

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究代表者

川寄 敏祐

(京都大学大学院薬学研究科 教授)

「糖鎖シグナルを介する生体防御システムの解析」

1. 研究実施の概要

糖鎖シグナルを介する生体防御システムの解析に関する平成10年度の研究は、平成9年度の研究成果のうえにいくつかの興味深い新しい発見があり、全体として順調に進行している。Aグループでは、マンナン結合タンパク質を用いた遺伝子治療による顕著なガン抑制作用(MBP依存性細胞性細胞障害作用、MDCC)の発見、MBP刺激によるヒト多形核白血球からの活性酸素の放出現象の発見、ウシ血清コングルチニンの遺伝子発現機構の解析などの成果をあげた。BグループではSO₃-→6GlcNAc:β1,4ガラクトース転移酵素の発見及び精製に成功した。また、IL-2のレクチン活性の生理的意義を解明する手掛りを得た。Cグループではカプトガニ顆粒細胞や血漿中に含まれるレクチンや抗菌性ペプチドを精製し、機能解析を行うとともに構造解析を行った。本研究課題は最近特に注目されている先天性免疫機構の重要な一分野をなすものであり次年度もさらに新しい展開が期待される。

2. 研究実施内容

(1) 哺乳動物の生体防御グループ

1) マンナン結合タンパク質依存性細胞性細胞障害作用の発見

京大グループにより血清中に見出されたマンナン結合タンパク質(MBP)は、マンノース、N-アセチルグルコサミンに特異的に結合する糖結合タンパク質である。本グループは、MBPの補体依存的細胞障害性作用の研究を進める途中で、MBPはこれまでに知られていない新しい生体防御因子として作用機作を持つことを発見した。すなわち、生体を構成する正常細胞は通常シアル酸を含む複合型糖鎖に覆われており、MBPとは反応しない。一方、ヒト結腸癌細胞SW1116株細胞などある種のガン細胞では、MBPと結合することが知られている。そこで、SW1116株細胞をヌードマウスの皮下に移植し、平成9年度の研究で作成したMBP組換えワクシニアウイルスを投与し、*in vivo*でのガン抑制作用を調べた。その結果、予想以上に顕著ながん細胞増殖抑制が観察された。すなわち、投与後2週間でヌードマウス背中に形成されたガン組織はほとんど完全に消滅した。当

初、このガン増殖抑制作用は補体依存的細胞障害性作用によるものと考えた。しかしながら、その後の研究により、このガン細胞の増殖抑制作用は、補体系を介さない他の機構によることが明らかとなった。そこで我々はこの MBP の作用を MBP-dependent cell-mediated cytotoxicity、MBP 依存性細胞性細胞障害反応 (MDCC) と名付けた。MDCC は、その分子機作については、現在 in vitro での MDCC 解析系を確立し解明中であるが、細胞障害性 T 細胞、マクロファージ、好中球などの免疫系細胞の関与により、細胞障害性エフェクター分子が放出され、その作用でガン細胞の増殖が抑制されるものと考えられる。さらに、本レクチンの臨床応用がデンマーク、イギリスなどで進められようとしているが、MDCC 機構を介するガン抑制作用の発見は、ガンの遺伝子治療にも道を拓くものと期待されている。

2) MBP はヒト多形核白血球を刺激し活性酸素を放出する事を見いだした

MBP は、多形核白血球からの走化因子の産性を誘導することにより多形核白血球の凝集し、凝集部において活性酸素を発生させることにより、細胞障害性作用を持つことを見いだした。この多形核白血球の凝集は、PAF (血小板活性化因子) のアンタゴニストである TCV-309 で処理すると用量依存的に阻害された。この活性酸素の放出は多形核白血球の関与する MDCC 反応と考えられる。

3) 54 番目のアミノ酸グリシンをアスパラギン酸に変異した MBP (G54D MBP) は血清中で早い代謝回転を持つことを見いだした。

G54D MBP を持つヒトはオプソニン不全症とよばれ、血液中の MBP 濃度が著しく低下している。この血中 MBP 濃度の低下の理由については、これまで全く明らかにされていない。筆者らは、まず、ヒト野生型 MBP と G54D MBP のマウス血液中での分解速度をアイソトープ標識した MBP を作成して測定した。その結果、G54D MBP は野生型 MBP の約 2 倍の速度で血液中から消失する事が判明した。

4) ウシ血清コングルチニンの遺伝子発現機構の解析

ウシ血清コングルチニンの遺伝子プロモーター領域に新規な正の発現調節エレメントの存在を明らかにすることができた。

5) マンナン結合タンパク質遺伝子欠損マウスの作成

MBP 遺伝子欠損マウスの作成を進めており、これに成功したことを確認した。

(2) 糖鎖シグナルと疾病グループ

1) L-セレクチンのリガンド糖鎖合成に関わるガラクトース転移酵素に関する研究

リンパ球のホーミングに関わる L-セレクチンの認識糖鎖である硫酸化シアリル LeX 抗原の合成に関わる GlcNAc-6-O-硫酸: β 1,4 ガラクトース転移酵素を発見し、その調製法を特許申請した。また、本酵素の精製をすすめて、UDP-ヘキサ

ノールアミン-Sepharose、アシアロ-ガラクト-オボムチン-Sepharose クロマトグラフィー等により数万倍まで精製した。

2) 糖鎖シグナルを介した糖タンパク質の細胞内輸送機構に関する研究

トランスゴルジネットワーク (TGN) から apical 側に向かう輸送小胞の膜タンパク質、VIP36 が Man6~9GlcNAc2-peptides を認識する動物レクチンであることを明らかにした。

3) サイトカインのレクチン活性とその生理的意義

インターロイキン 1 β が GPI アンカーのグリカン部と結合することを見い出すと共にこのレクチン活性が細胞増殖の制御に関与していることを明らかにした。また、IL-2 は高マンノース型糖鎖を認識し IL-2 依存的細胞増殖を調節していることを明らかにした。

(3) 無脊椎動物の生体防御グループ

1) タキレクチン-3 の構造機能解析

タキレクチン(TL)-3 は血球の主要レクチンである TL-1、TL-2 と同様にカプトガニの大顆粒中に局在していることを明らかにした。また、各組織の mRNA から作製した cDNA を template とした PCR によって TL-3 の発現を調べたところ、血球以外に心臓及び筋肉においても発現していることが判明した。

2) カプトガニ血漿 C-反応性タンパク質 (CRP) に関する研究

カプトガニ血漿より、リガンドに対するアフィニティーの違いにより CRP-、CRP-2、CRP-3 3種の溶血因子を精製した。CRP-2 と CRP-3 は共にシアル酸特異的レクチンであり、CRP-2 は莢膜にポリシアル酸を持つ大腸菌 *E. coli* K1 を強く凝集した。

3) アセチル基を認識する血漿レクチンの構造機能解析

カプトガニ血漿より、アセチル基を認識する 2種の強い赤血球凝集活性と細菌凝集活性をもつレクチンを精製した (TL-5A、TL-5B と命名)。TL-5 は、フィブリノーゲン(β 、および γ 鎖) や ficolins に高い配列類似性を示した。

4) キチン結合性抗菌ペプチドの機能と構造解析

カプトガニ顆粒細胞から 3種の抗菌性ペプチド、タキスタチン A、B、C を精製した。タキスタチン C は、細胞壁の主にキチンを認識しており、カプトガニの抗菌性ペプチドの中で最も強い溶血活性を示した。タキスタチン C は、C 末端に特徴的な、両親媒性の β シート構造をとっていることが推定され、これが抗菌活性に重要な役割を果たしていると思われた。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Terayama, K., Seiki, T., Nakamura, A., Matsumori, K., Ohta, S., Oka, S.,

- Sugita, M. & Kawasaki, T. Purification and characterization of a glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope on glycoproteins from rat brain. *J. Biol. Chem.*, 273, 30295-30300 (1998)
- Kawasaki, N., Satonaka, M., Imagawa, M., Naito, H. & Kawasaki, T. Functional characterization of the bovine conglutinin promoter : Presence of a novel element for transcriptional regulation of a C-type mammalian lectin containing a collagen-like domain. *J. Biochem.* 124, 1188-1197 (1998)
- Ma, Y., Uemura, K., Oka, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, N. & Kawasaki, T. Antitumor activity of mannan-binding protein in vivo as revealed by a virus expression system: Mannan-binding protein dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 371-375 (1999)
- Seiki, T., Oka, S., Terayama, K., Imiya, K. & Kawasaki, T. Molecular cloning and expression of a second glucuronyl transferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 182-187 (1999)

他 11 件