

「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

(東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所 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、昨年度までに確立した種々の遺伝子改変マウスのコロニーを用いて B 細胞に発現する膜型レクチン分子 Siglec2/CD22 とその糖鎖リガンドの液性免疫応答における機能解明を行った。その結果、Siglec2/CD22 が液性免疫応答を制御し、感染免疫の増強や免疫疾患の制御を行う際の重要な標的となることが明らかになった。また、糖鎖抗原への抗体応答は莢膜陽性細菌への感染防御に重要であるが、糖鎖抗原に反応した際には Siglec2/CD22 が通常のタンパク抗原と反応した場合は異なる動態を示し、このことが、糖鎖抗原が T 細胞ヘルプなしに抗体産生を誘導できることに関与することが明らかとなった。さらに、Neu5Ac を Neu5Gc に変換することにより Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド産生に必須の酵素 CMP-Neu5Ac 水酸化酵素の発現が胚中心 B 細胞では消失し、その結果、胚中心 B 細胞では Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの発現が消失すること、また、CMP-Neu5Ac 水酸化酵素欠損マウスでは糖鎖抗原への反応に関わる辺縁帯 B 細胞が有意に増加することが明らかとなり、Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドが B 細胞の分化で重要な役割を果たすことが示唆された。また、Siglec2/CD22 の合成改変糖鎖リガンドを用いて、Siglec2/CD22 の機能が制御できることが明らかとなった。今後は、新たな組み換えマウスの系を樹立することにより、Siglec2/CD22 とその糖鎖リガンドの生体内での機能解明をさらに進めることにより、免疫応答におけるこれらの分子の役割をさらに明らかにし、改変糖鎖リガンドなどを用いた 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 が抗原と反応した 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。糖鎖抗原への抗体産生は、通常のタンパク抗原への抗体産生と異なり T細胞によるヘルプを必要とせず、また、莢膜陽性細菌

への生体防御で中心的な役割を果たす。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し、その際の Siglec2/CD22 のリン酸化や細胞膜上での分布を解析することにより、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 は B 細胞抗原受容体 (BCR) と共局在せず、また、BCR シグナル伝達への抑制性機能を発揮しないこと、さらに、抑制性機能の消失により B 細胞が T 細胞ヘルプなしに活性化することを明らかにした。この結果から、糖鎖抗原への T 細胞非依存性抗体反応に Siglec2/CD22 によるシグナル抑制の解除が関与す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

GL7 はマウスの活性化 B 細胞、とりわけ胚中心 B 細胞を染色する単クローン抗体であるが、そのエпитープは未知であった。糖鎖関連遺伝子 DNA マイクロアレイを用いた、糖鎖関連遺伝子の多サンプルでの遺伝子発現プロファイル解析等により、GL7 は α 2-6 結合をしたシアル酸と結合する抗糖鎖抗体であることを示した。さらなる解析の結果、GL7 はシアル酸分子種のうち、N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) をシアル酸として持つ糖鎖と特異的に結合し、一方、Siglec-2 は N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) をシアル酸として持つ糖鎖と結合することを示した。GL7 は前述のように胚中心の B 細胞と結合するが、Siglec-2 の糖鎖リガンドは胚中心 B 細胞において発現が抑制されていることが明らかとなった。さらにこの Siglec-2 糖鎖リガンド発現制御の分子機構を明らかにしていくため、In vitro で活性化させた脾臓由来 B 細胞において、Siglec-2 のリガンド生合成に関わる遺伝子の発現についてリアルタイム PCR を用いて調べたところ、Siglec-2 リガンド認識の際の親和性に関わるシアル酸分子種 Neu5Gc の発現に関わる CMP-Neu5Ac 水酸化酵素の遺伝子発現が抑制されていた。このことより、活性化 B 細胞でおこる Siglec-2 の糖鎖リガンド発現抑制はシアル酸分子種 Neu5Gc の発現抑制により、転写レベルで行われていることが明らかとなった。

α 2,6 シアル酸転移酵素は Siglec2/CD22 糖鎖リガンド (α 2,6 シアル酸残基) 生合成の最終段階を触媒し、リガンド発現の鍵酵素の一つである。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。なお、 β セクレターゼによるシアル酸転移酵素のプロセッシングが Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの発現に影響することは既に明らかにしている (未発表データ)。この現象の生体内での機能を明らかにするために、B6 Conditional BACE-KO-マウスの作製を行った。今後は、種々の臓器・細胞で Cre リコンビナーゼを発現したマウスと交配し、任意の臓器や細胞種 (特に B 細胞など) で BACE を欠損した個体を作成する。B 細胞特異的なノックアウト・マウスで、免疫実験を行う予定である。

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、糖鎖リガンドを欠損する CMP-Neu5Ac 水酸化酵素遺伝子欠損マウスを解析し B 細胞の活性化が亢進していることを示唆する知見が得られた。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、B細胞を種々の抗原で刺激したところ、抗原の種類によってBCRシグナル伝達に異常があり、また、むしろシグナル伝達が低下する傾向にあることが明らかとなった。また、CMP-Neu5Ac 水酸化酵素遺伝子欠損マウスで、糖鎖抗原への反応に関わる辺縁帯 B 細胞が有意に増加していることを明らかにし、Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドが B 細胞の分化と活性化を制御していることを明らかにした。また、CMP-Neu5Ac 水酸化酵素トランスジェニックマウスを数系統樹立した。今後は、CMP-Neu5Ac 水酸化酵素遺伝子欠損マウスおよびトランスジェニックマウスを用いて、Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの機能の解明を進める。

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 細胞が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、さらに、これらのマウスの Ly5.1 コンジェニックマウスを樹立した。今後は、これらのマウスを用いて解析を行う。

5. 改変糖鎖リガンドによる Siglec2/CD22 の機能制御法の開発

α 2,6 シアル酸転移酵素欠損ミエローマ細胞を利用して、Siglec2/CD22 とその糖鎖リガンドの反応阻害を計測する系を樹立した。次いで、この系を用いて化学合成した Neu5Gc α 2-6Gal が Siglec2/CD22 とその糖鎖リガンドの反応を阻害できること、さらに、Siglec2/CD22 と BCR の共局在を阻害できることを明らかにした。今後は、Neu5Gc α 2-6Gal の種々の誘導体を用いて、Siglec2/CD22 の機能を有効に制御する化合物を得る。

6. CD33 ファミリーSiglecs と CD72 の機能の解明

ヒト CD33 ファミリーに属する Siglec7 が細胞機能に対して抑制的に働くことを見出した。この抑制効果は、SHP のリクルート効率が高い Siglec9 では高く、効率が低い Siglec7 では弱かった。また、2つのアミノ酸 mutant Siglec7 は Siglec9 と同様の表現型を示したことから、この抑制効果は ITIM による SHP1 フォスファターゼのリクルート量に異存しているが明らかとなった。また、B 細胞が糖鎖抗原と反応する際に CD72が Siglec2/CD22 と同様の動態を示すことが明らかとなった。

3. 研究実施体制

(1)「免疫シグナル制御」グループ

①研究者名

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 の糖鎖リガンドの機能解明
- Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの反応様態の解明
- 改変糖鎖リガンドによる Siglec2/CD22 の機能制御法の開発
- CD33 ファミリーSiglecs と CD72 の機能の解明

(2)「リガンド糖鎖研究」グループ

①研究者名

小堤 保則 (京都大学 教授)

②研究項目

- Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの反応様態の解明
- Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明

(3)「リガンド代謝」グループ

①研究者名

橋本 康弘 ((独) 理化学研究所 チームリーダー)

②研究項目

- CD33 ファミリーSiglecs と CD72 の機能の解明
- Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明

4. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

- Devi, S. S., Hagiyaama, H., Adachi, T., Muiyasaki, 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
- Akagawa, M., Ito, S., Toyoda, K., Ishii, Y., Tatsuda, E., Shibata, T., Yamaguchi, S., Kawai, Y., Ishino, K., Kishi, Y., Adachi, T., Tsubata, T., Takasaki, Y., Hattori, N., Matsuda, T. and Uchida, K.: Bispecific Abs against modified protein and DNA with oxidized lipids. *PNAS* 103: 6160-6165. 2006
- Tsubata, T.: B cell abnormality and systemic lupus erythematosus. *APLAR J. Rheum* 9: 372-376. 2006
- 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.* 23: 437-441. 2006
- Hattori, C., Asai, M., Onishi, H., Sasagawa, N., Hashimoto, Y., Saido, T., K. Maruyama and S. Ishiura.: BACE1 interacts with lipid raft proteins. *J. Neurosci. Res.* 84: 912-917. 2006
- Sakuraba, H., Chiba, Y., Kotani, M., Kawashima, I., Ohsawa, M., Tajima, Y., Takaoka, Y.,

- Jigami, Y., Takahashi, H., Hirai, Y., Shimada, T., Hashimoto, Y., Ishii, K., Kobayashi, T., Watabe, K., Fukushima, T. and Kanzaki, T.: Corrective effect on Fabry mice of yeast recombinant human α -galactosidase with N-linked sugar chains suitable for lysosomal delivery. *J. Hum. Genet.*, 51: 341-352. 2006
- Asai, M., Hattori, C., Sasagawa, N., Kobayashi, T., Maruyama, K., Kiso, Y., Ishiura, S., Hashimoto, Y., Saido, T. C.: A novel beta-secretase inhibitor KMI-429 reduces amyloid beta-peptide (A β) production in amyloid precursor protein (APP) transgenic and wild-type mice. *J. Neurochem.* 96: 533-540. 2006
- 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: 924-933. 2006
- Sato, M., Adachi, T. and Tsubata, T.: Augmentation of signaling through BCR containing IgE but not that containing IgA due to lack of CD22-mediated signal regulation. *J. Immunol* 178: 2901-2907. 2007
- Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itohara, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., Kozutsumi, Y.: Germinal Center Marker GL7 Probes Activation-Dependent Repression of N-glycolylneuraminic Acid, a Sialic Acid Species Involved in the Negative Modulation of B-Cell Activation. *Mol Cell Biol.* 127: 8. **in press** 2007
- Nagai, N., Habuchi, H., Kitazume, S., Toyoda, H., Hashimoto, Y. and Kimata, K.: Regulation of heparan sulfate 6-O-sulfation by beta-secretase activity. *J. Biol. Chem.* **in press** 2007
- Hayakawa, T., Makino, A., Murate, M., Sugimoto, I., Hashimoto, Y., Takahashi, H., Ito, K., Fujisawa, T., Matsuo, H. and Kobayashi, T.: pH-dependent Formation of MCB-like Closely Stacked Multilamellar Vesicles of GM1/Bis (Monoacylglycero) Phosphate Mixed Membranes. *Biophysical Journal-Biophysical Letters.* **in press** 2007

(2) 特許出願累計数

平成 18 年度特許出願: 2 件 (CREST 研究期間累積件数: 3 件)