(LCA)が挙げられる。現在、世界各国で糖鎖関連バイオマーカー開発が盛んであるが、そのプローブ開発が遅れている。疾患マーカー探索の次の課題としてプローブ開発が

位置づけられるが、糖鎖に対する抗体は作製が困難であるため、細胞や糖タンパク質製剤の品質管理、細胞選別、疾患マーカー探索などに有効なレクチンの開発が望まれている。

これまでに知られている多くのレクチンは赤血球に対する凝集活性試験で発見された。赤血球凝集活性試験を用いると、誰もが簡単にレクチン活性をスクリーニングすることができる。しかし、

- 1、赤血球表面には存在しない糖鎖に特異性を示すレクチンを探索することはできない。
- 2、レクチンの特異性は糖阻害試験で解析するが、用いることができる糖は限定されているために詳細な特異性を解明することができない。
- 3、膜型レクチンのようにCRDを1つしか有さない、すなわち赤血球同士を架橋・凝集することができないレクチンを探索することはできない。

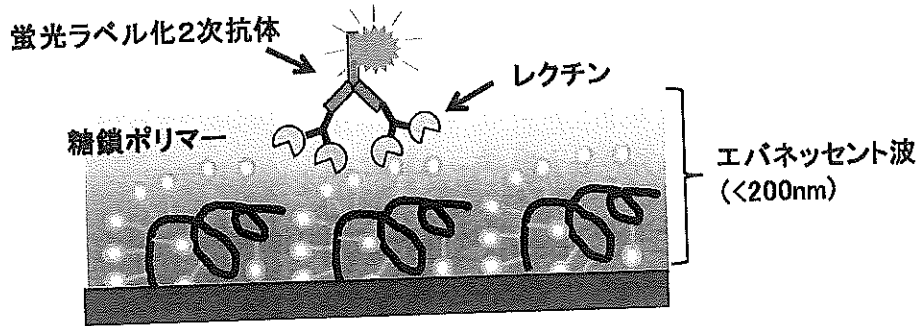
などの欠点もあるため、全てのレクチンを網にかけることはできない。これまでにヒトでは約100種類のレクチンが見出されている。ヒト糖転移酵素の数が約200種類と考えると、それを認識する認識分子数としては少ない。バイオインフォマティクスを用いてデータマイニングを行ってみると、予想されたように、多数のレクチン候補分子が存在することがわかってきた。一方、特異性と親和性に優れた糖鎖認識プローブとしての新規レクチンの開発も望まれている。こうした中、簡便、迅速、高感度な新しいレクチンスクリーニングシステムとして、エバネッセント波励起型・糖鎖複合体アレイを開発した<sup>(1)</sup>。本技術の特徴は以下3点に集約される(図1)。

- 1、多価糖鎖(糖鎖ポリマー)を固定化
- 2、抗体でレクチンを架橋
- 3、エバネッセント波励起型スキャナーを検出系として採用

クラスター効果でレクチンの糖鎖に対する親和性を増強させて、液相中で相互作用を観察することにより、高感度且つ簡便にレクチンの糖鎖に対する結合を検出することを実現した。代表的な植物レクチンでは4ngという非常に微量のレクチンで解析が可能であった。更に、培養上清等のクルードなサンプル中に存在しているレクチンの特異性を、抗体を混ぜるだけで簡単に解析するプロトコールを確立した(図2)。

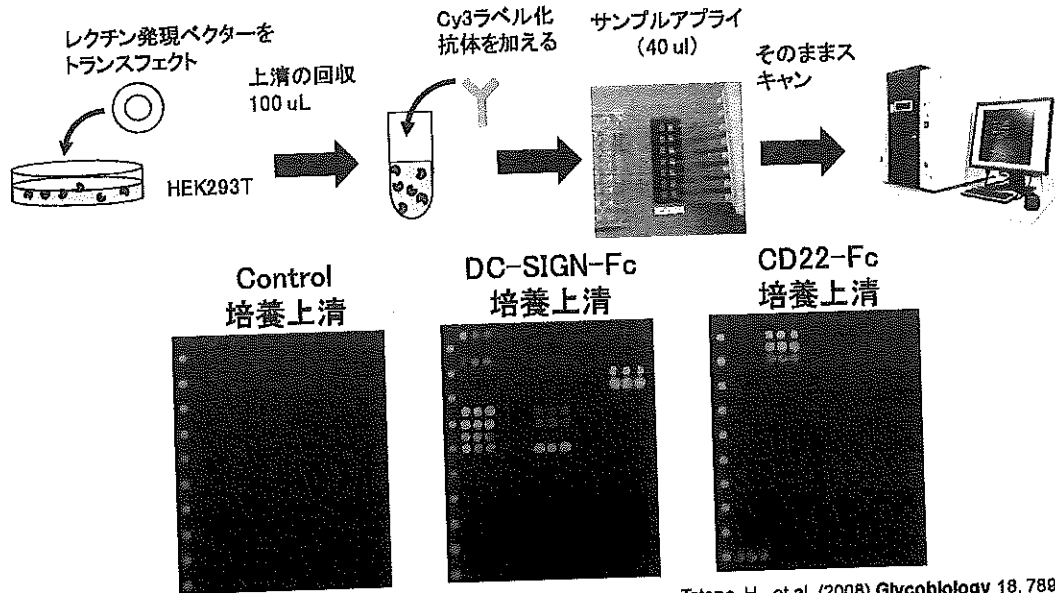
- 1、多価糖鎖100種を固定化
- 2、抗体でレクチンを架橋
- 3、エバネッセント波励起蛍光検出系を採用

ngオーダーのレクチンの特異性を世界最高感度検出実現



Tateno, H., et al. (2008) *Glycobiology* 18, 789-798  
 特願2007-285877「糖鎖アレイ基板とそれを用いた糖鎖結合分子検出法」

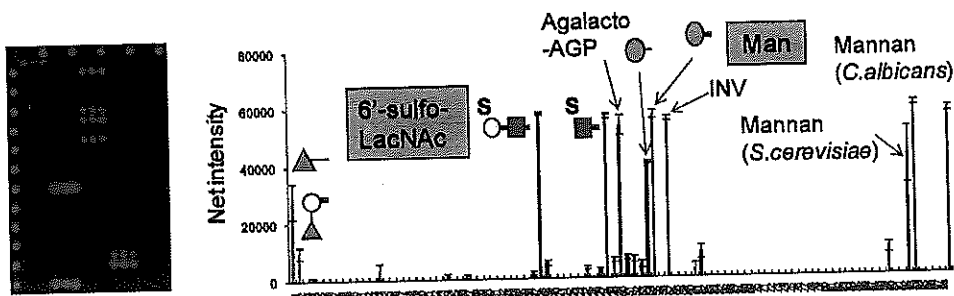
図1 糖鎖複合体アレイの開発



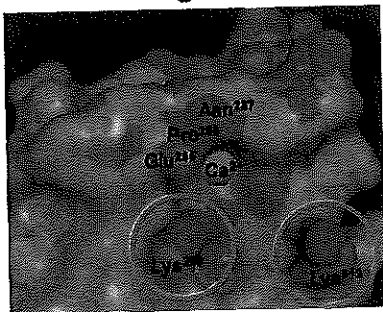
Tateno, H., et al. (2008) *Glycobiology* 18, 789-798  
 Yabe, R., et al. (2010) *FEBS J.* in press

図2 クレードサンプルの直接解析を実現

本技術を用いてこれまでに78種類のヒトレクチン候補分子をFc融合タンパク質として発現し、糖鎖結合活性のスクリーニングを実施した。そのうち20種類(26%)で糖鎖結合活性を確認することができた。20種類の分子の中で特に興味深いヒト内在性レクチン候補分子に関して更に詳細な解析を行った。ヒトの真皮に局在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞上には Langerin と呼ばれる C タイプレクチンが発現している。この分子はランゲルハンス細胞を同定する際の目印となっている分子であり、ランゲルハンス細胞特有のオルガネラであるパーベック顆粒形成に関与していることが以前から知られている。Langerin の糖鎖結合特異性を糖鎖複合体アレイで解析したところ、マンノースへの結合性に加えて、6 硫酸化ガラクトース含有糖鎖に、カルシウム依存的に結合する活性を有するという、二重特異性を獲得した分子であることが明らかとなった<sup>(2)</sup>。更に、Langerin は Gal-6-sulfate 含有糖鎖の 1 種であるケラタン硫酸に結合する活性を有していた。6 硫酸化ガラクトース含有糖鎖への結合には、マンノース結合性 C タイプレクチンの糖結合ドメイン (CRD) に進化的に保存されている EPNモチーフに加えて、Lys299 と Lys313 が関与していることがわかった (図3)。この 2 つの塩基性アミノ酸を Ala に置換したところ、マンノースへの結合性は維持されていたが、硫酸化糖鎖への結合活性は決失した。硫酸化 Langerin リガンドの局在を調べたところ、Gal の 6 位に硫酸を転移する活性を有するケラタン硫酸-6-硫酸化酵素 (KS6ST) の mRNA の発現が高い脳や脾臓に局在していた。ケラタン硫酸は脳腫瘍組織で発現が増加することが報告されているが、実際に硫酸化 Langerin リガンドは正常と比較して悪性脳腫瘍組織で増加していた。更に、脳腫瘍組織の間質では Langerin 発現細胞が確認された。以上の結果から、Langerin は脳腫瘍組織特異的糖鎖を認識して何らかの機能を発揮している可能性が示唆された。一方、Langerin は腫瘍関連糖鎖に加え、マンナンで細胞表層を被覆された *Candida* や *Malassezia* などの病原真菌に対しても強い結合活性を有することが分かった。以上の結果から、Langerin は進化の過程で 1 つの CRD を介して、硫酸化糖鎖とマンノースという全く異なる糖鎖に結合する 2 重特異性を獲得した分子であることが分かり、非自己としての腫瘍特異的糖鎖や病原菌特異的糖鎖に結合することによりランゲルハンス細胞上で多様な機能に関係している可能性が示された。



Langerin



進化的に高度に保存されたC-type CRD (EPNモチーフ)に加え、Lys299とLys313がGal-6-sulfateへの結合に関与

Tateno, H., et al. (2010) J. Biol. Chem. 285, 6390-6400.

図3 Langerinは二重特異性Cタイプレクチン

同様の手法を用いて、Cタイプレクチンの1種であるMincleがマンノースポリマーに結合特異性を有することを発見した<sup>(3)</sup>。また、線虫のCタイプレクチン様分子が、Core1構造にカルシウム非依存的に結合する活性を有することを明らかにした<sup>(4)</sup>。更に、魚卵から見出されたSUEL様レクチンドメイン<sup>(5)</sup>を有するヒトC21orf63がへパリンに結合する活性を有することを明らかにした<sup>(6)</sup>。

従来、多くのレクチンは赤血球凝集活性で同定されてきた。ポストゲノム時代において、遺伝子配列からレクチン候補分子を選択して、糖鎖複合体アレイでスクリーニングするという新たなレクチンスクリーニング技術を確立することができた。今後、更に糖鎖研究基盤を構築して、普及化するためには、レクチンのリコンビナント化は避けておれない。糖鎖複合体アレイは、新規レクチン探索だけでなく、組み換えレクチンの品質管理、改変レクチンのスクリーニングシステムとしても有効であろう。

## 謝 辞

本研究は、2009年度「杉山産業化学研究所研究助成」の支援を受けて実施した。感謝の意を表したい。

## 参考文献

1. Tateno, H., Mori, A., Uchiyama, N., Yabe, R., Iwaki, J., Shikanai, T., Angata, T., Narimatsu, H., and Hirabayashi, J. (2008) *Glycobiology* 18, 789-798
2. Tateno, H., Ohnishi, K., Yabe, R., Hayatsu, N., Sato, T., Takeya, M., Narimatsu, H., and Hirabayashi, J. (2009) *J Biol Chem*
3. Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Tateno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, T. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1897-1902
4. Takeuchi, T., Sennari, R., Sugiura, K., Tateno, H., Hirabayashi, J., and Kasai, K. (2008) *Biochem Biophys Res Commun* 377, 303-306
5. Tateno, H. *Biosci Biotechnol Biochem* 74, 1141-1144
6. Mitsunaga, K., Harada-Itadani, J., Shikanai, T., Tateno, H., Ikehara, Y., Hirabayashi, J., Narimatsu, H., and Angata, T. (2009) *J Biochem* 146, 369-373