

「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

哺乳動物の生体防御グループでは動物レクチンの生体防御における役割に関する研究を進めた。マンナン結合タンパク質(MBP)依存的細胞性細胞障害作用(MDCC)に単球形細胞の関与を明らかにすると共に、開始因子となる糖鎖を単離した。MBPが肝細胞のみならず、腸管上皮細胞において発現することを見出した。また、マクロファージのガラクトース特異的レクチンの新しい機能を明らかにした。さらに、human natural killer (HNK)-1 糖鎖欠失マウスの作成に成功した。興味あることに、本糖鎖は高次神経機能発現に必要で有ることが明らかとなった。糖鎖シグナルと疾病グループでは、細胞のがん化に伴う糖鎖変化を糖鎖特異的な硫酸転移酵素遺伝子を中心に明らかにし、また、糖タンパク質の細胞内輸送への細胞内レクチンの関与、サイトカインが認識する GPI アンカー糖鎖の構造と機能に関する新しい知見を明らかにした。無脊椎動物の生体防御グループでは、カブトガニの抗菌タンパク質であるタキレクチンのX線結晶構造解析を報告するとともに、体液タンパク質であるヘモシアニンが抗菌タンパク質と相互作用することでフェノール酸化酵素に変換するという全く新しい現象を報告した。また、カブトガニ血球の LPS による刺激が G タンパク質を經由していることを見いだした。

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:ヒト結腸がん細胞株 SW1116 を MBP 存在下に、ヒト単球系細胞株 THP-1 と共培養すると、顕著な増殖抑制作用が観察された。この作用は培地中に分泌されるある種の可溶性因子により媒介されること、また、この時、次項に述べる、SW1116 細胞由来の高分子量糖ペプチド画分を加えると、反応は著しく促進することから、がん細胞表面の糖鎖が一連の反応を引き起こしていることが明らかとなった。
- 2) マウス組織におけるMBPの発現:単クローン抗体を用いた組織化学的研究、Western blot および PCR, in situ ハイブリダイゼーションなどにより検討した結果、小腸上皮細胞が強い MBP 発現を示すことを見出した(論文投稿中)。
- 3) ヒトがん細胞表面の MBP リガンドの同定:FITC 標識 MBP のヒト結腸がん SW1116 細胞への結合は ALL などのフコース認識植物レクチンにより強く阻害され、また、抗ルイスB抗体、抗ルイ

ス A 抗体により阻害されたことより、フコース残基の重要が示された。また、細胞膜可溶化物より調製した高分子量の糖ペプチド画分を MBP カラムにかけて得られた MBP 高親和性の糖鎖リガンドはフコース、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミンを主成分とするユニークな長鎖の糖鎖であることが示された。これらの結果は、MBP がマンースをもつ糖鎖を認識対象とするという従来の考えを覆すものである。

- 4) HNK-1 抗原の機能に関する研究: HNK-1 糖鎖の生合成を担う2種類のグルクロン酸転移酵素(GlcAT-P および GlcAT-S) 遺伝子をクローニングした (発表論文2)。 *in vitro* での細胞形質変換実験において HNK-1 糖鎖の発現は細胞に著しい形態変化を引き起こすこと、また、同種細胞の凝集を顕著に阻害することを明らかにした(論文投稿中)。さらに、GlcAT-P 遺伝子欠損マウスを作成し、HNK-1 糖鎖が記憶・学習などの高次脳機能に関与していることを見出した(論文投稿中)。
- 5) ストレス応答細胞内シグナル伝達機構の解析: 新規なプロテインキナーゼをクローニングし Leucine Zipper bearing Kinase (LZK)と名づけ、この分子がストレス応答性の MAP キナーゼを強く活性化することを明らかにしている。本年度の研究では、本酵素遺伝子が3q27にマップされること(発表論文1)。 LZK のロイシンジッパー構造が LZK の多量形成に必要であること(発表論文5) および JNK カスケードのスカフォールドタンパク質である JIP-1 が LZK と特異的に結合すること(発表論文3)などを明らかにした。また、酵母 two-hybrid 法を用いて、膵臓で LZK と相互作用する分子として AOP-1 (anti-oxidant protein-1)の単離に成功した。
- 6) マクロファージレクチンの機能に関する研究: 熊本大学医学部松野教授との共同研究で、ラットの樹状細胞には、当グループが1990年にクローニングにした、ガラクトース、*N*-アセチルガラクトサミンに特異的なマクロファージレクチンが発現しており、本レクチンが樹状細胞の Kupffer 細胞への結合および樹状細胞によるウイルス粒子の取り込みに関与することが示唆された(発表論文7,8)。

<糖鎖シグナルと疾病グループ>

- 1) 大腸癌の悪性度に関わる硫酸転移酵素の同定
 - a) ヒト大腸粘液癌特異的 GlcNAc:→6 硫酸転移酵素(GlcNAc6ST)の同定: ヒト大腸粘液癌に存在して、分化型癌及び正常粘膜には存在しない GlcNAc6ST を GlcNAc6ST-2 と同定した。一方、正常粘膜における GlcNAc6ST 活性は、GlcNAc6ST-3 遺伝子由来で癌部において発現量が低下していることが判った(発表論文10)。
 - b) ヒト大腸スルホムチンの生合成に関与する Gal:→3 硫酸転移酵素(Gal3ST)の同定: ヒト大腸スルホムチンの主要糖鎖は 3'-スルホルイス a 構造をもつ。本糖鎖の 3'-硫酸化に関する Gal3ST 遺伝子を Gal3ST-2 と同定した。また、本酵素の発現低下が癌組織におけるスルホムチンの減少の一因であることを推定した(発表論文13)
- 2) ガレクチン-4 の細胞内局在性の解析: ガレクチン-4 は小腸、大腸に主に発現するレクチンであり、*O*-結合型糖鎖の $\text{SO}_3^- \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha \rightarrow$ を特異的に認識する(発表論文12)。抗ガレクチン-4 抗体を用いて各組織の免疫染色を行った結果、正常粘膜では腸上皮細胞のうち、

腸管腔近傍の細胞の核が強く染色されるのに対し、癌組織では細胞質が染色されることが判った。

- 3) 高マンノース型糖鎖認識細胞内レクチン VIP36 の機能解析: 輸送小胞の膜タンパク質として同定された VIP36 は、細胞内の小胞体、ゴルジ体および原形質膜におよぶ広い領域での存在が明らかとなり、VIP36 は輸送初期のみならず新生糖タンパク質が細胞外に分泌されるまでの過程において関わっていることが示唆された。
- 4) サイトカインが認識する GPI アンカー糖鎖の構造と機能: IL-18 が Glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)アンカー型膜糖タンパク質のグリカン部を認識するサイトカインであることを見出した。また、哺乳動物に共通して GPI アンカー糖鎖の側鎖構造に β -*N*-アセチルグルコサミニルリン酸残基が存在することを明らかにした。また、この β -*N*-アセチルグルコサミニルリン酸残基が *Aeromonas hydrophila* が産生する毒素 Aerolysin の標的となっていることを見出した。

<無脊椎動物の生体防御グループ>

- 1) タキレクチンのX線結晶構造解析: タキレクチンのX線結晶構造解析に成功した。電子顕微鏡観察では、プロペラ状のオリゴマーを形成していることが推測されていたが、今回、解析された結晶中ではモノマーとして存在していた。しかし、結晶学的には4量体が可能であり、生理的条件下ではこのようなオリゴマーを形成してリガンドに対して多価で反応することが期待される(発表論文 19)。
- 2) 抗菌ペプチドによるヘモシアニンのフェノールオキシダーゼへの機能変換: キチン結合性抗菌ペプチド、タキプレシンがヘモシアニンの PO 活性発現を誘導することを見いだした。表面プラズモン共鳴センサーを用いて、結合親和性を速度論的に解析するとともに、化学修飾したタキプレシンを用いて、ヘモシアニンと相互作用するアミノ酸残基を特定した(発表論文 18)。
- 3) *Drosophila* S2 cells を用いたカブトガニ Factor C の LPS 結合ドメインの発現: Factor C の lectin-like ドメインをショウジョウバエ Schneider 2 培養細胞を用いて発現させた。1L の細胞培養から約 4mg の組換えタンパク質が得られた。プロテアーゼ活性部位の Ser を Ala に置換した Factor C 全長の発現を進めている。
- 4) G タンパク質共役型受容体のクローニング: 脱顆粒シグナル伝達系に G タンパク質共役型受容体(GPCR)が関与していることが推定された。今回、GPCR に高度に保存されているアミノ酸配列を参考に PCR プライマーを設計し、プローブを作製して、カブトガニ血球細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、GPCR をコードしている遺伝子のクローンが得られた。
- 5) カブトガニ外骨格を構成するキチン結合タンパク質群の分析: カブトガニ外皮を構成する主要タンパク質分子のうち、特にキチンと結合するタンパク質をキチンアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

3. 研究実施体制

氏名	所属	役職
1) 研究グループ名	哺乳動物の生体防御	
川寄 敏祐	京都大学大学院 薬学研究科	教授
2) 研究グループ名	糖鎖シグナルと疾病	
山下 克子	佐々木研究所	部長
3) 研究グループ名	無脊椎動物の生体防御	
川畑 俊一郎	九州大学大学院 理学研究院	助教授

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

<哺乳動物の生体防御>

- Yamamoto, S., Oka, S., Saito, F., Inazawa, J., & Kawasaki, T., Molecular cloning and genomic analysis of mouse glucuronyltransferase involved in biosynthesis of the HNK-1 epitope. *J. Biochem.*, 131(3), 337-347 (2002)
- Ikeda, K., Hasegawa, K., Masaki, M., Moriguchi, T., Nishida, E., Kozutsumi, Y., Oka, S., & Kawasaki, T., Mixed lineage kinase LZK forms a functional signaling complex with JIP-1, a scaffold protein of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *J. Biochem.*, 130(6), 773-781 (2001)
- V-Jensen, T., Sorensen, E.S., Jensen, U.B., Schwaeble, W., Kawasaki, T., Wakamiya, N., Jensen, T.G., Takahashi, K., Ezekowitz, R.A., Thiel, S., & Jensenius, J.C., Recombinant expression of human mannin-binding lectin. *Int. Immunopharm.*, 1(4), 677-687 (2001)
- Ikeda, A., Masaki, M., Kozutsumi, Y., Oka, S., & Kawasaki, T., Identification and characterization of functional domains in a mixed lineage kinase LZK. *FEBS Lett.*, 488, 190-195 (2001)
- Yamaji, T., Nakamura, S., Takematsu, H., Kawasaki, T., & Kozutsumi, Y., Apoptosis of CTLL-2 cells induced by an immunosuppressant, ISP-I, is caspase-3-like protease-independent. *J. Biochem.*, 129(4), 521-527 (2001)
- Uwatoku, R., Akaike, K., Yamaguchi, K., Kawasaki, T., Ando, M., & Matsuno, K., Asialoglycoprotein receptors on rat dendritic cells: Possible roles for binding with kupffer cells and ingesting virus particles. *Arch. Histol. Cytol.*, 64 (2), 223-232 (2001)
- Katsuyama, R., Morioka, A., Oka, S., & Kawasaki, T., Expression of macrophage asialoglycoprotein-binding protein is induced through MAPK classical pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 1269-1273 (2001)

<糖鎖シグナルと疾病>

- Hara-Kuge, S., Ohkura, T., Ideo H., Shimada, O., Atusmi, S., & Yamashita, K., Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized MDCK cells. *J.*

J. Biol. Chem., 277, 16332–16339 (2002)

- Ideo, H., Seko, A., Ohkura, T., Matta, K.L. & Yamashita, K., High Affinity Binding of Recombinant Human Galectin-4 to $\text{SO}_3^- \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ pyranoside. *Glycobiology*, 12(3):199–208 (2002)
- Fukushima, K., Hara-Kuge, S., Ideo, H., & Yamashita, K., Carbohydrate recognition site of interleukin-2 in relation to cell proliferation *J. Biol. Chem.*, 276, 31202–31208 (2001)
- Seko, A., Hara-Kuge, S., & Yamashita, K., Molecular cloning and characterization of a novel human galactose 3-*O*-sulfotransferase that transfers sulfate to Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc residue in *O*-glycans. *J. Biol. Chem.*, 276, 25697–25704 (2001)
- Fukushima, K., & Yamashita, K., Interleukin-2 carbohydrate recognition modulates CTLL-2 cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 276, 7351–7356 (2001)

<無脊椎動物の生体防御>

- Inamori, K., Koori, K., Mishima, C., Muta, T., & Kawabata, S.: A horseshoe crab receptor structurally related to *Drosophila* Toll. *J. Endotoxin Res.* 6, 397–399 (2001)
- Nagai, T., Osaki, T., & Kawabata, S.: Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 276, 27166–27170 (2001)
- Kairies, N., Beisel, H.-G., Fuentes-Prior, P., Tsuda, R., Muta, T., Iwanaga, S., Bode, W., Huber, R., & Kawabata, S.: The 2.0 -Å crystal structure of tachylectin 5 provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13519–13524 (2001)

(2) 特許出願 国内1件