

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成16年度採択研究代表者

本家 孝一

(高知大学医学部 遺伝子病態制御学教室 教授)

## 「病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明」

### 1. 研究実施の概要

今年度は初年度であり年度途中から始まったので、共焦点レーザ走査型顕微鏡をはじめとする設備備品の導入、人材の確保、研究材料の調製等、研究基盤の整備を中心に行ったので、来年度から本格的に計画を遂行する。第1回チーム全体会議を平成17年3月11日に行い、各グループの研究背景、研究計画について発表討論を行った。今後、年2回の割合で実施し、各グループの進捗状況を相互評価してチーム全体の戦略を立てる。

本家グループは、硫酸化糖脂質のセミノリピドが精子形成細胞の細胞膜マイクロドメイン画分に局在することを確認し、膜マイクロドメイン画分に対する単クローン抗体を作製し、抗原分子の同定を進めている。膜マイクロドメイン指向性プローブの開発は、インテグリンに対する抗体をプローブとして進めている。また、硫酸化糖脂質に対する単クローン抗体DI8を作製し、単鎖抗体に改変した。単鎖抗体の結合力を高めるために、アミノ酸置換や多量体化を検討している。

今井グループは、EBV発がん関連遺伝子産物であるLMP1、LMP2Aの上皮細胞での機能発現における膜マイクロドメインの意義を検討するため、LMP1、LMP2A発現細胞株を樹立した。これを用いて、先ずLMP1、LMP2Aが胃癌をはじめとする上皮細胞でも膜マイクロドメインに局在するかどうかを確認する。局在が確認された場合、LMP1、LMP2Aと会合する糖脂質を解析する。さらにマイクロドメインに対するモノクローナル抗体の反応性の解析と会合性分子の同定を行う。また糖鎖改変によるLMP1、LMP2Aのシグナル伝達の変化についても解析を行う。

宇高グループは、未熟T細胞が、胸腺内で、キラーあるいはヘルパーT細胞へと分化する分子機構について解析している。TCRにリガンドの情報を提供する胸腺上皮細胞上の糖脂質マイクロドメインの役割に着目し、糖脂質マイクロドメインの攪乱により、本来ヘルパーT細胞に分化するTCRをもつ胸腺細胞が、キラーT細胞への分化に傾くことを見出した。MHCクラスII分子のパルミチル化に参与するシステイン残基をアミノ酸置換すると、糖脂質マイクロドメインに会合しなくなるとともに、本来ヘルパーT細胞に分化するTCRをもつ胸腺細胞がキラーT細胞へ分化することがわかった。今後、ヘルパー、キラーT細胞への分化シグナルの実態を明らかにする。一方、糖脂質マイクロドメインを乱す工夫をして抗原

特異的にヘルパーT細胞を抑制する技術を開発し、アレルギーや自己免疫疾患の抗原特異的制御をはかりたい。

藤本グループは、膜マイクロドメインを免疫原として動物に免疫した場合、特定の糖脂質に対する抗体産生が起こるなど、細胞そのものを免疫した場合とは異なる免疫応答を生体に引き起こす原理を解明し、それを癌あるいは自己免疫疾患等の治療法開発に応用する。今年度は、ヒト癌細胞株由来膜マイクロドメインをマウスに免疫した場合の抗糖脂質抗体特異性解析を開始した。また、マウス癌細胞株由来膜マイクロドメインについても調製の終了しているものから順に同系あるいは同種マウスへの免疫を実施した。

## 2. 研究実施体制

### 糖鎖機能解析法グループ

- ①研究分担グループ長：本家 孝一（高知大学医学部遺伝子病態制御学教室、教授）
- ②研究項目：
  - 1) 膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定
  - 2) 膜マイクロドメイン指向性プローブの開発と応用
  - 3) 糖鎖抗体遺伝子導入による糖鎖機能阻害にもとづく膜マイクロドメインの機能制御

### 免疫制御グループ

- ①研究分担グループ長：宇高 恵子（高知大学医学部分子免疫学教室、教授）
- ②研究項目：胸腺細胞分化決定機構における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明

### ウイルス感染制御グループ

- ①研究分担グループ長：今井 章介（高知大学医学部 感染分子病態学教室、教授）
- ②研究項目：EBウイルス（EBV）関連腫瘍における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明

### 抗体産生グループ

- ①研究分担グループ長：藤本 純一郎（国立成育医療センター研究所、副所長）
- ②研究項目：
  - 1) 膜マイクロドメイン調整と免疫および抗体作成
  - 2) 膜マイクロドメイン抗体作成とエピトープの決定
  - 3) 膜マイクロドメインによる生体免疫反応検討

### 3. 主な研究成果の発表

#### (1) 論文(原著論文)発表

- Cheng, X., Zhang, Y., Kotani, N., Watanabe, T., Lee, S., Wang, X., Kawashima, I., Tai, T., Taniguchi, N., and Honke, K.: Production of a recombinant single chain variable fragment (scFv) antibody against sulfoglycolipid. **J. Biochem.** 137, 415-421 (2005)
- Zhang, Y., Hayashi, Y., Cheng, X., Watanabe, T., Wang, X., Taniguchi, N., and Honke, K.: Testis-specific sulfoglycolipid, seminolipid is essential for germ cell function in spermatogenesis. **Glycobiology** Jan 19; (Epub ahead of print) (2005)
- Kanamori, M., Watanabe, S., Honma, R., Kuroda, M., Imai, S., Takada, K., Yamamoto, N., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y.: Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein induces expression of thymus and activation-regulated chemokine in B cells. **J. Virol.** 78, 3984-3993 (2004)
- Ohga, S., Nomura, A., Takada, H., Tanaka, T., Furuno, K., Takahata, Y., Kinukawa, N., Imai, S., and Hara, T.: Dominant expression of interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$  genes in activated T-cells of chronic active Epstein-Barr virus infection. **J. Med. Virol.** 74, 449-458 (2004)
- Nasimuzzaman, Md., Kuroda, M., Dohno, S., Yamamoto, T., Iwatsuki, K., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Kumita, W., Matsuzaki, S., Rashel, M., Nakamura, H., Wakiguchi, H., and Imai, S.: Eradication of Epstein-Barr virus episome and associated inhibition of infected tumor cell growth by adenovirus vector-mediated transduction of dominant-negative EBNA1. **Mol. Ther.** 11, 578-590 (2005)
- Oka, Y., Tsuboi, A., Taguchi, T., Osaki, T., Kyo, T., Nakajima, H., Elisseeva, O. A., Oji, Y., Kawakami, M., Ikegami, K., Hosen, N., Yoshihara, S., Wu, F., Fujiki, F., Murakami, M., Masuda, T., Nishida, S., Shirakata, T., Nakatsuka, S., Sasaki, A., Udaka, K., Dohy, H., Aozasa, K., Shinzaburo N., Kawase, I., and Sugiyama, H.: Induction of WT1(Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101, 13885-13890 (2004)
- Tsuboi, A., Oka, Y., Osaki, T., Kumagai, T., Tachibana, I., Hayashi, S., Murakami, M., Nakajima, H., Elisseeva, O. A., Fei, W., Masuda, T., Yasukawa, M., Oji, Y., Kawakami, M., Hosen, N., Ikegame, K., Yoshihara,

- S., Udaka, K., Nakatsuka, S.-I., Aozasa, K., Kawase, I. and Sugiyama, H.: WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: Report of two cases. **Microbiol Immunol.** 48, 175-184 (2004)
- Kiyokawa, N., Sekino, T., Matsui, T., Takenouchi, H., Mimori, K., Tang, W., Matsui, J., Taguchi, T., Katagiri, Y. U., Okita, H., Matsuo, Y., Karasuyama, H., and Fujimoto, J.: Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma. **Modern Pathol.** 17, 423-429 (2004)
- Sekino, T., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Takenouchi, H., Matsui, J., Tang, W., Suzuki, T., Nakajima, H., Saito, M., Ohmi, K., Katagiri, Y. U., Okita, H., Nakao, H., Takeda, T., and Fujimoto, J.: Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant stock of Vero cells. **Microbiol. Immunol.** 48, 377-387 (2004)
- Tang, W., Kiyokawa, N., Eguchi, T., Matsui, J., Takenouchi, H., Honma, D., Yasue, H., Enosawa, S., Mimori, K., Itagaki, M., Taguchi, T., Katagiri, Y. U., Okita, H., Amemiya, H., and Fujimoto, J.: Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I  $\alpha$  chain. **Hybridoma Hybridom** 23, 187-191 (2004)
- Takenouchi, H., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Matsui, J., Katagiri, Y. U., Okita, H., Okuda, K., and Fujimoto, J.: Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. **J. Cell. Sci.** 117, 3911-3922 (2004)
- Taguchi, T., Kiyokawa, N., Takenouchi, H., Matsui, J., Tang, W., Nakajima, H., Suzuki, K., Shiozawa, Y., Saito, M., Katagiri, Y. U., Takahshi, T., Karasuyama, H., Matsuo, Y., Okita, H., and Fujimoto, J.: Deficiency of BLNK hampers PLC- $\gamma$ 2 phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. **Immunology** 112, 575-582 (2004)