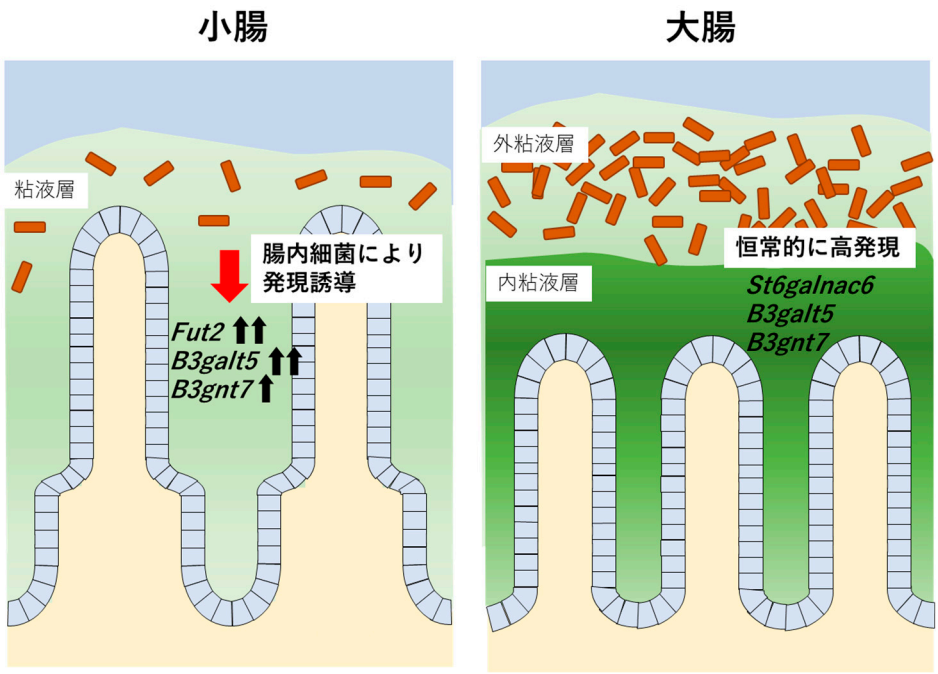
139　腸管上皮細胞における糖鎖修飾機構の解析	奥村　龍

【目的】消化管においては、ムチンで構成される粘液層を中心とした粘膜バリアが消化管粘膜を覆い、体外から侵入する微生物や常在する腸内微生物叢の腸管組織への侵入を防止している。そのような粘液層を構成するムチンならびに、近年我々がバリア分子として同定した Lypd8 の機能には、蛋白に付加される糖鎖が重要である。小腸上皮細胞における蛋白の糖鎖修飾については、フコースに代表される一部の糖鎖の修飾が腸内細菌によって誘導されることが明らかとなっているが、どのような糖鎖がどのような腸内細菌で誘導されるのか？小腸と大腸ではそのメカニズムが異なるのか？など、腸管上皮細胞における糖鎖修飾機構のメカニズムはほとんど明らかとなっていない。そのため、本研究では腸内細菌によって腸管上皮細胞で誘導される糖転移酵素の発現を解析した。

【方法】SPF マウスと無菌（GF）マウスのそれぞれ雄、雌から小腸上皮細胞、大腸上皮細胞を単離し、それぞれの上皮細胞集団から RNA を抽出した後、次世代シークエンサーを用いた RNA-sequencing（RNA-seq）により、それぞれの上皮細胞集団における遺伝子発現を網羅的に解析した。

【結果】RNA-seq 解析により、全サンプルにおいて発現レベルを示す FPKM 値が 0.1 以上の糖転移酵素をコードする 134 の遺伝子を対象に、SPF マウスと GF マウスでの発現レベルの違いを解析した。その結果、大腸上皮においては、雄、雌共に 2 倍以上の発現変化がある糖転移酵素遺伝子は認められなかったが、小腸上皮おいては、これまで腸管上皮細胞による発現誘導されることが報告されている *Fut2* 以外に、*B3galt5*、*B3gnt7*、*B3gnt5* などの計 11 つの遺伝子が、雄、雌の平均値で、SPF マウスで発現が 2 倍以上高く、小腸上皮おいてはそれらの遺伝子が腸内細菌によって誘導されることが示唆された。また SPF マウスの小腸と大腸での各糖転移酵素の発現レベルを比較すると、*St6galnac6*、*St6gal1*、*B3galt5*、*B3gnt7* などの遺伝子が大腸において恒常的に高発現していることが明らかとなった。今後それらの糖転移酵素遺伝子が小腸ではどのようなメカニズムで腸内細菌により発現誘導されるのか、さらには遺伝子欠損マウスを用いて、それらの糖転移酵素によって付加される糖鎖が腸管内でどのような機能を持つのかについて解析を進めていく。

腸管上皮細胞における糖転移酵素遺伝子の発現



139. 腸管上皮細胞における糖鎖修飾機構の解析

奥村　龍

大阪大学 大学院医学系研究科 免疫制御学

Key words：腸内細菌叢，腸管上皮細胞，糖鎖修飾，粘膜バリア

緒　言

内なる外といわれる腸管には他の臓器と異なり、食物由来の外来異物や病原性細菌を含む多数の腸内微生物が存在する。そのため、共生する腸内微生物から腸管組織守り、またそれらに対する過剰な免疫応答を回避するために、腸管上皮細胞によって構築される多種多様な生体防御機構（粘膜バリア）が存在する。腸管上皮によって形成される粘膜バリアは化学的バリアと物理的バリアの二つに大別される。化学的バリアには、ディフェンシンファミリー分子などの抗菌分子が含まれる。一方で物理的バリアには、上皮細胞を覆う粘液層、上皮細胞表面の糖衣、細胞間接着装置である密着結合と接着結合が含まれる。特に夥しい数の腸内細菌が存在する大腸においては、物理的バリアの一つである分厚い粘液層が大腸上皮を覆い、腸内細菌と大腸上皮を分け隔てている。粘液層や糖衣などの物理的バリアの機能に不可欠とされるのが、ムチン分子などの腸管上皮細胞に発現する糖タンパク質に付着する大量の糖鎖である。我々はこれまで大腸粘膜バリアに関連する新規分子として、Ly6／Plaur domain containing 8（Lypd8）というGPIアンカー型タンパク質を同定し、この分子が腸内細菌の中で特に大腸菌などの有べん毛細菌の腸管上皮への侵入を抑制し、腸管炎症を防止していることを明らかにした［1］。さらにこの分子は、高度にN型糖鎖修飾される糖タンパク質であり、この分子機能に糖鎖が重要であることを明らかにしているが、どういった糖鎖構造が重要であるかについてはこれまで明らかになっていない。

糖タンパク質の糖鎖構造を決定する最重要因子が糖鎖をタンパク質に付加する糖転移酵素である。糖転移酵素の発現は、細胞各々によって異なり、同じアミノ酸配列でも発現する細胞によって糖タンパク質の糖鎖構造は異なるとされている。近年後藤、清野らはマウス小腸上部では腸管上皮細胞の膜タンパク質のフコース付加（フコシル化）が見られないのに対し、小腸下部では糖転移酵素の一つであるFucosyltransferase 2（Fut2）の発現とともに、腸管上皮膜タンパク質のフコシル化が見られることを報告している［2］。さらに同報告では、小腸上皮におけるFut2の発現が、ある種の腸内細菌依存的であり、腸内細菌によって誘導される膜タンパク質のフコシル化が生体防御に重要であることを明らかにしている。このように、腸内細菌が腸管上皮の糖鎖発現に影響を与え、その結果として粘膜バリア機能に影響を与えることが少しずつ明らかとなっているが、その詳細なメカニズムは依然として不明である。以上のことを明らかにする足掛かりとして、本研究では腸内細菌によって腸管上皮細胞で誘導される糖転移酵素の発現を解析した。

方　法

日本クレア株式会社より購入したC57BL/6N系統のSPFマウスと無菌（GF）マウスの雄、雌各1匹ずつより小腸、大腸を剖出。小腸は中央で切離し、口側を小腸上部、肛門側を小腸下部とした。それぞれの小腸上部、小腸下部、大腸の内容物をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄した後、37℃のEDTA（5mM）を含むハンクス緩衝塩溶液（HBSS）中で振盪させ、遊離した上皮細胞を含む上清を回収した。上清中に含まれる上皮細胞を遠心分離にて沈降させた後、PBSで再度細胞を洗浄し、再び細胞を沈降させ、得られた腸管上皮細胞をTRI reagent®（Sigma-aldrich）で溶解し、total RNAを抽出した。Illumina hiseq 2500、Illumina Casava1.8.2 softwareを用いて、抽出したRNAのシークエンシングを行い、得られたシークエンスをソフトウェアTopHat、Bowtie2、SAMtoolsで解析し、各遺伝子の発現量をThe fragments per kilobase of exon per million mapped fragments（FPKMs）として数値化した。

結　果

1. SPF マウスと無菌マウスの糖転移酵素遺伝子の発現量比較

全遺伝子の中で発現量が FPKM0.1 以上の遺伝子を解析対象とし、その中で計 134 の糖転移酵素遺伝子について発現量を解析した。

まず大腸上皮における糖転移酵素の発現を調べたところ、SPF マウスと GF マウスで 2 倍以上の発現変化を認める糖転移酵素遺伝子は認められず、大腸においては腸内細菌により発現が誘導される糖転移酵素は同定できなかった。一方で小腸においては、SPF／GF で雄、雌の平均が 2 倍以上の発現上昇を認める糖転移酵素が存在し、特に小腸下部においては、これまで腸内細菌によって発現誘導されることが報告されている *Fut2*（SPF／GF fold change : 20.22）以外にも、*B3galt5*（SPF／GF fold change : 34.35）、*B3gnt7*（SPF／GF fold change : 3.84）、*B3gnt5*（SPF／GF fold change : 3.04）など、小腸下部にて腸内細菌によって 2 倍以上発現が亢進する糖転移酵素遺伝子が計 10 個同定された。

2. SPF マウスにおける大腸と小腸下部の糖転移酵素遺伝子の発現量比較

大腸と小腸における糖転移酵素遺伝子の発現を比較すると、上述した小腸下部で腸内細菌による誘導される糖転移酵素遺伝子の多くが、小腸に比べ大腸上皮において発現が高く（*Fut2* : 6.25 倍、*B3galt5* : 14.20 倍、*B3gnt7* : 10.17 倍（大腸／小腸下部））、特に *St6galnac6* は大腸で著しく発現が高いことが明らかとなった。

表．小腸下部において腸内細菌によって誘導される糖転移酵素遺伝子

遺伝子名	発現比 SPF/GF(小腸下部)	発現比 SPF/GF(大腸)	発現比 大腸/小腸下部（SPF）	FPKM値 (小腸下部(SPF))	FPKM値 (小腸下部(GF))	FPKM値 (大腸(SPF))	FPKM値 (大腸(GF))
B3galt5	34.35	1.37	14.20	8.209	0.239	116.6	85.127
Fut2	20.22	1.20	6.25	10.505	0.5195	65.7055	54.7245
B3gnt7	3.84	1.29	10.17	24.9795	6.501	253.9795	197.3835
B3gnt5	3.04	1.30	7.10	2.1565	0.7085	15.321	11.7425
Gcnt1	2.54	0.63	2.04	4.1185	1.6225	8.4145	13.4
Chst12	2.78	1.53	0.20	1.7705	0.637	0.348	0.227
A4gnt	2.80	1.47	6.96	2.1805	0.7785	15.185	10.315
St6galnac6	2.35	1.13	373.51	0.849	0.3615	317.1105	280.6095
St3gal3	2.03	1.12	12.34	2.123	1.0435	26.1955	23.2925
Alg8	2.03	1.14	0.45	19.3365	9.535	8.671	7.6305

小腸下部におけるSPFマウスとGFマウスの発現比が2倍以上であった糖転移酵素遺伝子とその発現比（SPF vs GF、大腸 vs 小腸下部）ならびにFPKM値（小腸下部、大腸）を示す。

考　察

SPF マウスと GF マウスの小腸および大腸の上皮細胞の遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に解析することで、特に小腸において腸内細菌によって発現が誘導される糖転移酵素が新たに同定された。一方で、計画時に予測していた大腸における腸内細菌による糖転移酵素の発現誘導は認められなかった。しかしながら、粘膜バリア機能に重要とされる *Fut2* も大腸で発現が高いものの、大腸では腸内細菌によって発現が誘導されておらず、今回新たに同定した糖転移酵素もまた *Fut2* と同様に、小腸では腸内細菌で発現が誘導され、大腸ではさらに高い発現が認められることから粘膜バリアに重要である可能性があると考える。特に *B3galt5* は腸管上皮の抗菌分子の発現を誘導するインターロイキン（IL）-22 により発現が誘導されることが報告されており［3］、粘膜バリア機能に関係していることが考えらえる。今回新たに腸内細菌によって発現誘導されることが明らかとなった糖転移酵素のほとんどは、*in vitro* において酵素活性は同定されているものの、生体内での機能は不明である。今後は CRISPR/Cas9 システムを用いてそれぞれの糖転移酵素の欠損マウスを作製し、その表現型を解析することで、特に腸管におけるそれらの機能を明らかにしていく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センターの奥崎大介氏である。

文　献

1） Okumura R. et al. Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. Nature. 2016 Apr 7;532(7597):117-21. doi：10.1038/nature17406. Epub 2016 Mar 30.

2） Goto Y. et al. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. Science. 2014 Sep 12;345(6202):1254009. doi：10.1126/science.1254009. Epub 2014 Aug 21.

3） Muñoz M. et al. Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. Immunity. 2015 Feb 17;42(2):321-331. doi：10.1016/j.immuni.2015.01.011. Epub 2015 Feb 10.