

シンポジウム 2-3

グライコプロッティング法と糖鎖ナノテクノロジー

西村紳一郎

北海道大学大学院先端生命科学研究院

複合糖質は糖鎖とそれ以外の多様な分子とが共有結合により複合化した高度に複雑な構造の生体高分子であり、たとえば糖タンパク質や糖脂質等として細胞膜や血液中に我々が想像していたよりはるかに大量に存在する。腸内細菌と腸粘膜上皮（腸上皮細胞）のインターフェイスはまさに複合糖質とレクチン（糖鎖認識タンパク質）による多様なコミュニケーションの場である。腸内免疫においてもこの相互認識は極めて重要で、樹状細胞のTLRsは病原微生物の糖鎖認識を通して自然免疫系を作動させている。また、DC-SIGN, Siglecs, MGL, Dectin-1などのC型レクチンも樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞表面で様々な糖鎖を結合するパターン認識レセプター（PRRs）として免疫応答シグナルを調節している。微生物側にも宿主の糖鎖を識別するエンベロープタンパク質が存在することから糖鎖パターン認識は双方向で成立していることが想像できる。

最近、Dcir, Mincle, SignR1, SignR3などのPRR遺伝子ノックアウトマウスのグライコプロッティング法^{1,2)}を用いたグライコミクスにより、糖タンパク質の代謝や糖鎖リサイクル機構とPRRsの機能に関する極めて興味深い結果が得られた³⁾。また、ガングリオシドGM3合成酵素欠損マウス由来細胞 [GM3 synthase deficient (GM3S (-/-)) mouse embryonic fibroblast (MEF)] ではGM3およびその下流に位置する糖脂質の消失のみならず、細胞膜の糖タンパク質糖鎖においてもシアル酸を含む糖鎖群が激減するというダイナミックな糖鎖発現変動が観察された⁴⁾。これらの結果は、個々の糖鎖構造の発現には関連するグライコムを含む他の複合糖質やそれらと結合するレセプター分子の発現プロファイルが影響し得ることを示唆している。

糖鎖を提示したリン脂質被覆量子ドット (phosphorylcholine self-assembled monolayers-coated quantum dots, PCSAM-QDs)^{5,6)} は血液や細胞培養液中に共存する不特定多数のタンパク質等との非特異的吸着が抑制されているため糖鎖認識分子の検出や同定などに有効な新しい蛍光ナノ微粒子である。腸上皮細胞表面のPRRsの分布状況や機能解析を進める際にも有力なツールとなるかもしれない。腸管免疫に関与する糖鎖や糖鎖認識分子の構造と機能解析を加速する新しい方法論を紹介したい。

参考文献

- 1) Nishimura SI et al., 2005 *Angew Chem Int Ed* 44, 91-96.
- 2) Nishimura SI, 2011 *Adv Carbohydr Chem Biochem* 65, 219-271.
- 3) Amano M et al., 2012 *Chem Bio Chem* 13, 451-464.
- 4) Nagahori N et al., in submission.
- 5) Ohyanagi T et al., 2011 *J Am Chem Soc* 133, 12507-12517.
- 6) Nishimura SI, 2012 *Clinics in Lab Med* 32, 73-87.

Glycoblotting Method and Glyconanotechnology

Shin-Ichiro Nishimura

Graduate School of Life Sciences, Hokkaido University

Glycoconjugates are highly complicated biopolymers composed of glycans covalently conjugated with various biomolecules such as proteins and lipids. Whole glycan chains of glycoproteins and glycosphingolipids found in serum and cell surfaces have been demonstrated to be much more abundant than that estimated. Interface between intestinal commensal bacteria and intestinal epithelial cells seems to be a platform for the interaction between glycoconjugates and lectins (carbohydrate recognizing proteins). The glycan-lectin interaction is a crucial step in the intestinal immune system. For example, antigen presenting cells, dendritic cells and macrophages, control innate immune responses through the recognition of a variety of pathogen-specific glycans by TLRs in collaboration with many C-type lectins (pattern recognition receptors) such as DC-SIGN, Siglecs, MGL, Dectin-1, and so on. Since many pathogens also express envelope proteins recognizing glycans on the host cells surfaces, it is considered that glycan pattern recognition might be an essential and interactive mechanism from both sides.

Recently, we revealed by glycoblotting-based glycomics^{1,2)} of PPRs gene knock-out mice that metabolism and homeostasis of serum glycoproteins appear to correlate significantly with expression profiles of PPRs such as Dcir, Mincle, SignR1, or SignR3³⁾ In addition, ganglioside GM3 deficient cells, GM3S (–/–) mouse embryonic fibroblast (MEF), lost various *N*-glycans bearing sialic acids as well as GM3 and related glycosphingolipids, indicating that the single genetic damage in the GM3 synthetic enzyme influences *N*-glycome in the glycoproteins synthesized by different glycosyltransferases⁴⁾. These results show that individual glycomes might be influenced greatly by the expression of other glycoconjugates involving a similar glycan structures and lectins/PPRs recognizing these molecules as functionally equivalent “glycotype”.

Phosphorylcholine self-assembled monolayers-coated quantum dots (PCSAM-QDs)^{5,6)} are novel class of fluorescent nano-scaffold to display various glycans and glycoconjugates because nonfouling nature of PCSAM-QDs abolishes non-specific adsorption of abundant proteins in serum and cell lysate. It is likely that PCSAM-QDs become nice tool for monitoring distribution and functions of intestinal epithelial cells surface PPRs. I would like to introduce new methods and approaches to accelerate the investigation of glycoconjugates and carbohydrate recognizing proteins related to intestinal immune systems.

References

- 1) Nishimura SI et al., 2005 *Angew Chem Int Ed* **44**, 91–96.
- 2) Nishimura SI, 2011 *Adv Carbohydr Chem Biochem* **65**, 219–271.
- 3) Amano M et al., 2012 *Chem Bio Chem* **13**, 451–464.
- 4) Nagahori N et al., in submission.
- 5) Ohyanagi T et al., 2011 *J Am Chem Soc* **133**, 12507–12517.
- 6) Nishimura SI, 2012 *Clinics in Lab Med* **32**, 73–87.