

ナマズ卵レクチンのクラスター形成と細胞内輸送

河野 資, 桃井 秀世, 細野 雅祐, 菅原 栄紀, 荻谷由貴子, 仁田 一雄

Cluster Formation and Intracellular Traffic of Catfish Lectin

Tasuku KAWANO, Shyusei MOMOI, Masahiro HOSONO, Shigeki SUGAWARA, Yukiko KARIYA, and Kazuo NITTA

(Received November 20, 2008)

Rhamnose-binding lectins are widely found in fish eggs, and *Silurus asotus* lectin (SAL) isolated from catfish eggs having three carbohydrate recognition domains preferentially recognizes non-reducing end Gal α -linked sugar chain. In the previous study, we revealed that SAL binds to globotriaosylceramide (Gb3) by the surface plasmon resonance analysis. However, its biological effect on cultured cells is still unclear. To investigate localization and trafficking of SAL in the renal adenocarcinoma ACHN cells, which express Gb3 on the cell surface, we prepared HiLyte Fluor 555-labeled SAL (HL-SAL). When ACHN cells were treated with HL-SAL at 4°C for 5 min, and at 37°C for 24 h, HL-SAL was distributed on the cell membrane and in the intracellular compartment, respectively. To trace the trafficking route of HL-SAL from cell surface to the intracellular compartment, the images of HL-SAL-treated live cells were obtained using confocal laser scanning microscopy. HL-SAL was clustered on ACHN cell surface, and furthermore, partially co-localized with transferrin in intracellular compartment. These results suggest that SAL induces alteration of Gb3 distribution on the membrane and migrates from the cell surface to the intracellular vesicles.

Key words — lectin; globotriaosylceramide; cell membrane; clustering; intracellular traffic

緒 論

レクチンは、その道具としての潜在能力の高さから、細胞表面糖鎖の構造解析や糖タンパク質糖鎖の識別、^{1,2)} さらに最近では糖鎖関連バイオマーカー探索にも利用されるようになってきている。³⁾ 動物レクチンは、感染、生体防御、受精、細胞分化、細胞培養などの生体反応への関与が報告されているが、⁴⁾ 魚卵やカエル卵は古くから研究材料として重用され、多くのレクチンが精製されている。⁵⁾ これらのなかでも魚卵には、L-ラムノースと α -ガラクトシドに対して高い親和性を有する、ユニークなレクチンが存在することが示されている。⁶⁻¹⁰⁾ これまでの研究から、L-ラムノースに親和性をもつ魚卵レクチンをラムノース結合性レクチン (rhamnose-binding lectin, RBL) と呼んでいる。ナマズ卵より精製された RBL (*Silurus asotus* lectin, SAL) も同様の糖親和性を示すが、近年、糖脂質グロボトリアオシルセラミド (Gb3) に対する結合性が注目されている。¹¹⁾ Gb3 はスフィンゴ糖脂質に分類され、細胞膜上では glycosphingolipid-enriched microdomain (GEM) と呼ばれる領域に存在し、シグナル伝達や機能発現のための重要なプラットフォームとして様々な分子が会合している。疎水基としてセラミ

ドをもつスフィンゴ糖脂質は、すべての脊椎動物の細胞に存在し、細胞の分化や増殖あるいは接着の調節、制御に関っていると考えられている。¹²⁾ GEM に存在するスフィンゴ糖脂質の多様な糖鎖を、様々なレクチンが認識し、結合することにより、細胞機能を調節している可能性が考えられる。これまでに、RBL が免疫細胞表面の Gb3 と結合し、細胞を賦活化することによって、サイトカインの産生を上昇させることが報告されている。¹³⁾ しかし、RBL が糖タンパク質やスフィンゴ糖脂質の糖鎖に結合することにより、細胞にどのような影響を与えるかについては明らかではない。GEM を介した細胞機能の調節を理解するうえで、レクチンの挙動は大変重要と考えられる。

本論文では、細胞における SAL の細胞動態を観察することを目的として、蛍光標識した SAL を作製し、Gb3 発現細胞を用いて、その分布および輸送機構について検討した。

実験方法および材料

1. 材料

ナマズ卵由来レクチン (SAL) は、既報の方法より精製した。⁷⁾ ヒト腎癌細胞株である ACHN 細胞

は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより供与されたものを用いた。ACHN細胞は10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS, Gibco 社製) を含む MEM 培地 (Sigma 社製) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下にて培養を行った。

2. ACHN 細胞表面の Gb3 発現

2-1. フローサイトメトリー解析

細胞 (2×10^5 個) に対し、抗 Gb3 抗体 (生化学工業社製) を終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ になるように加え、4°C、30 分間処理した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で洗浄後、AlexaFluor (AF) 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes 社製) を終濃度 $0.8 \mu\text{g/ml}$ で加え、4°C、30 分間処理した後、FACScalibur (Becton Dickinson 社製) により蛍光強度を測定した。

2-2. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

細胞を PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで室温、15 分間処理した。PBS で洗浄後、0.1% Triton X-100 で室温、10 分間処理した。PBS で洗浄後、抗 Gb3 抗体 (PBS で 100 倍希釈) を加え、4°C、1 時間処理した。PBS で洗浄後、AF488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (PBS で 2500 倍希釈)、核を染色する目的で TO-PRO-3 iodide (PBS で 1000 倍希釈; Molecular Probes 社製) および RNase A ($100 \mu\text{g/ml}$, Sigma 社製) を含む溶液で 4°C、1 時間処理した。PBS で洗浄後、共焦点レーザー顕微

鏡 (FV1000, Olympus 社製)、60 倍対物レンズ (NA; 1.35) にて Gb3 の発現を観察した。

3. HiLyteFluor 555 標識 SAL の作製

HiLyteFluor 555 (HL) Labeling kit (同仁化学社製) を用い、付属のテクニカルマニュアルに従い、HL 標識 SAL (HL-SAL) を作製した。

4. HL-SAL の局在観察

HL-SAL ($20 \mu\text{g/ml}$) で 4°C、5 分間、あるいは 37°C、24 時間処理した細胞を PBS で洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドで 4°C、15 分間処理した。PBS で洗浄後、0.1% Triton X-100 で室温、10 分間処理し、1% ウシ血清アルブミン (BSA) を加え、室温で 30 分間処理した。PBS で洗浄後、アクチンを染色する目的で AF488 標識 phalloidin (PBS で 2000 倍希釈; Molecular Probes 社製)、TO-PRO-3 iodide (PBS で 1000 倍希釈) および RNase A ($100 \mu\text{g/ml}$) を含む溶液で 4°C、1 時間処理した。PBS で洗浄した後、FV1000 にて SAL の局在を観察した。

5. HL-SAL エンドサイトーシスの観察

HL-SAL ($20 \mu\text{g/ml}$) で 4°C、5 分間処理した後、氷冷 recording medium [RM; 10 mM HEPES (pH 7.4), 10% FBS を含む RPMI1640] で 2 回洗浄し、AF488 標識トランスフェリン (Tf) RM 溶液 (AF488Tf, $2.5 \mu\text{g/ml}$) を加え、ヒート機能付ステージに載せて観察した。温度を 37°C に設定し、ヒート機能を作動させ

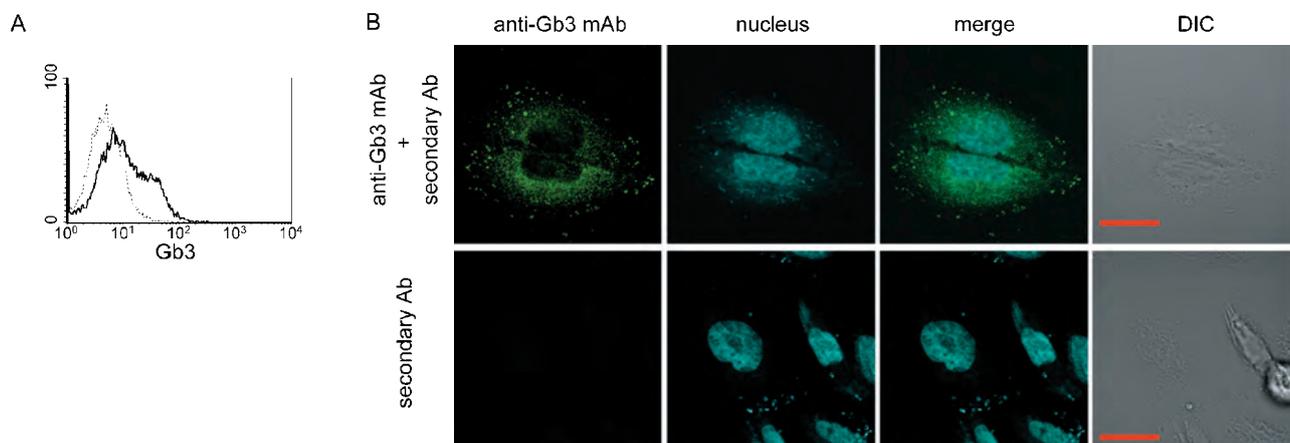


Fig. 1. Gb3 expression and localization on ACHN cell membranes

A: Cells were stained with anti-Gb3 monoclonal antibody (mAb) and AF488-tagged goat anti-mouse Ab (—). The degree of Gb3 expression on ACHN cell membranes was determined by FACScalibur. Control cells; (---). B: The paraformaldehyde-fixed cells were stained with anti-Gb3 mAb and secondary Ab. Data were obtained using FV1000 confocal laser-scanning microscopy (CLSM) at $\times 60/\text{N.A. } 1.35$ objective (Olympus). Bars, $20 \mu\text{m}$.

始めた時間を 0 分とし、時間ごとの HL-SAL と AF488Tf の挙動を FV1000 にて 25 分間観察した。

結 果

1. ACHN 細胞における Gb3 の発現

Gb3 は、細胞表面に存在することが知られている。実験に用いた ACHN 細胞の Gb3 発現と細胞膜における分布を調べたところ、細胞膜全体に Gb3 の発現が認められた (Fig. 1)。

2. HL-SAL を用いた SAL の局在

ACHN 細胞に対する SAL の結合を観察するため、蛍光ラベルを施した HL-SAL で細胞を処理し、固定後透過処理を行い、アクチン線維と核を染色して共焦点レーザー顕微鏡により局在を観察した。その結果、HL-SAL (20 $\mu\text{g/ml}$), 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 分間処理で、蛍光が細胞膜に観察されることから、HL-SAL は細胞膜に結合することが確認できた (Fig. 2A)。一方、37 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間処理では、蛍光が細胞内にも観察されることから、HL-SAL は細胞内に取り込まれることが示された (Fig. 2B)。また、Z 軸連続撮

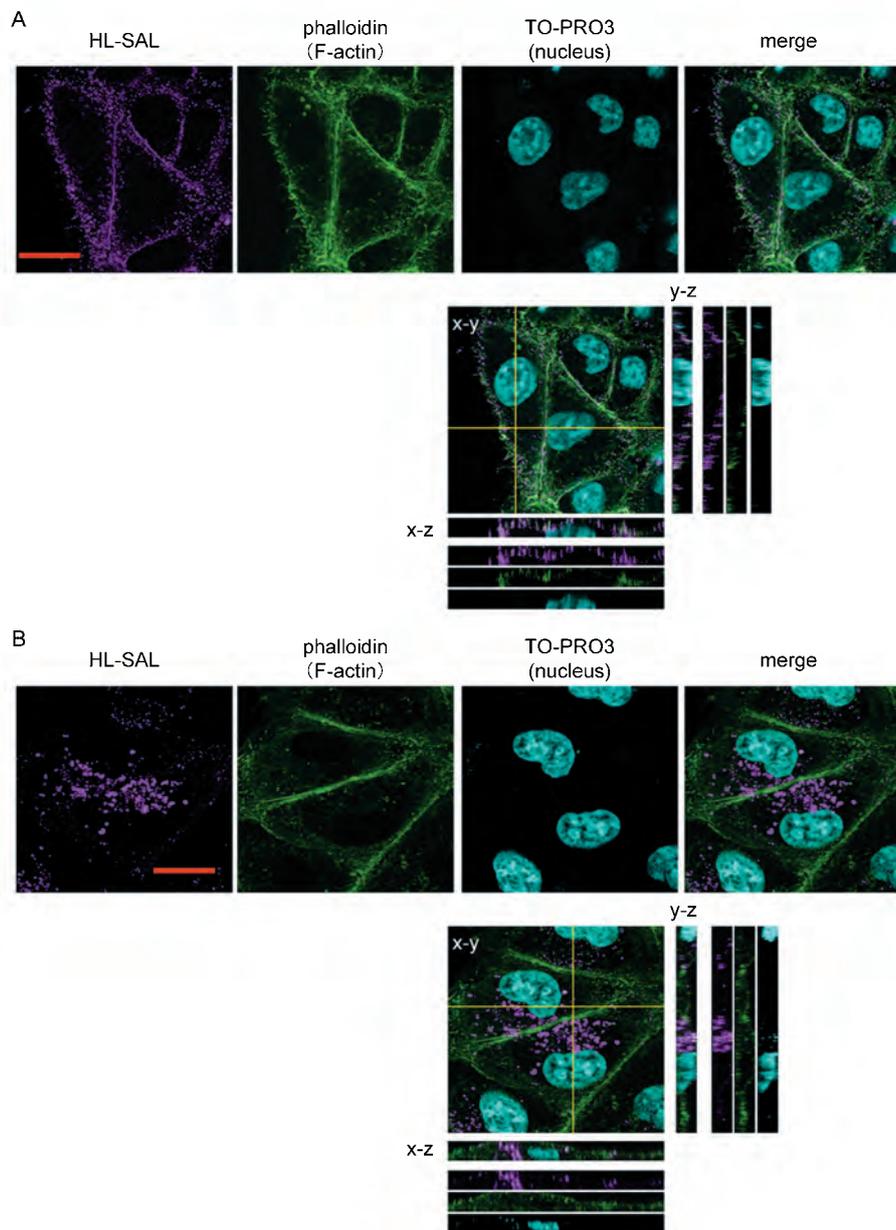


Fig. 2. Localization of HL-SAL

Cells were treated with HL-SAL (20 $\mu\text{g/ml}$) at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min (A) or at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h (B). The cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and stained with AF488-tagged phalloidin and TO-PRO3. Optical Z-axis sections were recording cells at 0.2 μm intervals. Data were obtained using FV1000 CLSM at $\times 60/\text{N.A. } 1.35$ objective (Olympus). Bars, 20 μm .

影により, 取り込まれた HL-SAL は細胞質に拡散せず, 小胞として主に核周辺に存在することが確認できた (Fig. 2B).

3. HL-SAL のクラスター形成と細胞内移行

次に SAL の細胞内動態について検討を行った. 上述したように 4°C, 5 分間処理では, HL-SAL は細胞膜全体に分布していたが (Fig. 3A), ヒート機能を作動させ, 温度を 37°C に上昇させて観察を続

けると, 5 分後から細胞膜上で矢印で示す蛍光強度の強い領域と弱い領域が認められた (Fig. 3B-F). 時間経過に従って蛍光強度の差が明らかになり, 集積がはっきりし, 蛍光物質が細胞内に取り込まれるのが観察された (Fig. 3C-F).

HL-SAL が細胞内に取り込まれる様子が観察されたことから, クラスリン依存性のエンドサイトーシスにより取り込まれることが知られている Tf の取り込み機構と比較検討した. HL-SAL で 4°C, 5

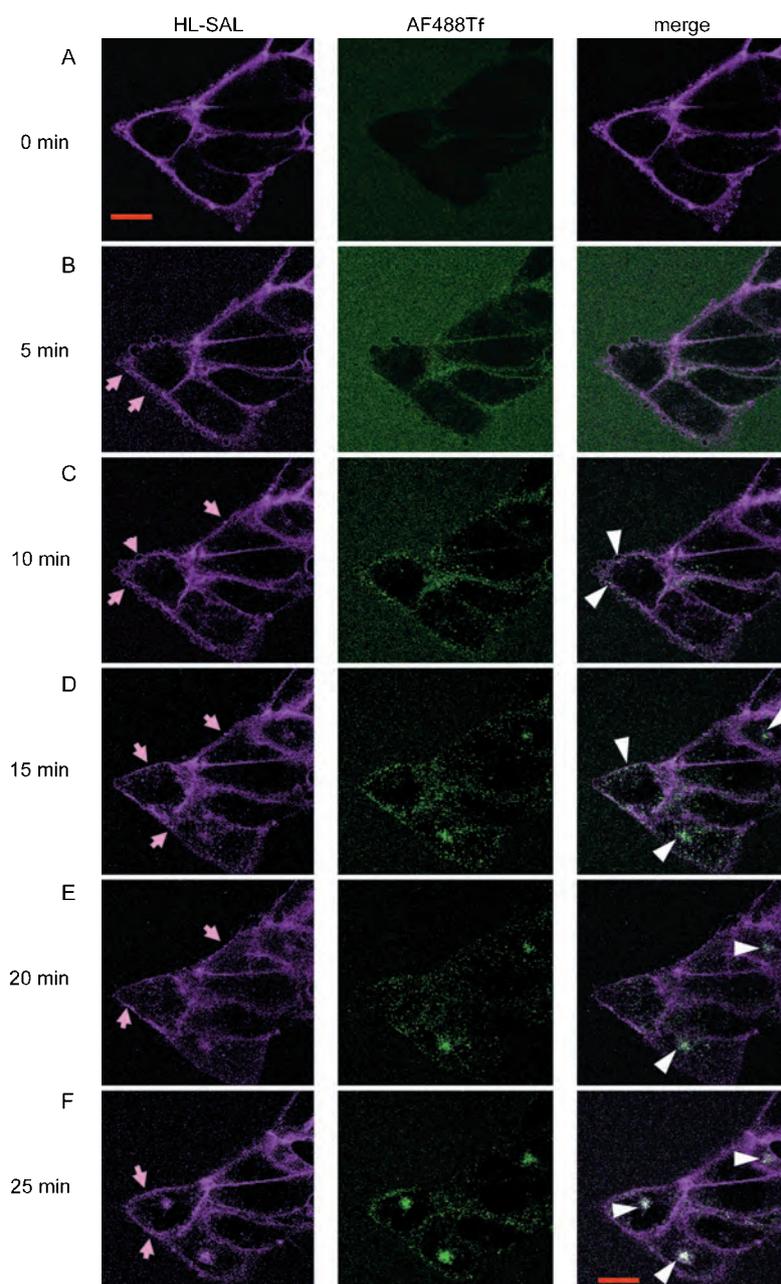


Fig. 3. Intracellular traffic of HL-SAL

Cells were treated with HL-SAL (20 μ g/ml) at 4°C for 5 min. After removal of an excess of HL-SAL, the cells were immersed in ice-cold AF488Tf solution (2.5 μ g/ml in RM), and sifted from 4°C to 37°C on a heat stage. Distribution of HL-SAL (magenta) and AF488Tf (green) was taken using FV1000 CLSM at $\times 60$ /N.A. 1.35 objective (Olympus) for the indicated time. HL-SAL was partially overlaid with AF488Tf as monitored by white color (arrowheads). HL-SAL clusters indicate arrows. Bars, 20 μ m.

分間処理した後、温度を 37°C に上昇させた。ヒート機能を作動させた直後に AF488Tf (2.5 µg/ml) 加え観察を続けたところ、AF488Tf を加えて 5 分後に、Tf の細胞内取り込みが観察されたが、HL-SAL の取り込みは認められなかった (Fig. 3B)。10 分後では、細胞膜上に互いに重なるところ (矢頭で示す) が観察された (Fig. 3C)。25 分後では、細胞内において、それぞれ小胞を形成し、部分的に重なるところが観察された (Fig. 3F)。以上の結果から、HL-SAL はクラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれることが示唆された。

考 察

本論文では、SAL が Gb3 を発現している ACHN 細胞に結合し、細胞内に取り込まれることを明らかにした。蛍光標識した SAL が細胞膜上で集積する様子が観察されたので、クラスターを形成した後に取り込まれると考えられ、さらに小胞の構造体として核の近傍に集積することが明らかになった (Fig. 2B)。SAL の取り込みは Tf の取り込みと部分的に重なることから、クラスリン依存性エンドサイトーシスによるものである可能性が示唆された。

また、Gb3 は志賀毒素の受容体として知られており、この毒素は Gb3 を認識し細胞内に侵入することが知られている。^{14,17)} 志賀毒素は、毒素活性を担う A サブユニットと Gb3 への結合を担う B サブユニットから構成されている。これまでに、B サブユニット 1 分子あたり、3 つの Gb3 結合部位が存在し、5 量体構造をとる B サブユニットでは合計 15 個の結合部位のあることが結晶構造解析により示された。¹⁸⁾ この多価型の相互作用が志賀毒素と Gb3 との結合親和性を著しく亢進させている。SAL は L-ラムノース結合性レクチンファミリーに属し、類似した糖認識ドメインがタンデムに 3 個並んだ構造を有している。⁶⁾ すなわち、志賀毒素 B サブユニット同様に、SAL の場合も 1 分子内に 3 つの糖認識サイト (ドメイン) が存在している。さらに Murayama らの研究により、SAL は水溶液中で主に 3 量体構造をとることが示されており、¹⁹⁾ 細胞膜の Gb3 と多価型の相互作用を起こすことが推測される。

細胞膜脂質の水平拡散が抑制されている状態 (4°C) において、SAL は、細胞膜全体に均一に分

布することが確認された (Fig. 3A)。一方、この細胞を 4°C から 37°C に移行させると、時間経過とともに SAL のクラスター形成が確認された (Fig. 3B-F)。SAL が細胞膜糖脂質の分布に影響を与え、細胞膜の機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。これまでに、SAL が特異的に Gb3 に結合し、細胞膜内層側に存在するホスファチジルセリンを細胞膜外層側へ移行させ、²⁰⁾ さらに、細胞縮小を引き起こすことが明らかにされている。²¹⁾ SAL 処理により脂質二重層の脂質局在性が崩れ、細胞の縮小が観察されることと、SAL が ACHN 細胞膜上に Gb3 のクラスターを形成することとの相関性は明らかではない。しかし、Gb3 のクラスター形成が何らかのシグナル伝達を誘導し、その結果として脂質二重層におけるリン脂質と糖脂質の分布状態の変化を引き起こすものと考えられる。また、Takenouchi らは、志賀毒素 B サブユニットが Gb3 に結合すると、わずか 1 時間の間に、アクチン重合の促進を伴う形態変化が起こることを報告している。²²⁾ この過程で ezrin/radixin/moesin (ERM) の一過性の活性化が起こること示しており、さらに ERM の活性化は、抗 Gb3 抗体でも惹起されることを報告している。このことから、Gb3 は細胞形態を調節する機構に関っていると考えられる。今後、SAL のクラスター形成、脂質二重層の非対称性の崩壊、細胞の形態変化についての実験を行い、Gb3 および SAL の機能をさらに明らかにする必要がある。

SAL が Gb3 を介してエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたことから、Gb3 の細胞における機能を解析するツールとして、またスフィンゴ糖脂質を標的とする薬物輸送担体としての応用など、糖脂質とレクチンの相互作用を利用した創薬への可能性が示唆された。食生活における嗜好が従来の日本食から欧米型の食へと変化している現在、大腸癌の罹患率が今後さらに上昇することが予測されており、さらに大腸癌細胞における Gb3 の発現量と悪性度とが相関するとの報告が幾例かなされている。^{23,24)} 大腸癌細胞における SAL の効果についても詳細に検討し、情報を蓄積することで、レクチンを用いた癌悪性度の診断への応用が期待される。さらに、糖鎖機能の解明を通じ、今後、Gb3 を標的とした創薬の開発が進めば、癌治療の有効な手段になると考えている。

謝辞

本研究は、平成 18 年度文部科学省学術高度化推進事業「学術フロンティア研究推進事業」の助成を受けた。

REFERENCES

- 1) Gabius H.-J. & Gabius S., Eds., "Lectins and Glycobiology", Springer, Berlin, 1993.
- 2) Rhodes J. M. & Milton J. D., Eds., "Lectin Methods and Protocols", Humana Press, Totowa N.J., 1998.
- 3) Matsuda A., Kuno A., Ishida H., Kawamoto T., Shoda J., Hirabayashi J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **370**, 259-263 (2008).
- 4) Sharon N., Lis H., "Lectins", Second Edition, Kluwer Academic Publishers, London, 2003.
- 5) Krajhanzl A., *Adv. Lectin Res.*, **3**, 83-131 (1990).
- 6) Hosono M., Ishikawa K., Mineki R., Mrayama K., Numata C., Ogawa Y., Takayanagi Y., Nitta K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 668-675 (1999).
- 7) Hosono M., Kawauchi H., Nitta K., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1-5 (1993).
- 8) Hosono M., Matsuda K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., Nitta K., *Biomed. Res.*, **13**, 443-449 (1992).
- 9) Tateno H., Saneyoshi A., Ogawa T., Muramoto K., Kamiya H., Saneyoshi M., *J. Biol. Chem.*, **273**, 19190-19197 (1998).
- 10) Shimons K., Tateno H., Ogawa T., Muramoto K., Saneyoshi M., Kamiya H., *Fish. Sci.*, **68**, 1352-1366 (2002).
- 11) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Trends Glycosci. Glycotech.*, **16** (Suppl.), S46 (2004).
- 12) Hakomori S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 225-232 (2002).
- 13) Watanabe Y., Tateno H., Nakamura-Tsuruta S., Kominami J., Hirabayashi J., Nakamura O., Watanabe T., Kamiya H., Naganuma T., Ogawa T., Naudé R. J., Muramoto K., *Dev. Comp. Immunol.*, **33**, 187-197 (2009).
- 14) Sandvig K., van Deurs B., *EMBO J.*, **19**, 5943-5950 (2000).
- 15) Jacewicz M., Clausen H., Nudelman E., Donohue-Rolfe A., Keusch G. T., *J. Exp. Med.*, **163**, 1391-1404 (1986).
- 16) Lindberg A. A., Brown J. E., Strömberg N., Westling-Ryd M., Schultz J. E., Karlsson KA., *J. Biol. Chem.*, **262**, 1779-1785 (1987).
- 17) Lingwood C. A., Law H., Richardson S., Petric M., Brunton J. L., De Grandis S., Karmali M., *J. Biol. Chem.*, **262**, 8834-8839 (1987).
- 18) Ling H., Boodhoo A., Hazes B., Cummings M. D., Armstrong G. D., Brunton J. L., Read R. J., *Biochemistry*, **37**, 1777-1788 (1998).
- 19) Murayama K., Taka H., Kaga N., Fujimura T., Mineki R., Shindo N., Morita M., Hosono M., Nitta K., *Anal. Biochem.*, **247**, 319-326 (1997).
- 20) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 434-441 (2005).
- 21) Sugawara S., Sasaki S., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 327-334 (2005).
- 22) Takenouchi H., Kiyokawa N., Taguchi T., Matsui J., Katagiri Y. U., Okita H., Okuda K., Fujimoto J., *J. Cell Sci.*, **117**, 3911-3922 (2004).
- 23) Kovbasnjuk O., Mourtazina R., Baibakov B., Wang T., Elowsky C., Choti M. A., Kane A., Donowitz M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 19087-19092 (2005).
- 24) Falguières T., Maak M., von Weyhern C., Sarr M., Sastre X., Poupon M. F., Robine S., Johannes L., Janssen K. P., *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 2498-2508 (2008).