

「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

鏑田 武志

(東京医科歯科大学 教授)

「糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用」

1. 研究実施の概要

本研究においては、種々の遺伝子改変マウスを用いて糖鎖シグナルによる獲得免疫応答の制御機構を解明し、その制御法の開発を行う。本年度は、昨年度に引き続き、種々の遺伝子改変マウスのコロニーを確立するとともに、これらのマウスを用いることにより、液性免疫応答における膜型レクチン分子 Siglec2/CD22 の機能解明を行い、Siglec2/CD22 が液性免疫応答を制御する際の重要な標的となることを強く示唆する知見を得た。また、Siglec2/CD22 が糖鎖抗原への免疫応答に関わるという新たな知見を得た。さらに、Siglec2/CD22 のリガンドの機能解明を行うための遺伝子組み換えマウスの樹立を行った。現在、研究は当初の予定通り順調に進行しており、今後は、種々の遺伝子組み換えマウスを用いることにより、糖鎖リガンドの機能の解明、糖鎖リガンドの反応様態を解明し、Siglec2/CD22 を標的とした免疫制御法の開発を行っていく。

2. 研究実施内容

(1) 免疫応答における Siglec2/CD22 の機能解明

我々は、Siglec2/CD22 は抗原と反応した B リンパ球 (B 細胞) が活性化するかアポトーシスをおこすかの分子スイッチとして機能することを明らかにし、また、Siglec2/CD22 の活性が B リンパ球の産生する免疫グロブリンのクラスによって異なることを明らかにしてきたが、Siglec2/CD22 のスイッチ機能の役割をさらに解明するために糖鎖抗原への応答の際の Siglec2/CD22 の活性化について検討した。これまでに確立したすべての B 細胞が特定の抗原に反応する遺伝子改変マウス由来の B 細胞や B 細胞株を糖鎖抗原で刺激することにより、糖鎖抗原に反応した場合にはタンパク抗原に反応した場合とは異なり、Siglec2/CD22 の抑制性機能が発現せず、その結果、強い B 細胞の活性化がおこることを明らかにした。これまで、微生物由来の糖鎖抗原の一部が T 細胞のヘルプなしに抗体反応を誘導し、この反応が感染防御で重要な役割を果たすことが示唆されていたが、我々の結果は、微生物由来の糖鎖シグナルが B 細胞を活性化する際に、Siglec2/CD22 が何らかの役割を果たすことを示したものである。

また、我々は、Siglec2/CD22 の機能を解明するために、そのシグナル変異体の作成をおこなった。シグナル変異体を B 細胞株に発現させ、その機能を検索したところ、Siglec2/CD22 による B 細

胞の活性化制御についてのこれまでの知見とは相反する結果を得た。Siglec2/CD22 の細胞内領域には抑制性チロシンモチーフが3つあるが、これまではその内の少なくとも2つが Siglec2/CD22 によるB細胞機能抑制に必要であるとされてきたが、より適切な条件で機能の解析を行ったところ、抑制性モチーフが1つあるだけで、活性化制御がおこることが明らかとなった。

(2) Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明

B細胞活性化状態での Siglec2/CD22 糖鎖リガンドの発現がどのように制御されているかを明らかにするため、我々は、Siglec-2/CD22 プローブを作成し、これを用いてマウスの脾臓切片を染色した。その結果、活性化B細胞が集積し液性免疫応答で重要とされる胚中心では Siglec-2/CD22 糖鎖リガンド発現が抑制されている事が明らかとなった。また、胚中心 B細胞をはじめとする活性化 B細胞で CMP-Neu5Ac 水酸化酵素が特異的に抑制され、結果として Siglec-2/CD22 糖鎖リガンドの発現抑制が起こっていることも明らかにした。

また、我々は、 α 2,6 シアル酸転移酵素が β セクレターゼ (BACE1 プロテアーゼ) により切断され細胞外に分泌されることを培養細胞系で見いだした。そこで、 β セクレターゼ・トランスジェニック及びノックアウト・マウス (129Sv 系統 ES 細胞由来) における α 2,6 シアル酸転移酵素や糖鎖リガンドの代謝変化の解析を行い、 β セクレターゼが *in vivo* において α 2,6 シアル酸転移酵素のプロセッシングを行い、 α 2,6 シアル酸残基の代謝を制御することを明らかにした。この現象の免疫学的機能を解明するために、上記のノックアウト・マウスを C57BL/6 系統に戻し交配を行った。また、遺伝的背景が均一な B6 Conditional BACE-KO-マウスの作製を行った。今後は、このマウスを用いて解析を進める。

(3) Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの機能解明

Siglec2/CD22 糖鎖リガンドの機能を解明するために、糖鎖リガンド欠損マウスを解析し欠損 B細胞では活性化が亢進していることを示唆する知見を得、また、この点をさらに詳細に検討するために、Siglec2/CD22 欠損免疫グロブリントランスジェニックマウスを樹立した。また、マウス胚中心において、Siglec2/CD22糖鎖リガンドの産生に必須の CMP-Neu5Ac 水酸化酵素の発現が著しく低下していることが明らかになったので、CMP-Neu5Ac 水酸化酵素の発現の低下を阻害するために、幾つかの B細胞特異的なプロモーターをもつ CMP-Neu5Ac 水酸化酵素トランスジェニックマウスの作成を試みた。現在、複数のマウスで遺伝子産物の発現が確認されている。今後、これらのマウスのライン化を行った後、B細胞の反応性について、野生型マウス及び CMP-Neu5Ac 水酸化酵素ノックアウトマウスと比較検討する予定である。

(4) Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの反応様態の解明

Siglec2/CD22 がどのようなリガンドとの反応により特異的な機能を発揮するのかを明らかにするために、Siglec2/CD22 糖鎖リガンド欠損マウスと免疫グロブリントランスジェニックマウスやB細胞欠損マウスを交配し、すべての B細胞は特定の抗原に反応する Siglec2/CD22 糖鎖リガンド欠損マウス

やB細胞を欠損する Siglec2/CD22 糖鎖リガンド欠損マウスを樹立した。今後は、このマウスを用いて解析を進める。

3. 研究実施体制

「免疫シグナル制御」グループ

- ①研究分担グループ長：鏑田 武志（東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所、教授）
- ②研究項目：免疫応答における Siglec2/CD22 の機能解明、Siglec2/CD22 と糖鎖リガンドの反応様態の解明、CD33ファミリーSiglecs とCD72の機能の解明

「糖鎖リガンド」グループ

- ①研究分担グループ長：小堤 保則（京都大学大学院生命科学研究科高次生命科学専攻、教授）
- ②研究項目：Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの機能解明、Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明

「リガンド代謝」グループ

- ①研究分担グループ長：橋本 康弘（独立行政法人理化学研究所、チームリーダー）
- ②研究項目：Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明、CD33ファミリーSiglecs の機能の解明

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- 北爪しのぶ、中川和博、山本正雅、樋口真人、西道隆臣、橋本康弘. アルツハイマー病βセクレターゼによるシアル酸転移酵素切断の pathophysiology. 日本血栓止血学会誌, 17, 78-82 (2006).
- Tsubata, T.: B cell abnormality and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 38: 331-337 (2005)
- Devi, S. S., Hagiwara, H., Adachi, T., Muiyasa, N. and Tsubata, T.: The tumor suppressor p53 is not required for antigen receptor-mediated apoptosis of B lymphocytes. *Signal Transduction* 6:54-61 (2006)
- Watanabe, K., Okamoto, K., Yonehara, S.: Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through down-regulation of cellular FLIP. *Cell Death and Differentiation* 12:10-188 (2005)
- Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T. C. Sato, Y., Endo, T. & Hashimoto, Y. : Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid-beta peptides. *J.*

- Neurochem.*, **96**, 924-33 (2006).
- Asai, M., Hattori, C., Iwata N., Saido, T. C., Sasagawa, N., Szabo, B., Hashimoto, Y., Maruyama, K., Tanuma, S., Kiso, Y. & Ishiura, S. : A novel beta-secretase inhibitor KMI-429, reduces amyloid beta-peptide (Abeta) production in amyloid precursor protein (APP) transgenic and wild-type mice. *J. Neurochem.*, **96**, 533-40 (2006).
 - Kitazume, S., Oka, R., Tachida, Y., Ogawa, K., Nakagawa, K., Luo, Y., Citron, M., Shitara, H., Taya, C., Yonekawa, H., Paulson, J.C., Miyoshi, E., Taniguchi, N. & Hashimoto, Y. : In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer's beta-secretase (BACE1), *J. Biol. Chem.*, **280**, 8589-95 (2005).
 - Yamaji, T., Mitsuki, M., Teranishi, T., & Hashimoto, Y. : Characterization of inhibitory signaling motifs of the natural killer cell receptor Siglec-7: Attenuated recruitment of phosphatases by the receptor is attributed to two amino acids in the motifs. *Glycobiology*, **15**, 667-76 (2005).
 - Kotani, N., Kitazume, S., Kamimura, K., Takeo, S., Aigaki, T., Nakato H. & Hashimoto, Y. : Characterization of *Drosophila* Aspartic Proteases that induce the secretion of a Golgi-resident transferase, heparan sulfate 6-O-sulfotransferase. *J. Biochem.*, **137**, 315-22 (2005).
 - Sakuraba, H., Chiba, Y., Kotani, M., Kawashima, I., Ohsawa, M., Tajima, Y., Takaoka, Y., Jigami, Y., Takahashi, H., Hirai, Y., Shimada, Y., Hashimoto, Y., Ishii, K., Kobayashi, T., Watabe, K., Fukushige, T. & Kanzaki, T. : Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human alpha-galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.*, (in press)
 - Kitazume, S., Oka, R., Tachida, Y., Ogawa, K., Nakagawa, K., Takashima, S. & Hashimoto, Y. : Screening a series of sialyltransferases as possible BACE1 substrates. *Glycoconjugate J.*, (in press)
 - Kobayashi, T., Takematsu, H., Yamaji, T., Hiramoto, S., and Kozutsumi, Y.: Disturbance of Sphingolipid Biosynthesis Abrogates the Signaling of Mss4, Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase, in Yeast. *J Biol Chem* 280, 18087-18094. (2005)
 - Tanoue, D., Kobayashi, T. Sun, Y., Fujita, T., Takematsu, H., and Kozutsumi, Y. : The requirement for the hydrophobic motif phosphorylation of Ypk1 in yeast differs depending on the downstream events, including endocytosis, cell growth, and resistance to a sphingolipid biosynthesis inhibitor, ISP-1. *Arch Biochem Biophys* 437, 29-41. (2005)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)