

研究課題名	糖鎖生物学的アプローチによる果実のアレルゲン性発現メカニズムの解明
フリガナ	オカダ タカヒロ
代表者名	岡田 貴裕
所属機関 (機関名) (役職名)	佐賀大学 医学部 分子生命科学講座 細胞生物学分野 助教
本助成金による発表論文, 学会発表	<ol style="list-style-type: none"> <li>Okada T, Ihara H, Ito R, Ikeda Y. Molecular cloning and functional expression of Lewis type <math>\alpha</math>1,3/<math>\alpha</math>1,4-fucosyltransferase cDNAs from <i>Mangifera indica</i> L. <i>Phytochemistry</i>, 144:98-105. 2017.</li> <li>岡田貴裕, 井原秀之, 伊東利津, 池田義孝. マンゴー由来 <math>\alpha</math>1,3-フコース転移酵素遺伝子 (MiFUT11) の同定・機能解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017 年 12 月 6 日.</li> <li>岡田貴裕, 池田義孝. マンゴー由来 <math>\beta</math>1,2-キシロース転移酵素遺伝子の同定・機能解析. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 2018 年 3 月 17 日.</li> <li>岡田貴裕. マンゴーをモデルとした果実のアレルゲン性発現機序に関する研究. 第 42 回 蛋白質の構造と機能に関する九州シンポジウム. 2018 年 8 月 29 日.</li> <li>岡田貴裕, 井原秀之, 伊東利津, 池田義孝. マンゴー由来ルイス型 <math>\alpha</math>1,3/<math>\alpha</math>1,4-フコース転移酵素の酵素学的性質. 2018 年度 日本生化学会大会. 2018 年 9 月 26 日.</li> <li>岡田貴裕, 池田義孝. マンゴー由来 <math>\beta</math>1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の同定・機能解析. 日本農芸化学会大会. 2019 年 3 月 24 日.</li> </ol>

## 研究結果要約

花粉症関連食物アレルギー症候群は花粉と食用植物との交差反応により発症する疾患であり、交差抗原の分子実体と発現機序の理解が重要な課題となっている。本課題では、植物の主要な交差抗原として知られるアスパラギン結合型糖鎖 (*N*-glycan) に着目し、アーウィン種マンゴー果実をモデルとしてその生化学的基盤を調査した。

*N*-glycan のアレルゲン糖エпитープ ( $\alpha$ 1,3-フコース、 $\beta$ 1,2-キシロース) 修飾に関わる責任遺伝子として、新たに  $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素遺伝子 (*MiFUT11*)、 $\beta$ 1,2-キシロース転移酵素遺伝子 (*MiXyIT*) を見出し、これらが細胞レベルで機能することを明らかにした。また、ルイス a 構造の形成に関わり、交差反応性の低減化にはたらくと考えられる  $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子 (*MiGALT1*)、 $\alpha$ 1,3/ $\alpha$ 1,4-フコース転移酵素遺伝子 (*MiFUT13*) を見出した。さらに、登熟に伴い *MiFUT11*、*MiXyIT* の発現が亢進する一方で、*MiFUT13* の発現活性は顕著に低下する傾向を見出した。以上の結果が

ら、マンゴー果実は完熟に近づくにつれて交差反応性の高い *N*-glycan が増加し、アレルギーの発症リスクが高くなる可能性が考えられる。

## 研究目的

本課題では、花粉症関連食物アレルギーの原因植物の交差反応性の生化学的基盤を調査し、その発現メカニズムの解明を目的とする。具体的には、異種植物由来の花粉との交差反応性を持つマンゴーを対象とし、(1)主要な交差抗原として知られるアスパラギン結合型糖鎖 (*N*-glycan) の交差反応性に関わる糖転移酵素遺伝子の同定、(2)果肉における糖転移酵素遺伝子の発現活性の検討、(3)*N*-glycan の構造バリエーションの解析に取り組む。

以上を通じ、*N*-glycan に起こるアレルギー糖エピトープ修飾の分子基盤を検討することで、果実タンパク質成分の交差反応性/アレルギーの発症リスクが、いつ、どのように発現するのかについて具体的な知見を得ることができる。また、果実の登熟と糖鎖生合成系のバランスとの相関が明らかになることで、特定の糖転移酵素遺伝子、あるいは糖エピトープの発現に着目した交差反応性の検討が可能となり、これに基づくアレルギーリスク検査法の開発研究を展開できる。また、ゲノム編集技術を利用して糖転移酵素遺伝子の発現を制御することで、タンパク質成分の交差反応性を低減させた品種の開発が期待できる。このような糖鎖改変品種は、アレルギーリスクの少ない組換えタンパク質の生産宿主として利用できるため、安全性の高い”食べる”バイオ医薬品の工業的生産にも貢献できる可能性がある。

## 研究計画及び研究手法

### ① 糖転移酵素候補遺伝子の機能解析

各遺伝子がコードするタンパク質を異種細胞で発現させ、糖ヌクレオチドおよび 2-アミノピリジン標識糖鎖を含む反応系を用いて糖転移活性を検討した (表 1)。*MiFUT11*、*MiXylT* については、*N*-glycan 生合成系への影響についても検討した。申請者らの報告に従い<sup>1)</sup>、親株、遺伝子導入株に発現する全糖タンパク質糖鎖を回収し、再アセチル化後に 2-アミノピリジンで標識した。さらに、この蛍光標識試料を逆相/順相 HPLC で単一成分にまで分画し、MALDI-TOF MS に供することで、目的遺伝子導入による糖転移活性の発現を評価した。

表 1. 各遺伝子の発現に用いた宿主細胞、機能検討に用いた糖供与体/受容体基質

候補遺伝子	宿主細胞	糖供与体	受容体糖鎖
MiFUT11	Sf21	GDP-fucose	GnGnF6-Asn
MiXyIT	Sf21	UDP-xylose	GnGn
MiFUT13	COS1 Sf21	GDP-fucose	lacto- <i>N</i> -tetraose lacto- <i>N</i> -neotetraose
MiGALT1	Sf21	UDP-galactose	GnGn

後述のように、本検討では *MiGALT1* の機能を明らかにできなかったため、新たに 5 種類のガラクトース転移酵素候補遺伝子 (*GALT2~6*) をクローニングした。

### ②果実における糖転移酵素遺伝子の発現活性の検討

登熟段階が異なる果実サンプルより全 RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を調製した。これらを鋳型としたリアルタイム PCR を行い、各糖転移酵素遺伝子の相対発現量を決定した。内在性コントロールにはグリセルアルデヒド-2-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を用い、比較 Ct 法を用いてデータ解析を行った。

### ③果実に発現する花粉症関連糖鎖発現の検討

5%ギ酸存在下で果肉試料をペプシン消化し、脱イオン水に透析することで低分子成分を回収した。透析外液を濃縮し、ゲル濾過に供することで糖ペプチド画分を回収した。さらに、ヒドラジン分解/*N*-グリカナーゼ A 処理によって糖ペプチド試料から *N*-glycan を遊離させ、グラファイトカーボンカラムで回収した。

*N*-glycan の解析に本学共用の高速液体クロマトグラフ質量分析装置を用いる予定であったが、故障・修理による利用停止期間が生じたために本項目の検討は完了していない。

## 結果と考察

### 本研究課題で得られた結果

マンゴーはゲノム情報が未解読であり、*N*-glycan の生合成に関わる責任遺伝子は未知である。研究計画①に従い、*N*-glycan の交差反応性に関わる糖転移酵素遺伝子を同定した。

#### (1) *N*-glycan のアレルゲン糖エpitep 生合成に関わる責任遺伝子の同定

*N*-glycan は、アレルゲン糖エpitep (コア  $\alpha$ 1,3-フコース、 $\beta$ 1,2-キシロース) が修飾されることで高い交差反応性を発揮する<sup>2)</sup>。これらの糖エpitep の形成に関わる糖転移酵素のホモログ遺伝子 *MiFUT11*、*MiXyIT* をクローニングし、それらの機能を解析した。

ヨトウガ由来 Sf21 細胞を宿主として、目的遺伝子の導入による *N*-glycan の生合成系への影響を検討した。その結果、*MiFUT11*、*MiXyIT* はいずれも細胞レベルで機能し、それぞれ  $\alpha$ 1,3-フコー

ス、 $\beta$ 1,2-キシロース修飾反応を亢進させた。また、バイアンテナ型 *N*-glycan を受容体基質として組換えタンパク質の糖転移反応を検討した結果、MiFUT11 が  $\alpha$ 1,3-フコース転移活性を発揮した一方で、MiXylT では目的の糖転移酵素活性を確認できなかった。

以上の検討から、MiFUT11、MiXylT は *N*-glycan の交差反応性に関わる責任遺伝子であることを明らかにできた。MiXylT の *in vitro* 糖転移活性については、組換えタンパク質のデザインを変更した上で再検討していく予定である。

## (2) *N*-glycan の交差反応性低減化に関わる責任遺伝子の同定

植物 *N*-glycan の分岐上には Le<sup>a</sup> 構造：Fuc $\alpha$ 1,4(Gal $\beta$ 1,3)GlcNAc が形成される<sup>3)</sup>。この三糖は動物の血液型抗原であり、*N*-glycan の分岐を伸長させることで免疫原性の低減化にはたらくと考えられる<sup>4) 5)</sup>。その形成に関わる候補遺伝子 MiFUT13、MiGALT1 の機能を解析した。

lacto-*N*-tetraose、lacto-*N*-neotetraose を用いた検討により、MiFUT13 は目的とする  $\alpha$ 1,3/ $\alpha$ 1,4-フコース転移酵素をコードすることを確認した。また、MiGALT1 についても糖転移活性の検討を行なったが、糖鎖に対する  $\beta$ 1,3-ガラクトース転移活性は認められなかった。一次構造の情報から、MiGALT1 は O-結合型糖鎖形成に関わる類縁のガラクトース転移酵素である可能性が示唆されたため<sup>6)</sup>、新たに 5 種の候補遺伝子 (MiGALT2~6) を見出した。

以上の検討から、MiFUT13 はマンゴー果実において *N*-glycan 上の Le<sup>a</sup> 構造形成に関与し、交差反応性の低減化にはたらくことが示唆された。今後は、MiGALT2~6 の機能検討に取り組み、Le<sup>a</sup> 構造の形成に関わる  $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を決定したいと考えている。

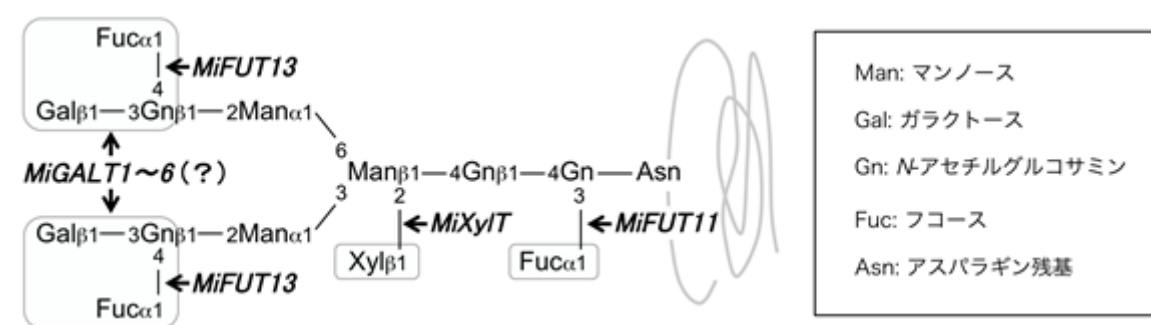


図 1. *N*-glycan の交差反応性に関わる糖残基とその生合成に関わる糖転移酵素遺伝子

## (3) 果実における糖転移酵素遺伝子の発現活性の変化

*N*-glycan の生合成系のバランスは糖転移酵素遺伝子群の発現活性に大きく左右される。果肉における遺伝子発現を検討した結果、登熟が進むに従って MiFUT11、MiXylT の発現が亢進することが明らかとなった。これに対し、MiGALT1 は一定の発現活性を示す一方で、MiFUT13 の発現は検出限界以下にまで低下することが明らかとなった。

以上の結果は、完熟に至るまでに *N-glycan* の  $\alpha$ 1,3-フコース/ $\beta$ 1,2-キシロース修飾反応が亢進し、*Le<sup>a</sup>* 構造の形成プロセスがほぼ完全に抑制されることを示唆している。すなわち、マンゴー果実は完熟に近づくほど可食部のアレルギーリスクが増す可能性が考えられる。

#### (4) 果実に発現する *N-glycan* の変化

*N-glycan* サンプルの調製までは完了したが、分析機器の故障・修理期間が生じたために構造バリエーションの決定にまでは至らなかった。今後、*N-glycan* のプロファイリングを継続して行い、糖転移酵素の発現活性との相関について検証する予定である。

#### 助成期間後に残された課題

マンゴー果実より新たにクローニングしたガラクトース転移酵素候補遺伝子 *MiGALT2~6* の機能解析に取り組み、*ルイス a* 構造の形成に関わる責任遺伝子を同定する。また、果実に発現する *N-glycan* の構造バリエーションの解析を完了させ、糖転移酵素遺伝子の発現との相関を明らかにする。

#### 学会・論文発表の予定

*MiFUT11*、*MiXylT* の機能解析については論文執筆中であり、本年度中に投稿する予定である。また、*GALT1~6* の機能、糖転移酵素の遺伝子発現と *N-glycan* のバリエーションとの関連性については、解析が完了した時点で学会発表・論文投稿を行う予定である。

#### 今後の研究活動について

糖転移酵素遺伝子の発現活性の検討結果から、マンゴー果実では何らかの要因が引き金となり *N-glycan* の交差反応性が発現すると考えられる。糖転移酵素遺伝子の転写調節エレメントや、植物ホルモンや光などの環境要因に対する転写応答を調査していくことで、果実のアレルギーリスクに影響する内的・外的要因を明らかにしていきたいと考えている。また、糖転移酵素の遺伝子情報を比較すると、*N-glycan* 生合成系の下流ではたらくものほど多様性を持つ傾向を見出すことができた。今後は、起源が異なる約 80 品種を対象に糖転移酵素の遺伝的背景を調査し、系統による *N-glycan* 生合成プロセスの特徴を明らかにしていく予定である。これにより、アレルギーリスクがより少ない系統を推定し、遺伝子組換えに頼らない低アレルギー性品種の開発研究に展開させていきたいと考えている。

本課題では糖転移酵素に着目したが、*N-glycan* のバリエーションはグリコシダーゼの発現にも影響される。現時点において、マンゴーに発現するグリコシダーゼの遺伝子情報は未知なため、今後はそれらを同定し、果実の糖鎖生合成系を包括的に調査することが課題となる。

## 参考文献

- 1) Okada T, Ihara H, Nakano M, Matsumoto K, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Ikeda Y. N-Glycosylation engineering of lepidopteran insect cells by the introduction of the  $\beta$ 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III gene. *Glycobiology*. 2010 Sep;20(9):1147-1159.
- 2) Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142(2):99-115.
- 3) Wilson IB, Zeleny R, Kolarich D, Staudacher E, Stroop CJ, Kamerling JP, Altmann F. Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core  $\alpha$ 1,3-linked fucose and xylose substitutions. *Glycobiology*. 2001 Apr;11(4):261-274.
- 4) Altmann F. Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis. *Allergo J Int*. 2016;25(4):98-105.
- 5) Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jan;121(1):185-190.
- 6) Basu D, Liang Y, Liu X, Himmeldirk K, Faik A, Kieliszewski M, Held M, Showalter AM. Functional identification of a hydroxyproline-O-galactosyltransferase specific for arabinogalactan protein biosynthesis in Arabidopsis. *J Biol Chem*. 2013 Apr;288(14):10132-10143.

以上