

実施課題名 藻類多糖体によるTLR4 依存的アレルギー反応抑制機構の解明

【背景】
 フコイダン、アルギン酸、ヒトエグサ、アオサ、アオノリ、ハバノリなどの藻類多糖体の中でハバノリ多糖体のみがマウスの塩化ピクルリルに対する遅延型アレルギー反応を有意に抑制した(Fig. 1)。しかもこの抑制はTLR4(自然免疫受容体 toll-like receptor 4)が野生型の場合のみ有効であり、TLR4の細胞質部分に突然変異がありシグナル伝達のできないマウスでは抑制効果がなかった(Fig. 1)。今回新たに大量発現により調整していただいたシグナルペプチドのないマウスMD-2とフコイダン、アオサ、ハバノリの藻類多糖体との相互作用解析を試みた。

【実施内容】
 His-tagを付加してあるMD-2を8 M 尿素の存在下で、BiacoreセンサーチップにNi²⁺を介したキレート作用で固定し、標準緩衝液で海藻多糖体との結合が解析できたことで、MD-2がリポ多糖の脂肪酸に結合するだけでなく、水溶性の多糖体にも結合することが判明した。しかし、Fig.2で示すように80 mM以上の尿素存在下ではMD-2とハバノリ多糖体の結合のセンサーグラムが大きく変化することから、この条件では生理的条件でのハバノリ多糖体とMD-2の結合をNMRで推測することはできないと判断し、NMRでの相互作用解析は断念した。MD-2がリポ多糖の脂肪酸に結合するだけでなく、水溶性の多糖体にも結合することが判明したので、今後TLR4を介するシグナル伝達を考える上で、多糖体がTLR4を介するシグナルの強度を制御する可能性が考えられた。

Polysaccharides	NFκB induction in response to	In vitro migration to eotaxin	In vivo DTH		
			C3H/HeN		C3H/HeJ TLR4 mutant
			Orally	i.p.	i.p.
Alginate acid	TLR4: ↑↑ TLR2: →	↓↓	→	→	→
Carrageenan (ι, λ)	TLR4: ↑ TLR2: →	↓	ND	ND	ND
Fucoidan	TLR4: ↑↑ TLR2: →	↓↓	→	→	→
Habanori	TLR4: ↑↑ TLR2: ↑	↓↓	↓	↓	→
Heparin	ND	↓↓	ND	↓	→

Fig.1. Regulatory effects of algae polysaccharides on the migration of eosinophils and their activities through TLR2 and TLR4. i.p.: intraperitoneally, ND: not done, ↑ : up-regulated, ↑↑ : up-regulated to the higher level than that of ↑ .→ : no change. ↓ : down-regulated. ↓↓ : down-regulated weakly. ↓↓ : down-regulated to the lower level than that of ↓ .

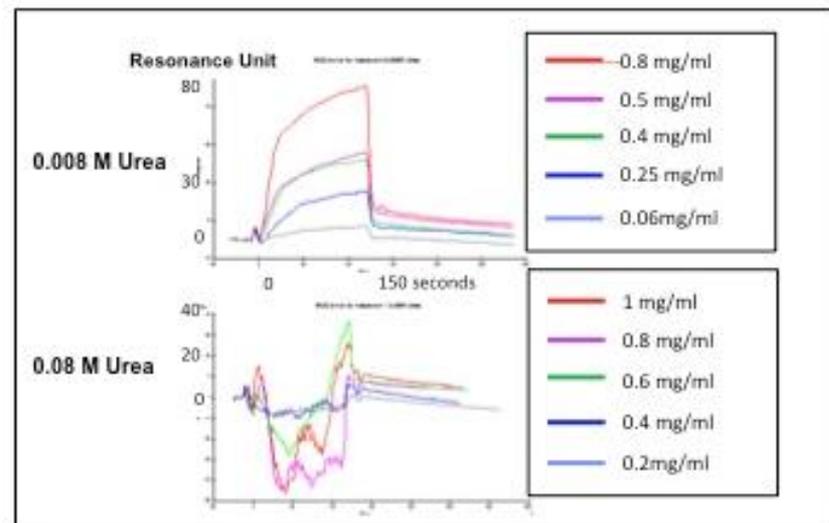


Fig.2. Interaction analysis between MD-2 and Habanori polysaccharides by Biacore

NMR 共用プラットフォーム 特定課題利用
利用報告書

申請番号	PF020	課題受付番号	PF15-100-008
実施機関名	高知大学		
実施部署名	教育研究部総合科学系黒潮圏科学部門・医学部分子細胞生物学		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 富永 明
実施部署所在地	〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮 高知大学医学部分子細胞生物学		
利用課題名	藻類多糖体による TLR4 依存的アレルギー反応抑制機構の解明		
本課題の概要・目的	<p>フコイダン、アルギン酸、ヒトエグサ、アオサ、アオノリ、ハバノリなどの藻類多糖体の中でハバノリ多糖体のみがマウスの塩化ピクリルに対する遅延型アレルギー反応を有意に抑制した。しかもこの抑制はTLR4（自然免疫受容体 toll-like receptor 4）が野生型の場合のみ有効であり、TLR4の細胞質部分に突然変異がありシグナル伝達のできないマウスでは抑制効果がなかった。アレルギー制御に関与すると予想されているマスト細胞で産生されている硫酸多糖体ヘパリンでも同様にTLR4依存的な抑制を示した。硫酸多糖体は炎症の場に白血球を誘導するケモカインや接着因子に結合することが知られ、硫酸基の位置の重要性も指摘されている。しかし、TLR4との関連は未解明である。そこで本研究では種々の藻類多糖体の構造をアレルギー抑制との関連でNMRの多変量解析で解明すると共に、TLR4と硫酸多糖との相互作用の解明を試みるものである。TLR4は二量体として炎症のシグナル伝達をすることが予想されているが、ハバノリ多糖体やヘパリンは炎症抑制のシグナルを伝えるような複合体を膜上で形成する可能性がある。そこで、本研究はTLR4と会合してシグナル伝達に関与すると考えられているMD-2とTLR4を試験管内で合成し、藻類多糖体との関係を溶液中でNMRを用いて解析することを目的としている。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成 27 年 10 月 2 日 ～ 平成 27 年 11 月 4 日 総利用日数：22 日 当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由)</p> <p>TLR4 と複合体を形成する MD-2 が可溶化する条件を探したが、8 M 尿素の存在下でないと可溶化しなかった。そこで、この条件で Biacore センサーチップに Ni²⁺ を介したキレート作用で固定した His-tag 付加 MD-2 への藻類多糖体の結合試験を行った。この時、標準緩衝液 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 μM EDTA, 0.05% Surfactant p20, PH7.4) では MD-2 とハバノリ多糖、フコイダン、ヘパリンが結合した。この際、今回新たに大量発現していただいたシグナルペプチドのないマウス MD-2 を使用した。MD-2 はリポ多糖の脂肪酸結合部位を有することが報告されているが、多糖体との結合を確認できたことは非常に重要である。しかも、多糖体の MD-2 との結合はこれら多糖体の種類により異なっていた。しかし、結合を解析する緩衝液に 80 mM 以上の尿素を加えると、結合はするものの結合の様態が変化するので、NMR での解析は行わなかった。</p>		
利用施設	立体構造解析	・発現確認 : 利用回数 1 回	
理化学研究所	パイプライン	・大量調製 : 利用回数 1 回	

その他の 利用施設		
成果の 概要	実施内容	<p>フコイダン、アルギン酸、ヒトエグサ、アオサ、アオノリ、ハバノリなどの藻類多糖体の中でハバノリ多糖体のみがマウスの塩化ピクリルに対する遅延型アレルギー反応を有意に抑制した (Fig. 1)。しかもこの抑制は TLR4 (自然免疫受容体 toll-like receptor 4) が野生型の場合のみ有効であり、TLR4 の細胞質部分に突然変異がありシグナル伝達のできないマウスでは抑制効果がなかった (Fig. 1)。今回新たに大量発現により調整していただいたシグナルペプチドのないマウス MD-2 を使用してフコイダン、アオサ、ハバノリの藻類多糖体との結合試験を行った。His-tag を付加してある MD-2 を 8 M 尿素の存在下で、Biacore センサーチップに Ni²⁺ を介したキレート作用で固定した。この時、標準緩衝液 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 μM EDTA, 0.05% Surfactant p20, PH7.4) で多糖体との結合を確認できたことは非常に重要である。しかも、多糖体の MD-2 への結合はこれら多糖体の種類により異なっていた。</p> <p>しかし、MD-2 とハバノリ等の多糖体結合を解析する緩衝液に 80 mM 以上の尿素を加えると、結合はするものの結合の様態が変化するので、NMR での解析は行わなかった。8 M の尿素存在下でも MD-2 とハバノリ等の多糖体の結合は観察されたが、上述の標準緩衝液と同じレベルの結合は観察されなかったことから今回は NMR の解析を断念した。Fig. 2 に 8 mM 尿素と 80 mM 尿素を加えた場合の MD-2 とハバノリ多糖体の結合のセンサーグラムを示す。これから判断すると、尿素がハバノリ多糖体と MD-2 の結合を変化させていることが推測される。</p>
	本課題により得られた成果と当初目標との比較	<p>今回新たに大量発現により調整していただいたシグナルペプチドのないマウス MD-2 とフコイダン、アオサ、ハバノリの藻類多糖体との結合は、Biacore では確認できたものの、高濃度尿素の存在下では MD-2 と多糖体の結合様式が変化していることが予想されたので可溶化状態での NMR は断念した。</p> <p>しかし、His-tag を付加してある MD-2 を 8 M 尿素の存在下で、Biacore センサーチップに Ni²⁺ を介したキレート作用で固定し、標準緩衝液で海藻多糖体との結合が解析できたことで、MD-2 がリポ多糖の脂肪酸に結合するだけでなく、水溶性の多糖体にも結合することが判明したので、TLR4 を介するシグナル伝達を考える上で、多糖体がこのシグナルの強度を制御する可能性が示唆された。これは、我々が得ている海藻の多糖体の種類が様々な程度に TLR4 を介するシグナルを調節することを予想させる。</p> <p>従って、当初の目的は達せられなかったが、フコイダン、アオサ、ハバノリの藻類多糖体と MD-2 が結合することが判明し、NMR の新たな手法の開発につながる結果が得られた。この機会を与えて下さったことに感謝します。</p>
	成果発表	

	今後の展開	MD-2 を Biacore センサーチップに Ni ²⁺ を介したキレート作用で固定した場合に MD-2 と藻類多糖体の結合が観察できた。このように試験管壁あるいはビーズの表面に MD-2 を Ni ²⁺ を介したキレート作用で固定すれば、標準的な緩衝液で、高濃度の尿素を使用することなく NMR の測定が可能なが予測できたので、今回は断念したが、この方法は、可溶化しにくい蛋白質と他の分子との相互作用の解析に利用できると思われる。
社会・経済への波及効果の見通し	MD-2 のような溶解性の低い蛋白質を Ni ²⁺ を介したキレート作用で固定し、様々な分子との結合状態を NMR で解析することが可能な方法を開発することができれば、TLR4 のような難溶性で免疫系を調節する作用の非常に強い分子の解析ができるようになると思われる。もしそうなれば、海藻多糖体のような分子の利用の妥当性が NMR で予測可能となり医学分野で大きな貢献ができると思われる。課題担当者はスピルリナの複合多糖体がヒト大腸ポリープ由来の上皮細胞の傷害を TLR2 及び、TLR4 を介するシグナルで大腸上皮細胞に IL-22 産生を誘導することにより修復することを見いだしているので、大変有効な分子が海藻等の多糖体から見つかる可能性が大きいと考えている。この分野で NMR の技術開発の促進を期待するものである。	
利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望	タンパク質の発現方法をいくつか試せるようにしていただけると、非常に有用であると思いました。しかし、不溶性蛋白質でも尿素等の存在下で Ni ²⁺ を介したキレート作用で固定することで、新たな利用が可能であることが分かり、非常に重要なきっかけが得られたと思っています。大量発現をして下さった皆様に感謝します。	
今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待	難溶性蛋白質をうまく利用できるよう、人工細胞膜やキレート作用で固定する等して、解析できる蛋白質を増やすことができれば、NMR の利用が大いに進展すると思いました。 今後の展開を期待して、お礼とさせていただきます。	
成果公開延期の希望の有無	() あり : (○) なし 「あり」の場合理由 :	
その他		