

機関番号：24701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570112

研究課題名 (和文) タンパク質の糖付加修飾・C-マンノシル化に関わる自然免疫系シグナル制御機構の解明

研究課題名 (英文) Protein C-mannosylation and signaling related to innate immunity

研究代表者

井原 義人 (IHARA YOSHITO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70263241

研究成果の概要 (和文)：

C-マンノシル (Man) 化 TSR 由来ペプチドは自然免疫系シグナルの制御に関わる。本研究では、マクロファージ系細胞における C-Man 化ペプチドの特異的結合分子を探索し、Hsc70 を同定した。C-Man 化ペプチドは高い親和性で Hsc70 と結合した。Hsc70 による TNF- $\alpha$  産生誘導シグナルは C-Man 化ペプチドにより増強されることから、C-Man 化ペプチドに関わる Hsc70 を介した自然免疫系シグナル機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

C-Mannosylated peptides derived from the thrombospondin type 1 repeat (TSR) are involved in the regulation of innate immunity. In this study, we searched for the proteins that bind to C-mannosylated TSR-derived peptides in macrophage-like RAW264.7 cells, and identified heat shock cognate protein 70 (Hsc70). C-Mannosylated peptides enhanced the Hsc70-induced signaling to produce TNF- $\alpha$ , demonstrating a novel function of C-mannosylation of TSR-derived peptides in terms of interaction with Hsc70 to regulate cellular signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖質

## 1. 研究開始当初の背景

生体におけるタンパク質の翻訳後修飾は、様々な生理的局面でタンパク質に新たな情報/機能を付与することから、その生理的意義や制御機構の解明は、ポストゲノム、プロテオーム研究に続く生命科学の重要な課題と考えられる。

C-マンノシル (C-Man) 化は、近年見出された新しいタイプの糖付加による翻訳後修飾

である。C-Man 化は、マンノースがトリプトファン (Trp) のインドール環の C2 炭素と直接に炭素-炭素結合するという点がユニークである。これまで報告された C-Man 化タンパク質は、いずれも分泌タンパク質であり、C-Man 化される Trp は多くの場合、Trp-X-X-Trp というモチーフの第一番目の Trp である。この Trp-X-X-Trp モチーフは、Thrombospondin type 1 repeat (TSR) と呼ばれる機能ペプチ

ドモジュールの一部であることが知られ、主にタンパク分子表面に露出し、その機能としてヘパリンやヘパラン硫酸プロテオグリカン、コラーゲンなどと結合して細胞の接着や細胞間シグナルの制御に関与することが注目されている。

Trp-X-X-Trp モチーフをもつ C-Man 化の標的タンパク質としては、Ribonuclease、IL-12、エリスロポエチン受容体などのサイトカイン受容体や、Thrombospondin や補体 (C6, C7, C8a, C8b, C9) などの TSR ファミリータンパク質が知られている。しかしながら、現状では、細胞内における Trp-X-X-Trp モチーフの C-Man 化の有無とその制御による個々の標的分子に対する細胞生物学的影響については全く検討されていない。このことは、Trp-X-X-Trp モチーフをもつサイトカイン受容体や TSR ファミリータンパク質などが関わる様々なシグナル伝達カスケードにおいて、C-Man 化が制御に関わる分子機構の解明は、未だ手つかずの状態であることを意味する。

近年、申請者は精密化学合成した C-Man-Trp を用いて抗 C-Man-Trp 特異抗体の作製に成功した。これまでの研究で、C-Man 化タンパク質が高グルコース濃度条件下のマクロファージ細胞株 RAW264.7 で高発現すること、さらに、糖尿病 II 型発症モデルとして知られる Zucker fatty ラットの大動脈血管組織でも発現が増加しており、組織での C-Man 化標的タンパク質のひとつが Thrombospondin であることを報告した。また、RAW264.7 細胞において、C-Man 化 TSR 由来ペプチドである C-Man-Trp-Ser-Pro-Trp が、単独では作用しないが、リポポリサッカライド (LPS) と共存すると、LPS のシグナル伝達を増強することを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が発見した C-Man 化 TSR 由来ペプチドによる LPS シグナルの増強制御の知見をもとに、その分子機構の生化学・細胞生物学的解析を進め、マクロファージ細胞株における C-Man 化の標的となる制御分子を明らかにし、自然免疫系シグナル伝達に対する C-Man 化ペプチドの作用機構を解明することを目的とした。また、本研究を C-Man 化が果たす単球/マクロファージ機能における生理的役割の解明へと発展させ、生理機能が未だ知られていない C-Man 化タンパク質がもつ自然免疫における役割の解明をも目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、マクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞を自然免疫系シグナルの解析モデルとして用いた。これまでの研究から、化学合成 C-Man 化 TSR 由来ペプチドが LPS 誘導性の TNF- $\alpha$  産生シグナルの増強に関わるこ

とがわかっていた。本研究では、C-Man 化ペプチドによる自然免疫系シグナルの制御機構を明らかにするため、以下の研究を行なった。

### (1) C-Man 化ペプチド結合標的分子の探索と同定

C-Man 化ペプチドの結合標的分子を検出するため、ビオチン化した C-Man 化 TSR 由来ペプチドとコントロールペプチドを合成した

(C-Man-Trp-Ser-Pro-Trp-Ser-Cys-Biotin, Trp-Ser-Pro-Trp-Ser-Cys-Biotin)。化学合成は連携研究者の眞鍋博士 (理化学研究所) が担当した。それぞれのビオチン化ペプチドを細胞に添加し、化学架橋剤でクロスリンクした後、ビオチン化ペプチドの結合したタンパク質を電気泳動で分離し、ペルオキシダーゼ標識アビジンによりブロッティング法で解析した。また、C-Man 化ペプチドの結合標的分子を同定するため、ビオチン化ペプチドを細胞に添加し、化学架橋剤でクロスリンクした後、ビオチン化ペプチドの結合したタンパク質をアビジン標識アガロースビーズで回収した。タンパク質サンプルを濃縮、凍結乾燥後、電気泳動により展開、分離した。電気泳動ゲルを銀染色後、コントロールペプチドとの比較で、C-Man 化ペプチド結合タンパク質に特異的な染色バンドについて、トリプシンによる In-Gel 消化産物を用いたマスのフィンガープリンティング解析へと進めた。

### (2) C-Man 化ペプチド結合標的分子としての Hsc70 の同定

C-Man 化ペプチド結合標的分子の中で、分子量 72kD の分子についてマスフィンガープリンティング解析を行った結果より、Hsc70 が候補タンパク質として考えられた。Hsc70 が C-Man 化ペプチド結合分子であることを確認するため、上記の様に細胞から回収したビオチン標識 C-Man 化ペプチド結合サンプルを、抗 Hsc70 抗体を用いたイムノプロット法で解析した。逆に、C-Man 化ペプチドと化学架橋を行った細胞から Hsc70 を免疫沈降法で回収し、Hsc70 に結合したビオチン化ペプチドをペルオキシダーゼ標識アビジンによるブロッティング法で解析した。

### (3) C-Man 化ペプチドと Hsc70 の結合に関する解析

「固相化法」ビオチン標識ペプチドをアビジンコートした 96-穴プラスチックプレートに添加し、固相化した。Poly-His-Tag 付きヒト Hsc70 遺伝子を大腸菌系で発現させ、Hsc70 タンパク質を Ni-キレートカラムで精製した。精製 Hsc70 を C-Man 化ペプチドあるいはコントロールペプチドをコートしたプレートに添加し、その結合について抗 Hsc70 抗体を用いた ELISA 法にて解析した。

「溶液内結合法」 ビオチン標識ペプチドを DyLight488 標識アビジンと反応させ、蛍光標識ペプチドプローブを調製した。蛍光標識ペプチドプローブと精製 Hsc70 の溶液内での結合相互作用について、蛍光偏光度の変化を BEACON2000 (Panvera 社) で測定することにより解析した。

#### (4) 細胞内シグナル伝達の解析

Hsc70 は TLR4 が関与する自然免疫系シグナルと関与することが報告されている。本研究では、Hsc70 により誘導される自然免疫関連シグナル経路に着目し、TNF- $\alpha$  産生誘導に関わる細胞内シグナルを解析した。Hsc70 は、精製 Hsc70 からポリミキシン B カラムにより LPS 成分を除去したものをを用いた。RAW264.7 細胞を Hsc70 (0.01  $\mu$ M) により、C-Man 化ペプチドあるいはコントロールペプチド (10  $\mu$ M) の共存下で刺激した。TNF- $\alpha$  産生については、培地中に分泌される TNF- $\alpha$  を ELISA 法で検出した。細胞シグナルについては、TGF- $\beta$ -activated kinase (TAK)1 と c-Jun kinase (JNK) の活性化状態を、特異的リン酸化抗体を用いたイムノブロット法により解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) C-Man 化ペプチド結合標的分子としての Hsc70 の同定

RAW264.7 細胞において、C-Man 化ペプチドプローブと特異的に結合する複数の分子を検出した (図 1A)。マスフィンガープリンティング解析により、Heat shock cognate protein 70 kDa (Hsc70) (72 kDa), Ephrin type A receptor (109 kDa), MTA1 (80 kDa) といったタンパク質が候補として検出された。これらが C-Man 化ペプチド結合分子であることを確認するため、細胞から回収した、ビオチン標識 C-Man 化ペプチド結合サンプルを、各特異抗体を用いたイムノブロット法で解析した。その結果、分子量 72 kDa のタンパク質は、抗 Hsc70 抗体陽性であることが確認された (図 1B)。

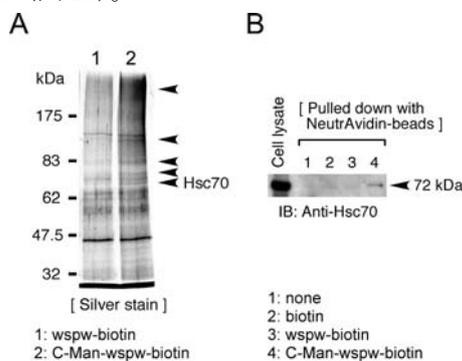


図 1 : (A) C-Man-WSPW ペプチド結合タンパク質の SDS-PAGE と銀染色。マスフィンガープリンティング解析より Hsc70 (矢印) が候補となった。(B) C-Man-WSPW ペプチド結合タンパク質の抗 Hsc70 抗体によるイムノブロット解析。

また、C-Man 化ペプチドと化学架橋を行った細胞から Hsc70 を免疫沈降法で回収し、Hsc70 に結合したビオチン化ペプチドをペルオキシダーゼ標識アビジンによるブロッティング法で解析し、その結合を確認した。以上より、C-Man 化ペプチド結合分子のひとつが Hsc70 であることが明らかとなった。

#### (2) C-Man 化ペプチドと Hsc70 の結合解析

ビオチン標識ペプチドをアビジンコートした 96-穴プラスチックプレートに固相化し、精製した Hsc70 と C-Man 化ペプチドあるいはコントロールペプチドとの結合について、抗 Hsc70 抗体を用いた ELISA 法で解析した。その結果、Hsc70 は C-Man 化あるいはコントロールペプチドと同様に結合することがわかった。次に、Hsc70 と C-Man 化ペプチドの溶液内での結合を解析するため、C-Man 化あるいはコントロールペプチドのビオチン付加物を蛍光標識アビジンと結合させ、蛍光標識ペプチドプローブを作製した。これらの蛍光化合物 (2 nM) と精製 Hsc70 との緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.2], 150 mM KCl) 中での相互作用を、蛍光偏光度測定により解析した。その結果、Hsc70 は C-Man 化ペプチドあるいはコントロールペプチドと解離定数 ( $K_d$ ) 75 nM あるいは、25 nM で結合し、C-Man 化ペプチドとのより高い結合親和性が明らかとなった (図 2A)。また、Hsc70 のシャペロン活性がアデニンヌクレオチドとの結合により制御されることが知られている。そこで、ATP あるいは ADP の結合への影響を調べたところ、Hsc70 と C-Man 化ペプチドの結合親和性は ADP による影響は無いが、ATP により増強されることが明らかとなった (図 2B)。この様

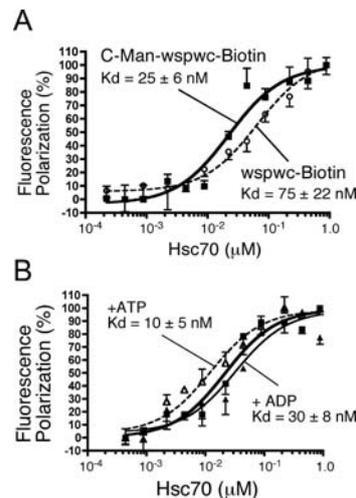


図 2 : (A) 蛍光偏光度測定による C-Man-WSPW ペプチドと Hsc70 の相互作用解析。(B) C-Man-WSPW ペプチドと Hsc70 の相互作用に対する ATP/ADP の影響についての解析。

に、Hsc70 のコンフォメーション変化が結合親和性に関与することから、Hsc70 のアミノ末端側ヌクレオチド結合ドメイン (NBD) とカルボキシル末端側基質結合ドメイン (SBD) を大腸菌で発現、精製し、それぞれの蛍光ペプチド化合物との結合を同様に調べた。その結果、C-Man 化ペプチドは NBD あるいは SBD と、

Kd 180 nM あるいは 40 nM でそれぞれ結合し、SBD と高い結合親和性をもつことが明らかとなった。以上の結果から、Hsc70 は非マンノシル化ペプチドに比べ、C-Man 化 TSR 由来ペプチドと高い親和性で結合することがわかった。またその結合は Hsc70 の基質結合ドメインを介することもわかった。

### (3) C-Man 化ペプチドの Hsc70 誘導性シグナルへの影響

Hsc70 は TLR-4 との結合を介して、自然免疫系シグナルの制御に関わることが報告されている。そこで、Hsc70 誘導性のマクロファージ細胞シグナル応答に対する C-Man 化ペプチドの影響について解析した。RAW264.7 細胞に対して、C-Man 化ペプチドあるいはコントロールペプチド (10  $\mu$ M) 共存下で、精製 Hsc70 (0.01  $\mu$ M) の添加による刺激を加えた。刺激後、経時的に細胞培地を採取し、分泌された TNF- $\alpha$  を ELISA 法で定量した (図 3A)。その結果、Hsc70 刺激により、TNF- $\alpha$  の産生が誘導されたが、この誘導は、コントロールペプチドに比べ、C-Man 化ペプチド共存下で明らかに促進されることがわかった。TNF- $\alpha$  分泌の増加は、転写レベルで、C-Man 化ペプチドによる促進を受けることもわかった。さらに、TNF- $\alpha$  の産生誘導に関わると考えられるシグナル伝達分子である TAK1 と JNK のリン酸化は Hsc70 により増強するが、そのリン酸化は、C-Man 化ペプチド共存下でより促進された (図 3B)。

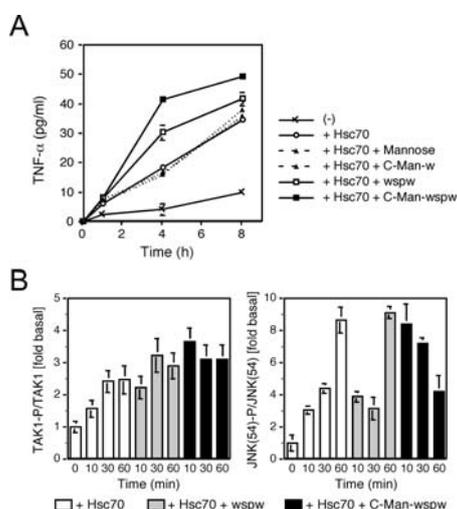


図3 : (A) Hsc70 による TNF- $\alpha$  の産生への C-Man-WSPW ペプチドの影響についての解析 (ELISA 法)。 (B) Hsc70 による TAK1 (左) と JNK (右) のリン酸化に対する C-Man-WSPW ペプチドの影響についての解析 (イムノブロット法)。

TAK1 の特異的阻害剤である 5Z-7-oxozeaenol により、Hsc70 誘導性の TNF- $\alpha$  産生増強が阻害されたことから、TAK1-JNK シグナルはこの TNF- $\alpha$  産生誘導機構に直接関与することが示唆された。以上の結果より、C-Man 化ペプチドは Hsc70 の作用に細胞レベルでも影響し、マクロファージ細胞の自然免疫系シグナル

の制御に関わることが示唆された。

### (4) まとめ

本研究では、我々が発見した C-Man 化 TSR 由来ペプチドによる LPS シグナルの増強制御機構を明らかにするため、C-Man 化ペプチドの標的結合分子を探索し、その一つとして Hsc70 を見出した。Hsc70 は TLR-4 との関与等、自然免疫系シグナルに関わることが知られていた。本研究では、Hsc70 を起点とする TNF- $\alpha$  産生誘導を、C-Man 化ペプチドが増強すること明らかにし、その作用経路として TAK1-JNK 経路への影響を明らかにした。このように、タンパク質 C-Man 化修飾が自然免疫シグナルの制御因子として関与する機構の一端は明らかとなったが、本研究が化学合成糖ペプチドの応用を主としたアプローチであったという技術的限界から、マクロファージ系細胞における内在性の C-Man 化機能分子の具体像については現時点でも未解明である。今後、実際の C-Man 化糖修飾の標的であり、かつ自然免疫系シグナルの制御に関わる分子の同定が必要となる。さらに、今後の研究を C-Man 化糖修飾の単球/マクロファージ機能における生理的役割の解明へと発展させることで、自然免疫の未知なる制御機構の解明に繋がるものと期待される。

### 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 6 件)

- ① Ihara Y., Manabe S., Ikezaki M., Inai Y., Matsui I., S. L., Ohta Y., Muroi E., and Ito Y.: C-Mannosylated peptides derived from the thrombospondin type 1 repeat interact with Hsc70 to modulate its signaling in RAW264.7 cells. *Glycobiology*, 20, 1298-1310, 2010. 査読有
- ② Shiraishi N., Inai Y., and Ihara Y.: Proteinase K-resistant aggregates of recombinant prion protein PrP-(23-98) are toxic to cultured cells. *Protein Peptide Lett.*, 16, 91-96, 2009. 査読有
- ③ Totani K., Ihara Y., Matsuo I., Tsujimoto T., and Ito Y.: The recognition motif of the glycoprotein-folding sensor enzyme, UDP-glc: glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry*, 48, 2933-2940, 2009. 査読有
- ④ Goto S., Kawakatsu M., Izumi S. I., Urata Y., Kageyama K., Ihara Y., Koji T., and Kondo T.: Glutathione S-transferase pi localizes in mitochondria and protects

against oxidative stress. Free Radic. Biol. Med., 46, 1392-1403, 2009. 査読有

- ⑤ Totani K., Ihara Y., Matsuo I., and Ito Y.: Effects of macromolecular crowding on glycoprotein processing enzymes. J. Am. Chem. Soc., 130, 2101-2107, 2008. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Ihara Y., Manabe S., Ikezaki M., Inai Y., Matsui I.-S. L., Ohta Y., Muroi E., and Ito Y. (2010) C-Mannosylated Peptides Derived from the Thrombospondin Type 1 Repeat Interact with Hsc70 to Enhance the Signaling in RAW264.7 Cells. C-P3-017. 25<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium, August 1-6, 2010, Tokyo, Japan
- ② Ihara Y., Manabe S., Ikezaki M., Inai Y., Matsui I.-S. L., Ohta Y., Muroi E., and Ito Y. (2010) C-Mannosylated TSR-derived Peptides Interact with Hsc70 to Enhance its Signaling in RAW264.7 Cells. PS[I]-17. The 28<sup>th</sup> Naito conference on Glycan expression and regulation [I]: Functions and disease mechanisms, July 27-30, 2010, Kanagawa, Japan
- ③ Ihara Y., Manabe S., Inai Y., Ikezaki M., and Ito Y. (2009) Cell signaling functions of C-mannosylated peptides from the thrombospondin type 1 repeat. Glycoconjugate J. (Supplement), S19, 182. GLYCO XX: 20<sup>th</sup> International Symposium on Glycoconjugates, November 29-December 4, 2009, San Juan, Puerto Rico, USA
- ④ 井原義人, 室井栄治, 池崎みどり, 井内陽子, 眞鍋史乃, 伊藤幸成: 「TGF- $\beta$ シグナルのC-マンノシル化TSR由来ペプチドによる制御」, 第81回 日本生化学会大会, 2009年10月21-24日, 神戸
- ⑤ 井原義人, 室井栄治, 池崎みどり, 井内陽子, 眞鍋史乃, 伊藤幸成: 「C-マンノシル化TSR由来ペプチドによるTGF $\beta$ シグナルの制御」 第29回 日本糖質学会年会, 2009年9月9-11日, 高山
- ⑥ 井原義人, 井内陽子, 室井栄治, 池崎みどり, 眞鍋史乃, 伊藤幸成, 近藤宇史: 「C-マンノシル化TSR由来ペプチド結合標的分子としてのHsc70の同定」, 第81回 日本生化学会大会, 2008年12月9-12日, 神戸
- ⑦ 井原義人: 「C-マンノシル化糖付加修飾と細胞シグナル機能」, 第6回糖鎖科学コンソーシアム シンポジウム, 2008年12月3-4日, 東京

- ⑧ 井原義人, 井内陽子, 室井栄治, 池崎みどり, 近藤宇史, 眞鍋史乃, 伊藤幸成: 「C-マンノシル化TSR由来ペプチドとしてのHsc70の結合」, 第28回 日本糖質学会年会, 2008年8月18-20日, 筑波

[図書] (計4件)

- ① Ihara Y., Inai Y., and Ikezaki M.: Protein C-mannosylation and its prospective functions in the cell. Trends Glycosci. Glycotech, 23, 1-13, 2011.
- ② 井原義人, 池崎みどり: 「酸化ストレスおよびERストレス」糖尿病性細小血管症(第2版)-発症・進展制御の最前線-, 日本臨牀68巻増刊号9, p49-52 (2010)
- ③ 井原義人: ERと酸化ストレス、病態解明に迫る 活性酸素シグナルと酸化ストレス癌、神経変性疾患、循環・代謝異常にかかわるレドックス制御機構と最新の技術開発「実験医学増刊」(谷口直之 監、赤池孝章、鈴木敬一郎、内田浩二 編)、羊土社、p92-96 (2009)
- ④ Ihara Y.: Calreticulin. In “Encyclopedia of Cancer, 2nd Edition” (Ed.) Schwab M, pp 456-459, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, Germany, 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井原 義人 (IHARA YOSHITO)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70263241

### (2) 研究分担者

白石 則之 (SHIRAISHI NORIYUKI)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30133169

井内 陽子 (INAI YOKO)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20316087

### (3) 連携研究者

眞鍋 史乃 (MANABE SHINO)  
理化学研究所・基幹研究所・専任研究員  
研究者番号: 60300901