

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590063

研究課題名（和文） 活性化リンパ球における糖鎖発現情報の認識に関わる分子とその機能

研究課題名（英文） Understanding of glycosylation functions in activated lymphocytes

研究代表者 竹松 弘 (TAKEMATSU HIROMU)

京都大学・大学院生命科学研究所・准教授

研究者番号：80324680

研究成果の概要（和文）：

N-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)とその受容体 CD22 は、共に B 細胞活性化を制御する因子であるが、それぞれの欠損における表現型は、相互作用を示し、部分的にオーバーラップする経路で B 細胞活性化を制御することが考えられた。また、CD22 を介さない Neu5Gc の機能に関して T 細胞系を用いた検討を加える試みにおいては、T 細胞においても Neu5Gc 欠損は、T 細胞活性化を亢進したことから、B 細胞における CD22 との部分的な表現型独立性を理解できることが分かった。

研究全体を通して、これまで、CD22 に対するリガンドのみの影響が強調されてきた Neu5Gc の機能であるが、本研究により、リンパ球における細胞種非依存的な Neu5Gc 機能が明らかになった。Neu5Gc がヒトでも欠損しているが、これらの研究結果から、ヒトの実験動物モデルとしてマウスを使用する場合には、シアル酸分子種をヒトに似せた研究代表者らの Cmah 欠損マウスを使用することが必要であることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this grant, I explored functional aspects of N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) in mouse lymphocytes to understand immunological function of sialic acid species modulation. Targeted disruption of CD22 and Neu5Gc-biosynthesis enzyme CMP-Neu5Ac hydroxylase (CMAH) resulted in the non-overlapping phenotypes in lymphocytes. Obtained data indicated that Neu5Gc, although that serves as high affinity glycan ligand for CD22, functions partly apart from CD22 ligand. This research results indicated that Neu5Gc has CD22-independent cellular autonomous function(s), that may not be limited in lymphocytes. Therefore, **when mice were utilized as a model for human in biomedical research, it is strongly recommended to use cmah-null background** to avoid confusion in the phenotypic analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の学科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：シアル酸 糖鎖 レクチン 認識 リンパ球 胚中心

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、シアル酸分子における修飾（図1）に関して、その生合成に関わる分子的基盤および、その生理学的な意義を世界に先駆けて明らかにしてきた。シアル酸には30種にも及ぶ分子の修飾が知られ、その多くはN-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) を生合成前駆体とする。Neu5Acに酸素原子が一つ付加された構造をもつNeu5Gcを代表とする修飾シアル酸の発現は、細胞種、分化段階などに応じて多様に調節されている。

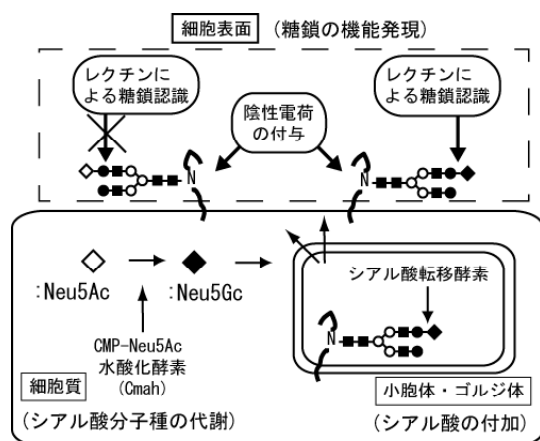


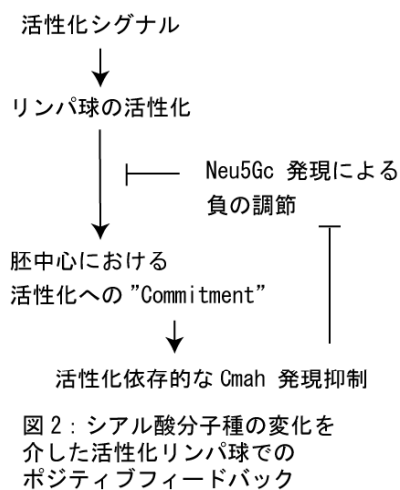
図1 細胞表面でのシアル酸含有糖鎖の発現・認識は細胞質での代謝反応を反映する

細胞表面でのシアル酸の機能は大きく2つに分類できる。一つとして、シアル酸が付加されることで糖鎖に陰性電荷をもたらす物理学的な性質の付与があり、これはゴルジ体のシアル酸転移酵素活性により規定される。一方、特定の分子種のシアル酸が付加された糖鎖はレクチンによる糖鎖認識を介して生体内情報として変換されるが、この情報伝達因子としての機能発現はシアル酸転移酵素と独立した酵素反応により制御されており、例えば、修飾シアル酸であるNeu5Gcの細胞表面における発現の程度は細胞質に存

在するCMP-Neu5Ac水酸化酵素 (Cmah) 活性により規定される。このことは、これら上記の **2つの機能が別個に制御されるべき事象であることを意味する** (図1上点線内)。しかし、修飾シアル酸の生理的機能に関しては、まだその生合成系の解明途上で、世界的にも研究代表者の関わった最近の研究以外にほとんど解析が進んでいない。

CD22/Siglec-2はB細胞に発現し、抗原受容体からの活性化シグナルを制御するが、この機能発現におけるリガンド糖鎖からの影響に関しては、まだコンセンサスが得られておらず、この分野でのこれからの研究課題である。

研究代表者は活性化依存的に発現が抑制されるNeu5GcがB細胞活性化を負に制御していることも明らかにした。このことからNeu5Gcの発現を介してB細胞活性化調節に関わるポジティブフィードバック機構が作用していることが示された(図2)。



2. 研究の目的

当該研究は、B細胞活性化時において発現が制御されているシアル酸分子種のN-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) の機能とその作用機序を明らかにする事を目的とする。現

在までに Neu5Gc 含有糖鎖はシグレックファミリーレクチン CD22/Siglec-2 により高親和性に認識されることは明らかとなっているが、Neu5Gc の機能が全てこのレクチンの作用で説明できるわけではない。そこで、CD22 欠損マウス、CD22 の高親和性リガンドを構成するシアル酸分子種 Neu5Gc 欠損マウスおよび、両者のダブルノックアウトマウスを作製し、CD22 および Neu5Gc 含有糖鎖の機能が B 細胞でどのような機能的重複を示すかを明らかにしたい。また、CD22 を介さない Neu5Gc の機能に関して T 細胞系を用いた検討を加えると共に、CD22 以外の Neu5Gc 認識分子の同定も視野に入れ、活性化リンパ球における Neu5Gc 機能の全貌を明らかにし、なぜこのシアル酸分子種 Neu5Gc が胚中心反応などの活性化で特異的な制御を受ける必要があるのかの意義を明らかにしていく事を目的とした。

3. 研究の方法

CD22 欠損マウス、CD22 の高親和性リガンドを構成するシアル酸分子種 Neu5Gc 欠損マウスおよび、両者のダブルノックアウトマウスを作製し、CD22 および Neu5Gc 含有糖鎖の機能が B 細胞でどのような機能的重複を示すかを明らかにすることを考えた。研究代表者らが作成した Neu5Gc 欠損マウスと Nitschke らの樹立した CD22 欠損マウスを C57/Black6 背景において交配し、それぞれを欠損した二重欠損マウスを作成した。また、Cmah の発現を強制するトランスジェニックマウスを作成し、胚中心活性化による Neu5Gc を介するフィードバックループを封じたマウスも併せて作成した。

これら様々なシアル酸分子種に関連因子を改変したマウスに由来する主には B 細胞を用いて、B 細胞活性における非常に初期段階で起こる反応である、カルシウムイオンの流

入を測定した。また、細胞内シグナル伝達経路の活性化を測定した。さらに下流のプロセスである細胞増殖応答を調べることで、シアル酸分子種の細胞運命決定に関わる意義を検討した。

4. 研究成果

研究の結果、Neu5Gc とその受容体 CD22 は、共に B 細胞活性化を制御する因子であるが、それぞれの欠損における表現型は、相互作用を示し、部分的にオーバーラップする経路で B 細胞活性化を制御することが考えられた。また、CD22 を介さない Neu5Gc の機能に関して T 細胞系を用いた検討を加える試みにおいては、T 細胞においても Neu5Gc 欠損は、T 細胞活性化を亢進したことからも、B 細胞における CD22 との部分的な表現型の独立性として理解できることが分かった。この表現型が CD22 機能を介していないことは非常に重要な意義を持つと考える。というのも、ヒトは Cmah 欠損マウスと同様に Neu5Gc を先天的に欠損する。Cmah 欠損による T 細胞活性化の亢進が起こることは、この表現型は T 細胞に限ると考える合理的な理由がないため、ヒトにおける細胞の特徴としても想定されるものである。今後の研究としては、マウスとヒトにおけるシアル酸分子種の影響を検討していく必要が生じたと考えられる。マウスをより有効なヒトモデルとするためには、Cmah 欠損を基本背景として使用することが、Neu5Gc 機能が完全に明らかになるまでの現状においては次善の策であると考えられる。

研究全体を通して、これまで、CD22 に対するリガンドのみの影響が強調されてきた Neu5Gc の機能であるが、本研究により、リンパ球における細胞種非依存的な Neu5Gc 機能が明らかになった。Neu5Gc がヒトでも欠損し

ているが、これらの研究結果から、ヒトの実験動物モデルとしてマウスを使用する場合には、シアル酸分子種をヒトに似せた研究代表者らの Cmah 欠損マウスを使用することが必要であることが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

(1) Adachi T, Harumiya S, Takematsu H, Kozutsumi Y, Wabl M, Fujimoto M, Tedder TF CD22 serves as a receptor for soluble IgM *Eur J Immunol.* 42 (1): 241-247 (2012)

(2) Takematsu H, Yamamoto H, Naito-Matsui Y, Fujinawa R, Tanaka K, Okuno Y, Tanaka Y, Kyogashima M, Kannagi R, Kozutsumi Y Quantitative transcriptomic profiling of branching in a glycosphingolipid biosynthetic pathway *J Biol Chem.* 286 (31): 27214-27224 (2011)

(3) Abdu-Allah HHM, Watanabe K, Completo GC, Sadagopan M, Hayashizaki K, Takaku C, Tamanaka T, Takematsu H, Kozutsumi Y, Paulson JC, Tsubata T, Ando H, Ishida H, Kiso M CD22-Antagonists with nanomolar potency: The synergistic effect of hydrophobic groups at C-2 and C-9 of sialic acid scaffold *Bioorg and Med Chem.* 19 (6):1966-71. (2011)

(4) Yabuuchi H, Niijima S, Takematsu H, Ida T, Hirokawa T, Hara T, Ogawa T, Minowa Y, Tsujimoto G, Okuno Y. Analysis of multiple compound-protein interactions reveals novel bioactive molecules *Mol Syst Biol.* 7:472 (2011)

(5) Yamamoto H, Naito Y, Okano M, Kanazawa T, Takematsu H, Kozutsumi Y

Sphingosylphosphorylcholine and lysosulfatide have inverse regulatory function in monocytic cell differentiation into macrophages *Arch Biochem Biophys.* 506 (1):83-91. (2011)

(6) Shimobayashi M, Takematsu H, Eiho K, Yamane Y, Kozutsumi Y Identification of Ypk1 as a novel selective substrate for nitrogen starvation-triggered proteolysis requiring autophagy system and ESCRT machinery components *J Biol Chem.* 285(47):36984-94. (2010)

(7) Hanashima S, Sato KI, Naito Y, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ito Y, Yamaguchi Y. Synthesis and binding analysis of unique AG2 pentasaccharide to human Siglec-2 using NMR techniques. *Bioorg Med Chem.* 18(11):3720-5. (2010)

(8) Nawar HF, Berenson CS, Hajishengallis G, Takematsu H, Mandell L, Clare RL, Connell TD. Binding to gangliosides containing N-acetylneuraminic acid is sufficient to mediate the immunomodulatory properties of the non-toxic mucosal adjuvant LT-IIb(T13I). *Clin Vaccine Immunol.* 17(6):969-78. (2010)

(9) Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ohdan H. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. *J Immunol.* 184(6):3269-75. (2010)

(10) Abdu-Allah HH, Watanabe K,

Hayashizaki K, Takaku C, Tamanaka T, Takematsu H, Kozutsumi Y, Tsubata T, Ishida H, Kiso M.

Potent small molecule mouse CD22-inhibitors: exploring the interaction of the residue at C-2 of sialic acid scaffold.

Bioorg Med Chem Lett. 19(19):5573-5. (2009)

(11)Abdu-Allah HH, Watanabe K, Hayashizaki K, Iwayama Y, Takematsu H, Kozutsumi Y, Tsubata T, Ishida H, Kiso M. Synthesis of biotinylated sialoside to probe CD22-ligand interactions

Tetrahedron Lett. 50(31) 4488-4491. (2009)

(12)Cariappa A, Takematsu H, Liu H, Diaz S, Haider K, Boboila C, Kalloo G, Connole M, Shi HN, Varki N, Varki A, Pillai S. B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase.

J Exp Med. 206(1):125-38. (2009)

(13)Kondo Y, Tokuda N, Fan X, Yamashita T, Honke K, Takematsu H, Togayachi A, Ohta M, Kozutsumi Y, Narimatsu H, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K.

Glycosphingolipids are not pivotal receptors for Subtilase cytotoxin in vivo: sensitivity analysis with glycosylation-defective mutant mice.

Biochem Biophys Res Commun. 378(2):179-81. (2009)

[学会発表] (計7件)

(1)第14回日本異種移植研究会

竹松弘

Cmah 欠損マウスーシアル酸分子種ヒト化マウス

2011. 12. 10 広島大学広仁会館 広島

(2)第6回スフィンゴセラピィ研究会

竹松弘

CIRES 法を用いた活性化 B 細胞におけるスフィンゴ糖脂質の生成分岐点での制御機構
2011. 7. 15 米子観光センター 米子

(3)第449回難研セミナー. 第21回難治疾患共同研究拠点セミナー

竹松弘

Quantitative transcriptomic profiling of biosynthetic pathway of CD77, a marker for human germinal center B cells

2011. 1. 17 東京医科歯科大学 東京

(4)2010 Annual conference of the society for glycobiology

Takematsu H., Naito Y., Yamamoto H., Okuno Y., Tanaka K., Kyogashima M., Kannagi R., Kozutsumi Y.

Genetic Understanding of Biosynthetic Pathway Branching Regulation by a Novel Phenotype-Genotype Correlation Analysis, CIRES

Nov 8 (Oral), Nov 9 (Poster), St Pete Beach

(5)The 28th Naito conference on Glycan expression and regulation [I]

Takematsu H., Naito Y., Tanaka K., Kyogashima M., Kannagi R., Kozutsumi Y.

Genetic understanding of glycosphingolipid biosynthetic pathway branching regulation by novel phenotype-genotype analysis, CIRES

Jul 29, 2010 (Poster), Kanagawa

(6)第12回生命科学研究所シンポジウム

新規表現型-遺伝型相関解析法を用いた糖鎖生成分岐点の解析

竹松弘

2010. 7. 1 芝蘭会館稲森ホール 京都

(7)第82回日本生化学会大会2009

糖脂質 CIRES (O/P)

2009. 9. 神戸ポートアイランド 神戸

[図書] (計7件)

(1)Hiromu Takematsu, Reiko Fujinawa, Yasunori Kozutsumi

cDNA microarray experiment: set up and execution

Glycoscience Protocol online database (2011),

<http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t118>

(2) 竹松 弘, 小堤保則

スフィンゴ脂質が関わる免疫抑制とシグナル伝達

化学と生物 49 (05) (2011) 日本農芸化学会

(3) 竹松 弘

非ヒト型シアル酸 N-グリコリルノイラミン酸

生化学事典 田中啓二、石浦章一、水島昇、谷口直之、遠藤玉夫、竹縄忠臣、伊藤俊樹、花岡文雄、塩見春彦 編 (2011) in press 朝倉書店

(4) 竹松 弘、内藤 裕子、小堤 保則

シアル酸分子種のアヒマウス (Cmah ノックアウトマウス)

生体機能モデルと新しいリソース、リサーチツール 小幡裕一、城石俊彦、芹沢忠夫、田中啓二、米川博通 編 393-399 (2011) エル・アイ・シー

(5) 竹松 弘

B リンパ球におけるシアル酸修飾機能解明に向けて

生化学 82 (8), 735-740 (2010) PMID: 20857688 日本生化学会

(6) 竹松 弘、小堤 保則

相関解析法を組み込んだ新しいDNA マイクロアレイデータ解析法 CIRES

-糖鎖生合成系を例にとって

タンパク質核酸酵素 54 (15), 1972-79 (2009) 共立出版

(7) 竹松 弘

B 細胞抗原受容体シグナルのシアル酸脱アセチル化酵素による制御

臨床免疫アレルギー科 52 (5), 561-70 (2009) 科学評論社

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 竹松 弘 (Takematsu Hiromu)
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号: 80324680

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし