

「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 B リンパ球の細胞分裂の速度を制御することにより、液性免疫応答のタイムコースを制御することを明らかにし、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を明らかにした。また、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 水酸化酵素を欠損するマウスで B 細胞の抗原受容体シグナル伝達が抗原によっては減弱することから、糖鎖リガンドがシグナル制御に重要であることを示した。また、B 細胞活性化時に転写レベルの制御により Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの発現が低下し、また、Siglec2/CD22 糖鎖リガンドの発現が  $\beta$  セクレターゼにより制御されるなど、リガンド発現がダイナミックに制御されていることを明らかにした。次いで、Siglec2/CD22 に高親和性で結合する改変糖鎖リガンドや Siglec2/CD22 の機能を制御することにより B リンパ球のシグナル伝達を制御する低分子化合物を同定し、実際に改変糖鎖リガンド等により Siglec2/CD22 の機能制御が可能であることを示した。さらに、Siglec2/CD22 と機能重複のある CD72 の C 型レクチンドメインがレクチン活性を持つことを明らかにし、CD72 コンジェニックマウスや遺伝子改変マウスを樹立した。今後は、Siglec2/CD22 や CD72 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 および CD72 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、細胞株などを用いた *in vitro* の研究により 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。生体内での免疫応答における Siglec2/CD22 の機能を解明するため、Siglec2/CD22 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を交配し、すべての B 細胞が特定の抗原に反応する Siglec2/CD22 欠損マウスを樹立した。このマウスから B 細胞を単離し、正常マウスにトランスファーした後に抗原刺激を行ったところ、Siglec2/CD22 欠損 B 細胞は正常 B 細胞に比べ細胞分裂が亢進し、その結果、早期に抗体産生をおこすことが明らかとなった。また、クラススイッチや、高親和性抗体の産生など、抗体の質的な向上も平行して早期に見られた。この知見は、Siglec2/CD22 が液性免疫応答の迅速さを規定し、Siglec2/CD22 を制御することによりワクチン接種と同様に免疫応答を早期化し、感染抵抗性を誘導することが可能であることを強く示唆する。

### 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、そのエピトープは未知であった。我々は糖鎖関連遺伝子を搭載した cDNA マイクロアレイを用いて複数の細胞での各遺伝子の発現を相対化することで、複数細胞における糖鎖関連遺伝子発現プロファイルを作成した。そこで、遺伝子発現プロファイルを作成する際に用いた複数細胞を GL7 で染色し FCM 解析することにより、GL7 エピトープ糖鎖の発現プロファイルを作成した。マイクロアレイに搭載された約 1000 の糖鎖関連遺伝子のうち、GL7 エピトープ発現のプロファイルに一番近いプロファイルを持つ遺伝子を同定するため、プロファイル間の相関係数を統計処理によりもとめたところ、シアル酸転移酵素をコードする ST6GAL1 遺伝子の発現プロファイルが GL7 エピトープ発現と強い相関性を示すことが明らかとなった。ここで得られた相関は、 $\alpha$ 2-6 型シアル酸を持たず、GL7 で染色されない CHO 細胞が ST6GAL1 を導入することで GL7 反応性になること、また、各種シアロ糖鎖プローブを固相化した ELISA で GL7 が Neu5Ac2-6Gal1-4GlcNAc1-3Gal1-4GlcNAc と特異的に結合したことから検証された(Naito Y, et al. 2007)。この発見は、これまでマウス胚中心 B 細胞を特異的に染色するマーカーとして用いられてきた単クローン抗体 GL7 が、胚中心 B 細胞活性化特異的に起こる CD22 リガンドの発現抑制を認識する抗体であることを明らかとしたものであり、このことから B 細胞活性化時に非常に特異的で機能的な糖鎖の変化機構があることがわかった。また、ここで用いた相関係数を利用した方法は、多数の植物レクチンを糖鎖結合プローブとして、方法論としての検証を行い、糖鎖結合性プローブのエピトープ糖鎖の発現を制御するための Correlation index-based responsible enzyme gene screening (CIRES)として報告した(Yamamoto H, et al. 2007)。

また、培養細胞肝細胞を用いたモデル実験により、 $\beta$  セクレターゼによる  $\alpha$ 2,6 シアル酸転移酵

素のプロセッシングを介した Siglec2/CD22 糖鎖リガンドの発現制御を解析した。β セクレターゼの高発現により α 2,6 シアル酸化がアップレギュレーションされ、β セクレターゼ siRNA 処理により α 2,6 シアル酸化がダウンレギュレーションされた。すなわち、β セクレターゼは α 2,6 シアル酸転移酵素のプロセッシングを介して糖鎖リガンド発現を制御していることが示された。Iv vivo での β セクレターゼによる糖鎖リガンド発現制御を調べるために、C57BL/6 系統由来の ES 細胞を使用した β セクレターゼ(BACE1)欠損マウスを作成した。また、β セクレターゼと類縁のプロテアーゼである BACE2 ノックアウトマウスの作製を行った。今後、β セクレターゼ欠損マウスの B 細胞における糖鎖リガンドの発現を解析する予定である。また、B 細胞機能に及ぼす β セクレターゼ欠損の影響を調べる予定である。

### 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。しかしながら、シグナル伝達の低下は軽度であり、これは、CMP-Neu5Ac 水酸化酵素遺伝子欠損マウスで発現する Neu5Acα2-6Gal が Siglec2/CD22 の低親和性リガンドとし機能するためであるかもしれない。そこで、この可能性について、今後 α 2-6 シアル酸を完全に欠損する ST6GalI 遺伝子欠損マウスを用いて検討する。

### 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を樹立した。さらに、免疫グロブリントランスジェニックマウスまたは Siglec2/CD22 糖鎖リガンド欠損免疫グロブリントランスジェニックマウスの骨髄細胞を放射線照射した正常マウスまたは Siglec2/CD22 糖鎖リガンド欠損マウスに移入し、血液細胞でのみ Siglec2/CD22 糖鎖リガンドを発現するマウスや血液細胞でのみ Siglec2/CD22 糖鎖リガンド発現を欠損するマウスを作成した。今後、このようなマウスを用いて、シスまたはトランスの糖鎖リガンドの機能解明を行なう。

### 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。この系を利用して約 40 の合成 Neu5Gc α 2-6Gal 誘導体をスクリーニングし、Neu5Gc α 2-6Gal よりも数千倍高い親和性で Siglec2/CD22 に結合する誘導体を同定した。さらに、ヒト Siglec2/CD22 とマウス Siglec2/CD22 では高親和性で結合する誘導体が異なる

ることを明らかにした。また、同様の系を用いて低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行ない、Siglec2/CD22 に結合する低分子化合物を同定した。次いで、Neu5Gc  $\alpha$  2-6Gal が、Siglec2/CD22 と BCR の共局在を阻害できることを明らかにした。また、Siglec2/CD22 に結合する低分子化合物が実際に BCR シグナル伝達を増強することを明らかにした。今後は、これらの化合物が B リンパ球の応答を増強するかを検討する。

#### 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。一方、Siglec7 と高いホモロジーを示す Siglec9 はこの抑制効果を示さなかった。Siglec7 は Siglec9 と 80% 以上のホモロジーを示すことから、両者の間で機能的な差が見出された場合には両者の間でキメラ変異体を作製することによって表現形に対して重要なアミノ酸配列部分をマッピングすることが可能である。見出された Siglec7 と Siglec9 の間における抑制効果の差に関してキメラ作製を行い、抑制効果に重要な部分のマッピングを開始した。また、この抑制効果は Siglec7 に対する F(ab)<sub>2</sub> 抗体による架橋によっているが、これによって細胞内シグナルの活性化が予想される。このシグナルについても解析を行っている。

ヒトおよびマウス CD72 には多型があり、ヒト CD72 は SLE の発症を制御することが知られている。また、マウス CD72 の多型は C 型レクチンドメインに集積している。我々は、可溶性 CD72 融合タンパクを作成し、このタンパクを用いた解析により CD72 がその C 型レクチンドメインを介して糖鎖に結合することを明らかにした。さらに、マウス CD72 のコンジェニックマウス、CD72 の欠損マウスおよび、CD72 の ITIM に変異を導入したノックインマウスを樹立した。今後は、これらのマウスを用いて、液性免疫応答制御における CD72 の機能を解明する。

### 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)

#### 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
- ・改変糖鎖リガンドによる Siglec2/CD22 の機能制御法の開発

#### (2)「糖鎖リガンド」グループ

① 研究者名: 小堤 保則(京都大学)

## 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
- CD33 ファミリー Siglecs の機能の解明

## (3) 「リガンド代謝」グループ

① 研究者名: 橋本 康弘 (福島県立医科大学)

### ② 研究実施項目

- 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. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表(原著論文)

#### 「免疫シグナル制御」グループ

- Sato, M., Adachi, T. and Tsubata, T. (2007): 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.
- Yu, J., Sawada, T., Adachi, T., Gao, X., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Ishida, H., kiso, M. and Tsubata, T. (2007): Synthetic glycan ligand excludes CD22 from antigen receptor-containing lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360: 759-764.
- Yan, B, C., Adachi, T., Tsubata, T. (2007) : ER stress is involved in B cell antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365: 143-148.
- Adachi, T., Wienands, J., Tsubata, T., Kurosaki, T. (2007): Interdomain A is crucial for ITAM-dependent and -independent regulation of Syk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364: 111-117.
- Onodera, T., Poe, J. C., Tedder, T. F. and Tsubata, T. (2008): CD22 Regulates Time Course of Both B Cell Division and Antibody Response. *J. Immunol.* 180: 907-913
- Zhu, C., Fujimoto, M., Sato, M., Yanagisawa, T., Tsubata, T. (2008): Novel binding site for Src homology 2-containing protein-tyrosine phosphatase-1 in CD22 activated by B lymphocyte stimulation with antigen. *J. Biol. Chem.* 283: 1653-1659.
- Adachi, T. and Tsubata, T. (2008): FRET-based  $Ca^{2+}$  measurement in B lymphocyte by flow cytometry and confocal microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 377-382.

#### 「糖鎖リガンド」グループ

- Kanazawa, T., Takematsu, H., Yamamoto, A., Yamamoto, H., Kozutsumi, Y. (2008): Wheat germ agglutinin stains dispersed post-golgi vesicles after treatment with the cytokinesis inhibitor psychosine. *J Cell Physiol.* 215: 517-525.
- Yamamoto, H., Takematsu, H., Fujinawa, R., Naito, Y., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Suzuki, A., Kozutsumi, Y. (2007): Correlation index-based responsible-enzyme gene screening (CIRES), a novel DNA microarray-based method for glycan biosynthesis enzyme gene *PLoS ONE*, 2:1232.
- Kimura, N., Ohmori, K., Miyazaki, K., Izawa, M., Matsuzaki, Y., Yasuda, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Moriyama, A., Kannagi, R. (2007): Human B-lymphocytes express alpha 2-6 sialyl 6-sulfated LacNAc serving as a preferred ligand for CD22/Siglec-2. *J Biol Chem.* 282: 32200-7.
- Hedlund, M., Tangvoranuntakul, P., Takematsu, H., Long, J, M., Housley, G, D., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Wynshaw-Boris, A., Ryan, A,F., Gallo, R., Varki, N., Varki, A. (2007): N-glycolylneuraminic Acid Deficiency in Mice: Implications for Human Biology and Evolution. *Mol Cell Biol.* 27: 4340-4346.
- 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. (2007): 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.* 27: 3008-22.

#### 「リガンド代謝」グループ

- Kitazume, S., Takashima, S. and Hashimoto, Y. (2008): Processing of glycosyltransferases as Alzheimer's secretase ( BACE1). *Glycoscience Lab Manual.*
- Tachida, Y., Nakagawa, K., Saito, T., Saido, T, C., Sakaguchi, G., Kato, A., Kitazume, S. and Hashimoto, Y. (2008): Interleukin-1beta upregulatesTACE to enhance alpha-cleavage of APP in neurons: Resulting decrease of Abeta producton. *J. Neurochem.* 104:1387-1393.
- Nagai, N., Habuchi, H., Kitazume, S., Toyoda, H., Hashimoto, Y. and Kimata, K. (2007): Regulation of heparan sulfate 6-O- sulfation by secretase activity. *J. Biol. Chem.* 282: 14942 – 14951.
- Sugimoto, I., Futakawa, S., Oka, R., Ogawa, K., Marth, J, D., Miyoshi, E., Taniguchi, N. and Hashimoto, Y. (2007): Beta-Galactoside alpha 2,6-sialyltransferase I Cleavage by BACE1 Enhances the sialylation of soluble glycoproteins -a Novel Regulatory mechanism for alpha 2,6-sialylation. *J. Biol. Chem.* 282: 34896 – 34903.
- Hayakawa, T., Makino, A., Murate, M., Sugimoto, I., Hashimoto, Y., Takahashi, H., Ito, K., Fujisawa, T., Matsuo, H. and Kobayashi, T. (2007): pH-dependent Formation of MCB-like Closely Stacked Multilamellar Vesicles of GM1/Bis (Monoacylglycero) Phosphate Mixed

Membranes. *Biophys J.* 92:13-6.

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:0件 (CREST 研究期間累積件数:2 件)