

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370057

研究課題名(和文) 自然免疫をダイナミックに制御する糖鎖修飾の解析

研究課題名(英文) Dynamic regulation of innate immune responses in Drosophila by Senju-mediated glycosylation.

研究代表者

後藤 聡 (Goto, Satoshi)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：60280575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫は病原体から我々の身体を守るために必須です。しかし、非感染時に免疫反応が活性化してしまうと自己免疫疾患や慢性炎症などが引き起こされ身体は多大なるダメージを受けます。一方、感染時に免疫反応が活性化しなければ感染症などで死に至る場合もあります。従って免疫反応は非感染時には抑制されいったん感染が起こると速やかに活性化されなければなりません。本研究では、過剰な免疫反応を抑制する糖鎖の存在を見出し、この合成に必須なsenju遺伝子を同定しました。さらに、感染が起きるとこの抑制的に働く糖鎖は減少して免疫反応の活性化を促進していることを見出しました。

研究成果の概要(英文)：The innate immune system is the first line of defense against invading pathogens. Activation of the innate immune response by infection and suppression during steady state are stringently controlled to eliminate pathogens and prevent inflammation. We found that host glycosylation plays an important role in the activation of immune responses and in maintaining innate immune homeostasis. In the steady state, a high amount of galactose-containing glycan suppresses undesirable activation of the immune response; however, activation of immune responses leads to reduced levels of galactose-containing glycan, which is needed for raising immune responses to an adequate level. Our finding suggests a novel mechanism for the regulation of innate immune quiescence and activation via changes in glycosylation status.

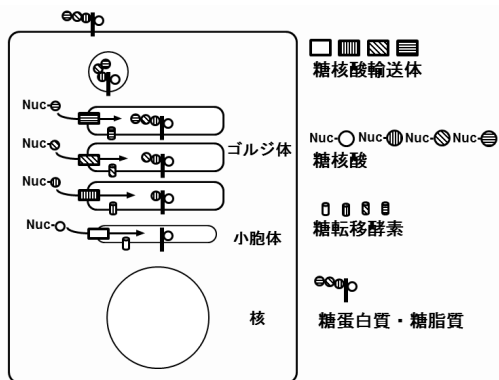
研究分野：糖鎖生物学

キーワード：自然免疫 糖鎖 ガラクトース

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、病原体が体内に侵入したときに最初に惹起される防御反応である。しかし、侵入した病原体の量に対して極端に弱い免疫応答はもちろんのこと、過剰な免疫応答も生体に悪影響を及ぼす。もし非感染時に自然免疫反応が活性化されていると慢性炎症や自己免疫疾患が引き起こされてしまう。逆に感染時に自然免疫反応が十分に活性化されなければ感染症で死に至ってしまう。したがって、**自然免疫は非感染時には抑制され、感染時には速やかに活性化されなければならない**。しかし、その制御メカニズムの多くの部分が不明であった。

私達は、糖鎖の新しい生理機能を探索する過程で、偶然にも**自然免疫を負に制御する糖鎖が生体内に存在すること**を見出した。これは、今まで報告のなかった新たな発見である。すなわち、私達は、ショウジョウバエをモデル系に用い、糖鎖合成に必須な糖核酸輸送体(図1)のひとつである *senju* 遺伝子のノックアウト変異体を作成した。その結果、*senju* 変異体では自然免疫が異常に亢進していること、さらに少なくとも Toll/TLR pathway の異常な活性化が生じていることがわかつ



た。
図1. 糖核酸輸送体の役割。ゴルジ体や小胞体の膜上にある糖核酸輸送体によって、細胞質から小胞体・ゴルジ体内腔へ、糖核酸が輸送される。その糖核酸を使って、糖転移酵素が糖鎖を生合成する。糖核酸輸送体には、輸送する糖核酸の種類に特異性がある。

さらに、*Senju* タンパク質がどのような糖核酸を輸送するかを調べたところ、UDP-Galactose を選択的に輸送することがわかった。この結果から、おそらく *senju* 変異体では Galactose を含む糖鎖に異常が生じていると予想された。

一般に、自然免疫のシグナル伝達における正・負の制御は、非常によく研究されている。特に細胞内のシグナル伝達については多くの研究があるにもかかわらず、細胞外のリガンドやレセプターに対する翻訳後修飾の研究は進んでいない。ただ、糖鎖が膜蛋白質の品質管理に必要という一般的な糖鎖機能を TLR で解析した例があるのみである。そいつ

った観点からも、私達が見出した糖鎖は自然免疫の新たな調節機構であり、他の研究とは一線を画す独創的研究ということが出来る。

2. 研究の目的

本研究では、糖鎖による自然免疫の制御メカニズムを明らかにする。具体的には、*senju* 変異体では Toll/TLR pathway のどの因子が異常に活性化しているかを明らかにする。また、*senju* 変異体では自然免疫が異常に亢進していたので、逆に *senju* 遺伝子を過剰発現させると自然免疫が抑制されるかを検討し、*senju* 遺伝子が関与する糖鎖の量が自然免疫の反応の強さを決定しているかを明らかにする。さらに、この糖鎖量が感染時に変化するかも明らかにする。これらの解析を通じて、「**糖鎖修飾による自然免疫レベルのダイナミックな制御とそのメカニズムの解明**」を目指す。

3. 研究の方法

まず、Toll/TLR pathway のどの因子が異常に活性化しているかを明らかにするために、Toll/TLR pathway の各因子の変異体と *senju* 変異体の二重変異体を用い、epistatic analysis を行った。活性化している因子が同定できたので、実際に生化学的に活性化しているかを検証した。

次に、*senju* 遺伝子を過剰発現させ、実際に糖鎖量が増加するか、自然免疫が抑制されるかを検討した。

最後に、このように自然免疫を抑制する糖鎖が、感染時に変化するかを検討した。

4. 研究成果

senju 変異体と Toll pathway の様々な因子の変異体を組み合わせ、自然免疫の異常な活性化が抑制されるかを調べた。その結果、Toll 受容体のリガンドである Spaetzle (*Spz*) の変異体でのみ抑制された(図2)。それより上流の因子の変異体では抑制されなかった。従って、*senju* 変異体では *Spz* が活性化している可能性が考えられた。そこで、生化学的に *senju* 変異体での *Spz* の活性化状態を調べたところ、非感染時にもかかわらず異常に活性化していた。

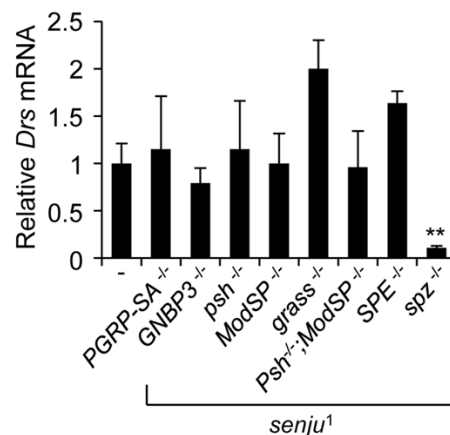


図2 . *senju* 変異体と Toll pathway の様々な因子の変異体を用いた epistatic analysis

次に、*senju* 遺伝子を過剰発現させ、糖鎖量を測定したところ、galactose を含む糖鎖の量が増加していることがわかった。続いて、感染時における自然免疫の活性化度を抗菌ペプチドの発現量で定量したところ、*senju* 遺伝子を過剰発現させると半分程度まで減少することがわかった。さらに、感染させてからの生存率を測定したところ、*senju* 遺伝子を過剰発現させた個体のほうの生存率が有意に低いことがわかった(図3)。この結果から、*senju* 遺伝子を過剰発現させて galactose を含む糖鎖量を増加させると、自然免疫が抑制されることが明らかとなった。

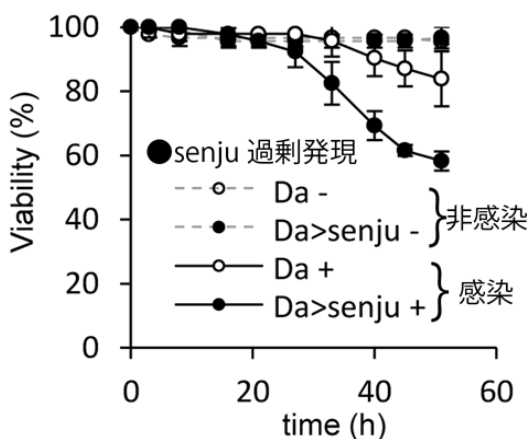


図3 . *Senju* 過剰発現による感染に対する脆弱性の上昇

最後に、感染を再現するために Toll 受容体の恒常的活性化型を発現させ、その量は有意に減少していた。を定量した。すると、その量は有意に減少していた。さらに、実際に病原体を感染させ、galactose を含む糖鎖量を定量した。この場合も、糖鎖量は有意に減少していた。これらの結果から、感染すると、自然免疫を抑制する糖鎖は減少することがわかった。

以上の結果から、*Senju* タンパク質がその生合成に必要とされる糖鎖は、Toll pathway の Spz の活性化を抑制していること、そしてその糖鎖量が自然免疫の強さを調節していること、さらに、感染時にはその糖鎖量が減少することで、十分な自然免疫応答が引き起こされることがわかった。つまり、非感染時には galactose を含む糖鎖が自然免疫の活性化を抑制し、自己免疫疾患や慢性炎症が引き起こされることを防いでいる一方、感染時にはその糖鎖量が速やかに減少することで、十分な自然免疫の活性化が誘導されることを示している(図4)。このような糖鎖による自然免疫のダイナミックな制御は、世界でも初めての報告であり、重要な発見といえる。

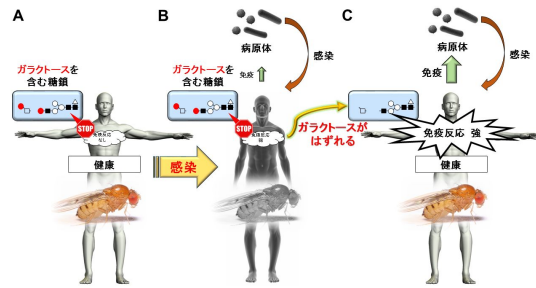


図4 . 糖鎖による自然免疫のダイナミックな制御メカニズム

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7件)

Yamamoto-Hino,M., Muraoka,M., Kondo,S., Ueda,R., Okano,H. and Goto,S., Dynamic regulation of innate immune responses in *Drosophila* by *Senju*-mediated glycosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (査読有) vol.112, No. 18, 2015, pp.5809-5814,

DOI: 10.1073/pnas.1424514112

Yamamoto-Hino,M., Yoshida,H., Ichimiya,T., Sakamura,S., Maeda,M., Kimura,Y., Sasaki,N., Aoki-Kinoshita,K.Y., Kinoshita-Toyoda,A., Toyoda,H., Ueda,R., Nishihara,S., and Goto,S., Phenotype-based clustering of glycosylation-related genes by RNAi-mediated gene silencing. Genes Cells, (査読有) vol.20, No.6, 2015

DOI: 10.1111/gtc.12246

Yamamoto-Hino,M. and Goto,S., *In vivo* RNAi-based screens: studies in model organisms.(査読有)2013, Genes, vol.4, pp.646-665

DOI:10.3390/genes4040646

Yamamoto-Hino,M., Abe,M., Shibano,T., Setoguchi,Y., Awano,W., Ueda.R., Okano,H. and Goto,S., Cisterna-specific localization of glycosylation-related proteins to the Golgi apparatus. Cell Struct. Funct., (査読有) vol.37, pp.55-63, 2012

DOI: dx.doi.org/10.1247/csf.11037

Yano,H., Yamamoto-Hino,M., Awano,W., Aoki-Kinoshita,K.F., Tsuda-Sakurai,K., Okano,H. and Goto,S., Identification of proteasome components required for apical localization of Choptin using functional genomics. J. Neurogenet.,(査読有)vol.26, pp.53-63, 2012

DOI: 10.3109/01677063.2012.661497

Kametaka,S., Kametaka,A., Yonekura,S., Haruta,M., Takenoshita,S., Goto,S. and Waguri,S. AP-1 clathrin adaptor and

CG8538/Aftiphilin are involved in Notch signaling during eye development in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.*, (査読有) vol.125, pp.634-648, 2012
DOI: 10.1242/jcs.090167
Mukai, A., Yamamoto-Hino, M., Komada, M., Okano, H. and Goto, S. Balanced ubiquitination determines cellular responsiveness to extracellular stimuli. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (査読有) vol.69, pp.4007-4016, 2012
DOI: 10.1007/s00018-012-1084-4

〔学会発表〕(計8件)

山本(日野)美紀、村岡 正敏、近藤 周、岡野 栄之、上田 龍、後藤 聡
糖鎖修飾による自然免疫反応の恒常性維持

平成26年度 日本生化学会九州支部例会 (招待講演)

2014年5月17日から2014年5月18日

九州大学(福岡県福岡市)

Miki Yamamoto (Hino), Masatoshi Muraoka, Shu Kondo, Hideyuki Okano, Ryu Ueda, Satoshi Goto

Dynamic regulation of innate immune responses by Senju-mediated glycosylation in *Drosophila*

第11回 日本ショウジョウバエ研究会

2014年6月4日から2014年6月6日
金沢歌劇座(石川県金沢市)

山本(日野)美紀、村岡 正敏、近藤 周、岡野 栄之、上田 龍、後藤 聡
糖鎖修飾による自然免疫反応の恒常性維持

第66回日本細胞生物学会

2014年6月11日から2014年6月13日

東大寺総合文化センター(奈良県奈良市)

山本(日野)美紀、村岡 正敏、近藤 周、岡野 栄之、上田 龍、後藤 聡
糖鎖修飾の変化による自然免疫反応のダイナミックな制御

第25回日本生体防御学会

2014年7月9日から2014年7月11日
東北大学(宮城県仙台市)

Dynamic regulation of innate immune responses in *Drosophila* by Senju-mediated glycosylation (口頭発表)

Miki Yamamoto-Hino, Masatoshi Muraoka, Hideyuki Okano, Satoshi Goto

第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ

2013年12月4日 神戸ポートアイラン

ド(兵庫県神戸市)

「Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate Immunity」(口頭発表、ポスター発表)

Miki Yamamoto-Hino, Masatoshi Muraoka, Hideyuki Okano, Satoshi Goto,

The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting, The Homeostatic Inflammation International Symposium, The 18th Japan Endotoxin and Innate Immunity Society meeting and the 11th Japanese Biochemical Society Bio-Frontier Symposium,

2012年10月24日, Chiyoda-ku, Tokyo

「Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate Immunity」(口頭発表)

Miki Yamamoto-Hino, Takako Shibano, Wakae Awano, Masatoshi Muraoka, Hideyuki Okano and Satoshi Goto

日本ショウジョウバエ研究会

2012年10月13日・東京都、港区

「Novel Roles of Glycosylation in *Drosophila* Innate Immunity」(ワークショップ(口頭発表)、ポスター発表)

山本(日野)美紀、芝野孝子、粟野若枝、村岡正敏、岡野栄之、後藤 聡

日本発生・細胞生物学会合同大会

2012年5月31日・兵庫県神戸市

〔図書〕(計1件)

Yamamoto-Hino, M. and Goto, S.
SpringerReference (Heidelberg) 、

Localization of glycosyl enzymes and nucleotide-sugar transporters in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus., In “Glycoscience: Biology and Medicine”, Taniguchi, N. et al. ed. , 2014

DOI: 10.1007/978-4-431-54836-2_48-1

〔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：
出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://goto-lab.net/>

6．研究組織

(1)研究代表者

後藤 聡 (GOTO Satoshi)

立教大学、理学部、生命理学科、教授

研究者番号：6 0 2 8 0 5 7 5

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：