

「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

昨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、研究は順調に進行している。京大グループでは、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)の分子機構の解明を進め、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を見いだした。また、ヒトマンナン結合タンパク質の遺伝子発現機構の解析、新規血清レクチンの発見などの成果をあげた。佐々木研究所グループでは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、IL-1βの生理活性におよぼすレクチン様機能の重要性を明らかにした。九大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類を精製し、機能解析を行うとともにX-線結晶構造解析に成功した。

2. 研究実施内容

(1) 哺乳動物の生体防御グループ

1) MBPの新しい機能としての細胞性細胞障害作用

本グループにより血清中に見出された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。本研究において、MBPが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。本グループは正常細胞はMBPとは反応しないのに対し、ある種のガン細胞がMBPと結合することを見いだした。そこで次に、MBPによるガン細胞増殖抑制作用を調べた。ヒト結腸癌細胞SW1116株細胞をヌードマウスの皮下に移植し、MBP組換えワクシニアウイルスを投与し、in vivoでのガンの抑制作用の検討を試みた。その結果、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、このガン細胞増殖抑制作用は、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組換えワクシニアウイルスによるガン細胞増殖抑制作用をMBP-dependent cell-mediated cytotoxicity、MBP依存性細胞性細胞障害作用

(MDCC) と名付けた。

2) MBPによるヒト多形核白血球からの活性酸素の放出

MBPは多形核白血球からのPAFの産生を誘導することにより多形核白血球を凝集し、凝集部において活性酸素を発生することを見いだした。この活性酸素の放出は多形核白血球の関与するMDCC反応の一つと考えられる。

3) 変異体MBPの血液中での代謝的安定性の解析

G54D MBP 変異体を持つヒトはオブ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。しかしながら、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、ヒト野生型MBPとG54D MBPのマウス血液中での代謝回転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ことが判明した。

4) ヒト血清MBPおよび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した。ヒト血清MBP遺伝子の発現は肝特異的転写因子HNF-3により正の、デキサメサゾンにより負の転写制御を受けることを示した。

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に成功した。MBP遺伝子欠損マウスは、ほぼ正常な発育を示している。今後、これら遺伝子欠損マウスについて外来異物排除機能、微生物感染抵抗性、T細胞分化、免疫機能など高次の生体防御機能の変化を調べることにより本レクチンの機能を解明していく計画である。

6) ブタ血清中の新規な殺菌性レクチンの精製と遺伝子クローニング

ブタ血清中に新規な殺菌性レクチンの存在を見いだした。その部分アミノ酸配列を基に本レクチンのcDNAクローニングを行い全アミノ酸配列を決定した。

7) NK細胞におけるCD57/HNK-1糖鎖抗原の構造と機能の解析

CD57陰性の培養動物細胞にグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) 遺伝子を導入しCD57を発現させると、細胞相互の接着性が著しく減少した。第二のグルクロン酸転移酵素 (GlcAT- S) 遺伝子をクローニングした。また、ヒトGlcAT-P遺伝子のクローニングと染色体上の位置を決定した。さらに、GlcAT-P遺伝子欠損マウスの作成に成功した。

(2) 糖鎖シグナルと疾病グループ

「糖鎖シグナルを介する生体防御システムの解析」

1) ヒト大腸粘液癌に特異的に出現するGlcNAc:→6硫酸転移酵素に関する研究

ヒト大腸粘液癌は分化型癌に比べ予後が悪いという報告がなされており、そ

の出現過程及び癌細胞の諸性質について生物学的背景を明らかにすることは、新たな治療・診断法の開発をする上で重要である。本グループではヒト大腸粘液癌に特異的に発現するGlcNAc:→6硫酸転移酵素 (SulT-b) を見出し、その生化学的性質を明らかにした。本SulTは広い基質特異性を有し、O- 結合型糖鎖のcore3を基質に用いることによって正常粘膜上皮に存在するSulTと区別して活性を測定し得る (Glycobiology, 2000印刷中)。

粘液の異常蓄積を認める癌では15例中14例で本SulTが発現していたことから本SulTの酵素活性もしくはその生成物は粘液癌を早期診断する上で良いマーカーとなり得ることが判明した。現在、本SulTが既にクローニングされている3種のGlcNAc:→6SulTのうちいずれかに相当するか、もしくは新規な酵素であるかについて検討中である。なお、本SulTの生成物Gal β 1→4(SO₃→6)GlcNAcの合成に与るGlcNAc-6-O硫酸: β 1, 4ガラクトース転移酵素 (FEBS Lett, 1998) がスフィンゴシン要求性であることを明らかにしており、その生物学的意義を検討中である。

2) サイトカインの生理活性におけるレクチン様機能の重要性に関する研究

当グループでは、種々のサイトカインの生理活性発現におけるレクチン作用の役割を明らかにすることを目指している。本年度は当研究グループが明らかにしたGPIアンカー糖鎖を認識するIL-1 β (J. Biol.Chem. 1997) 高マンノース型糖鎖を認識するIL-2に着目し、それぞれに依存して増殖する細胞を用いて糖鎖が果たす役割を検討した。まず、IL-1 β がマンノース6- リン酸を中心としたGPIアンカー糖鎖を認識することから、IL-1 β 依存的に増殖するD10G4.1細胞を用いてGPIアンカーのハプテン糖鎖による増殖阻害能を検討した。その結果、マンノース6- リン酸ジエステル共存下で増殖能を測定した場合に、細胞増殖阻害が認められた。

一方、IL-2依存的に増殖するCTLL-2細胞は高マンノース型ハプテン糖鎖共存下で増殖阻害が認められた。また、In vitro translation法を用いて点突然変異を導入した一連のIL-2変異体のうち、二量体を保持しうる変異体のみがレクチン活性を保持し、レクチン活性の変化に比例して細胞増殖活性が変化することが示された。また、IL-2の糖鎖を介した情報伝達が Lyn, Lck, Jak1, Jak3, いずれのチロシンリン酸化酵素とも連結していることが判明した (論文投稿中)。

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

新生糖タンパク質は輸送小胞によりその機能を発現する特定の場所に輸送される。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6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た。変異体Vip36を作製し、高マンノース型糖鎖との結合に対する影響を調

べたところ、 β シート内の糖結合ドメインに保存されているアスパラギン残基（131）がレクチン活性に必須であることが明らかとなった。MDCK細胞では高マンノース型糖鎖とVIP36が同じ局在性を示すが、さらにMDCK細胞より単離したVIP36の高発現株および糖結合欠損株を解析した結果、MDCK細胞ではVIP36が高マンノース型糖鎖を持つ糖タンパク質の輸送に機能していることが明らかとなった（論文投稿中）。VIP36に対するポリクローナル抗体を作製し各種組織を染色した結果、腎臓の遠位尿細管、唾液腺導管、肺気管支上皮、乳腺腺房細胞、毛のう外根鞘など外界と接する部位にVIP36が多く存在することが明らかとなり、VIP36の生体防御への関与が示唆された。

(3) 無脊椎動物の生体防御グループ

抗体の多様性を利用できない無脊椎動物にとって、感染微生物に対する異物認識は、微生物の表層に存在する糖鎖を認識するレクチンと呼ばれる糖結合タンパク質によるところが大きい。本グループでは、カプトガニの血球や体液中から、微生物の表層成分を認識するレクチンや、抗菌ペプチドを発見した。さらに、カプトガニのN-アセチルグルコサミン（D-GlcNAc）認識レクチンのX線結晶構造解析を行い、非自己認識におけるパターン認識の一端を明らかにした。

1) タキレクチン-3

タキレクチン-3は、A型5糖や大腸菌0111:B4に由来するLPSに対して高い親和性を示すことから、大腸菌0111:B4のO-抗原を特異的に認識していることが推測された。事実、このLPSのO-抗原とA型5糖の糖鎖構造を比較すると、非常によく似ている。タキレクチン-3は123残基からなり、分子内には3つのジスルフィド結合があって、56残基からなる2回の繰り返し配列からなっている。分子内の2回繰り返し配列の約40残基にわたって、血球凝集活性を有するウイルスのノイラミニダーゼとの間に有意な配列類似性がある。タキレクチン-3は、水溶液中では2量体で存在していることが、超遠心分析により確認された。

2) タキレクチン-5

タキレクチン-5は、A、B、O型すべての赤血球を凝集し、生物に普遍的に存在するアセチル基を認識している。興味深いことに、タキレクチン-5は、顆粒細胞由来の抗菌ペプチドの抗菌活性を増大させる活性がある。タキレクチン-5のC-末端側領域は、フィブリノーゲン β 、 γ 鎖のC末端ドメインや哺乳類フィコリンとの間に40-50%の配列類似性を示した。タキレクチン-5は、溶液中では多量体を形成しており、ゲルろ過分析でタキレクチン-5Aは6量体および8量体、タキレクチン-5Bは4量体と推定された。さらに、タキレクチン-5の電子顕微鏡像は、これらの多量体形成を支持しており、その花束状の形態

は哺乳類のフィコリンやコレクチンといった異物認識レクチンとの機能類似性を連想させた。フィブリノーゲンの祖先蛋白質は、異物認識レクチンとして機能していた可能性がある。

3) C- 反応性蛋白質

ホスホリルコリン、ホスホリルエタノールアミン、およびシアル酸に対する親和性の違いにより機能的に3つに分類できるCRP蛋白質を精製した。CRP- 2とCRP- 3は、血漿中の溶血因子であり、CRP- 1は、溶血活性を示さない。CRP- 1とCRP- 2は、ホスホリルコリンやホスホリルエタノールアミンに結合するが、CRP- 3はこれら2種のリガンドに結合しない。一方、CRP- 2とCRP- 3は共にシアル酸特異的レクチンであり、tCRP- 2は莢膜にポリシアル酸を持つ大腸菌E. coli K1を強く凝集する。CRPにはイソ蛋白質が存在し、塩基配列の異なる22種類のCRPの塩基配列を決定した。CRP- 1とCRP- 2とは配列類似性が高く、CRP- 3はCRP- 1とCRP- 2から分子進化的に離れている。CRP- 3のアミノ酸配列には、CRP- 1とCRP- 2には見られない20残基程度からなる疎水的な領域があって、その配列がニジマスのクラスI 主要組織適合性抗原の膜貫通ドメインと類似性を示した。この領域がCRP- 3の溶血活性と関連している可能性がある。

4) タキレクチン- 2の立体構造

タキレクチン- 2の立体構造は、5つのβ- プロペラ構造から構成され、その構造は、直径48 、高さ25 、一辺28 の正五角形トーラスである。β- プロペラ構造をもつファミリーのなかでは、初めての5葉構造の報告となった。加えて、レクチン- リガンド複合体の構造解析から、それぞれのプロペラに1個のD-GlcNAcが結合していることが判明した。タキレクチン- 2の非自己認識の方法は、感染微生物特異的な物質を認識するのではなく、生物に普遍的に見い出される糖鎖リガンドの高い表面密度を認識していると考えられる。個々の結合部位とリガンドとの親和性は安定な結合を維持するほど強くはないが、結合部位を多価にして親和性を増強させるとともに、それぞれの結合部位を近接させることにより、リガンドが高密度で存在している状態、すなわち感染微生物表面の分子パターンに対する非自己認識の高い特異性が生み出されている。この非自己認識の戦略が、より普遍的で単純な構造要素であるアセチル基を認識するタキレクチン- 5にも適用されていると推測される。

5) タキスタチン

カプトガニ血球より3種のキチン結合性タンパク質を精製し、タキスタチンA、タキスタチンB、タキスタチンCと命名した。タキスタチン類の特徴は、大腸菌などのグラム陰性菌よりも、グラム陽性菌や真菌に対して強い抗菌活性が

あり、なかでもタキスタチンCがもっとも強い活性を示す。タキスタチンAは、クモ毒の電位依存性カルシウムチャネルブロッカーである ω -アガトキシンと配列類似性を示すが、タキスタチンAにはカルシウムチャネルブロッカーとしての活性は見られなかった。いずれのタキスタチンにも、LPS 感作赤血球をLPS 依存的に溶血する性質があり、その溶血活性は、ポリエチレングリコール # 1540 の存在下で阻止されることから、直径 2.4 nm 程度の穴を細胞膜に開けていることが推定された。

6) タキレクチン-P

ウシ顎下線ムチンを固定化したアガロースを用いて、困卵液からA型赤血球を特異的に凝集するレクチン（タキレクチン-Pと命名）を精製した。タキレクチン-Pのアミノ酸配列は、驚いたことにタキレクチン-1 とほとんど一致し、わずか3つのアミノ酸残基が異なるのみであった。ところが、タキレクチン-Pには、タキレクチン-1とは異なり、LPSとの親和性はなく、グラム陰性菌に対する抗菌活性も見られない。両レクチンの生物活性が異なる原因のひとつは、サブユニット構造の相違によるものと考えられる。タキレクチン-Pは3回から4回目の胚脱皮の間に、抗原レベルで7.7倍も増加する。この時期は、卵が急激に大きくなり5倍もの体積変化を伴うため、浸透圧調節に重要な働きをしていると考えられた。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- 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-independent cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A*, 96, 371-375 (1999)
- Naito, H., Ma, Y., Uemura, K., Arano, Y. & Kawasaki, T. Metabolic properties of normal and mutant mannan-binding proteins in mouse plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256, 231-234 (1999)
- Seiki, T., Oka, S., Terayama, K., Imiya, K. & Kawasaki, T. Molecular cloning and expression of a second glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 182-187 (1999)
- Kawasaki, T., Structure and biology of mannan-binding protein, MBP, an important component of innate immunity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 186-195 (1999)
- Naito, H., Ikeda, A., Hasegawa, K., Oka, S., Uemura, K., Kawasaki, N. & Kawasaki, T. Characterization of human serum mannan-binding protein promoter. *J. Biochem.*, 126, 1004-1012 (1999)
- Mitumoto, Y., Oka, S., Sakuma, H., Inazawa, J. & Kawasaki, T. Cloning and

- chromosomal mapping of human glucuronyltransferase involved in biosynthesis of the HNK-1 epitope. *Genomics*, 65, 166-173 (2000)
- Hara-Kuge, S., Ohkura, T., Seko, A. & Yamashita, K. Vesicular-integral membrane protein, VIP36, recognizes high-mannose type glycans containing $\alpha 1 \rightarrow 2$ mannosyl residues in MDCK cells. *Glycobiology*, 9, 833-839 (1999)
 - Yamashita, K., Hara-Kuge, S. & Ohkura, T. Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. *Biochem. Biochim. Acta*, 1473, 147-160 (1999)
 - Kawabata, S. & Iwanaga, S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. *Dev. Comp. Immunol.*, 23, 391-400 (1999)
 - Inamori, K., Saito, T., Iwaki, D., Nagira, T., Iwanaga, S., Arisaka, F. and Kawabata, S. A newly identified horseshoe crab lectin with specificity for blood group A antigen recognizes specific O-antigens of bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.*, 274, 3272-3278 (1999)
 - Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, S. N., Iwanaga, S. & Kawabata, S. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10086-10091 (1999)
 - Iwaki, D., Osaki, T., Yoshimitsu, M., Wai, S. N., Iwanaga, S. & Kawabata, S. Functional and structural diversities of C-reactive proteins present in horseshoe crab hemolymph plasma. *Eur. J. Biochem.*, 264, 314-326 (1999)
 - Beisel, H.-G., Kawabata, S., Iwanaga, S., Huber, R. & Bode, W. Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* *EMBO J.* 18, 2313-2322 (1999)
 - Osaki, T., Omotezako, M., Nagayama, R., Hirata, M., Iwanaga, S., Kasahara, J., Hattori, J., Ito, I., Sugiyama, H. & Kawabata, S. Horseshoe crab hemocyte-derived antimicrobial polypeptides, tachystatins, with sequence similarity to spider neurotoxins. *J. Biol. Chem.*, 274, 26172-26178 (1999)
 - Nagai, T., Kawabata, S., Shishikura, F. & Sugita, H. Purification, characterization, and amino acid sequence of an embryonic lectin in perivitelline fluid of the horseshoe crab. *J. Biol. Chem.*, 274, 37673-37678 (1999)