

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

Tool-like receptor 4 結合分子MD-2 の機能解析 と創薬への応用

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究者 大西 貴弘

要旨

MD-2 でのグリコシル化の役割を調べた。グリコシル化部位を他のアミノ酸に置換した MD-2 を発現させると LPS による TLR4 を介した NF- κ B の活性化が大きく減少したが、MD-2 と TLR4 の結合、MD-2 の細胞表面への発現、LPS の細胞への結合には影響しなかった。これらのことからグリコシル化の作用はいまだ不明であるが、MD-2 のグリコシル化は LPS の情報伝達に重要な役割を果たしていることが示唆された。

1. 研究目的

エンドトキシンは感染症に伴って重篤な疾患を引き起こし、多くの人々が死亡する原因因子として臨床で大きな問題となっている毒素である。しかし、エンドトキシンの作用に中心的な役割を果たしているマクロファージの活性化機構はこれまでほとんど解明されていなかった。このため、エンドトキシン疾患に対する真に効果的な治療法および拮抗薬の開発が妨げられてきた。最近になってエンドトキシンによる細胞活性化シグナルを直接細胞質内に伝達する受容体として Toll-like receptor (TLR) ファミリーの中の TLR4 が同定された。この TLR4 と細胞膜上で結合し TLR4 を介したエンドトキシンのシグナル伝達に必要な不可欠な分子として MD-2 が知られている。しかしながら、この MD-2 の分子機序に関してはほとんど知られていない。本研究はこの MD-2 の分子機序を明らかにすることにより、エンドトキシンによるマクロファージ活性化機構を解明し、本質的なエンドトキシン疾患治療法および拮抗薬の開発への応用を目指すものである。

2. 研究方法

すでに我々は MD-2 がグリコシル化を受ける糖タンパクであることを見出している。そこで今回は MD-2 におけるグリコシル化の役割解明に的を絞って研究を行っていく。

プラスミドの作成および変異体 MD-2 の作成

ヒト CD14cDNA を含むプラスミドは大分医科大学の山本俊輔博士より分与していただいた。ヒト MD-2 (hMD-2) と hTLR4 のコード領域はそれぞれ THP-1 細胞からの RNA および人の脾臓 RNA (Origene Technologies, Rockville, MD) より RT-PCR を用いて増幅した。hMD-2, hCD14, hTLR4 のコード領域から予想されるシグナルペプチド配列を除いたものをプレプロトリプシンシグナル配列と EIAV タグ (アミノ酸配列 ADRIIPTGTAE) を含む哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。タグの付加は培養細胞における hMD-2, hCD-14, hTLR4 の活性に影響を与えなかった。ルシフェラーゼレポータープラスミド endothelial cell-leukocyte adhesion molecule pELAM-L は E-セレクチンプロモーターの PCR 断片 (-730 から +52) を pGL3 Basic vector (Promega,

Madison, WI)の SacI-HindIII 部位に挿入して作成した。

MD-2 におけるグリコシル化が MD-2 の働きにどのような影響を及ぼしているかを調べるために、ヒト MD-2 (hMD-2)における 2ヶ所の N-グリコシル化部位である 26, 114 番目のアスパラギンの内いずれかひとつ (N26Q および N114Q)、もしくは両方をグルタミンに置換した変異体 MD-2 (N26:114Q)を作成した。変異体作成は PCR で行った。使用した PCR プライマーは N26Q には 5' -GGG TCT GCC AGT CAT CCG ATG CA-3' と 5' -AAT ACT GCT TCT GAG CTT CAG TAA ATA TGG-3'、N114Q には 5' -GAG ACT GTG CAG ACA ACA ATA TCA TTC TCC-3' と 5' -TCC CTT CAG AGC TCT GCA AAA AGA GT-3' を用いた。全ての変異は dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway) と ABI Prism 310 genetic analyzer (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いたシーケンスを行い確認した。

グリコシダーゼ処理

hMD-2 発現ベクター (5 μ g) をリン酸カルシウム法で 293 細胞にトランスフェクトして 24 時間後、protease inhibitor mix (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を含む lysis buffer (10 mM HEPES-KOH, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 10 mM KCl (pH 7.9)) を用いて細胞を氷上で溶解した。1000 \times g、5 分間遠心後、上精を細胞抽出液として使用した。細胞抽出液は 0.5% SDS、1% 2-ME 存在下で 10 分間煮沸した。1/10 容量の 0.5 M sodium phosphate (pH 7.5) と 10% Nonidet P-40 を加えた後、PNGaseF (最終濃度 10U/ml) と共に 37 $^{\circ}$ C、1 時間加熱し、SDS-PAGE 電気泳動に用いた。hMD-2 は抗 EIAV 抗体と ECL システム (Amersham, Arlington Heights, IL) を用いたウエスタンブロットで検出した。

LPS による細胞活性化に対する MD-2 のグリコシル化の影響

MD-2 におけるグリコシル化が TLR4 を介した LPS による NF- κ B の活性化にどのような影響を与えているか調べた。LBP (100ng/ml) を含む無血清 DMEM 中で hTLR4、hCD14 および野生型もしくは変異体 hMD-2 を発現させた 293 細胞を LPS 刺激した。6 時間後、細胞の活性化を NF- κ B 依存性のレポーターアッセイで測定した。さらにグリコシル化の影響を調べるために、N-グリコシル化の阻害剤であるツニカマイシン存在下で LPS 刺激を行った。hMD-2、hTLR4 を発現させた 293 細胞をツニカマイシン存在下で 16 時間培養後、DMEM (10%FCS) 中で LPS (10 ng/ml) もしくは TNF- α (10 ng/ml) で刺激した。6 時間後、細胞の活性化を NF- κ B 依存性のレポーターアッセイで測定した。この実験ではツニカマイシンの影響で GPI-アンカータンパクである CD14 が細胞膜表面から遊離するため CD14 は発現させなかった。代わりに 10%FCS 添加 DMEM を用いて、可溶性 CD14 と LBP を供給した。

MD-2 の細胞表面への発現に対するグリコシル化の役割

グリコシル化はタンパクの折りたたみや輸送に重要な役割を果たすと考えられているため、MD-2 の細胞表面への発現にグリコシル化が関与しているか調べた。293 細胞に野生型もしくは変異体 hMD-2 をリン酸カルシウム法で発現させ (5 μ g) 24 時間後、PBS で 2 回洗浄した。氷冷した膜非透過性のビオチン化試薬 sulfo-NHS-LC-LC-biotin (Pierce) と共に 4 $^{\circ}$ C、30 分培養した。その後、ビオチン化反応を停止するために 20 mM グリシンを含む PBS 中で 4 $^{\circ}$ C、15 分培養した。細胞は 200 μ l の lysis buffer で溶解し、0.5% Nonidet P-40 を含む PBS (PBSN) で 500 μ l に希釈した。ストレプトアビジンアガロースを加え 4 $^{\circ}$ C、1 時間培養後、PBSN でアガロースを 3 回洗浄した。アガロースは SDS-PAGE sample buffer 中で煮沸し、上精をウエスタンブロットに用いた。

TLR4 への結合能に対する MD-2 のグリコシル化の役割

MD-2 は細胞表面で TLR4 と複合体を形成しているため、MD-2 と TLR4 の結合に MD-2 のグリコシル化が関与しているか調べた。293 細胞に野生型もしくは変異体 hMD-2 と hTLR4 を発現させ (5 μ g) 24 時間後、上述の様に細胞抽出液を作成した。PBSN で 500 μ l に希釈後、抗 hTLR4 抗体とプロテイン A/G セファロース (Pierce) を加え 4 $^{\circ}$ C、1 時間培養した。セファロースを PBSN で 3 回洗浄後、SDS-PAGE sample buffer 中で煮沸し、上精をウエスタンブロットに用いた。

LPS の細胞表面への結合に対する MD-2 のグリコシル化の役割

細胞表面への LPS の結合に MD-2 のグリコシル化が関与しているか調べた。293 細胞をラットコラーゲン type I コートカバーガラス (BD Biosciences, San Jose, CA) に接種した後、野生型もしくは変異体 hMD-2、hCD14、hTLR4 をそれぞれ単独もしくは複数の組み合わせで発現させ、Alexa fluor 594 標識 LPS (100 ng/ml) (Molecular Probes) と共に 37 $^{\circ}$ C、1 時間培養した。PBS で 3 回洗浄後、3% パラホルムアルデヒドを含む PBS (pH7.6) で 20 分間固定後、VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いてスライドガラス上に載せ、蛍光顕微鏡下で観察した。

NF- κ B レポーターアッセイ

293 細胞を 6-ウェルプレートに接種後 (4 \times 10⁵/ウェル)、リン酸カルシウム法で発現プラスミド (0.02 μ g)、pELAM-L luciferase プラスミド (0.2 μ g)、pRL-TK (*Renilla* luciferase-thymidine kinase) (Promega) をトランスフェクトした。24 時間後、ヒト LBP (100 ng/ml) を含む無血清 DMEM 中で刺激した。結果は thymidine kinase の活性で標準化した。

ヒト LBP の精製

hLBP のコード領域からシグナルシーケンスを取り除いたものを THP-1 細胞の RNA から RT-PCR を用いて増幅し、N 末端に \times 6 ヒスチジン タグ配列を持つ酵母発現ベクター-pGAPZ α (Invitrogen, Carlsbad, CA) にサブクローニングした。LBP は *Pichia* expression system (Invitrogen) で発現させ、Ni²⁺ カラムで精製した (Novagen, Madison, WI)。

3. 研究成果

hMD-2 を 293 細胞に発現させ、細胞から細胞抽出液を作成した。この細胞抽出液を抗 EIAV 抗体を用いたウエスタンブロットで検出すると hMD-2 は移動度の異なる 3 本のバンドとして検出された (Fig.1 左半分)。見かけ上の分子量は \sim 14, 18, 23kDa だった。このような複数のバンドが検出された原因としてグリコシル化の影響が考えられたので、hMD-2 を発現させた 293 細胞の細胞抽出液を N-グリコシダーゼの 1 種である PNGaseF で処理した。PNGaseF 処理した細胞抽出液を抗 EIAV 抗体を用いたウエスタンブロットによって調べたところ、三本のバンドは最も移動度の速いバンド一本に収束した。フォスファターゼ処理ではバンドの移動度に変化はなかった (データ示さず)。これらのことから、hMD-2 が 3 本のバンドとして検出される原因として hMD-2 の N-グリコシル化が示唆された。このことをさらに明らかにするために、hMD-2 上の 2ヶ所の N-グリコシル化部位 (26, 114 番目のアスパラギン) をグルタミンに置換した変異体 hMD-2 を作成した (Fig.1 右半分)。1ヶ所のグリコシル化部位を置換した変異体 (N26Q もしくは N114Q) を発現させるともっとも移動度の遅いバンドが消失した。2ヶ所のグリコシル化部位を置換した変異体 (N26:114Q) を発現させるともっとも移動度の

遅いバンドと中間のバンドが消失し、1本に収束した。以上のことから hMD-2 は 26 番目と 114 番目のアスパラギンに N-グリコシル化を受ける糖タンパクであることが明らかとなった。

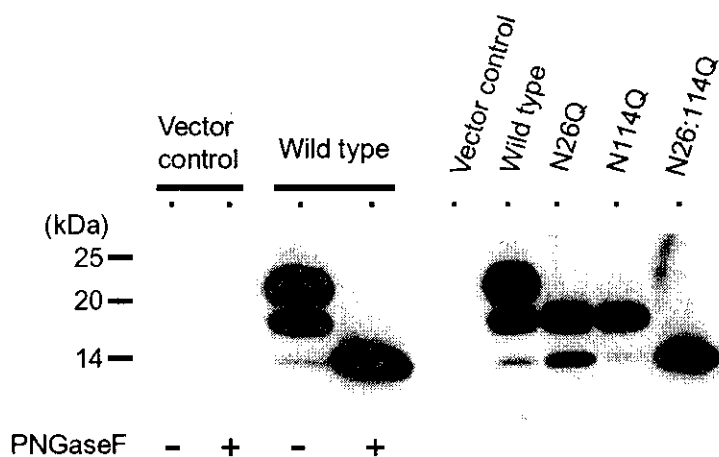


Fig.1 PNGase 処理前後および変異体 hMD-2 の泳動像

TLR4 を介した LPS による NF- κ B の活性化に対する hMD-2 のグリコシル化の影響を NF- κ B 依存性のレポーターアッセイで調べた (Fig. 2)。293 細胞に hTLR4 と hCD14 のみを発現させて LPS 刺激を行っても細胞はほとんど反応しなかった。ここに野生型 hMD-2 を発現させると LPS によるレポーター活性の強い増強が見られた。野生型 MD-2 に代えて N26Q もしくは N114Q を発現させると部分的な活性が見られた。特に全てのグリコシル化部位を置換した N26:114Q を発現させるとわずかな活性化のみが認められた。

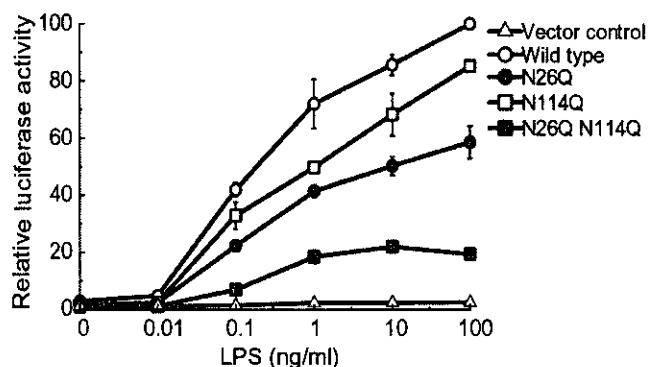


Fig. 2 LPS による細胞活性化における hMD-2 のグリコシル化の影響

グリコシル化の消失がこの弱い活性化の原因であることを確認するために、ツニカマイシンの影響を調べた (Fig. 3)。野生型 hMD-2 と hTLR4 を発現させた 293 細胞をツニカマイシン処理すると LPS による NF- κ B の活性化はツニカマイシンの濃度依存性に抑制された。一方 TNF- α による NF- κ B の活性化は抑制されなかった。これらのことから TLR4 を介した LPS による NF- κ B の活性化には MD-2 のグリコシル化が重要であることが示唆された。

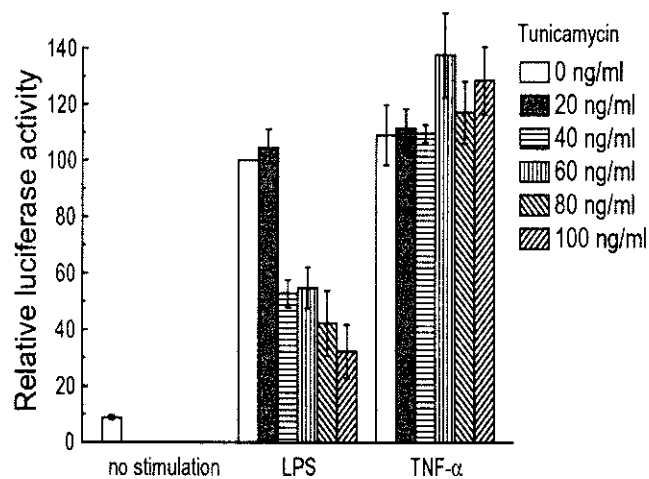


Fig. 3 LPS による細胞活性化におけるツニカマイシンの影響

hMD-2 の細胞表面への発現に対して hMD-2 のグリコシル化が及ぼす影響を検討した。野生型もしくは変異体 hMD-2 を 293 細胞に発現させ、細胞表面のタンパクを膜非透過性のビオチン化試薬で標識した。ビオチン化タンパクはストレプトアビジンアガロースで回収し、ウエスタンブロットで hMD-2 を検出した。ストレプトアビジンでの沈降物からはほぼ等量の野生型 hMD-2 と変異体 hMD-2 が回収された。このことから 26 番目、114 番目のアスパラギンのグリコシル化は hMD-2 の細胞表面への発現には関与していないことが示された。

hMD-2 におけるグリコシル化が hMD-2 と TLR4 の結合に関与しているか調べた。hMD-2 と hTLR4 を 293 細胞に発現させ抗 hTLR4 抗体で免疫沈降を行い hTLR4 と共沈降してきた hMD-2 を検出した。その結果、hTLR4 もしくは hMD-2 を単独で発現させた場合、hMD-2 は沈降しなかった。野生型 hMD-2 と hTLR4 を発現させると hMD-2 は hTLR4 と共に沈降した。N26Q, N114Q, N26:114Q それぞれと hTLR4 を発現させても hTLR4 と共に沈降した。以上のことからグリコシル化を受けていない hMD-2 も野生型 MD-2 同様に TLR4 と結合できることが明らかになった。

Alexa Fluor594 標識 LPS を用いて、LPS の細胞表面への結合に hMD-2 のグリコシル化が関与しているか調べた。293 細胞に Vector control、hTLR4、野生型 hMD-2、N26:114Q のいずれか単独もしくはその組み合わせを発現しただけでは LPS の結合は検出できなかった。しかし、野生型 hMD-2 と hCD14 もしくは野生型 hMD-2、TLR4、hCD14 の組み合わせで発現させると LPS の明らかな結合が観察された。この時、野生型 hMD-2 の代わりに N26:114 を発現させても LPS の結合を観察することができた。これらのことから hMD-2 におけるグリコシル化は LPS の細胞表面への結合には関与していないことが示唆された。

4. 考察

N-グリコシル化は多くの細胞表面タンパクに見られる修飾である。しかし、タンパクにおける糖鎖付加の正確な役割については明らかになっていない。現在までに理解されているグリコシル化の役割は少なくとも 2 つのグループに別けられる。ひとつはタンパクの物理化学的な正常に関するもので、タンパクの可溶性、電化、質量などの変化に関与する。これらはタンパクの折りたたみや、立体構造の維持、細胞内輸送に重要である。もうひとつは、生物学的な機能に関するものである。最近では細胞表面のレセプターにおけるリガンドの認識や情報伝達にこのグリコシル化が関与しているという報告がある。hMD-2 におけるこのグリコシル化の機能を探るために、N-グリコシル化部位を欠失した変異体 hMD-2 を作成した。LPS 刺激による TLR4 を

介した NF- κ B の活性化は野生型 hMD-2 に代えて変異体 MD-2 を発現させるとわずかな活性しか認められなくなった。しかし、変異体 hMD-2 も TLR4 との結合能を保持していることから、hMD-2 のアミノ酸を置換したことによって hMD-2 の二次構造が変化し、その機能の消失につながったとは考えにくい。さらに、ツニカマイシン処理を行った実験では、LPS による TLR4 を介した NF- κ B の活性化が大きく阻害された。この結果は hMD-2 におけるグリコシル化が TLR4 を介した LPS の反応に重大な意味を持つことを示唆している。TLR4 もそのアミノ酸配列上にグリコシル化部位を持つ。TLR4 を単独で細胞に過剰発現させると、定常的な NF- κ B の活性化の増加が見られるが、ツニカマイシン処理によっては、この定常的な NF- κ B の活性化の増加は阻害されなかった。このことは TLR4 におけるグリコシル化の欠失は少なくとも TLR4 の機能には影響を与えないことを示唆している。これに対して TNF- α レセプターには三ヶ所のグリコシル化部位が存在するが、TNF- α による NF- κ B の活性化はツニカマイシン処理による影響を受けなかった。このことは LPS 反応における hMD-2 のグリコシル化が特別な役割を持つことを示唆する。

MD-2 を定常的に発現させた細胞では TLR4 の発現無しでは MD-2 は細胞表面へ発現できないという報告がありこのことから MD-2 は細胞膜に TLR4 を介して結合していると示唆される。しかし、今回の実験では TLR4 の発現が無くとも hMD-2 の細胞表面での発現を検出できた。今回用いたビオチン化試薬が細胞内の hMD-2 を標識したとは考えにくい。その理由として 1) この試薬は強く負に荷電しているため細胞膜を通過できないことが報告されている。2) エンドサイトシスを防ぐため 4°C でビオチン化を行い、ビオチン化反応を停止するため細胞を溶解する直前にグリシンを加えた。3) この試薬では細胞質タンパクである I κ -B のビオチン化は起こらなかったなどが挙げられる。今回の実験ではリン酸カルシウム法を用いた一過性のプラスミド発現を行ったのに対し、先の報告では定常的なプラスミド発現法を用いていた。一過性のプラスミド発現法は定常的な発現法より強いタンパクの発現が見られる。このため TLR4 の発現無しで、hMD-2 を細胞表面で検出できたのかもしれない。

5. まとめ

今回の結果から、hMD-2 のグリコシル化が TLR4 を介した LPS の情報伝達に大きな意味を持つことが示された。しかし、その作用機序について今回は明らかにすることはできなかった。今回検討した範囲では hMD-2 の細胞表面への発現、TLR4 との結合、LPS の細胞表面への結合にこのグリコシル化は関与していなかった。

当初、その役割がよくわからなかった MD-2 であるが、その後の研究により MD-2 が LPS との結合能を有しており、MD-2 自身がエンドトキシンの認識に積極的に関与していることが少しずつ明らかになってきている。MD-2 のグリコシル化もこのようなエンドトキシンの認識に関与しているかもしれない。今後の更なる検討が必要であろう。

6. 研究発表

T. Ohnishi, M. Muroi, and K. Tanamoto. N-linked glycosylations at Asn(26) and Asn(114) of human MD-2 are required for toll-like receptor 4-mediated activation of NF- κ B by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 167 (6):3354-3359, 2001.

7. 知的所有権の所得状況

特になし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社