

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440066

研究課題名(和文) 病原菌を効率的に排除するために必要な、糖鎖修飾変化の機構

研究課題名(英文) Mechanism of glycan change involved in the activation of innate immunity

研究代表者

山本 美紀(日野美紀)(YAMAMOTO(HINO), MIKI)

立教大学・理学部・ポストドクトラルフェロー

研究者番号：40301783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫は、生体が病原体に感染した時に起こる、最初の防御反応である。これまでに研究代表者はショウジョウバエを用いて、この防御反応が効率的に活性化するために、宿主の糖鎖修飾の変化が重要であることを発見していた。本研究では、感染によって糖鎖が変化するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究代表者はまず、自然免疫を制御する糖鎖の一つとして、グリコサミノグリカン糖鎖(GAG)を同定した。即ち、GAGは定常時、自然免疫の不適切な活性化を抑制していた。そして感染時には、この糖鎖合成酵素であるbotvの転写量が低下しており、それによって糖鎖は不完全となり、自然免疫が効率的に活性化していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The innate immune system is the first line of defense encountered by invading pathogens. We have found that immune challenge leads to change host glycosylation, which involved in full activation of immune response. Our aim in this study was to reveal the mechanism of the host glycan change by immune challenge.

In this study, we found that glucosaminoglycan (GAG) regulates immune activity. GAG suppresses hyper-activation of the Toll pathway in the steady state. Interestingly, pathogen infection reduces the expression of a GAG synthesizing enzyme to enhance immune responses. These results indicate that GAG plays an important role in both suppression of runaway inflammation and enhancement of immune responses.

研究分野：細胞生物学

キーワード：自然免疫 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、病原体などの感染に対する最初の防御機構である。感染時に十分に活性化しなければ敗血症などの感染症に陥るが、異常な活性化は慢性炎症や自己免疫疾患の原因となることが最近明らかになってきた(Nat. Rev. Immunol. 2006)。従ってこれらの病態を理解し治療薬を開発するうえで、自然免疫反応の緊密な制御機構を解明することは喫緊の課題であった。

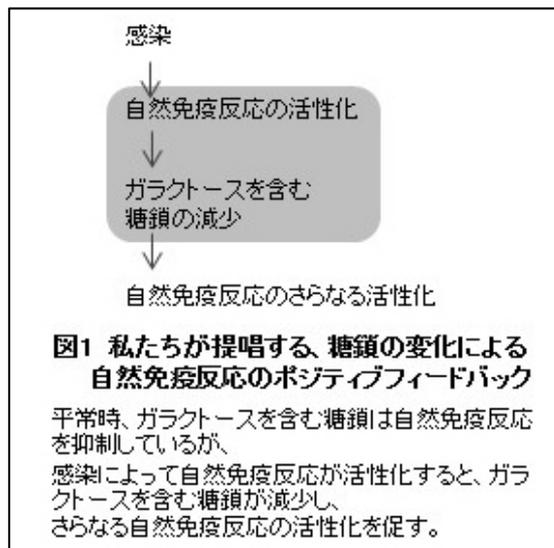
研究代表者はこれまでに、その制御機構の一つとして、自然免疫反応の活性化によって宿主のガラクトースを含む糖鎖が減少し、その減少がさらに自然免疫反応を促進するという、糖鎖の変化による自然免疫反応のポジティブフィードバック機構を見出していた(図1)。

背景(1) 自然免疫反応の活性化によって、糖鎖が変化する

研究代表者は本研究開始以前に、ショウジョウバエを用いて、自然免疫を司る Toll 情報伝達系の受容体である Toll 受容体の恒常的活性化型を強制発現させると、ガラクトースを含む糖鎖が顕著に減少することを発見していた(2014年)。

背景(2) その糖鎖の変化は、自然免疫反応を活性化させる

研究代表者は、ガラクトースを含む糖鎖の合成に必要な、UDP-ガラクトース輸送体 *senju* をショウジョウバエでノックアウトした。この変異体ではガラクトースを含む糖鎖が減少していた。そして細菌に感染していないにも関わらず、自然免疫を司る Toll 情報伝達系が恒常的に活性化しており、自然免疫反応が異常に亢進していることを見出した。逆に UDP-ガラクトース輸送体を強制発現させて量を増やすと、感染時の自然免疫反応が抑制され、生存率が低下するという結果を得ていた(2014年)。



以上の結果から、糖鎖の変化が自然免疫反応を適切なレベルまで活性化するのに重要であることは明らかであった。図1の後半に

示している、ガラクトースを含む糖鎖の減少が自然免疫反応を活性化するメカニズムについては、これまでの研究により、ショウジョウバエの Toll レセプターの内在性リガンドの活性化によるものであることを明らかにしてきた。しかし前半の、自然免疫の活性化によって糖鎖が変化するメカニズムについては、まだ明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究ではまだ解明されていない点、即ち(1)自然免疫反応の活性化によって糖鎖が減少する(図1 灰色で網掛けの部分)メカニズムを明らかにし、(2)脊椎動物でも糖鎖の変化による自然免疫反応の制御が行われているかどうか、検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Toll 情報伝達系の活性化によって、どのようなメカニズムで糖鎖が減少するのか。

Toll 情報伝達系の活性化による糖鎖の変化は、ガラクトースを含む糖鎖の合成系の抑制が分解系の促進が原因であると予想される。どちらの経路が関与しているのか、糖鎖分解酵素や糖転移酵素のショウジョウバエ変異体を用いて明らかにする。

で明らかになった経路に関わる分子の転写量、翻訳量、局在を解析し、どの分子のどのような変化によってガラクトースを含む糖鎖が減少するのか明らかにする。

ショウジョウバエに細菌を感染させ、で明らかにした分子の変化が起きているかどうか検討し、私達が解明したメカニズムが感染時に起こっていることを確認する。

(2) 脊椎動物においても、糖鎖の変化による自然免疫反応の制御が存在するか。

これについては当初、哺乳動物の自然免疫に関わる細胞の培養系を用いて検討する計画であった。しかしショウジョウバエでの糖鎖の変化による自然免疫反応の制御は、単独の細胞で起きているというより、多臓器間での連携によって起こっている可能性が示唆されていたため、ゼブラフィッシュ個体を用いて検討することにした。具体的には、ショウジョウバエで発現を抑制すると自然免疫が活性化した UDP-ガラクトース輸送体 *senju* のゼブラフィッシュホモログを同定し、その変異体を作成した。そして自然免疫が活性化しているかどうか、解析を行った。

4. 研究成果

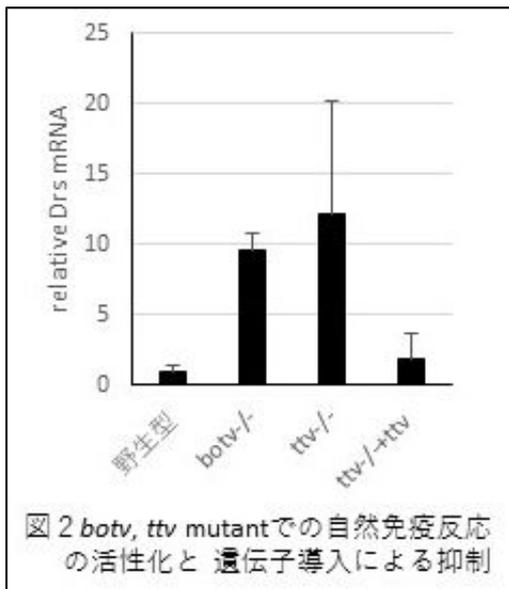
(1) Toll 情報伝達系の活性化によって、どのようなメカニズムで糖鎖が減少するのか。

Toll 情報伝達系の活性化による糖鎖の変化は、ガラクトースを含む糖鎖の合成系の抑制が、分解系の促進が原因であると予想された。これを明らかにするために、まず合成系に関わる分子の同定を行った。

自然免疫を制御する糖鎖の合成系に関わる分子の同定

糖鎖の合成には、基質である糖核酸を細胞質からゴルジ体や小胞体に運ぶ糖核酸輸送体と、実際に糖鎖を合成する糖転移酵素が必要である。したがって自然免疫を制御する糖鎖の合成には、糖核酸輸送体 *senju* のほかに、糖鎖を合成する糖転移酵素が存在するはずである。その糖転移酵素は、機能を阻害されると *senju* 変異体同様に定常状態でも自然免疫反応が活性化されると考えられる。そこでショウジョウバエ免疫担当器官特異的に様々な糖転移酵素のノックダウンを行い、バクテリアに感染しなくても自然免疫反応が恒常的に活性化する糖転移酵素のスクリーニングを行った。

具体的には、Toll 情報伝達系活性化によって発現が誘導される抗菌ペプチドドロソマイシン(*Drs*)のプロモーター下流で GFP を発現するレポーター系を用い、遺伝子ノックダウンによって GFP の発現が誘導されるかどうか、観察した。その結果、グリコサミノグリカンという糖鎖を合成する酵素をコードする遺伝子、*botv* と *ttv* のノックダウンにより、自然免疫反応が活性化することを見出した。これら酵素の変異体でも *Drs* の転写量が上昇しており、恒常的な自然免疫反応の活性化が確認できた(図2)。*ttv* 変異体に *ttv* 遺伝子を導入すると、自然免疫の活性化は抑制された(図2)。以上の結果から、*botv*、*ttv* が自然免疫を制御する糖鎖の合成系に関わる分子であり、合成されるグリコサミノグリカンが自然免疫を制御する糖鎖構造であると推定された。

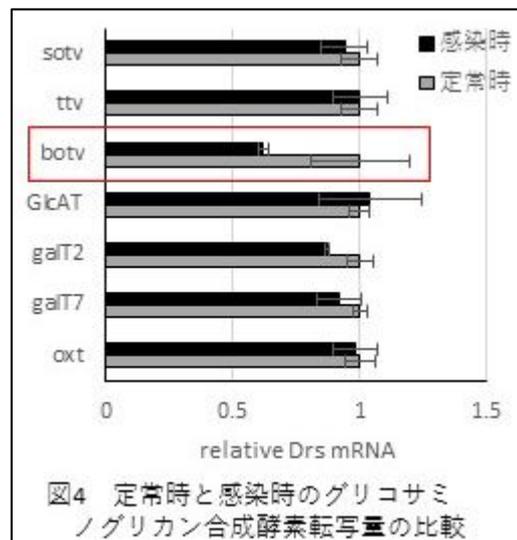


グリコサミノグリカンの構造は、図3に示すとおりである。蛋白質の Ser または Thr 残基にキシロースが結合し、それに続いてガラクトースが2つ結合する。*Botv* や *Ttv* はそれよりも遠位の糖結合を触媒しており、これらの変異体ではグリコサミノグリカンの長さが短くなって(あるいは不完全で)、自然免疫反応の恒常的な活性化が誘導されていると考えられる。一方先に私達が発見していた *senju* 変異体では、タンパク質に近い側の2つのガラクトース基質が十分に補給されないため、やはりグリコサミノグリカンの長さが短くなって自然免疫反応が活性化していたと推測される。以上の解析より、自然免疫を制御する糖鎖の1つとして、グリコサミノグリカンを同定することができ、その合成に関わる分子は、糖核酸輸送体 *senju* と、*botv*、*ttv* をはじめとしたグリコサミノグリカン合成する糖転移酵素であると結論できた。

糖鎖の合成系に着目した、感染時の糖鎖減少メカニズムの解析

研究代表者が見出した、自然免疫の活性化によるガラクトースを含む糖鎖の減少に、糖鎖の合成系が関わっているならば、で同定した糖核酸輸送体 *senju* や糖転移酵素の転写量、蛋白量、活性、また局在などが変化して、糖鎖の合成が抑制されていると考えられる。

まず最初に *senju* について、感染時や Toll 情報伝達系を人為的に活性化させ、その転写量、蛋白量の検討を行ったが、自然免疫反応の活性化による変化は認められなかった。さらに *Senju* に対する抗体を作成し、細胞内局在を観察したが、定常時と感染時で変化は認められなかった。次にグリコサミノグリカン合成する酵素について、その転写量の検討を行った。その結果、グリコサミノグリカン合成する酵素の中で、*botv* の発現量が約60%まで減少することが明らかになった(図4)。つまり、感染時における糖鎖の減少は、*botv* の発現量低下によって引き起こされていることが強く示唆された。



自然免疫を制御する糖鎖の分解系に関わる分子の同定

研究代表者が見出した、自然免疫の活性化によるガラクトースを含む糖鎖の減少に、糖鎖の分解系が関わっているならば、分解酵素の変異体では糖鎖の減少が起こらないと考えられる。ショウジョウバエのガラクトース分解酵素は、そのゲノム上に3種類コードされている。これらの変異体を用いて、感染時に糖鎖の減少が起こるかどうかが、検討を行ったところ、ガラクトース分解酵素 CG7997 の変異体では、感染時の糖鎖の変化が認められなかった。したがって、この酵素が感染時にガラクトースを含む糖鎖を分解していると考えられた。

この説が正しいとすると、この酵素を強制発現させたハエでは常にガラクトースを含む糖鎖が分解されるため、自然免疫反応が活性化していなければならない。しかし実際にトランスジェニックハエを作成して強制発現させたハエでは、恒常的な自然免疫反応活性化を示さなかった。

この矛盾を解決するためには、今後、候補となっている遺伝子について、複数の変異体システムを作成して、どの変異体でも同じ表現型を示すかどうか、検討する必要がある。また作成したトランスジェニックハエで、本当に酵素活性がうまく発現しているかどうか、確認する必要があると考えられた。

(2) 脊椎動物においても、糖鎖の変化による自然免疫反応の制御が存在するか。

研究代表者は、ショウジョウバエの糖核酸輸送体 *senju* が自然免疫を制御することを明らかにしたので、ゼブラフィッシュの *senju* ホモログの変異体を作成し、自然免疫の活性化を調べることとした。

ゼブラフィッシュの *senju* ホモログは、*slc35a4* と *slc35a5* の2種類存在する。それぞれについて変異システムを樹立し、定常時に自然免疫が活性化しているかどうか、炎症性サイトカイン (IL-1, IL-8, *mmp9*) の mRNA 発現量を検討した。しかし、これらの変異体で、自然免疫反応の恒常的な活性化は認められなかった。可能性としては、*slc35a4*, *a5* が互いに機能を保証しあっているために表現型が出なかったことが考えられる。今後はこれらのダブル変異体の作成を予定している。また本研究によってグリコサミノグリカンの異常が自然免疫を活性化することが明らかになったので、ゼブラフィッシュのグリコサミノグリカン変異体で、自然免疫の活性化を調べる予定である。

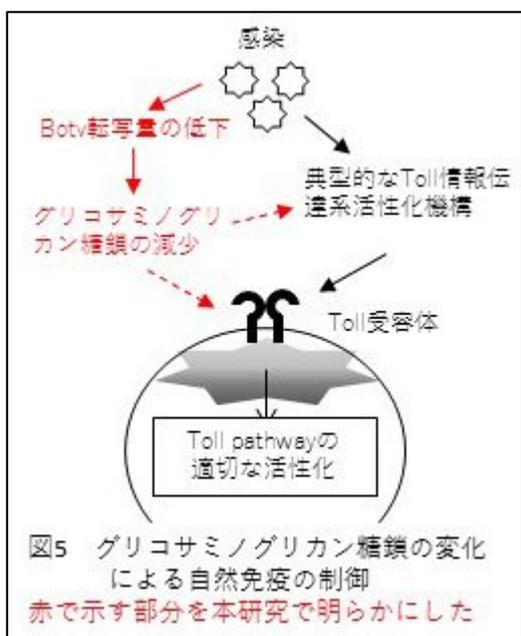
(3) 本研究で得られた成果の位置づけ、今後の展望、および計画以外で新たに得られた知見

グリコサミノグリカンは、発生において重要な役割を果たすことはよく知られていたが、自然免疫における機能はほとんど知見が

なかった。*Botv* や *ttv* 変異体の免疫担当器官の発生分化は異常になっていないことは確認しており、グリコサミノグリカンは自然免疫反応を制御していることは新しい発見である。また感染などの状況によって、グリコサミノグリカン合成酵素の転写が抑制され、糖鎖の長さが変化することで情報伝達系へのフィードバックを行っていることは、大変興味深い。糖転移酵素のプロモーターエンハンサーの解析は、組織や細胞特異的な糖鎖発現に関しては知見があるが、感染時にどうやって糖転移酵素の発現が変化するのか、今後研究を進展させていきたい。

また本研究を行う過程で私達は、感染時に典型的な Toll 情報伝達系の活性化以外に、別の活性化経路があることを発見し、紙上発表を行った。即ち、Toll レセプターのリガンド *Spz* 変異体では、感染時に Toll 情報伝達系の活性化は起こらないので、感染時の Toll 情報伝達系の活性化のほとんどは、*Spz* 依存적である。しかしリガンド *Spz* を活性化させるプロテアーゼ SPE 変異体では、感染時の Toll 情報伝達系の活性化は 65%程度にしか低下せず、SPE 以外のプロテアーゼによる *Spz* の活性化が起きていると考えられた。SPE よりも上流で働く複数のプロテアーゼ全てに変異をいれた個体では、感染時の Toll 情報伝達系は活性化しないので、この新しいプロテアーゼは既知のプロテアーゼカスケードの下流で機能していることが示唆された。発生時期、また感染する菌の種類によっては、これまで知られている SPE 依存的な活性化よりも非依存的な活性化の貢献が大きいことを明らかにした。ショウジョウバエで発現しているプロテアーゼについてその構造を解析した結果、新しいプロテアーゼの候補分子を絞り込むことができた。また本研究で見つけたグリコサミノグリカンの変化による自然免疫反応活性化は、未分化血球細胞からの未知の活性化因子によることが示唆されている。

以上をまとめると、私研究代表者は当初の目的であった、感染時に自然免疫を効率的に活性化させるメカニズムとして、通常自然免疫の抑制に働くグリコサミノグリカン糖鎖を合成する糖転移酵素 *botv* の転写が低下することによって糖鎖が減少し、これによって自然免疫を効率的に活性化されることを明らかにした。またその過程で、典型的な Toll 情報伝達系活性化と異なる経路を示唆することができた (図5)。今後糖転移酵素の転写が変化するメカニズムや、これまでに報告がない Toll 情報伝達系活性化を明らかにすることによって、感染症や慢性炎症の病態や治療に新しい切り口を与えることができると考えられる。



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)

Yamamoto-Hino Miki, Goto Satoshi,
「Spätzle-Processing
Enzyme-independent Activation of the
Toll Pathway in Drosophila Innate
Immunity.」, Cell Structure and Function,
査読あり 2016 May 7;41(1):55-60. doi:
10.1247

Yamamoto-Hino Miki (13 authors 中 1 番
目), Goto Satoshi (13 authors 中 13 番
目), 「Phenotype-based clustering of
glycosylation-related genes by
RNAi-mediated gene silencing.」, Genes
to Cells, 査読あり 2015
Jun;20(6):521-542. doi: 10.1111/

Yamamoto-Hino Miki, (6 authors 中 1 番
目), Goto Satoshi (6 authors 中 6 番目)
「Dynamic regulation of innate immune
responses in Drosophila by
Senju-mediated glycosylation.」, Proc
Nat'l Acad Sci U S A., 査読あり 2015
May 5;112(18):5809-5814. doi: 10.1073/

Yamamoto-Hino Miki, Goto Satoshi,
「Localization of glycosyl enzymes and
nucleotide-sugar transporters in the
endoplasmic reticulum and the Golgi
apparatus.」 Glycoscience: Biology and
Medicine, 査読あり 2014, 1-5
doi:10.1007/

[学会発表](計12件)

加瀬彩和子、山本(日野)美紀、後藤聡
「Screening of glycosyltransferase
involved in innate immunity in
Drosophila.」, 日本ショウジョウバエ学会、
2016年9月11日、立教大学(東京都豊
島区)

山本(日野)美紀、後藤聡 「宿主の糖
鎖修飾変化による自然免疫反応の制御」
第38回日本分子生物、第88回日本生
化学会合同年会、2015年12月3日、神戸
ポートアイランド(兵庫県神戸市)

加瀬彩和子、山本(日野)美紀、後藤聡
「自然免疫を制御する糖転移酵素 Manju
の探索」, 第34回日本糖質学会年会、2015
年8月1日、東京大学(東京都文京区)

山本(日野)美紀、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、東北大学(宮城県仙台
市)

山本(日野)美紀、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12
日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

山本(日野)美紀 「ショウジョウバエ自
然免疫の応答制御に寄与する内在性リガ
ンドの糖鎖修飾」, 平成26年度日本生
化学会九州支部例会シンポジウム(招待講
演)、2014年5月18日、九州大学(福岡
県福岡市)

[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

山本 美紀(日野 美紀)(YAMAMOTO Miki)
立教大学・理学部・ポストドクトラルフェ
ロー
研究者番号：40301783

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

後藤 聡(GOTO Satoshi)
立教大学・理学部・教授
研究者番号：60280575

(4) 研究協力者

加瀬 彩和子 (KASE Sawako)
立教大学・理学研究科・大学院生