

「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

高知大学医学部生化学講座・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。

本家グループは、これまで、膜マイクロドメイン免疫法でマウス精子形成細胞やラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞の膜マイクロドメインに対する多数の単クローン抗体を得、その一部の認識抗原を決定した。さらに、新たに発見した Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応を利用して、生細胞の細胞膜上における分子クラスターを同定する方法を開発した。

宇高グループは、未熟胸腺細胞が、胸腺上皮細胞の発現する MHC クラス II 分子を認識して CD4 T 細胞に分化する際に、MHC クラス II 分子が脂質ラフト会合性になることが重要であることを明らかにした。マウスの細胞傷害性 T 細胞や、NK 細胞では、asialo GM1 の発現が細胞傷害性細胞系列への分化マーカーとなるが、その意義は不明であるので、asialo GM1 の抗原認識に対する影響を調べている。

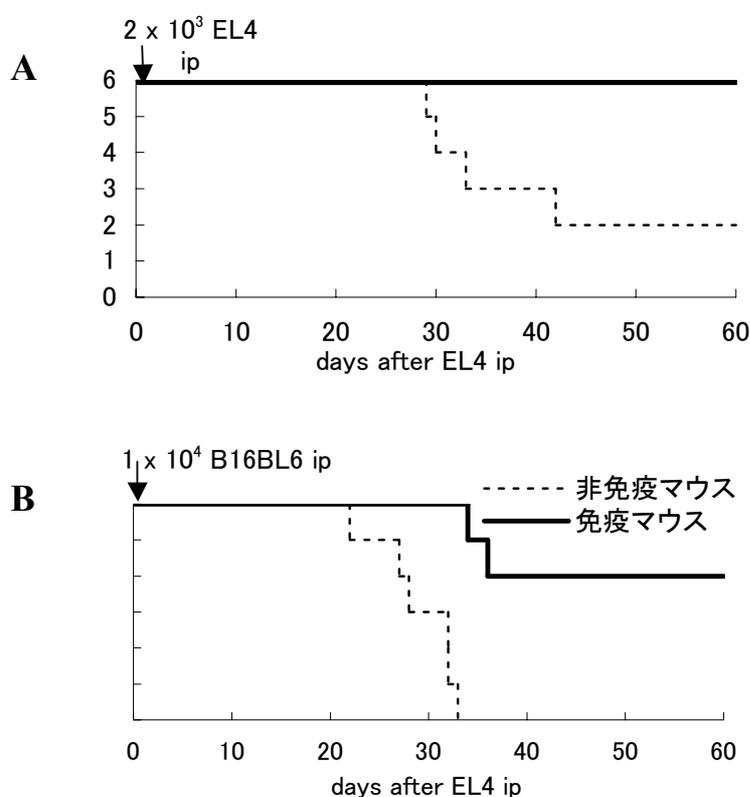
藤本グループは、同系抗原に対しても免疫応答が誘導可能という脂質ラフト免疫法の利点を生かして、脂質ラフト免疫が抗原特異的にも抗原非特異的にも抗腫瘍効果を示すことを示した。被免疫マウスでは脾臓樹状細胞や  $\gamma$   $\delta$  T 細胞が活性化されていることから、脂質ラフトにはアジュヴァント効果、自然免疫の増強作用があることがわかった。ACHN 細胞由来脂質ラフト免疫によって得られた新規抗-SSEA-4 (sialylGb5Cer) 単クローン抗体 6E2 は、ヒト及びサル ES 細胞の未分化マーカーとなる。単クローン抗体 6E2 を用いて、着床前胚や ES 細胞における膜マイクロドメインの動態を調べている。

## 2. 研究実施内容

- 1) マウス精巢から分画した膜マイクロドメイン画分 (DRM) を、マウスに2回免疫して、DRM と反応する 192 クローンのハイブリドーマを得た。これら抗体をさらに、ウェスタンブロッティングで DRM タンパク質に対する反応性と免疫組織化学で精細管に対する染色性を調べた。これらスクリーニングでの陽性クローンについて、抗原エпитープの決定を試みているが、これらの抗体を固相化したイムノアフィニティークロマトは無効なことが多い。精製できたものは、電気泳動にかけて銀染色したバンドを切り出し、ゲル内消化の後、マススペクトルメトリーを用いて解析した。これまで、膜マイクロドメインを裏打ちする細胞骨格タンパク質などが同定されている。
- 2) 脳の雄化に関与するマスキュリン遺伝子を PC12 細胞に強制発現させると、N-グリコシド型糖鎖が 3 本付加し、神経様突起の先端に集積するが、これらの糖鎖が付かないように改変した変異マスキュリンは小胞体にとどまり、突起の先端には運ばれなかった。このことから、マスキュリンの糖鎖が輸送のための膜マイクロドメインの形成に関与することが示唆された (論文準備中)。
- 3) 新たに発見した Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応を利用して、生細胞における細胞膜上分子の相互作用を解析するための方法を開発した (PNAS 印刷中)。この方法を応用して、さまざまな条件下における膜マイクロドメイン中の分子クラスターを解析している。
- 4) 胸腺上皮細胞に発現される、MHC クラス II 分子の膜貫通部に保存されている Cys には、palmitoyl 化が起こり、ラフト会合性になることがわかった。この Cys を置換することにより、ラフト会合性が失われ、本来、MHC クラス II 分子を認識して CD4 T 細胞へ分化するはずの TCR を有する transgenic thymocytes が、CD8 T 細胞へと分化することがわかった (論文投稿中)。
- 5) マウスでは、リンパ系細胞の初期分化の段階で、細胞傷害活性をもつ NK 細胞や CD8 T 細胞は、asialo GM1 を細胞表面に表出する。GM3 synthase の発現を調べたところ、CD4 T 細胞にはあり、CD8 T 細胞では発現がないことがわかった。そこで、CD8 T 細胞クローンに GM3 synthase を強制発現させ、抗原認識への影響を調べている。一方、asialo GM1 の発現が、種を超えて保存されているものかどうかを調べるため、ヒト CD4、CD8 T 細胞について解析したところ、asialo GM1 は発現されていないことがわかった。さらに、系統発生的に古いと考えられている NK 細胞の腫瘍細胞株2種についても調べたが、いずれも asialo GM1 の発現はなかった。東北薬科大の井ノ口 仁一教授と共同で、GM3 synthase KO マウスの免疫機能について調べることを検討している。
- 6) 脂質ラフト免疫法は、移入された同系腫瘍細胞の増殖生存に抵抗性を示す。今年度は、ヒト ACHN 細胞の脂質ラフト免疫により誘導される抗腫瘍効果を検証した。ACHN 細胞の脂質ラフトでマウスを免疫すると、sialylGb5Cer を認識抗原とする monoglycolipid-specific な抗糖脂質抗体産生が誘導されるが、腫瘍拒絶実験に用いた C57BL/6 マウス由来胸腺腫 EL4 にも同黒色腫 B16BL6 にも sialylGb5Cer は発現していない。免疫マウスの抗血清は、EL4 には反応したが、B16BL6 には反応しなかった。免疫マウスの抗血清を使った二次元 Western/プロテオミクス解

析の結果、タンパク抗原に関しては、HSP90 と  $\gamma$  カテニンに対する抗体が産生されており、この抗血清はマウス  $\gamma$  カテニンにも反応を示した。

7) ACHN 細胞の脂質ラフトで免疫された C57BL/6 マウスに EL4 細胞  $2 \times 10^3$  個を移入し、生存率を非免疫マウスと比較した。非免疫マウスは6匹中4匹が 33.5 日 ( $\pm 5.9$  日) で死亡したが、免疫マウスでは6匹すべてが寛解した(下図パネル A)。同様に、B16BL6 細胞  $1 \times 10^4$  個を移入したところ、全非免疫マウスが平均 29 日 ( $\pm 4.2$  日) で死亡したが、免疫マウス6匹中2匹が 33.5 日 ( $\pm 1.4$  日) で死亡したのみで、他 4 匹は寛解した(下図パネル B)。ACHN 細胞の脂質ラフト免疫は、非特異的抗腫瘍能を誘導すると推測された。



8) 脂質ラフトの機能的構造を阻害する filipin で処理した ACHN 細胞から調製した脂質ラフト免疫では、HSP90 や  $\gamma$  カテニンに反応する抗血清は得られず、また、上記のような抗腫瘍効果はみられなかった。ACHN 脂質ラフトの特殊な免疫原性には、ラフトの機能的構造が必須であると考えられる。

9) ACHN 脂質ラフト免疫マウスの脾臓樹状細胞は、PMA/ionomycin 刺激で CD40 の発現が上昇し、 $\gamma \delta$  T 細胞では IL-4 産生が亢進していたことから、樹状細胞や  $\gamma \delta$  T 細胞などによってもたらされる自然免疫の亢進に起因すると考えられる。

10) ACHN 脂質ラフト中に含まれる主要な抗原は sialylGb5Cer であるが、これは初期発生の重要な未分化細胞のマーカー分子として知られている SSEA-4 のエピトープを担う糖脂質である。そ

ここで、初期発生における膜マイクロドメインの機能解明を目的として、新規抗-SSEA-4 単クローン抗体 6E2 を用い、着床前胚や ES 細胞における膜マイクロドメインの動態解析を開始した。6E2 抗体を直接蛍光標識して未固定のマウス着床前胚を染色し、共焦点レーザー顕微鏡によって SSEA-4 の局在を観察したところ、受精卵の卵割に伴いその分布が割球界面域に移動することが明らかとなり、この抗体を用いてマウス胚上でのラフトの動態を観察することが可能であることが示された。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「糖鎖機能解析法研究」グループ

①研究者名: 本家 孝一 (高知大学医学部生化学講座)

②研究項目

(ア) 膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定

(イ) 膜マイクロドメイン指向性プローブの開発と応用

#### (2)「免疫制御研究」グループ

①研究者名: 宇高 恵子 (高知大学医学部免疫学講座)

②研究項目

(ア) 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構の解明

(イ) T 細胞の抗原認識における糖脂質の機能解析

#### (3)「抗体産生」グループ

①研究者名: 藤本 純一郎 (国立成育医療センター研究所)

②研究項目

(ア) 膜マイクロドメイン調製と免疫及び抗体作成

(イ) 膜マイクロドメイン免疫の抗腫瘍活性

(ウ) 膜マイクロドメイン免疫により惹起される免疫反応の検討

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

○ Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K.: Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, in press.

○ Katagiri YU, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N.:

The detergent-insoluble microdomains, rafts can be used as an effective immunogen., **Glycoconj J**, in press.

- Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, Miyoshi E, Tsukihara T, Honke K, Matsumoto A, Nakagawa A, Taniguchi N.: Crystal structure of mammalian  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase, FUT8. **Glycobiology**, 17, 455-466, 2007.
- Li W, Takahashi M, Shibukawa Y, Yokoe S, Gu J, Miyoshi E, Honke K, Ikeda Y, Taniguchi N.: Introduction of bisecting GlcNAc in *N*-glycans of adenylyl cyclase III enhances its activity. **Glycobiology**, 17, 655-662, 2007.
- Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T.: Study on the quality control of cell therapy products. Determination of *N*-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. **J Chromatogr A**, 1160, 263-269, 2007.
- Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J-I, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N.: A novel monoclonal anti-SSEA-4 antibody, 6E2, preferentially stained interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. **Biochem Biophys Res Commun**, 364, 838-843, 2007.

## (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:1 件)