

## 腸管免疫で重要な $\alpha 1,2$ -フコース修飾 その新たな標的タンパク質を発見！

名古屋大学医学部附属病院 消化器内科の橋口 裕樹 医員（筆頭著者）、同大医学系研究科 消化器内科学 藤城 光弘 教授、および機能分子制御学 岡島 徹也 教授（責任著者）らの研究グループは、マウス小腸組織を用いた質量分析により、 $\alpha 1,2$ -フコース<sup>\*1</sup>で修飾された抗菌タンパク質を明らかにしました。

腸内細菌との共生や病原菌を排除する上で、N-アセチルラクトサミン<sup>\*2</sup>の $\alpha 1,2$ -フコースによる修飾（糖による付加）が、重要な役割を担っていることが分かっています。しかしながら、腸内恒常性維持に関わるこの $\alpha 1,2$ -フコースの持つ機能の大部分はまだ不明であり、特に $\alpha 1,2$ -フコシル化される糖タンパク質自体ごくわずかし報告されていませんでした。本研究では、最新の統合的なグライコプロテオーム解析<sup>\*3</sup>によってマウス小腸に内在する糖タンパク質を解析し、腸内恒常性に関連する新たな $\alpha 1,2$ -フコシル化糖タンパク質の同定を目指しました。

UEA-1<sup>\*4</sup>レクチンを用いた蛍光染色により、小腸においてはパネート細胞<sup>\*5</sup>の内部に $\alpha 1,2$ -フコシル化された糖タンパク質によるシグナルが示されるとともに、その正体が小胞内顆粒であることが明らかになりました。また Q Exactive<sup>\*6</sup>質量分析計を用いた精密な質量分析や、Byonic<sup>\*7</sup>分析プログラムを用いたデータ解析により、パネート細胞内抗菌タンパク質である CRS1 の存在が明らかにされ、複数の実験方法によって $\alpha 1,2$ -フコシル化が証明されました。

パネート細胞は抗菌タンパク質を分泌することで腸内細菌の構成を制御し、健康な微生物叢（フローラ）を維持しています。今後、この CRS1 と $\alpha 1,2$ -フコースによる糖修飾のメカニズムを正しく解明していくことで、炎症性腸疾患などの、腸内細菌と宿主との共生・抗生物質相互作用に関連する多くの難病に対して、有効な診断法や治療薬の開発に繋がる可能性があります。本研究は、米国 ELSEVIER より発行されている科学誌「ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS」（2020年10月27日付（米国東部時間）の on line 版）に掲載されました。

## ポイント

- 小腸環境において $\alpha$ 1,2-フコースによる糖修飾は、腸内細菌との共生や、病原菌の排除に大きく関与している。
- $\alpha$ 1,2-フコースによる糖修飾が、どのようなタンパク質を標的として起こっているかは知られていなかった。
- 本研究の結果、パネート細胞の持つ抗菌タンパク質 CRS1 の O-結合型糖鎖上に $\alpha$ 1,2-フコシル化が多く存在することが示された。
- $\alpha$ 1,2-フコースを含む糖修飾が CRS1 の抗菌性を調節して腸内環境を維持している可能性が高く、この制御メカニズムの解明を進めることで、腸管免疫と関連する数多くの疾患の診断や治療への応用が期待される。

## 1. 背景

糖鎖と糖鎖認識分子との相互作用は、生物の発生制御に密接に関係しており分化、増殖、接着、遺伝子発現、シグナル伝達などへ密接に関与しています。これらの知見は、糖鎖の構造異常に関連する疾患の診断や治療など様々な分野に応用可能です。

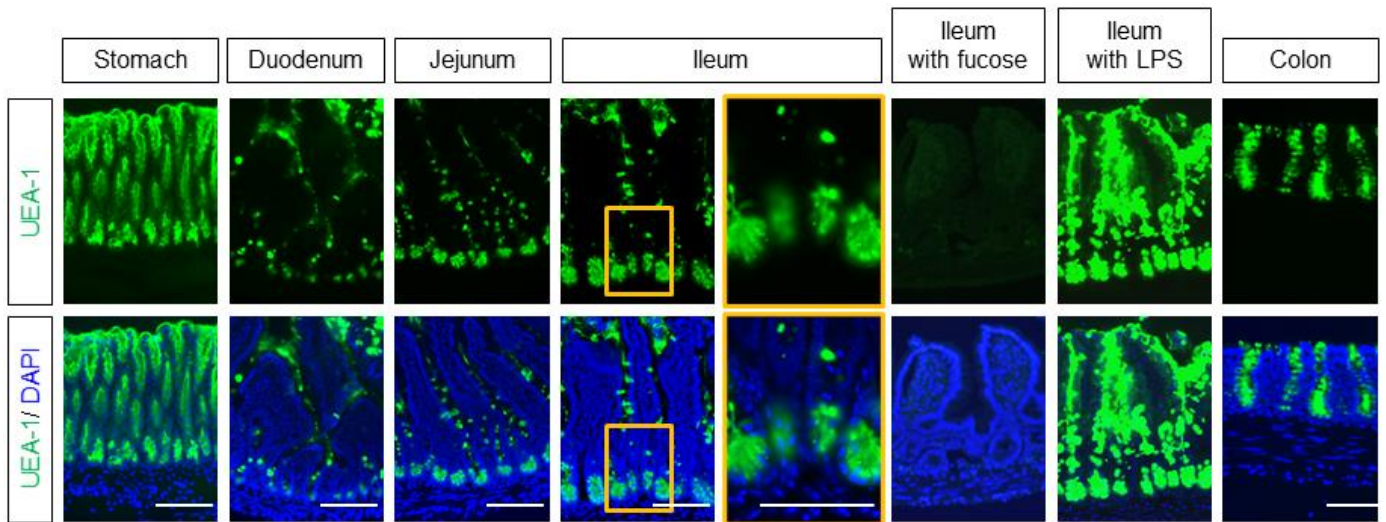
N-アセチルラクトサミンの $\alpha$ 1,2-フコースによる修飾は、腸内細菌との共生や病原菌の排除に関与しています。杯細胞から分泌されるムチン<sup>\*8</sup>が感染防御に関与しているなど推測されていますが、詳細な分子機構はまだ解明されていません。小腸は、多種多様な共生細菌叢や病原性微生物と常に接触している器官ですが、腸内恒常性維持に関わる $\alpha$ 1,2-フコースの機能の大部分は不明なままであり、この $\alpha$ 1,2-フコースで糖修飾された糖タンパク質もほとんど報告されていません。本研究では、統合的なグライコプロテオーム解析によって小腸内在性糖タンパク質を解析し、腸内恒常性に関連する新規な $\alpha$ 1,2-フコシル化糖タンパク質を同定することを目指しました。

## 2. 研究成果

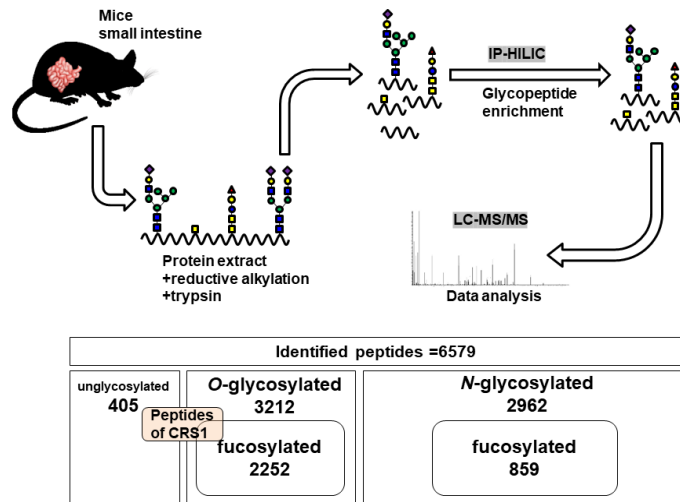
$\alpha$ 1,2-フコースに結合する UEA-1 レクチンを用いた蛍光染色では、小腸のパネート細胞内顆粒が検出されました (図 1)。この現象は、従前の LPS<sup>\*9</sup> への曝露の有無に関係無く恒常的に観察されました。レクチンブロットでは、小腸で $\alpha$ 1,2-フコシル化された 15 kDa の新しい糖タンパク質が検出されました。

小腸可溶化産物を IP-HILIC<sup>\*10</sup> で処理した質量分析によって、3,212 種類の O-結合型糖ペプチドと 2,962 種類の N-結合型糖ペプチドが同定されました (図 2)。その中でも、パネート細胞内に豊富に発現する抗菌タンパク質である cryptdin と構造的に類似する 15 kDa のタンパク質 cryptdin-related sequence 1 (CRS1) が高発現し、実際に $\alpha$ 1,2-フコースで修飾されていることが判明しました。我々は精密な MS スペクトラムの解析技術を駆使して、この CRS1 の CPVCPTCPQCPK と TAITTQAPNTQHK なるペプチド分画に結合した糖鎖のピークを観察することに成功しました (図 3)。その後、UEA-1 レクチンブロットの陽性領域からも $\alpha$ 1,2-フコースで糖修飾された CRS1 が同定されました。

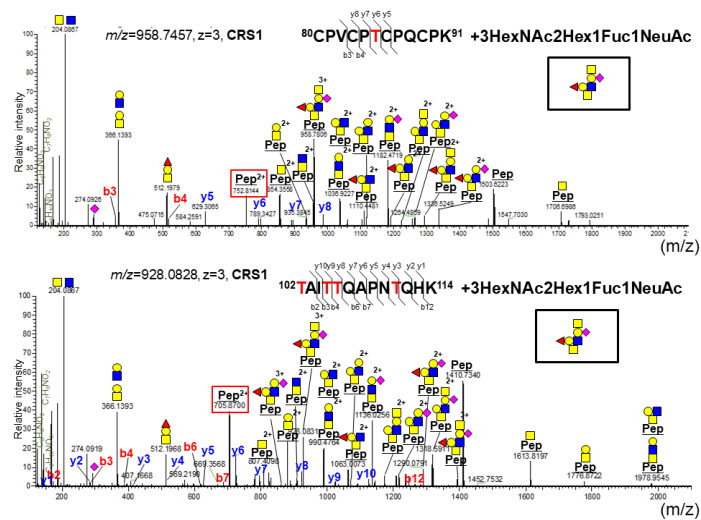
1



2



3



### 3. 今後の展開

本研究の結果により、腸管免疫で新しい分子機構を介し作用する可能性を持つ新たなプレイヤーが追加されました。この $\alpha$ 1,2-フコシル化された CRS1 の発見は、O-結合型糖鎖や $\alpha$ 1,2-フコースで糖修飾された $\alpha$ -デフェンシンファミリータンパク質において最初の例となりました。仮に糖修飾が CRS1 の抗菌活性を修飾するとすれば、「抗菌糖タンパク質」という新しい概念を呼び起こすこととなります。最新の研究で病原性サルモネラ菌の持つ線毛が $\alpha$ 1,2-フコースに結合し、腸管でのコロニー形成に重要になることが発表されました。おそらく CRS1 の $\alpha$ 1,2-フコシル化部位は、こういった有毒な微生物を標的にして、免疫反応を伴わないタンパク質の活性を引き出す働きをしているのではないかと推測されます。本研究が CRS1 の O-結合型糖鎖上に $\alpha$ 1,2-フコースが存在すると明らかにしたことで、腸内細菌との $\alpha$ 1,2-フコース依存性共生や腸内病原性細菌に対する防御機構の解明に繋がることも期待されています。

### 4. 用語説明

- ※1 フコース：自然界に広く存在する単糖の一種で、グルコースと比べて酸素原子を1つ欠く糖
- ※2 N-アセチルラクトサミン：ガラクトースとN-アセチルグルコサミンとが結合したオリゴ糖鎖
- ※3 グライコプロテオーム解析：糖鎖と結合したタンパク質を網羅的に解析しようという技術
- ※4 UEA-1： $\alpha$ 1,2-フコースと結合するレクチン（植物由来）の一種、*Ulex europaeus* agglutinin- I
- ※5 パネート細胞：小腸の基底部に存在する免疫担当細胞で、胃や大腸には存在しない細胞
- ※6 Q Exactive：様々な定性分析や定量分析のデザインを実現するサーモフィッシャー社製の質量分析装置の名称
- ※7 Byonic：質量分析で得られた膨大なデータを自動で処理するサーモフィッシャー社製の解析プログラム
- ※8 ムチン：小腸ゴブレット（杯）細胞から分泌される、高質量で粘液性の強い糖タンパク質
- ※9 LPS：エンドトキシンとも言われる内毒素で、腹腔内注射されたマウスは感染性腸炎モデルとなる
- ※10 IP-HILIC：親水性の強い糖ペプチドのみを選択的に濃縮することを可能にするイオンペアリング親水性相互作用型クロマトグラフィーのこと

## 5. 発表雑誌

雑誌名 : ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS (米国東部時間 10 月 27 日付)

論文タイトル : Glycoproteomic analysis of fucose-containing proteins in small intestine identified cryptdin-related sequence 1 as O-glycosylated proteins modified with  $\alpha$ 1,2-fucose

著者 : Hiroki Hashiguchi<sup>1,2</sup>, Yohei Tsukamoto<sup>2</sup>, Mitsutaka Ogawa<sup>2,3</sup>, Yuko Tashima<sup>2,3</sup>, Hideyuki Takeuchi<sup>2,3</sup>, Masanao Nakamura<sup>1</sup>, Hiroki Kawashima<sup>1</sup>, Mitsuhiro Fujishiro<sup>1</sup>, Tetsuya Okajima<sup>2,3\*</sup>

\*Corresponding author

所属 :

1 Department of Gastroenterology and Hepatology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8550, Aichi, JAPAN

2 Department of Molecular Biochemistry, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8550, Aichi, JAPAN

3 Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601, JAPAN

DOI : [10.1016/j.abb.2020.108653](https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108653)

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Ar\\_Bi\\_201027en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Ar_Bi_201027en.pdf)