

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860201

研究課題名(和文) Toll様受容体4複合体を介した自然免疫の機能におけるコアフコースの意義

研究課題名(英文) Core fucose is critical for CD14-dependent Toll-like receptor 4 signaling.

研究代表者

飯島 順子 (IIJIMA, Junko)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10559636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫を担うマクロファージではToll様受容体(TLR)が病原体を特異的に認識し排除することが分かっています。本研究では特に「TLR4を介する自然免疫での糖鎖の役割」を明らかにするために、コアフコースという糖に着目しました。コアフコース欠損細胞を用いてTLR4をリポ多糖で刺激したところ、2種類のTLR4シグナル伝達経路のうちの1つ、インターフェロン- β の産生が特異的に抑制されることを見いだしました。これは細胞表面のTLR4複合体のCD14依存的な細胞内への輸送が抑制されたためと考えられます。すなわち、コアフコースが自然免疫で病原体センサーTLR4を介した感染防御に必須であることが分かりました。

研究成果の概要(英文)：Core fucosylation, a posttranslational modification of N-glycans, modifies several growth factor receptors and impacts on their ligand binding affinity. We suspect that a lack of core fucose affects the Toll-like receptor 4 (Tlr4)-dependent signaling pathway. Indeed, upon lipopolysaccharide stimulation, Fut8-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) produced similar levels of interleukin-6 but markedly reduced levels of interferon- β (IFN- β) compared with wild-type MEFs. Lectin blot analysis of the TLR4 signaling complex revealed that core fucosylation was specifically found on CD14. After lipopolysaccharide stimulation, internalization of TLR4 and CD14 was significantly impaired. Given that internalized TLR4/ myeloid differentiation factor 2 (MD2) induces IFN- β production, impaired IFN- β production in Fut8-deficient cells is ascribed to impaired TLR4/MD2 internalization. These data show for the first time that glycosylation critically regulates TLR4 signaling.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：コアフコース TLR4 CD14 細胞内輸送 インターフェロン-

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の免疫機能は、主に獲得免疫と自然免疫に分類されます。主にリンパ球の働きによる獲得免疫は、抗原特異的な抗体の産生により病原体を特異的に認識し排除します。また、自然免疫を担うマクロファージは Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) が病原体を特異的に認識、排除することで感染防御を行うことが分かってきました。

一方、糖鎖は細胞の中で、糖転移酵素の働きにより糖が鎖状につながることで合成されます。この糖鎖は細胞表面上にあるタンパク質の表面を修飾し、タンパク質の機能を調整するため、生命活動に必須であることが分かっています。また、インフルエンザウイルスなど重篤な病気をもたらす病原体は宿主細胞の糖鎖を介して感染することが知られており、病原体の感染機構や感染防御を明らかにする上で、糖鎖が重要だと考えられます。

このように、TLR を介する自然免疫と糖鎖を介する感染機構のそれぞれが、生体において重要な役割を果たしています。一方、両者の関係を理解した「TLR を介する自然免疫での糖鎖の機能」は分かっていませんでした。そこで本研究では、「自然免疫での糖鎖の役割」を明らかにすることを試みました。

2. 研究の目的

TLR はヒトでは 10 種類 (TLR1~10) が存在し、それぞれの TLR を活性化するウイルスや細菌などが分かっています。

特に、TLR4 はマクロファージなどの免疫細胞において、グラム陰性細菌の外膜成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) などを認識し炎症性サイトカインの産生を誘導するなど、生体で重要な役割を果たしています。

本研究では、この TLR4 を介する自然免疫での糖鎖の役割を明らかにするために、「コアフコース」という糖に着目しました。コアフコースは、N 型糖鎖 (注 1) の根元にある糖の N-アセチルグルコサミンに付加されたフコースのことです。また、コアフコースを合成する酵素を Fut8 と呼びます (図 1)。2005 年に、Fut8 欠損マウス (コアフコース欠損マウス) では成長遅延や肺気腫などの重篤な症状を示すなど、コアフコースが生体において重要な役割を果たすことを報告されました (引用文献 1)。

そこで、生体にとって重要な糖であるコアフコースに重点を置き、TLR4 を介する自然免疫での糖鎖の役割を明らかにすることを目的としました。

注 1 : タンパク質のアスパラギン側鎖のアミド基の窒素 (N) に結合している糖鎖。糖鎖とはグルコース、ガラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミン、フコース、シアル酸などの単糖が、グリコシド結合と呼ばれる化学結合によりつながったもので、タンパク質や脂質を修飾し、それらの機能を調整する。

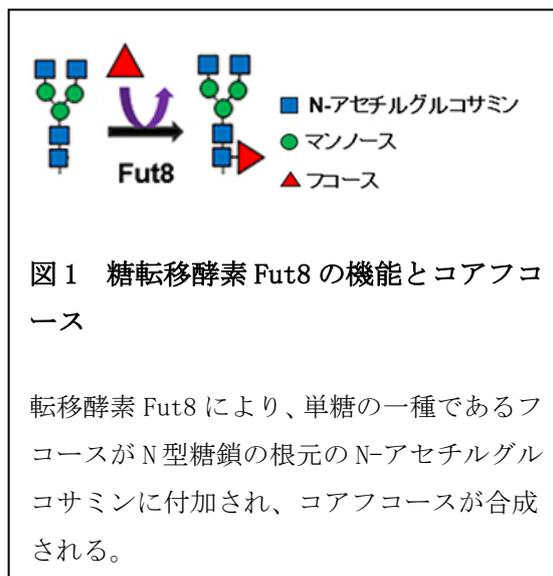


図 1 糖転移酵素 Fut8 の機能とコアフコース

転移酵素 Fut8 により、単糖の一種であるフコースが N 型糖鎖の根元の N-アセチルグルコサミンに付加され、コアフコースが合成される。

3. 研究の方法

コアフコース欠損マウスは致死率が高く解析が困難なため、TLR4 シグナル伝達におけるコアフコースの機能をコアフコース欠損マウス由来の胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) を用いて調べました。

TLR4 がその機能を発揮するためには、多くの補助因子が必要です。はじめに LPS が細胞膜上の CD14 に運ばれた後、LPS は TLR4 と MD2 の複合体と結合します。MD2 は TLR4 の細胞外部分に会合し TLR4 と共役して LPS を認識する分子です。その後、TLR4/MD2 複合体は 2 種類のシグナル伝達経路をたどります。1 つは、細胞表面でアダプター分子の MyD88 を介する経路でインターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインの発現を誘導します

(MyD88 依存的経路)。もう 1 つは、CD14 依存的に細胞内に取り込まれた TLR4/MD2 複合体に対するアダプター分子の TRIF を介する経路で、インターフェロン- β (IFN- β) の発現を誘導します (TRIF 依存的経路)。

そこで、MyD88 依存的経路と TRIF 依存的経路の TLR4 シグナルに必要な TLR4/MD2 複合体の形成や LPS の結合、LPS 刺激に対する反応性を調べました。

4. 研究成果

コアフコース欠損マウス由来の MEF 細胞を用い、TLR4 のリガンドである LPS に対する反応性を検討するため、炎症性サイトカインの分泌を測定しました。その結果、コアフコース欠損 MEF 細胞では、LPS 刺激後に TLR4 シグナル伝達経路の一つ MyD88 依存的経路で発現誘導される IL-6 は正常に分泌される一方、TRIF 依存的経路で誘導される IFN- β の分泌は抑制されることを見出しました (図 2)。また、

IFN- β の発現は mRNA の転写レベルで抑制されていることが分かりました。

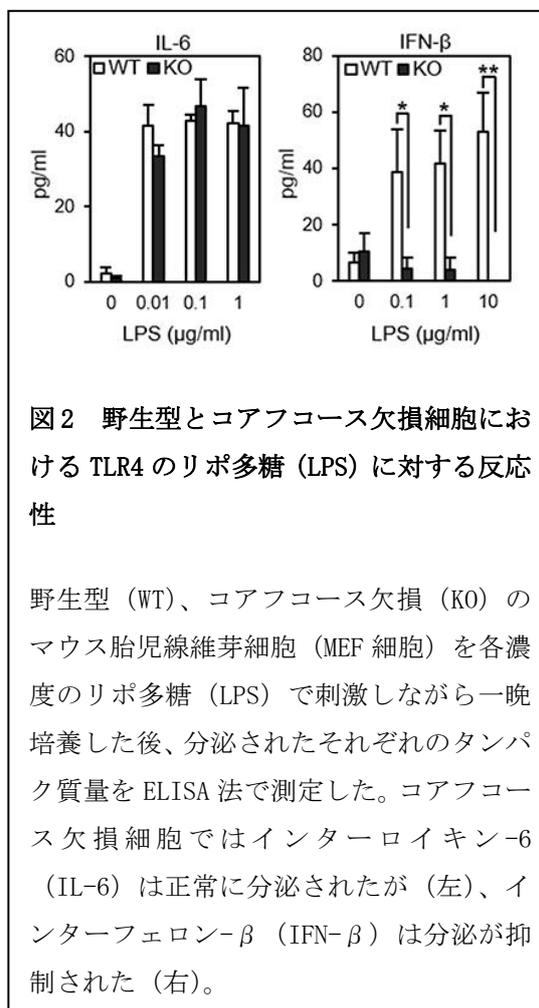


図2 野生型とコアフコース欠損細胞における TLR4 のリポ多糖 (LPS) に対する反応性

野生型 (WT)、コアフコース欠損 (KO) のマウス胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) を各濃度のリポ多糖 (LPS) で刺激しながら一晩培養した後、分泌されたそれぞれのタンパク質量を ELISA 法で測定した。コアフコース欠損細胞ではインターロイキン-6 (IL-6) は正常に分泌されたが (左)、インターフェロン- β (IFN- β) は分泌が抑制された (右)。

次に、MyD88 依存的経路と TRIF 依存的経路の TLR4 シグナルに必要な TLR4/MD2 複合体の形成や LPS の結合を調べました。その結果、コアフコースの有無に関わらず、両経路も TLR4/MD2 複合体の形成や LPS の結合が確認されました。また、MyD88 依存的経路にも異常がみられないことから、TRIF 依存的経路に注目し、LPS 刺激に対する反応性を調べました。TRIF 依存的経路による IFN- β の分泌には、CD14 依存的な TLR4/MD2 複合体の細胞内への取り込みが必要であることから、LPS 刺激前後の細胞表面上の CD14、TLR4/MD2 複合体、TLR4 の量の動態変化を測定しました。その結

果、野生型細胞では LPS 刺激に反応して細胞表面上の発現量が著しく低下した一方、コアフコース欠損細胞では細胞表面上の発現量の変化が抑制されました。このことより、LPS 刺激に対する CD14、TLR4/MD2 複合体、TLR4 の細胞内への取り込みがコアフコース欠損により抑制されることが分かりました (図 3)。

また、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞 (293T 細胞) を用いて、TLR4、MD2、CD14 上のコアフコース修飾の有無をコアフコースを特異的に検出するレクチンを用いて調べた結果、CD14 がコアフコースで修飾されていることが分かりました。さらに、コアフコース欠損細胞では、定常時 (LPS 刺激なし) でも CD14 の細胞表面上の発現量が減少したことから、コアフコースが CD14 の正常な細胞表面での発現に関わっていると考えられます。

これらの結果から、CD14 上のコアフコース欠損に起因する CD14 の細胞発現量低下や CD14 の機能損傷は、LPS の運搬や MyD88 依存的経路には影響を及ぼさないが、TRIF 依存的経路を介する IFN- β の分泌を特異的に抑制する可能性が示されました。これにより、コアフコースが自然免疫における TLR4 シグナルを介した感染防御に必須であることが分かりました (図 4)。

今後、コアフコースの欠損によって CD14、または別の因子がどのように IFN- β の分泌を抑制するか、より詳しく調べる必要があります。特に、IFN- β は免疫機能を活性化し感染防御に重要な役割を果たすと同時に、免疫活性による腫瘍増殖抑制作用も報告されています。TRIF 依存的経路を介した IFN- β の分泌を抑制する仕組みを解明することで、免疫応答システムの理解を深め、感染、腫瘍、自己免疫疾患などの治療法の開発が期待できます。また、TLR4 以外の他の TLR を対象に

研究することで、ウイルスなどさまざまな病原体に対する効果の解明が期待できます。

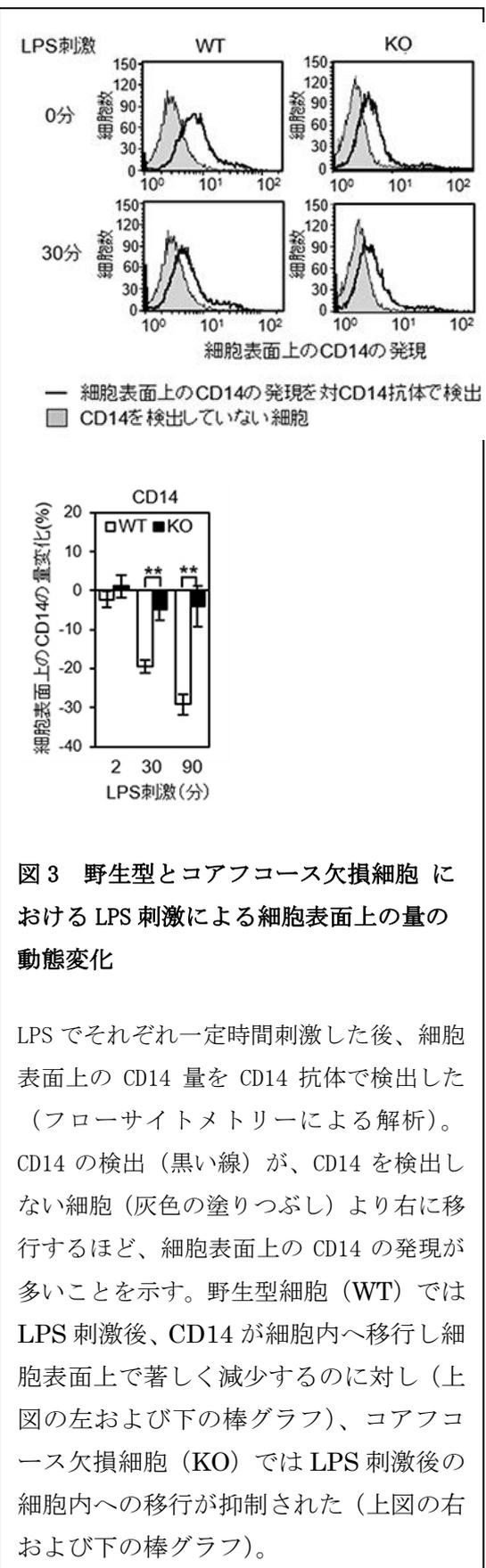


図 3 野生型とコアフコース欠損細胞における LPS 刺激による細胞表面上の量の動態変化

LPS でそれぞれ一定時間刺激した後、細胞表面上の CD14 量を CD14 抗体で検出した (フローサイトメトリーによる解析)。CD14 の検出 (黒い線) が、CD14 を検出しない細胞 (灰色の塗りつぶし) より右に移行するほど、細胞表面上の CD14 の発現が多いことを示す。野生型細胞 (WT) では LPS 刺激後、CD14 が細胞内へ移行し細胞表面上で著しく減少するのに対し (上図の左および下の棒グラフ)、コアフコース欠損細胞 (KO) では LPS 刺激後の細胞内への移行が抑制された (上図の右および下の棒グラフ)。

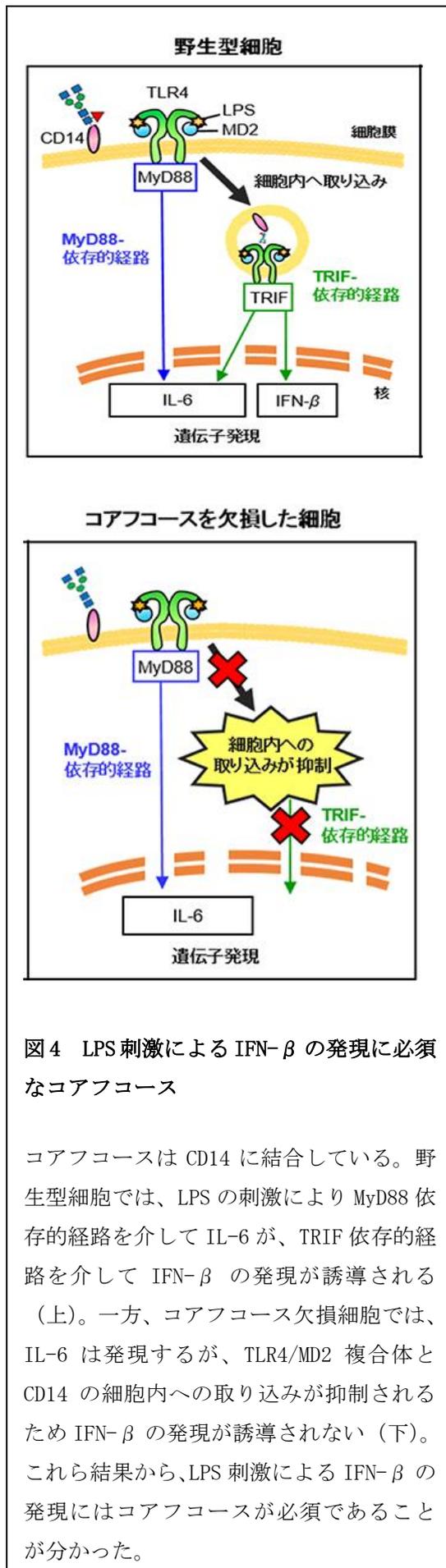


図4 LPS刺激によるIFN-βの発現に必要なコアフコース

コアフコースはCD14に結合している。野生型細胞では、LPSの刺激によりMyD88依存経路を介してIL-6が、TRIF依存経路を介してIFN-βの発現が誘導される(上)。一方、コアフコース欠損細胞では、IL-6は発現するが、TLR4/MD2複合体とCD14の細胞内への取り込みが抑制されるためIFN-βの発現が誘導されない(下)。これら結果から、LPS刺激によるIFN-βの発現にはコアフコースが必須であることが分かった。

<引用文献>

1. Wang X, et al. Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. No. 44, 15791-6, 2005

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)

Core fucose is critical for CD14-dependent Toll-like receptor 4 signaling.

Junko Iijima, Satoshi Kobayashi, Shinobu Kitazume, Yasuhiko Kizuka, Reiko Fujinawa, Hiroaki Korekane, Takuma Shibata, Shin-Ichiro Saitoh, Sachiko Akashi-Takamura, Kensuke Miyake, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi. *Glycobiology*.

2017 Nov 1;27(11):1006-1015, 査読あり
DOI: 10.1093/glycob/cwx075

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 4th RIKEN-Max Planck joint symposium (ポスター発表)
GlycoTOKYO 2015 (ポスター発表)

② 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015) (一般口頭発表、ポスター発表)

[図書] (計 0 件)

[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

理化学研究所 ホームページ 報道発表資料

「病原体センサーの機能を変える糖鎖を発見ーコアフコースが自然免疫におけるシグナル伝達経路に必須ー」

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170915_1/

2017年9月15日 掲載 (2018年6月27日 閲覧)

薬事日報

「コアフコース、病原体センサー機能に関与 - 自然免疫のシグナル伝達経路に必須」

2017年9月25日 掲載 8面

薬事日報ウェブサイト

<https://www.yakuji.co.jp/entry60756.html>

2017年9月25日 掲載 (2018年6月27日 閲覧)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 順子 (IIJIMA, Junko)

理化学研究所 グローバル研究クラスタ
システム糖鎖生物学研究グループ
疾患糖鎖研究チーム ・ 研究員

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号： 10559636

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()