

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究代表者

川崎 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

哺乳動物の生体防御グループではマンナン結合タンパク質依存的細胞性細胞障害作用 (MDCC) の機構解析をすすめ、本活性のin vitroアッセイ系を確立すると共に、開始因子となる糖鎖を単離した。また、マクロファージのガラクトース特異的レクチンの誘導に古典的MAPキナーゼ系路の関与を明らかにした。糖鎖シグナルと疾病グループでは、Gal: 3 硫酸転移酵素のクローニングに成功した。また、IL-2のIL-2受容体への結合にIL-2の有するレクチン活性が重要な役割を持つことを示した。無脊椎動物の生体防御グループでは、カプトガニ顆粒細胞表面に存在するToll-like receptor、LPS認識蛋白質および新規の表面抗原の構造機能解析を行うとともに、LPSシグナルを伝達すると考えられるG蛋白質共役受容体のクローニングを行った。

2. 研究実施内容

<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的細胞性細胞障害作用の機構解析

本グループは、最近、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、MBP組換えワクシニアウイルスを投与し、in vivoでのがん (SW1116細胞) の抑制作用の検討を試みたところ、顕著ながん細胞増殖抑制が観察された。当初、このがん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、このがん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。そこでこのMBP組換えワクシニアウイルスによるがん細胞増殖抑制の現象をMBP-dependent cell-mediated cytotoxicity、MBP依存的細胞性細胞障害反応 (MDCC) と名付けた。現在in vitroでのMDCC解析系を確立し解明を進めている。MBP存在下に、ある種のマクロファージ系細胞をがん細胞と共培養すると、がん細胞が顕著な増殖抑制作用を受けることを見いだ

した。この抑制作用はある種の可溶性因子により媒介されており、現在この因子の同定を進めている。

2) SW1116細胞表面のMBPリガンドの解析

SW1116細胞のトリトンX-100抽出物をプロナーゼ消化して得られる糖ペプチドをゲル濾過にかけると高分子画分にMBPリガンドが得られた。この糖ペプチドよりヒドラジン分解により糖鎖を遊離させ、これをPA化したのち、MBPを固定化したカラムにかけると、一部の糖鎖がカラムに結合した。このリガンド糖鎖画分は従来報告されたことのない高分子糖鎖であることが判明し、現在その構造解析を進めている。なお、この画分には MDCC開始因子としての活性が確認されている。

3) マクロファージレクチンに関する研究

先天性免疫における主役の一つであるマクロファージの細胞表面には様々な異物の取り込みに関与する受容体が存在する。本グループでは腹腔マクロファージにガラクトースに特異的な取り込みを見出し、本レクチン遺伝子のクローニングに成功している (Li, M., et al. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 11295-11298)。本年度は本レクチンの発現誘導の機構について調べ、単球形細胞の分化に伴い誘導され、その発現には古典的MAPキナーゼ系路が関与していることを明らかにした。

<糖鎖シグナルと疾病グループ>

1) サイトカインの生理機能発現における糖鎖認識の重要性に関する研究

サイトカインの糖鎖認識活性は、糖結合特異性から現在、3つのグループに分類されている。平成12年度にはIL-2はIL-2受容体 α -サブユニットの高マンノース型糖鎖と特定のペプチド鎖を二重に認識し、この結合がトリガーとなって高親和性の複合体、IL-2-IL-2受容体 α 、 β 、 γ を形成し、Jak1, Jak3, Srcファミリーチロシンキナーゼ群をリン酸化して細胞シグナリングが増幅されてCTLL-2細胞が増殖することを見出した。

2) 大腸上皮のガレクチン-4のリガンドの同定およびそのリガンドの合成に関わる硫酸転移酵素に関する研究

ガレクチン-4がヒト大腸上皮の基底膜側に局在し、癌化に伴って減少すること、 SO_3^- 3Gal1 β 1 3GalNAcを特異的に認識することを明らかにし、また、 SO_3^- 3Gal1 β 1 3GalNAc合成に特異的に関わるGal : 3硫酸転移酵素を新たにクローニングした。目下、特許出願準備中である。このGal : 3SulT (GP3ST-2) は486アミノ酸からなり、一ヶ所のN-結合型糖鎖の付加部位を有している。N末端側に膜結合ドメインをもつ2型膜タンパク質である。GP3ST-2はセレブロシド合成酵素 (CST) と33%、GP3STと39%のアミノ酸配列の一致が見

られた。

3) 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

当グループでは輸送小胞の膜タンパク質、VIP36がマンノース残基7個以上を含む高マンノース型糖鎖を認識する細胞内レクチンであることを明らかにしている。VIP36に対するポリクローナル抗体を作製し、電子顕微鏡でVIP36がERから細胞表面まで広く分布していることを確認した。さらにMDCK細胞よりVIP36の高発現株および糖結合能欠損株を単離し、MDCK細胞の主要分泌糖蛋白であるクラスタリンの糖鎖および分泌機構を解析した。また、MDCK細胞分泌糖蛋白質及び膜糖蛋白質の糖鎖構造解析の結果、GalNAc β 1-4GlcNAc残基結合N-グリカンが分泌糖蛋白質に特異的に存在することを見出した。

<無脊椎動物の生体防御グループ>

1) カプトガニToll-like receptorの構造機能解析

LPS認識に關与するToll類似受容体がカプトガニ顆粒細胞にも存在するものと考え、既知のToll類似受容体cDNAに関する情報をもとにそのスクリーニングを行った結果、約3.2 kbのORFを含むクローンが得られた。全長1058アミノ酸残基からなるこのタンパク質は、Tollと同様にN末端側にロイシンリッチリピートとシステインリッチ、そして膜貫通領域、さらにC末端側にToll相同領域を含んでいた。

2) ヘモシアニンの自然免疫系における役割の解明

甲殻類や昆虫のフェノールオキシダーゼ(PO)系やカプトガニの体液凝固系は、リポ多糖やbeta-1,3-グルカンに存在する特有の分子パターンを認識して生体防御反応を起動させる。甲殻類や昆虫のPO前駆体(proPO)は、proPO活性化酵素と呼ばれるセリンプロテアーゼによって限定分解を受け、活性化する。今回、カプトガニのヘモシアニンが、その体液凝固プロテアーゼの一つである凝固酵素と反応して、PO活性を発現することを見出した。

3) カプトガニ顆粒細胞の脱顆粒反応の解析とLPS受容体のクローニング

種々のカプトガニ生体防御因子群に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーにより顆粒細胞の表面抗原を検索した結果、体液凝固カスケードの開始因子であり、LPSと特異的に結合してプロテアーゼ活性を発現するFactor Cが細胞表面にも存在していることが判明した。Factor Cと固定化したリポ多糖との解離定数をBIAcoreにより解析した結果、27nMと非常に高い親和性を示し、Factor Cが顆粒細胞のLPS認識の初期過程で機能していることが推定された。

4) アセチル基を認識する血漿レクチンの構造機能解析

表面プラズモン共鳴センサーにGlcNAc-BSA(15-25 mol GlcNAc/mol)を固

定化し、TLs-5の親和性を速度論的に解析した。TL-5A、TL-5BはGlcNAc-BSAに対してそれぞれ異なる結合パターンを示し、TL-5AはTL-5Bに比べて約8倍速いリガンドへの結合を、TL-5BはTL-5Aに比べて約3倍遅いリガンドからの解離を示した。また、カプトガニ顆粒細胞由来のGlc/GalNAcに結合特異性をもつTL-2と比較したところ、TL-5Aのリガンドに対する結合速度はTL-2と同程度であったが、リガンドからの解離速度はTL-2の約5倍、TL-5Bの解離速度はTL-2の約14倍遅い値を示した。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Oka, S., Terayama, K., Imiya, K., Yamamoto, S., Kondo, A., Kato, I. and Kawasaki, T. The N-glycan acceptor specificity of a glucuronyltransferase, GlcAT-P, associated with biosynthesis of the HNK-1 epitope. *Glycoconjugate J.*, 17, 877-885, (2000)

V-Jensen, T., Sorensen, E.S., Jensen, U.B., Schwaeble, W., Kawasaki, T., Ma, Y., Uemura, K., Wakamiya, N., Jensen, T.G., Takahashi, K., Ezekowitz, R.A., Thiel, S. and Jensenius, J.C. Recombinant expression of human manna-binding lectin. *Int. Immunopharm.*, 1, 677-687 (2001)

Ikeda, A., Masaki, M., Kozutsumi, Y., Oka, S. and Kawasaki, T. Identification and characterization of functional domains in a mixed lineage kinase LZK. *FEBS Lett.*, 488,190-195(2001)

Katsuyama, R., Morioka, A., Oka, S. and Kawasaki, T. Expression of macrophage asialoglycoprotein-binding protein is induced through MAPK classical pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 1269-1273(2001)

Mitsumoto, Y., Oka, S., Sakuma, H., Inazawa, J. and Kawasaki, T. Cloning and chromosomal mapping of human glucuronyltransferase involved in biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Genomics*, 65(2), 166-173(2000)

Ohtsubo, K., Imajo, S., Ishiguro, M., Nakatani, T., Oka, S. and Kawasaki, T. Studies on the structure-function relationship of the HNK-1 associated glucuronyltransferase, GlcAT-P, by computer modeling and site directed mutagenesis. *J. Biochem.*, 128(2), 283-291(2000)

Kanazawa, T., Nakamura, S., Momoi, M., Yamaji, T., Takematsu, H., Yano, H., Sabe, H., Yamamoto, A., Kawasaki, T. and Kozutsumi, Y. Inhibition of cytokinesis by a lipid metabolite, psychosine. *J. Cell Biol.*, 149, 943-950(2000)

Sun, Y., Taniguchi, R., Tanoue, D., Yamaji, T., Takematsu, H., Mori, K., Fujita, T., Kawasaki, T. and Kozutsumi, Y. Sli 2 (Ypk 1) a homologue of mammalian protein kinase SGK, is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated

signaling pathway of yeast. *Mol. Cell Biol.*, 20, 4411-4119(2000)

Ueda, K., Wiesmuller, K-H., Kienle, S., Jung, G., Tamamura, H., Yamagishi, H., Okumura, K., Walden, P., Suto, T. and Kawasaki, T. An automated prediction of MHC class I-binding peptides based on positional scanning with peptide libraries. *Immunogenetics*, 51, 816-828(2000)

Seko, A., Hara-Kuge, S., and Yamashita, K. Molecular cloning and characterization of a novel human galactose 3-O-sulfotransferase that transfers sulfate to Gal β 13GalNAc residue in O-glycans. *J. Biol. Chem.*, 276, 25697-25704 (2001)

Fukushima, K. and Yamashita, K. Interleukin-2 Carbohydrate recognition of IL-2 modulates CTLL-2 cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 276, 7351-7356(2000)

Suetake, T., Tsuda, S., Kawabata, S., Miura, K., Iwanaga, S., Hikichi, K., Nitta, K., and Kawano, K. Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif. *J. Biol. Chem.*, 275, 17929-17932 (2000)

Nagai, T., and Kawabata, S. A link between blood coagulation and prophenoloxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem.*, 275, 29267-29267(2000)

Kawasaki, H., Nose, T., Muta, T., Iwanaga, S., Shimoshigashi, Y., and Kawabata, S. Head-to-tail polymerization of coagulogen, a clottable protein of the horseshoe crab. *J. Biol. Chem.*, 275, 35297-35301(2000)