

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659171

研究課題名(和文) グロボ系スフィンゴ糖脂質のLPS受容体への特異的結合による生体防御機構

研究課題名(英文) Bioprotection mechanisms by specific binding of globo-series glycosphingolipids to LPS receptors

研究代表者

古川 鋼一 (Furukawa, Koichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80211530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：LPSで誘導されるスフィンゴ糖脂質の生体防御機能と作用機構を解析した。とくに細胞膜におけるグロボ系糖脂質のLPSによる細胞障害に対する抑制機能につき、LPS受容体とGb4の結合特異性と相互作用を解析し新規の糖脂質機能の解明をめざした。Gb4のTLR-4/MD2への特異的結合と、LPSシグナルの抑制作用が示された。また、Gb4の中で、飽和脂肪酸含有セラミドから成る分子のみがTLR-4/MD2に結合したことから、免疫細胞染色や膜分子の分画の結果と共に、その結合が脂質ラフトで起こることが示唆された。LPS注入マウスへのGb4の投与でエンドトキシンショックの軽減が見られ、治療応用の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Bioprotective functions and action mechanisms of glycosphingolipids induced by LPS were analyzed. In particular, demonstration of novel functions of glycolipids was aimed by analyzing binding specificity and interaction between LPS receptors and Gb4 with focus on the suppressive function of globo-series glycolipids to LPS cytotoxicity. Specific binding of Gb4 to TLR-4/MD2 and the suppression of LPS signals with Gb4 were observed. The fact that only Gb4 with saturated forms of fatty acids bound to TLR-4/MD2 as well as results of immunocytochemistry and of fractionation of membrane molecules suggested that the binding occurred in lipid rafts. Administration of Gb4 into LPS-injected mice could restore them from endotoxin shock, suggesting the possibility of therapeutic application of Gb4 in the clinical fields.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 病態医化学

キーワード：グロボシド LPS エンドトキシンショック A4GALT TLR-4

1. 研究開始当初の背景

細菌感染は人類史の中で常に最大の重要課題であったが、抗生物質の普及によりその一般的脅威は大きく減少した。しかし、新興の薬剤耐性菌の出現、慢性および急性の免疫不全状態における細菌感染など、新たな事態への有効な対処法が常に要求される。とりわけグラム陰性桿菌によるエンドトキシンショックは、患者の生命を一気に奪うことが多く、临床上の深刻な脅威であり続けているが、その根本治療の開発はほとんど進展していない。本研究で提案する、グロボ系糖脂質の治療応用は、手詰まり状態のエンドトキシンショックの治療に光をあてる「晴天の霹靂」的な発見となる可能性が高い。

一方、スフィンゴ糖脂質は主に細胞膜表面に発現し、脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインにおいて様々なイベントの調節に働く。グロボ系糖脂質では、Gb3 が病原性大腸菌 0157 のペロ毒素の受容体であること以外、明確な機能は不明である。私たちはグロボ系糖脂質を欠損する Gb3/CD77 合成酵素 (A4galt) ノックアウト (KO) マウスを作成し、その役割を解析してきた。その中で、A4galt KO マウスでは LPS の 2 度注入によるアナフィラキシーショック死が著明に起こり、同時に、KO 由来の血管内皮細胞で LPS シグナルの著明な亢進が見られた。そこで、グロボ系糖脂質が LPS とその受容体である TLR4 複合体との結合を競合的に阻害する可能性を考えた。なぜなら、TLR4 とともに LPS 受容体を形成する MD-2 は、MD-2-related lipid-recognition (ML) タンパク質として種々の脂質との結合が知られていると同時に、ML タンパク質の一員である GM2 分解酵素の中の b-Hex-ase activating protein との立体構造の類似性が認められたため、MD-2 とグロボ系糖脂質との特異的結合を想定し、以下の実験を

行った。

2. 研究の目的

本研究では、LPS 刺激により発現誘導されるスフィンゴ糖脂質の生体防御機能と作用機構を解明する。とくに細胞膜表面におけるグロボ系糖脂質の LPS による細胞障害に対する抑制的機能について、LPS 受容体複合体と、糖鎖とセラミドから形成される両親媒性構造との結合特異性と相互作用に焦点をあて、全く新規の糖脂質機能の解明をめざす。

本研究の達成により、内因性のリガンド分子がほとんど不明である糖脂質糖鎖の特異的結合タンパク質を世界で初めて同定し、その生体防御における重要性を明らかにすると同時に、その治療応用の可能性が明らかになる、画期的な研究である。

3. 研究の方法

グロボ系糖脂質の、LPS 毒性の抑制および LPS 刺激によるシグナルの制御機能を解析するために、グロボ系糖脂質を欠損する Gb3/CD77 合成酵素 (A4galt) の KO マウスおよびそれらに由来する血管内皮初代培養細胞を用いた分子生物学的、生化学的、病理学的な検討を行う。とくに、LPS 受容体である TLR-4/MD2 複合体に対するグロボ系糖脂質の結合特異性と結合様式とについて焦点化した様々な検討を行い、A4galt 欠損マウスと野生型マウス間の、注入 LPS への感受性の差異のメカニズムを明らかにする。さらに、糖脂質の動物への投与による LPS 毒性の中和作用を検討し、グロボ系糖脂質のエンドトキシンショック予防と治療における有効性を検討して、その治療応用の可能性を明らかにする。

(1) グロボ系糖脂質の LPS 刺激に対する

生体反応での役割を解析するために、グロボ系糖脂質を欠損する A4gal の KO マウス由来の血管内皮初代培養細胞を用いた解析を行う。

- ① 血管内皮初代培養細胞の LPS 刺激時の、シグナル、遺伝子発現の比較検討。
 - ② 血管内皮初代培養細胞への糖鎖合成酵素遺伝子群の再導入時の反応性回復の検討。
 - ③ グロボ系糖鎖合成酵素 silencing LPS シグナルに与える効果の比較検討。
- (2) LPS を注入されたマウスの LPS 感受性を、A4galt 欠損マウスと野生型で比較し、糖脂質の注入による LPS 毒性の中和作用と治療応用の可能性を探る。
- ① A4galt KO マウスへの LPS 投与に対する感受性につき比較検討を行う。
- (3) 糖脂質の LPS 受容体複合体への結合の検討を行い、LPS-LPS 受容体間の相互作用の阻害と機構を解明する。
- ① 初代培養血管内皮細胞の糖鎖改変による LPS の結合実験：TLR-4/MD2 への糖脂質の結合を、複合体の共沈降、Native-PAGE、SPR により検討。
- (4) TLR-4/MD2 に対する糖脂質の結合のカイネティクスと特異性の解析。
- ① TLR-4/MD2 に対する糖脂質の結合機構の解明のために、複合体の結晶解析を試みる。
- (5) 糖脂質単分子とクラスター及び TLR-4/MD2 に対する糖脂質の結合のイメージング解析。
- (6) EMARS (Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources) 反応により、グロボ系糖脂質に会合する新規分子の同定を試みる。

(7) 臨床応用に向けたグロボ系糖脂質の機能の検証を行う。

- ① LPS 結合の *in vitro* の阻害実験を行い、結合特異性を明らかにする。
- ② 種々の糖脂質の前投与の LPS 毒性軽減効果を比較検討する。
- ③ LPS 注入後の糖脂質投与の効果を比較検討し、治療応用の可能性を検討する。

4. 研究成果

グロボ系糖脂質の、LPS 毒性の抑制及び LPS 刺激によるシグナル制御機能を解析するために、グロボ系糖脂質を欠損する Gb3/CD77 合成酵素遺伝子 (A4galt) ノックアウト (KO) マウス及びそれに由来する血管内皮初代培養細胞を用いた解析を行った。とくに LPS 受容体、TLR4-MD2 複合体に対するグロボシドの結合特異性について検討を行い、A4galt 欠損マウスと野生型マウス間の、LPS への感受性のメカニズムを明らかにした。具体的には、LPS 刺激に対する生体反応でのグロボ系糖脂質の役割を解析するために、グロボ系糖脂質欠損 A4galt の KO マウス由来血管内皮初代培養細胞を用いて、LPS 刺激時のシグナル変化と遺伝子発現を比較検討したところ、iNOS、TNF α 、IL-6、NO 等の発現レベルが亢進することが判明した。さらに、血管内皮初代培養細胞への Gb3 合成酵素 cDNA を再導入時に、反応性の回復が確認された。また、LPS 注入マウスの LPS 感受性を、KO マウスと野生型マウス間で比較し、KO マウスでの感受性の亢進を認めた。

次に、糖脂質の LPS 受容体複合体への結合の検討のため、血管内皮初代培養細胞の糖鎖改変による LPS の結合実験と TLR-4/MD2 に対する糖脂質の結合実験を行った。実際には、His-MD2 と糖脂質の

複合体の共沈降、及び Native-PAGE を行った。さらに種々の糖脂質による結合阻害実験を行い、結合特異性を明らかにした。これらの成果をふまえて、TLR-4/MD2 に対する糖脂質の結合機構を解明するために、複合体のドッキングモデルを構築して、セラミド部分のみならず Gb4 の 4 糖部分が MD2 の疎水性 gap にはまり込んで結合することが示された。

さらに、Gb4 と TLR-4/MD2 との複合体の細胞膜上での会合状態を、細胞免疫染色と超遠心による脂質ラフトの分離により観察した。LPS 刺激後 10-15 分後に、Gb4 と MD2 の膜近辺での共局在が示された。さらに LPS 刺激後の血管内皮初代培養細胞の Triton-X100 抽出物のショ糖密度勾配超遠心分離による画分のイムノブロットにおいて、刺激前には非ラフト画分にいた TLR-4 が、15 分後にはラフト画分に局在することが分かった。よって、この過程で、LPS が Gb4 に置換される可能性が示唆された。Gb4 と TLR-4/MD2 間の親和性が LPS のそれに比して低い点、この仮説の難点と思われるが、糖脂質のクラスター効果が基盤になっていることが想定される。

Gb4 と TLR-4/MD2 との結合特異性について詳細を明らかにするために、MD2-FLAG-His-tag 導入細胞から抗 His 抗体による免疫沈降を行い、沈降物の TLC-immunostaining 及び mass 解析を行った。その結果、Gb4 が特異的に沈降し、LacCer や Gb3 は検出されなかった。また、Gb4 の MS 解析では、d18:1 スフィンゴシンに加えて、C:16、C:24 などの飽和型脂肪酸含有セラミドのみが検出され、不飽和型脂肪酸は検出されなかった。これらの事実は、免疫細胞化学やラフト解析で示された、Gb4 と TLR-4/MD2 の結合が脂質ラフトで起こる、という所見と一致するものと思われた。

EMARS 法の実施に向けて、現存の抗 Gb4

抗体の全てが IgM であるため、KO マウスの免疫による IgG 型モノクローナル抗体を試み、成功している。

Gb4 の、LPS 注入により惹起されるエンドトキシンショックへの治療効果をマウスを用いて検討した。D-GlcNAc 注入後に LPS 投与したマウスに対して、4 時間後に Gb4 を投与したところ、Gb4 非投与マウスでは 100%死亡したのに比して、Gb4 投与マウスでは 50%以上が生存することが判明した。よって、Gb4 投与が敗血症の際のエンドトキシンショックに対して治療効果があることが示唆された。

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 4 件)

全て査読有

- ① Kondo, Y., Tokuda, N., Nishitani, C., Ohto, U., Akashi-takaura, S., Ito, Y., Uchikawa, M., Kuroki, Y., Miyake, K., Zhang, Q., Furukawa, K., Furukawa, K.: TLR4-MD-2 complex is negatively regulated by an endogenous ligand, globotetrasylceramide in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 4714-4719, 2013.
- ② Hashimoto, N., Hamamura, K., Kotani, N., Furukawa, K., Kaneko, K., Honke, K., Furukawa, K.: Proteomic analysis of ganglioside-associated membrane molecules: Substantial basis for molecular clustering. *Proteomics* 12, 3154-3163, 2012.
- ③ Oda, M., Kabura, M., Takagishi, T., Suzue, A., Tominaga, K., Urano, S.,

- Nagahama, M., Kobayashi, K., Furukawa, K., Sakurai, J. : Clostridium perfringens Alpha-toxin Recognizes the GM1a/TrkA Complex. *J. Biol. Chem.* 287, 33070-33079, 2012, 査読有
- ④ Furukawa K., Ohmi Y, Ohkawa Y, Tokuda N, Tajima O, Furukawa K.: Molecular mechanisms for the regulation of nervous systems with glycosphingolipids. *Seikagaku.* 83(3), 169-173, 2011.
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Koichi Furukawa : Spatio-temporal dynamics of the interaction between glycosphingolipids and membrane molecules. Gordon Research Conference & Glycolipids Sphingolipid Biology. (招待講演) (2014年1月14日アメリカ・カリフォルニア州 Four Points by Sheraton Ventura Harbor Hotel)
- ② 古川鋼一、近藤裕史、松本康之、古川圭子 : 糖鎖フィールド : 糖鎖がシグナル伝達を制御する原理 第86回日本生化学会大会 (2013年9月12日 パシフィコ横浜 横浜市)
- ③ 古川鋼一、近藤裕史、松本康之、古川圭子 : 複合糖質と糖鎖認識分子との相互作用の時空間的ダイナミクス 第86回日本生化学会大会 (2013年9月12日 パシフィコ横浜 横浜市)
- ④ Furukawa, K., Kondo, Y., Ohto, U., Akashi-Takamura, S., Ito, Y., Miyabe, K., Furukawa, K. : TLR4-MD-2 Complex is Negatively Regulated by Endogenous Ligand, Globotetraosylceramide in Vascular Endothelial Cells. Symposium in the 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan

“Glycans as disease modifier” (招待講演) (2012年12月12日 福岡国際会議場 福岡市)

- ⑤ Furukawa, K., Kondo, Y., Tokuda, N., Ito, Y., Akashi-Takamura, S., Miyabe, K., Furukawa, K. : Roles of globo-series glycolipids in the regulation of LPS-TLR4 signals. ICHC2012 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (招待講演) (2012年8月26日 京都国際会議場 京都市)
- ⑥ 古川鋼一 : 病理学におけるグライコム研究-神経・筋、感染症、がん、再生医学-医学における糖鎖研究の重要性。第8回日本病理学会 2011 カンファレンス松本(招待講演) (2011年8月5日 ホテルブエナビスタ松本 松本市)

[図書] (計 4 件)

- ① Koichi Furukawa, Yuji Kondo, Keiko Furukawa : α 4-galactosyltransferase (A4GALT). In Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. Springer, 2014, in press.
- ② 古川鋼一、松本康之、章青、古川圭子 : 肺転移モデル、転移浸潤モデルシリーズ モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用 がん エル・アイ・シー, 633(P60-67), 2012
- ③ 古川鋼一、近藤裕史、奥田徹哉、古川圭子 : グロボ系糖脂質欠損マウス 糖鎖関連遺伝子ノックアウトマウスシリーズ モデル動物利用マニュアル 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチ ツール エル・アイ・シー -, 671(P311-313), 2011
- ④ 古川鋼一、大海雄介、大川祐樹、徳田

典代、田島織絵、古川圭子：ガングリオシド合成酵素、糖鎖関連遺伝子ノックアウトマウスシリーズ モデル動物利用マニュアル 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール, エル・アイ・シー, 671 (P303-310), 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 鋼一 (Furukawa Koichi)

名古屋大学

医学系研究科・教授

研究者番号：80211530

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し