

論文の内容の要旨

論文題目 上皮細胞の防御応答に伴うムチン及び O-結合型糖鎖の生合成調節

氏 名 加納 亮

序論

糖鎖は構造的に多様であり、細胞や組織の表面に豊富に存在することが知られている。粘膜上皮細胞は消化管や呼吸器、泌尿生殖器などにおいて外界と直接接する細胞であり、この細胞が産生するムチン分子は、高頻度に O-結合型糖鎖による修飾を受けたタンデムリピートを持つ糖蛋白質である。ムチンは粘液の主要な構成成分として微生物やアレルゲン物質の付着から組織を防御していると考えられている。また、ムチンは糖鎖構造を含めて、上皮の種類に特異的であることが知られている。したがって、外界に対する防御応答に際して、ムチンの種類やその糖鎖が変化するかどうかは大きな問題である。ムチン糖蛋白質上の糖鎖生合成の第一段階は、UDP-GalNAc: polypeptide N-Acetylgalactosaminyl transferase (ppGalNAc-T) によってペプチド鎖のセリンあるいはスレオニン残基に N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が付加することで開始される。ヒト ppGalNAc-T は現在 1-4、6-13 の 12 種類が報告されており、合わせて 18 のアイソマーの存在が示唆されている。当研究室でのこれまでの研究を含めて、これら ppGalNAc-T の各アイソマーの組織発現分布や、各アイソマーの特定のペプチド配列に対する基質特異性が次第に明らかになりつつあるが、これら ppGalNAc-T の各アイソマーの発現が上皮の防御応答に伴って変化するのか、その結果として細胞表面に分泌される糖蛋白質の糖鎖がどのように変化するかなどについては全く知られていなかった。

そこで私は、Th2 系サイトカインが分泌型ムチン産生を促進する可能性に注目し、この時に ppGalNAc-T の発現が変化するか、その結果としてムチン上の糖鎖の種類が変化するかを解明する目的で以下の研究を行なった。

1. ppGalNAc-T および ムチン遺伝子発現定量系の構築と大腸癌細胞株での比較

(目的)細胞応答における各遺伝子の発現変化を記述するために、微量かつ多種類の遺伝子 mRNA 量を網羅的かつ定量的に測定できる competitive RT-PCR 法に基づいて、PCR 法で competitor DNA を作製する手法を用い ppGalNAc-T およびムチン遺伝子発現量の定量系を構築する。(方法)ヒトについては、既知の

ppGalNAc-T アイソマーのうち 8 種 (ppGalNAc-T1-4、6-9) とムチン遺伝子のうち 7 種 (MUC1-4、5AC、5B、6) について定量的 PCR 系を確立した。また、ヒト遺伝子との相同性に基づき、新規のマウス ppGalNAc-T2、T7 の遺伝子配列をクローニングした。両者のヒトホモログとの相同性はアミノ酸配列レベルで 90% を越えていた。マウスについては、これら新規の ppGalNAc-T を含めたアイソマー 6 種 (mouse ppGalNAc-T1-4、6、7) とムチン遺伝子 7 種 (mouse MUC1-4、5AC、5B、6) について定量的 PCR 系を確立した。(結果と考察)この遺伝子発現定量系を用いて、ヒト大腸癌細胞株 LS174T と T84 およびマウス大腸癌細胞株 colon 38 について RNA を抽出し、逆転写後 ppGalNAc-T とムチン遺伝子の発現量定量を行なった。LS174T 細胞では ppGalNAc-T8 を除く全ての ppGalNAc-T を、また T84 細胞は ppGalNAc-T9 を除く全ての ppGalNAc-T の遺伝子発現を定量できた。ppGalNAc-T4 の遺伝子発現量は LS174T 細胞に比べて T84 細胞の方が高かった。colon 38 細胞からマウス ppGalNAc-T1-4、7 の遺伝子発現を定量的に検出した。また、LS174T 細胞から MUC1、2、5AC、5B、6 の遺伝子発現を定量的に検出した。competitive RT-PCR 法により、ppGalNAc-T およびムチンの網羅的遺伝子発現定量を可能とした。

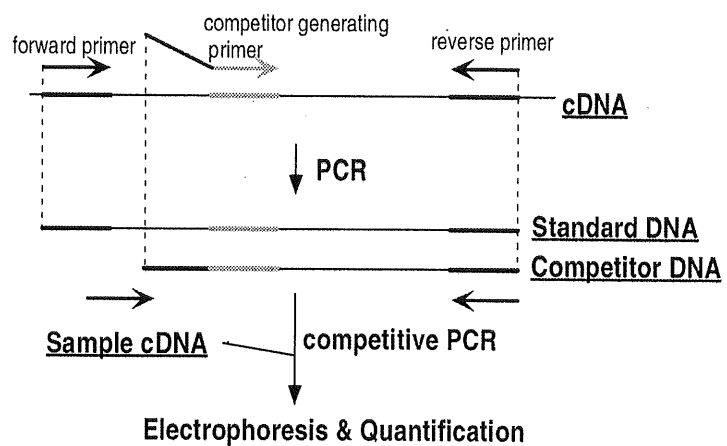


Fig. 1: Competitive PCR の概念図。cDNA から PCR によって Standard DNA と competitor DNA を作製し、プラスミドにサブクローニングして精製したものを 定量後 competitive PCR に用いた。

2. ヒト大腸癌 LS174T 細胞におけるムチン及びその糖鎖の生合成への Th2 系サイトカインの影響

(目的) 上皮組織においてムチン分泌を主に担う杯細胞の分化形質を持つヒト大腸癌細胞株 LS174T を *in vitro* におけるモデルとして用い、アレルギー反応時にリンパ球から分泌されることが知られている IL-4 がムチン遺伝子及び ppGalNAc-T 遺伝子 12 種類によって異なる影響を与えるかどうかを明らかにする。(方法) LS174T 細胞が IL-4 レセプター α 鎖の mRNA を発現していることを RT-PCR 法により確認した。20 ng/ml の濃度でリコンビナントヒト IL-4 を培養液中に添加して LS174T 細胞を培養し、RNA を得て (I.) で開発した方法によって mRNA 量を定量した。FITC 標識 MUC2 タンデムリピート 24mer を基質として、細胞マイクロソーム

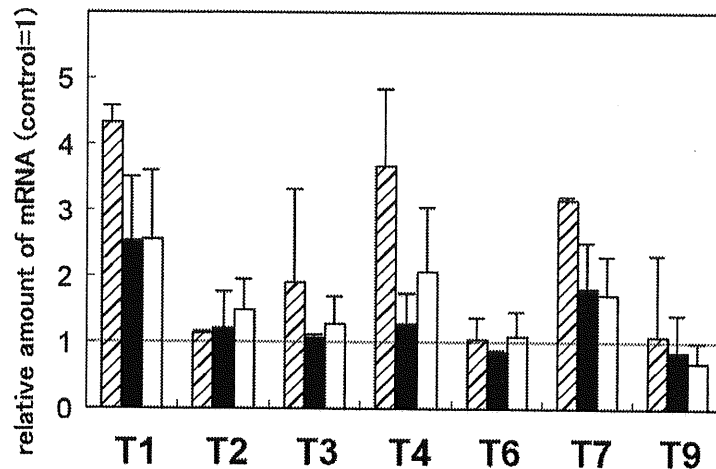


Fig. 2: IL-4 添加による LS174T 細胞の ppGalNAc-T 発現変化の経時的検討。検討したアイソマーにおいては、T1, T4, T7 の mRNA 発現が上昇し、そのピークは6時間後であった。▨6時間後、■12時間後、□24時間後。未処理群の mRNA を1とした相対値で表記した。

を酵素源として GalNAc 転移酵素反応を行ない、生成物を逆相 HPLC 分析のち質量分析によって GalNAc 付加数を決定し、IL-4 による細胞のペプチドへの GalNAc 転移能の変化を調べた。また、IL-4 によって細胞が分泌する糖蛋白質上の糖鎖の構造が変化するかを検討する目的で、LS174T 細胞を IL-4 を添加した無血清培養液中で 24 時間培養し、その培養上清から分子量 10 万以上の画分を粗精製し、プレートに固層化して

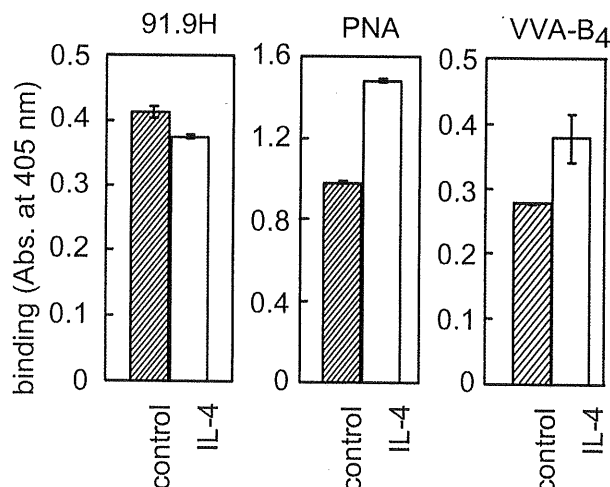


Fig.3 LS174T細胞の分泌糖蛋白質に対するモノクローナル抗体91.9H(抗スルホリスア)と2種のビオチン化レクチン(PNA、Gal-GalNAc構造を認識、とVVA-B4、GalNAc構造を認識)の結合性のELISA法による検出とその IL-4 処理による変化。図中では 1 mg の分泌蛋白質をプレート上にコートした場合について表記した。

その培養上清から分子量 10 万以上の画分を粗精製し、プレートに固層化してレクチンまたは抗糖鎖抗原抗体に対す

る結合性を ELISA 法で調べた。(結果と考察)24 時間後に MUC2 をはじめとする分泌型ムチン遺伝子 (MUC2、5AC、5B、6) の発現が上昇した。また、ppGalNAc-T の mRNA 発現を調べたところ、ppGalNAc-T1、T4、T7 の発現が有意に上昇した。一方で ppGalNAc-T2、T3、T6、T9 の発現は有意な変化をしなかった。経時的な検討によって、T1、T4、T7 の遺伝子発現上昇のピークは IL-4 添加 6 時間後にあることがわかった。これは分泌型ムチン遺伝子が IL-4 添加 24 時間後において発現上昇することと異なっていた。また、IL-4 を添加した場合に、MUC2 タンデムリピートペプチド配列への GalNAc 付加数の多い生成物が相対的に多く検出され、IL-4 によって細胞が合成するペプチド上の GalNAc 付加の様子が変化することが示唆された。シアル酸の付加していない Gal-GalNAc 構造を認識するレクチンである PNA と、GalNAc を認識するレクチンである VVA-B₄ の分泌糖蛋白質への結合性は、IL-4 を添加した場合に上昇した。一部の ppGalNAc-T 発現が変化した結果、糖蛋白質への O-グリカンの導入のされ方に変化が生じると考えられた。

ppGalNAc-T4 と T7 の、MUC2 のタンデムリピート配列に対して GalNAc 転移活性を検討した報告では、T4 は既に GalNAc が付加したペプチドに対してより強い活性を示し、また T7 は既に GalNAc が付加したペプチドのみに転移することがわかっている(Bennett E. P., et al. FEBS 460: 226-(1999))。IL-4 によってこれらのアイソマーの発現が変化した結果、ペプチドに付加した GalNAc の数が変化したことが考えられる。

3. 食物アレルギー性下痢マウスモデルにおける MUC2 および ppGalNAc-T 発現変化の検討

(目的) *in vivo* における腸管アレルギーモデルとして、権らが確立した食物アレルギー性下痢マウスモデルを用い、(I.)で開発した方法によってマウスムチンおよび ppGalNAc-T の遺伝子発現を発症前後で比較することを目的とした。(方法)卵白アルブミン(OVA)をアジュバントと共に皮下投与した後、経

口的に OVA を週 3 度投与すると 8 回目の投与から下痢が起きた。本条件下では腸上皮に好酸球の浸潤が

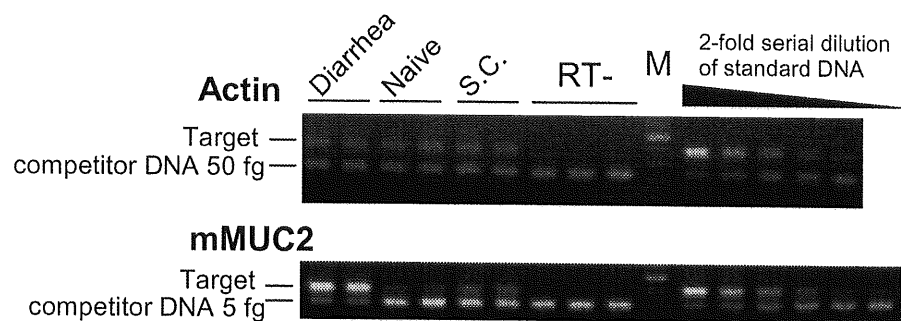


Fig. 4: 食物アレルギー性下痢誘導マウスの大腸上皮におけるMUC2ムチン遺伝子の定量的測定。下痢誘導マウスではMUC2ムチン遺伝子の発現が上昇していた。Diarrhea: アジュバント皮下投与後、OVAを経口投与した群、S.C.: アジュバント皮下投与のみの群、Naive: 未処置マウス

強く見られ、また下痢を起こしたマウスの大腸から抽出したリンパ球は IL-4、IL-5、IL-13 の産生量が高く、また IL-4 と IL-13 の遺伝子発現が高く、IFN- γ の遺伝子発現が低いことがわかっている(Kweon, M et al. J. Clin. Invest. 106:199 (2000))。この食物アレルギー性の下痢を起こしたマウスから大腸上皮細胞を抽出し、マウス MUC2 ムチン遺伝子の発現量を調べた。(結果と考察) 下痢発症マウスでは、コントロールに比べてマウス MUC2 の mRNA 発現量が上昇していた。また ppGalNAc-T に関しては、マウス ppGalNAc-T1 の発現量が下痢発症マウスで高かったが、他のアイソマーについては発現量が低く定量的な検出ができなかった。

結語

本研究では、ppGalNAc-T およびムチン遺伝子について網羅的な遺伝子発現定量系を確立し、上皮細胞が Th2 系サイトカインである IL-4 によって分泌型ムチンの mRNA 量を上昇させ、特定の ppGalNAc-T の発現を誘導することを示した。また、そのとき分泌されるムチンに対するレクチン結合性が変化することを明らかにした。IL-4 により ppGalNAc-T の発現が変化することで、O-結合型糖鎖の伸長に関わる他の糖転移酵素と競合する可能性も考えられる。IL-4 以外のサイトカイン、あるいは微生物感染などの場面において、上皮細胞がどのように糖転移酵素の発現を変化させるか、また生合成し分泌するムチン上の糖構造がどのように変化するのか、さらに解析することが必要と考える。