

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 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659016

研究課題名（和文）糖鎖修飾を制御する糖蛋白質内モチーフ

研究課題名（英文）A peptide sequence motif which regulates glycoforms

研究代表者

入村 達郎 (IRIMURA TATSURO)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：80092146

研究成果の概要（和文）：エボラウイルス表層糖蛋白質（GP）はそのC型レクチンMGLとの相互作用を通して感染性を決定し、その相互作用は糖鎖構造に依存する。糖付加の多いムチン領域からは離れた部分のペプチド配列モチーフが、糖鎖構造の伸長度、特にガラクトース付加の違いを決定していることを示した。この配列がゴルジ装置の特定の部位に糖蛋白質を留める可能性を示した。配列内に存在する18アミノ酸の内の特定の残基の重要性を示した。

研究成果の概要（英文）：The Ebola virus envelope glycoprotein (GP) determines the infectivity through their differential degree of interaction with MGL, a C-type lectin, and the interaction depends on the carbohydrate structures. Structural determinations of glycans of Zaire GP, Reston GP, and chimeric GPs clearly demonstrated that 18 amino acid residues in the GPs determines the N-glycan extension, particularly transfer of galactose. A possibility that the sequence determines the retention of the glycoprotein at a specific compartment in Golgi apparatus was also shown. Furthermore, importance of specific residues within the 18 amino acids was established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：免疫学・生化学・腫瘍学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：糖蛋白質、正合成、ゴルジ装置、ウイルス感染、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルス被膜糖タンパク質の糖鎖の違いが、C型レクチンMGLとの相互作用を通じて感染性を制御する可能性が、ザイール種とレストン種のウイルス由来の糖蛋白質さらにそれらを外皮に持つ擬似ウイルスの感染性を比較することによって示された。一

部のペプチド部位が糖蛋白質全体の複数のN-結合型糖鎖の修飾（伸長、分岐、シアル酸付加など）を制御することが予想されたが、糖鎖構造解析が完璧に行われていなかったためそれぞれの配列がどのような糖鎖生合成制御上の意味を持つのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、GPの糖付加における制御はペプチド配列のどのアミノ酸残基（の組み合わせ）によるのか、糖鎖の如何なる構造が制御されるのか、いかなる機構によるか、ザイールとレストンのどちらか一方または両方の配列に制御機能があるのか、などについて追究する。これらにより、糖転移酵素とは別のメカニズムにより糖鎖生合成が制御されるという新たなパラダイムが明らかになる。

3. 研究の方法

糖蛋白質の糖鎖の構造を詳細に解析比較することにより、糖鎖生合成のどのステップがこのアミノ酸配列によって制御されているのかを決定する。その過程に影響する因子に焦点を絞り、糖蛋白質の輸送経路、特に通過するゴルジコンパートメントにおける糖蛋白質のプロセシングの速度や特異的な局在を比較する。さらに配列内の重要なアミノ酸残基をさらに絞り込んで特定するとともに、出来ればこのペプチド配列を認識する細胞内蛋白質の同定を試みる。

これらを実現するために、ザイール種とレストン種及びそれらのスワップ変異糖蛋白質について、糖蛋白質を持つエボラ擬似ウイルス及びウイルス様粒子の糖蛋白質の糖鎖構造を比較し、細胞内局在と関係づける。既に予備実験の結果からレストン種由来のGP1のアミノ末端から33-50番目のペプチドの遺伝子をザイールGP1の中に組み込むと、発現したGP1全体の糖鎖がレストンと同じ「伸長、分岐型」になることが判明していた。本提案では先ずこのスワップ実験を逆方向でも行い、ウイルス様粒子を対象に、糖鎖構造に変化が起こるかどうかを網羅的糖鎖解析によって明らかにする。糖蛋白質のウイルス産生細胞における細胞内分布及びプロセシング速度の違いをこれらの改変糖蛋白質について解析する。

4. 研究成果

既にGPの糖鎖構造に影響することを明らかにしているN-末端近くの18個のアミノ酸をスワップし、それらの糖蛋白質の糖鎖構造を網羅的に解析した。その結果、ザイール配列は糖鎖の伸長を抑制し、レストン配列は伸長を促進する事、糖鎖の分岐には影響がない事、特にガラクトースの転移において顕著な差が見られる事、シアル酸の付加には影響がない事、等を明らかにした。異なるアミノ酸配列と、その結果糖鎖付加を異にするザイール、レストン及びキメラ糖蛋白質をウイルス産生細胞に発現させた場合に、細胞の殿1に局在するのか、特にゴルジ装置のどのコンパートメントにより親和性を持っているのかを、細胞化学的方法で追究した。既に重要性が示されている18個のアミノ酸の一部ずつをスワップして、ザイール種とレストン種で異なるどのアミノ酸残

基がこれらにおける細胞内プロセシングの違いに最も重要な影響を与えるのかを追究した。その結果約7アミノ酸残基に絞れることがほぼ明らかとなった。

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 12 件)

1. Kamoshida G, Matsuda A, Sekine W, Mizuno H, Oku T, Itoh S, Irimura T, Tsuji T. Monocyte differentiation induced by co-culture with tumor cells involves RGD-dependent cell adhesion to extracellular matrix. *Cancer Lett.* 2012 Feb 28;315(2):145-52. Epub 2011 Nov 2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.029>
2. Hayakawa Y, Sato-Matsushita M, Takekura K, Iwakura Y, Tahara H, Irimura T. Early activation and interferon- γ production of tumor-infiltrating mature CD27 high natural killer cells. *Cancer Sci.* 2011 Nov; 102(11):1967-71. Epub 2011 Aug 21. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02042.x.
3. Ueno S, Mojic M, Ohashi Y, Higashi, Hayakawa Y, Irimura T. Asialoglycoprotein Receptor Promotes Cancer Metastasis by Activating the EGFR-ERK Pathway. *Cancer Res.* 2011 Oct 15; 71: 6419-6427, 2011. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/20/6419.long>
4. Usami K, Matsuno K, Igarashi M, Denda-Nagai K, Takada A, Irimura T. Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin. *BBRC*;407(1):74-8. 2011 Apr 1. Epub Mar 6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.110>
5. Kamiyama S, Ichimiya T, Ikehara Y, Takase T, Fujimoto I, Suda T, Nakamori S, Nakamura M, Nakayama F, Irimura T, Nakanishi H, Watanabe M, Narimatsu H, Nishihara S. Expression and role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma. *Glycobiology* ; 21(2): 235-246, 2011 Feb. <http://glycob.oxfordjournals.org/content/21/2/235.long>
6. Matsuno K, Nakayama E, Noyori O, Marzi A, Ebihara H, Irimura T, Feldmann H, Takada A. C-type lectins do

not act as functional receptors for filovirus entry into cells. BBRC ; 403(1): 144-8, 2010 Dec 3, Epub Nov 5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.136>

7. Sugiura D, Denda-Nagai K, Takeda K, Irimura T. Organ microenvironment plays significant roles through Fas ligand in vaccine-induced CD4 T cell dependent suppression of tumor growth at the orthotopic site. *Cancer Sci*, 101(9): 1965-1969, 2010 Sep. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01634.x.
8. Matsuda A, Kuno A, Kawamoto T, Matsuzaki H, Irimura T, Ikehara Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H. Wisteria floribunda agglutinin-positive mucin 1 is a sensitive biliary marker for human cholangiocarcinoma. *Hepatology*. Jul; 52(1): 174-182, 2010 Jul. DOI: 10.1002/hep.23654
9. Matsuno K, Kishida N, Usami K, Igarashi M, Yoshida R, Nakayama E, Shimojima M, Feldmann H, Irimura T, Kawaoaka Y, Takada A. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J Virol*. 84(10): 5140-5147, 2010 May. <http://jvi.asm.org/content/84/10/5140.long>
10. Upham JP, Pickett D, Irimura T, Anderson EM, Reading PC. Macrophage receptors for influenza A virus: role of the macrophage galactose-type lectin and mannose receptor in viral entry. *J Virol*. 84(8): 3730-7, 2010 Apr. <http://jvi.asm.org/content/84/8/3730.long>
11. Yi Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, Itoh T, Okada K, Ishii-Schrade K, Iguchi A, Sugiura D, Irimura T. Mucin 21/Epiglycanin Modulates Cell Adhesion. *J Biol Chem*, 285(28): 21233-21240, 2010 Apr 13. <http://www.jbc.org/content/285/28/21233.long>

[学会発表] (計 6件)

1. Irimura T, Ueno S, Mojic M, Ohashi Y, Higashi N, Hyakawa Y. "Asialoglycoprotein Receptor Promotes Lung Metastasis by Activating the EGFR-ERK Pathway." 2011 Annual Conference of the Society for Glycobiology (2011. 11/9-12: The Westin Seattle, WA, US

A)11/11,P

2. Irimura T. "Mucin 21/epiglycanin as a potential marker and a determinant of malignant behavior of cancer cells." *Mucins in health and disease (11th International Workshop Carcinoma-associated Mucins)* (2011.7/9-13: Robinson College, Cambridge, UK) 7/13, 0
3. Irimura T, Denda-Nagai K, Tian Y. "Mucin21/epiglycanin in malignant behavior of cancer cells" 第69回日本癌学会学術総会 (2010.9.22-24: 大阪国際会議場、大阪) 9/24, S
4. Irimura T. "Galactose/Calcium-Type Lectins in Inflammation and Immunity" 第28回内藤コンファレンス (2010.7.27-30: 湘南国際村センター、神奈川) 7/29, 0
5. 入村達郎「疾患を解き明かす糖鎖: 樹状細胞の機能とレクチン」第11回 Pharma-Hematology Symposium (2010.6.18-19: 日本薬学会長井記念ホール、東京) 6/18、特別講演
6. 入村達郎「糖鎖生命科学を通じた免疫と病態の解明 (Elucidation of Immunity and Pathogenesis through Glycosciences)」第130年会日本薬学会 (2010.3.28-30: 岡山コンベンションセンター) 3/28、日本薬学会賞受賞講演

[図書] (計 2件)

1. 伝田香里、入村達郎「樹状細胞による抗原提示とMGL2」臨床免疫・アレルギー科, 55(1):116-122, 2011
2. 入村達郎 理系総合のための生命科学 第2版 分子・細胞・個体から知る “生命”のしくみ 第21章「免疫」 羊土社、2010.3.1、p.260-272

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~cancer/labpage/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入村 達郎 (IRIMURA TATSURO)
東京大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号：80092146

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：