

「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

本研究課題は、膜マイクロドメインに対する抗体の作製やマイクロドメイン指向性プローブの開発を通して膜マイクロドメインの可視化を目指すとともに、ウイルス感染や免疫における膜マイクロドメインの機能に関わる糖鎖の役割を解明することを目的とする。この統一的目的の下に、各研究グループが以下の個別研究を推進している。

本家グループは、精子形成細胞膜マイクロドメインに局在する硫酸化糖脂質のセミノリピドが精子形成に必須であることを突き止めたので、セミノリピドと相互作用する分子を探索するために、マウス精子形成細胞膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製し、エピトープを追究している。さらに、これら抗体を用いてマイクロドメイン指向性プローブを作製してセミノリピドの近傍分子の検出を行う。また、同グループの久下が発見した性的二型核特異タンパクのマスキュリンを発現する PC12 細胞から膜マイクロドメインを調製して単クローン抗体を作製し、マイクロドメインでマスキュリンと相互作用する分子を探索する。

宇高グループは、免疫制御を目指して、抗原ペプチドの反応が起こる T 細胞上の糖脂質膜マイクロドメインを壊すことにより、T 細胞応答を制御する方法を開発中である。さらに、胸腺細胞分化における膜マイクロドメイン（脂質ラフト）が提供する反応場の重要性を明らかにした。今後、生きた細胞の細胞膜上で、実際にラフト会合性の T 細胞認識とラフト非会合性の認識反応を比較し、分子集合による T 細胞認識反応がいかんしてラフトという反応場によって制御されているかを調べ、ラフトを人為的に攪乱することによりアレルギー反応を制御する工夫を行う。

今井グループは、ヒト癌ウイルスであるエプスタイン・バールウイルス（EBV）のトランスフォーム膜タンパク質 LMP1、LMP2A が、B 細胞の感染細胞膜マイクロドメイン上に発現し、“細胞の膜マイクロドメイン環境を攪乱”している可能性が示唆されていることから、LMP1、LMP2A が EBV の発癌過程とりわけ上皮細胞や T/NK 細胞への悪性増殖能の賦与にどのような機構で関与しているかを研究している。LMP1、LMP2A 遺伝子それぞれを安定発現する上皮細胞株において LMP1、LMP2A が膜マイクロドメイン上に発現していることを確認した。今後、

LMP1、LMP2A 発現糖脂質膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製し、マイクロドメインで LMP1、LMP2A と相互作用する分子を探索する。

藤本グループは、免疫原に膜マイクロドメインを用いる脂質ラフト免疫法は従来の免疫法ではみられなかった以下のような利点を有していることを見出した。①免疫が容易且つ効果的に行えること、②単一の脂質に対する抗体が産生されやすい、③従来得られなかったエпитープを認識する抗体が得られること。今後は抗体産生のメカニズムを明らかにして汎用をめざす。

2. 研究実施内容

糖鎖機能解析法（本家）グループ

1) 糖脂質硫酸転移酵素 (CST) ノックアウトマウスでは、精子形成が第一減数分裂の中期までで停止し、不妊になることから、セミノリピドが精子形成に必須であることが遺伝学的に証明された。さらに、CST ノックアウトマウスへの生殖細胞移植実験の結果、セミノリピドは生殖細胞側の機能に必要であることが判明した。セミノリピドは分化型の精原細胞から精子にいたる生殖細胞系譜の細胞膜上発現しており、生殖細胞細胞膜の界面活性剤不溶性浮遊画分 (DIM) に回収されることから、セミノリピドは膜マイクロドメイン (脂質ラフト) 画分に局在すると思われた。そこで、マウス精子形成細胞 DIM 画分を同系マウスに免疫して単クローン抗体を作製し、DIM 画分と反応するクローンを 100 種類以上得た。このうち、25-30%が硫酸化糖脂質に反応した。ウエスタンブロッティングでタンパク質のバンドを明確に呈するものは数%にとどまった。大部分のクローンは硫酸化糖脂質とも反応せず、ウエスタンブロッティングでも有意なバンドを呈さなかったもので、これらが反応する分子を検索するために、ラット精巣から総脂質画分を抽出してそれに対する反応性を調べている。ウエスタンブロッティングで明確なバンドを示したものに関しては、そのタンパク質の同定を行う。

2) 当グループの久下が発見した雄のラット新生児脳視索前野に時期・部位特異的に発現するマスキュリンの遺伝子を、神経系培養細胞株である PC12 細胞に強制発現させると、神経突起伸長が促進されるとともに、マスキュリンが突起先端部に集積することがわかった。生化学的に調べると、マスキュリンの一部は膜マイクロドメイン (脂質ラフト) 画分に存在することがわかった。さらに、マスキュリンには 3 本のアスパラギン結合型糖鎖が付加されており、少なくとも一部はコンプレックス型糖鎖を持つことがわかった。そこで、膜マイクロドメインにおいて糖タンパク質のマスキュリンと相互作用する分子を同定する目的で、マスキュリン発現 PC12 細胞から DIM 画分を調製し、単クローン抗体を作製し、マスキュリン発現 PC12 細胞とは強く反応するが、親株の PC12 細胞とはあまり反応しないクローンを 10 種類余得た。現在、これらの抗体のうち、マスキュリンと同様に PC12 細胞の神経突起先端部と強く反応するクローンを選択中である。次に、これら抗体のエピトープの決定を行う。

免疫制御（宇高）グループ

これまでに開発を進めてきた T 細胞が自己と抗原の識別の標的として認識する主要組織適合性複合体（MHC）分子結合性ペプチドの同定法を確立し、この技術を機軸として、癌や難治性ウイルス感染症に対する治療用ペプチド免疫治療法の開発を目指す。一方、アレルギーや自己免疫疾患を制御するため、抗原ペプチド特異的に免疫応答を抑制する工夫のひとつとして、抗原ペプチドの反応が起こる T 細胞上の糖脂質膜ドメインを壊すことにより、T 細胞応答の変化を調べる。この研究成果をもとに、特定の抗原に対する T 細胞のみを強く活性化したり、逆に抑制したりする技術の開発をしている。

平成 17 年度までに、HLA 結合性ペプチド自動予測プログラムの開発は基盤技術がほぼ確立できた。今後、世界人口の 7 割、日本人の 9 割をカバーできるよう、予想可能な HLA 型を増やすことを、技術補佐員を中心に行いたい。

胸腺細胞分化において糖脂質膜ドメイン（ラフト）が提供する反応場の重要性を明らかにし、論文にまとめた。今後、生きた細胞の細胞膜上で、実際にラフト会合性の T 細胞認識とラフト非会合性の認識反応を、1 分子蛍光観察で比較し、分子集合による T 細胞認識反応が、いかにしてラフトという反応場に制御されているかを調べる。その成果を、現在我々が臨床試験を進めている WT1 がん抗原および C 型肝炎ウイルスに対する標的免疫治療に積極的に活用する。また、ラフトを攪乱することによりアレルギー反応を制御する工夫をする。

ウイルス感染制御（今井）グループ

ヒト癌ウイルスである EBV のトランスフォーム膜タンパク質 LMP1、LMP2A は、EBV 潜伏感染細胞において多様なシグナル伝達経路を制御し、感染細胞の生存維持や宿主免疫の回避などにおいて重要な役割を果たしている事が知られている。しかし現在のところ、EBV の発癌過程とりわけ上皮細胞や T/NK 細胞への悪性増殖能の賦与において、これら膜タンパク質がどのような機構で関与しているかについては不明な点が多い。最近、LMP1、LMP2A が感染細胞膜マイクロドメイン上（B 細胞）に発現していることがわかり、これらが“細胞の膜マイクロドメイン環境を攪乱”している可能性が示唆されている。本研究ではこの攪乱現象が EBV 発癌機構と密接に関連するのではないかと推測し、特に非 B 細胞で糖脂質膜マイクロドメイン環境が LMP1、LMP2A によりどのような影響を受け、宿主細胞シグナル伝達が変化するかを解析することで、EBV 発癌メカニズムを解明することを目的としている。

平成 17 年度は、自己不活化型レトロウイルスベクター（SIN-RV）及び通常の発現ベクターにより、LMP1、LMP2A 遺伝子それぞれを安定発現する上皮細胞株を樹立することに成功した。本年度は、各種細胞株の性状解析や細胞のクローン化、およびショ糖密度勾配遠心法によりこれらの安定発現上皮細胞において LMP1、LMP2A が膜マイクロドメイン上に発現しているか否かの検討等を行った。その結果、SIN-RV を用いて構築した安定発現上皮細胞株が研究に適していることがわかった。

今後は、これら安定発現細胞や EBV 感染細胞株における膜マイクロドメイン環境やシグナル伝達の変化を捉え、EBV の発癌機構との関連について解析していく予定である。また、LMP1、LMP2A が発現した糖脂質膜マイクロドメインを用い、EBV 感染細胞特異的な膜マイクロドメイン環境に対するモノクローナル抗体を作製することで、EBV 感染胃癌細胞や慢性活動性 EBV 感染症などを標的とした抗体医薬品の可能性についても探る予定である。

抗体産生(藤本)グループ

膜マイクロドメインを介する刺激伝達関連分子の同定と機能解析を目的として始めたラフト免疫法は、多方面に応用が可能な有効な手法である。1% TritonX-100 不溶性の低密度画分として調製される膜マイクロドメインは、生理食塩水内で懸濁液となるため、ミネラルオイルとの混合などによって不溶性を獲得させる必要はない。また PBS 懸濁液を皮下に注入するだけで抗体価の上昇が見られるなど、adjuvant 効果も期待できる。ヒト腎癌由来細胞株 ACHN 細胞の膜マイクロドメインを免疫原として樹立された単クローン抗体 Raft. 2 はグロボ系スフィンゴ糖脂質の sialylGb5 を認識抗原とする。SSEA-4(stage-specific embryonic antigen-4)の epitope としても知られ、Gb5 が担う SSEA-3 とともに、初期胚や胚性(ES)幹細胞、胚性癌(EC)細胞の分化マーカーとして重要である。SSEA-3, 4 とともに糖脂質が担う epitope といわれてきたが、Raft. 2 はタンパクにも反応し、従来の糖脂質反応性の単クローン抗体とは異なる epitope を有することが推察された。Raft. 2 が反応するタンパク性の SSEA-4 抗原の解析を行った。

Raft. 2 は糖脂質性 SSEA-4 抗原を発現していない F9 細胞表面へ結合することが確認された。Western 解析で、Raft. 2 は分子量 44 K、等電点 5.1 のタンパクに結合すること、その結合はニトロセルロース膜を弱酸処理することにより著しく減弱することがわかった。MS 解析の結果、Raft. 2 が結合する分子は laminin binding protein(LBP)と同定された。¹⁴C-Galactose の取り込み、シアリダーゼ処理による Raft. 2 の結合の減弱は、LBP が SSEA-4 糖鎖を有していることを裏付けるものである。以前より汎用されている抗 SSEA-4 抗体 MC-813-70 と異なり、Raft. 2 は GM1b には結合せず、MC-813-70 よりも長い糖鎖構造を認識していると考えられる。laminin は初期発生の過程において重要な細胞外マトリックスであるが、胚体ではインテグリン以外の laminin 受容体が働いているといわれており、Raft. 2 抗体は胚発生における SSEA や LBP の機能解析にも応用が期待される。

ACHN 細胞のラフト免疫では、従来とは異なる epitope をもつクローンが得られることが示された。更に興味あることに、脂質反応性のクローンすべてが sialylGb5 を認識抗原としていた。ACHN 細胞の膜マイクロドメイン以外にも、単一の糖脂質に対する抗血清が得られる例が確認され、抗体出現のカイネティックスや産生機構の解明をめざす。

3. 研究実施体制

「糖鎖機能解析法 研究」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 研究」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 研究」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 研究」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

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

- Zhang, Y., Hayashi, Y., Cheng, X., Watanabe, T., Wang, X., Taniguchi, N., Honke, K.: Testis-specific sulfoglycolipid, seminolipid, is essential for germ cell function in spermatogenesis. *Glycobiology*, **15**, 649–654, 2005
- Cheng, X., Zhang, Y., Kotani, N., Watanabe, T., Lee, S., Wang, X., Kawashima, I., Tai, T., Taniguchi, N., Honke, K.: Production of a recombinant single-chain variable-fragment (scFv) Antibody against sulfoglycolipid. *J. Biochem.*, **137**, 415–421, 2005
- Gao, C. X., Miyoshi, E., Uozumi, N., Takamiya, R., Wang, X., Noda, K., Gu, J., Honke, K., Wada, Y., Taniguchi, N.: Bisecting GlcNAc mediates the binding of annexin V to Hsp47. *Glycobiology*, **15**, 1067–1075, 2005
- Eguchi, H., Ikeda, Y., Ookawara, T., Koyota, S., Fujiwara, N., Honke, K., Wang, P. G.,

- Taniguchi, N., Suzuki, K.: Modification of oligosaccharides by reactive oxygen species decreases sialyl Lewis X-mediated cell adhesion. *Glycobiology*, **15**, 1094–1101, 2005
- Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Miyoshi, E., Noda, K., Li, W., Mizuno-Horikawa, Y., Nakano, M., Asahi, M., Takahashi, M., Uozumi, N., Ihara, S., Lee, S. H., Ikeda, Y., Yamaguchi, Y., Aze, Y., Tomiyama, Y., Fujii, J., Suzuki, K., Kondo, A., Shapiro, S. D., Lopez-Otin, C., Kuwaki, T., Okabe, M., Honke, K., Taniguchi, N.: Dysregulation of TGF- β 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 15791–15796, 2005
 - Fukushima, A., Yamaguchi, T., Ishida, W., Fukata, K., Udaka, K., Ueno, H.: Mice lacking the IFN-gamma receptor or fyn develop severe experimental autoimmune uveoretinitis characterized by different immune responses. *Immunogenetics* **57**, 337–343, 2005
 - Fukushima, A., Yamaguchi, T., Ozaki, A., Taniguchi, T., Udaka, K., Ueno, H.: Fyn regulated eosinophil infiltration into the conjunctiva by downregulating the Th2 response. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**, 1043–1049, 2005
 - Li, Z., Oka, Y., Tsuboi, A., Masuda, T., Tatsumi, N., Kawakami, M., Fujioka, T., Sakaguchi, N., Nakajima, H., Fujiki, F., Udaka, K., Oji, Y., Kawase, I., Sugiyama, H.: WT 1₂₃₅, a Ninemer Peptide Derived from Wilms' Tumor Gene Product, Is a Candidate Peptide for the Vaccination of HLA-A*0201-Positive Patients with Hematopoietic Malignancies. *Int J. Hematol.* **82**, 458–459, 2005
 - Nasimuzzaman, Md., Kuroda, M., Dohno, S., Yamamoto, T., Iwatsuki, K., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Kumita, W., Matsuzaki, S., Rashel, M., Nakamura, H., Wakiguchi, H., 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.
 - Daibata, M., Bandobashi, K., Kuroda, M., Imai, S., Miyoshi, I., Taguchi, H.: Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection by synergistic action of rituximab and dexamethasone renders EBV-positive lymphoma cells more susceptible to ganciclovir cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* **79**, 5875–5879, 2005.
 - Okano, M., Kawa, K., Kimura, H., Yachie, A., Wakiguchi, H., Maeda, A., Imai, S., Ohga, S., Kanegane, H., Tsuchiya, S., Morio, T., Mori, M., Yokota, S., Imashuku, S.: Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am. J. Hematol.* **80**, 64–69, 2005.
 - 今井章介, 黒田正幸, 山下竜右, 石浦嘉人: Dominant-negative EBNA1 による EB ウイルス腫瘍の抑制. *ウイルス* **55**, 239–250, 2005.
 - Tang, W-R., Shioya, N., Eguchi, T., Ebata, T., Matsui, J., Takenouchi, H., Honma, D., Yasue, H., Takagaki, Y., Enosawa, S., Itagaki, M., Taguchi, T., Kiyokawa, N., Amemiya, H.,

- Fujimoto, J.: Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor δ -chains. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **103**, 113-127, 2005.
- Nakajima, H., Cocquerel, L., Kiyokawa, N., Fujimoto, J., Levy, S.: Kinetics of HCV envelope proteins' interaction with CD81 large extracellular loop. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 1091-1100, 2005.
 - Matsui, J., Kiyokawa, N., Takenouchi, H., Taguchi, T., Suzuki, K., Shiozawa, Y., Saito, M., Tang, W.-R., Katagiri, Y.U., Okita, H., Fujimoto, J.: Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Res.* **29**, 573-581, 2005.
 - Katagiri, Y.U., Kiyokawa, N., Nakamura, K., Takenouchi, H., Taguchi, T., Okita, H., Umezawa, A., Fujimoto, J.: Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 1004-1011, 2005.
 - Yamamoto, R., Isobe, T., Eguchi, T., Tang, W.R., Kiyokawa, N., Amemiya, H., Fujimoto, J., Sato, E., Takagaki, Y., Yasue, H.: Porcine TCR CD3zeta-chain and eta-chain. *Mol. Immunol.* **42**, 1485-1493, 2005.
 - Sohda, M., Misumi, Y., Yoshimura, S., Nakamura, N., Fusano, T., Sakisaka, S., Ogata, S., Fujimoto, J., Kiyokawa, N., Ikehara, Y.: Depletion of vesicle-tethering factor p115 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1268-1274, 2005.
 - Taguchi, T., Takenouchi, H., Matsui, J., Tang, W., Itagaki, M., Shiozawa, Y., Suzuki, K., Sakaguchi, S., Katagiri, Y.U., Takahashi, T., Okita, H., Fujimoto, J., Kiyokawa, N.: Involvement of Insulin-like Growth Factor-I and Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Pro-B-cell Development. *Exp. Hematol.* (in press)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 3 件 (CREST 研究期間累積件数 : 3 件)