

室井栄治 論文内容の要旨

主 論 文

C-Mannosylated peptides derived from the thrombospondin type 1 repeat enhance lipopolysaccharide-induced signaling in macrophage-like RAW264.7 cells

トロンボスポンジンタイプ1リピート由来のC-マンノシル化ペプチドはマクロファージ様 RAW264.7 細胞においてリポ多糖が誘導するシグナルを増強する

室井栄治、眞鍋史乃、池崎みどり、浦田芳重、
佐藤伸一、近藤宇史、伊藤幸成、井原義人

Glycobiology 2007; 17: 1015-28.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員：近藤宇史教授)

緒 言

C-マンノシル (C-Man) 化はトリプトファン-X(任意のアミノ酸)-X-トリプトファン (WXXW) 配列の最初の W の C2 炭素原子にマンノースが C-C 結合する糖修飾である。WXXW 配列はトロンボスポンジンタイプ1リピート (TSR) と呼ばれる構造内に存在しており、トロンボスポンジン1などのタンパク質において機能的なペプチドモチーフとして、細胞間の相互作用等に関与すると考えられている。C-Man 化は特異的な糖転移酵素によって行なわれると考えられているが、その酵素は未だ同定されていない。リポ多糖 (LPS) はマクロファージ/単球を刺激し炎症を引き起こす。また LPS はマクロファージなどの細胞に対して毒性を有していることも知られている。C-Man 化がマクロファージの LPS 誘導性シグナルに及ぼす影響を化学的に合成した TSR 由来の C-Man 化ペプチドを用いて検討した。

対象と方法

1、RAW264.7細胞をWSPW (S:セリン、P:プロリン)、C-Man化ペプチド (C-Man-WSPW、C-Man-WSP、C-Man-WS、C-Man-W、C-Man-WSPWS、C-Man-WSG、C-Man-WSK ; G:グリシン、K:リジン)、マンノースの存在、非存在下で48時間LPS処理し、細胞の生存率を3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイで測定した。

2、WSPW、C-Man-WSPW が細胞への LPS 結合量に及ぼす影響を FITC 標識 LPS を用いてフローサイトメトリーで検討した。また、WSPW、C-Man-WSPW の RAW264.7 細胞への結合をビオチン化したペプチド (WSPW-Cys-biotin, C-Man-WSPW-Cys-biotin) を用い

てフローサイトメトリー、ウェスタンブロット法で測定した。

3、LPS による TNF- α 産生への C-Man-WSPW の影響を ELISA 法、RT-PCR 法で検討した。

4、LPS 刺激後の interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1)、transforming growth factor- β (TGF- β)-activated kinase 1 (TAK1)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化に対する WSPW、C-Man-WSPW の影響をウェスタンブロット法で解析した。また JNK 活性への影響を GST-c-Jun 融合タンパク質を基質として用いて測定した。

結 果

1、MTT アッセイで C-Man-WSPW は濃度依存性に LPS 処理 (1 μ g/ml) を行なった細胞において細胞障害を誘導した。同様の効果は C-Man-WSP, C-Man-WSPW, C-Man-WSPWS, C-Man-WSG, C-Man-WSK で認められ、マンノース、C-Man-W, C-Man-WS の効果はわずかであった。

2、C-Man-WSPW、WSPW 処理で LPS の RAW264.7 細胞への結合量は差がなかった。更に、WSPW-Cys-biotin は細胞に結合しなかったが、C-Man-WSPW-Cys-biotin は細胞に結合した。また C-Man-WSPW-Cys-biotin の方が多くの種類のタンパク質と結合した。

3、TNF- α の産生は C-Man-WSPW と LPS で処理すると、LPS あるいは LPS と WSPW での処理と比較して処理後 1 時間、2 時間で増加した。RT-PCR では処理後 1 時間で同様の差を認めた。

4、IRAK1 のリン酸化は LPS, LPS と WSPW, LPS と C-Man-WSPW の刺激間で差がなかった。しかし、TAK1 と JNK のリン酸化、GST-c-Jun 融合タンパク質のリン酸化は LPS と C-Man-WSPW で刺激した際に他の場合よりも増強された。

考 察

合成 C-Man 化ペプチドは、少なくとも WSP のようなトリペプチドを有する場合、LPS 誘導性の細胞障害を増強することが示された。加えて、アミノ酸置換 (P/G, P/K) の実験結果は、C-Man-WSP の細胞障害増強効果において P の機能的特異性が高くないことを示唆した。

LPS はその刺激によりマクロファージから TNF- α を産生させることで細胞毒性を示すことが知られている。合成 C-Man 化ペプチドは LPS 刺激による TNF- α 産生を増強し、そのシグナルにおいて、LPS 受容体 (TLR4) 直下の分子である IRAK1 の活性化には影響しなかったが、MAPK 活性化の主要な MAPKKK である TAK1 と JNK の活性化を増強した。これらのことから C-Man-WSPW は、RAW264.7 細胞に存在する標的タンパク質と優位に結合することにより、IRAK1 と TAK1 の間のシグナル伝達に、間接的に働くことが示唆された。

以上の結果より、C-Man 化 TSR あるいは C-Man 化 TSR 関連分子は LPS シグナルの制御を行う新たな分子機構に関与することが明らかとなった、今後は C-Man 化 TSR の標的分子や内在性 C-Man 化 TSR 含有タンパク質の探索、同定を進め、その分子機構の詳細の解明が必要と考えられる。