

主論文の要旨

Glycoproteomic analysis identifies cryptdin-related sequence 1 as *O*-glycosylated protein modified with α 1,2-fucose in the small intestine

グライコプロテオーム解析により、cryptdin-related sequence 1 が小腸において α 1,2-fucose で修飾された *O*-結合型糖タンパク質であることが明らかになった

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：藤城 光弘 教授)

橋口 裕樹

【緒言】

糖鎖は細胞間相互作用において重要な役割を果たしている。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、シグナル伝達などに関与している。故にこれらの知見は、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することが可能である。

糖鎖修飾の一つで、N-アセチルラクトサミンへの α 1,2-fucoseによる修飾は、腸内細菌との共生や病原菌の排除に深く関与している。今のところ Goblet 細胞から分泌される α 1,2-fucosyl 化された mucin が感染防御に関与していると推測されているが、詳細な分子機構はまだ解明されていない。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ある。しかし、腸内恒常性維持に関わる α 1,2-fucoseの機能の大部分は不明なままであり、 α 1,2-fucosyl 化された糖タンパク質はごく一部しか報告されていない。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 α 1,2-fucosyl 化糖タンパク質を同定することを目的とした。

【対象と方法】

固形飼料および飲料水を自由に摂取させた 3-6 ヶ月齢マウスの消化管を、 α 1,2-fucosyl 化を特異的に検出する UEA-1 レクチンを用いて蛍光免疫染色した。マウス各消化管可溶化産物に対し UEA-1 レクチンブロッティングを行った。マウス小腸可溶化産物から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 (IP-HILIC) を用いて糖ペプチドを精製し、Q Exactive™質量分析計で分析した後、Byonic™および Proteome Discoverer™ソフトウェアを用いデータ処理を行った。その過程で糖タンパク質を、UEA-1 レクチンや α 1,2-fucosidase を用い α 1,2-fucosyl 化を monitor することで解析した。

【結果】

マウス消化管における α 1,2-fucosyl 化タンパク質の分布を明らかにする目的で施行した UEA-1 蛍光免疫染色では、小腸の Paneth 細胞顆粒において強いシグナルが検出された (Figure 1AB)。UEA-1 レクチンブロットでは、小腸可溶化産物から α 1,2-fucosyl 化された新規な 15 kDa の糖ペプチドが検出された (Figure 1C)。マウス回腸における新規な α 1,2-fucosyl 化タンパク質を同定するために in-solution digestion 法を用いたグライコプロテオーム解析を行ったところ、小腸可溶化産物より 3,212 種の O-結合型糖ペプチドおよび 2,962 種の N-結合型糖ペプチドが同定された (Figure 2AB)。その中でも、Paneth 細胞に豊富に蓄積するカチオン性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) が高発現していた (Figure 3AB)。CRS1 に対して α 1,2-fucosidase を使用すると α 1,2-fucosyl 化糖ペプチドの存在比が著減し、実際に α 1,2-fucosyl 化されていることが確認された (Figure 3C)。また我々は精密な MS/MS スペクトラムの解析技術を駆使して、この CRS1 の

CPVCPTCPQCPK および TAITTQAPNTQHK ペプチド領域に結合した 3HexNAc2Hex1Fuc1NeuAc なる糖鎖のピークを直接観察することができた (Figure 4ABCD)。CRS1 とそれ以外の cryptdin ファミリータンパク質との間で糖鎖修飾の有無に違いが存在するかを明らかにする目的で in-gel digestion 法を用いた MS 解析を行ったところ、レクチンブロッキングの UEA-1 陽性領域からは α 1,2-fucosyl 化を含む糖鎖修飾された CRS1 が同定された。一方 UEA-1 陰性領域からは同ファミリーである cryptdin 1、2、5、8、9、15、16、20、21、22、23、24、26 なる 11 種の抗菌タンパク質が同定されたが、いずれも糖鎖修飾は有していなかった (Figure 5ABC)。CRS1 の *in vitro* における分子機能を調べる目的で CRS1 の Thr 残基を変異させ糖鎖修飾を欠損させた CRS1- Δ O プラスミドベクターを作成し、HEK293T 細胞にトランスフェクトしたが、分泌された CRS1 の二量体形成には影響が見られなかった (Figure 6AB)。

【考察】

腸内細菌と宿主との共生・抗生物質相互作用は、 α 1,2-fucose が多元的に作用する複雑なプロセスである。本研究の成果により、新規な分子機構を介して作用する可能性を持つ新たなプレイヤーが追加された。CRS1 は他の cryptdin ファミリーのタンパク質とは異なり 20 アミノ酸ほど長く伸長した unique な C 末端領域を有するが、同領域に 3HexNAc2Hex1Fuc1NeuAc を代表とする O-結合型糖鎖によって修飾された Thr 残基を含んでいる。残念ながら CRS1 の分子機能や標的は不明であるため、この α 1,2-fucosyl 化が CRS1 活性に及ぼす影響を解析するためには、今後の研究を待たなければならない。しかしながら、 α 1,2-fucosyl 化された CRS1 の発見は、O-結合型糖鎖や α 1,2-fucose で修飾された cryptdin ファミリータンパク質の最初の例となるため意義がある。仮に O-結合型糖鎖や α 1,2-fucose 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になる。最新の研究で *S. typhimurium* の Std 線毛が α 1,2-fucose へ結合し、腸管のコロニー形成に重要であることが示唆されている。また、goblet 細胞から分泌される α 1,2-fucose で修飾された mucin が *Salmonella* 菌を捕捉することも示唆されている。大変興味深いことに回腸 Paneth 細胞内の CRS1 タンパク質のほとんどは、LPS (エンドトキシン) の曝露に関係なく常時 α 1,2-fucosyl 化されている (Figure 1B)。おそらく CRS1 の α 1,2-fucosyl 化部位は、 α 1,2-fucose と相互作用する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る (Figure 6D)。

【結語】

CRS1 は O-結合型糖鎖を持つ unique な糖タンパク質であった。本研究が CRS1 の O-結合型糖鎖上に α 1,2-fucose が存在することを明らかにしたことは、腸内細菌との α 1,2-fucose 依存性共生や腸内病原性細菌の排泄機構の解明につながると期待される。