

## TLR4-MD-2 複合体の内因性リガンドであるグロボテトラオシルセラミドは、その受容体機能をマイナスに調節する

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）生物化学講座の近藤 裕史（こんどう ゆうじ）COE 特任助教、古川 鋼一（ふるかわ こういち）教授らの研究グループは、グロボ系スフィンゴ糖脂質である Gb4 が LPS 受容体である TLR4-MD-2 に結合して、LPS の作用を減弱させることを明らかにしました。さらに、LPS 注入後に Gb4 を注射することで、エンドトキシンショックの治療への応用の可能性を示しました。

この研究成果は、『米国科学アカデミー紀要（Proceeding of the National Academy of Sciences USA : PNAS）』の 3 月 4 日－8 日の週の電子版に掲載されます。

# TLR4-MD-2 複合体の内因性リガンドであるグロボテトラオシルセラミドは、その受容体機能をマイナスに調節する

## ポイント

- グラム陰性桿菌の菌体を構成するリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) は、おもに血管内皮細胞に作用して、致死的な傷害作用を示す。
- グロボ系スフィンゴ糖脂質の糖鎖合成の出発点で働く、alpha1,4-ガラクトース転移酵素 (A4galt) のノックアウトマウスが、LPS の傷害作用を受け易いことを見いだしたので、そのメカニズムを解析した。
- A4galt のノックアウトマウス由来の血管内皮細胞では、LPS 刺激時により強いシグナルが導入され、グロボ系スフィンゴ糖脂質 Gb4 が反応の強さを調節していることが判明した。
- Gb4 が LPS 受容体である TLR4-MD-2 に特異的に結合することを、リコンビナント MD-2 と糖脂質との共沈降実験および native-PAGE 法で示すとともに、Gb4 が LPS と受容体との結合を非競合的に阻害することを明らかにした。
- LPS 注入後のマウスに Gb4 を注射し、明らかな延命効果が認められたことから、Gb4 がエンドトキシンショックの治療に応用しうる可能性が示された。

## 要旨

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）生物化学講座の近藤裕史 COE 特任助教、古川鋼一教授らの研究グループは、グロボ系スフィンゴ糖脂質である Gb4 が LPS 受容体である TLR4-MD-2 に結合して、LPS の作用を減弱させることを明らかにしました。さらに、LPS 注入後に Gb4 を注射することで、エンドトキシンショックの治療への応用の可能性を示しました。

この研究成果は、『米国科学アカデミー紀要 (Proceeding of the National Academy of Sciences USA : PNAS)』の3月4日 - 8日の週の電子版に掲載されます。

## 1. 背景

グロボ系スフィンゴ糖脂質は、ラクトシルセラミドにガラクトースを alpha1,4 結合で付加して合成される Gb3 を出発点とする、ユニークな糖脂質です。研究グループは、以前の研究で、Gb3 の合成に働く A4galt 遺伝子のノックアウトマウスが、病原性大腸菌 O157 が産生するベロ毒素に完全に抵抗性を示すことから、Gb3 がベロ毒素の唯一の受容体であることを報告しましたが、その他のグロボ系糖脂質の機能はほとんど分かっていませんでした。今回、A4galt を欠損するマウスが、LPS に対してより高い感受性を示したことから、血管内皮細胞における LPS 刺激への反応性を比較検討しました。

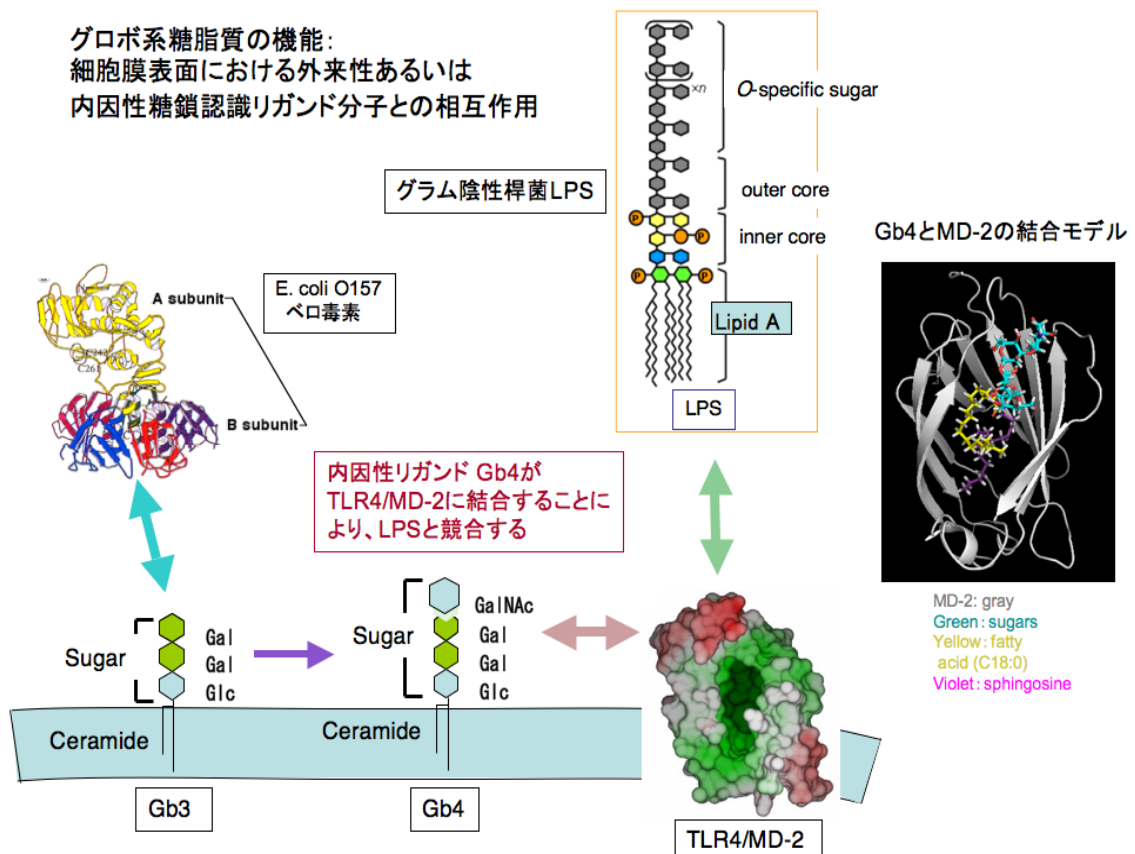
## 2. 研究成果

A4galt ノックアウトマウスではグロボ系糖脂質の欠損が見られましたが、LPS による障害に抵抗

性を賦与する糖鎖構造がグロボテトラオシルセラミド (Gb4) であることが判明しました。そこで、Gb4 が LPS 受容体である TLR4-MD-2 に結合して、LPS の作用を減弱させることを想定して、Gb4 と TLR4-MD-2 との結合につき検討しました。リコンビナント MD-2 と各種糖脂質との共沈降実験では、Gb4 のみが MD-2 に結合することが示され、さらに TLR4-MD-2 と Gb4 との native-PAGE による結合実験では、Gb4 が LPS の TLR4-MD-2 への結合を非競合的に阻害することが分かりました。通常 TLR4-MD-2 は脂質ラフトには存在しませんが、LPS による刺激時には脂質ラフトに移行して、Gb4 との相互作用が起こることが、細胞免疫染色および生化学的なラフトの分離実験によって示されました。LPS 注入後のマウスに Gb4 を注射したマウスでは、しないマウスに比べて明らかな延命効果が認められたことから、Gb4 がグラム陰性桿菌の感染時に見られるエンドトキシンショックの治療に応用しうる可能性が示されました。

### 3. 研究のまとめと今後の展開

今回の実験で、グロボ系糖脂質 Gb4 が、LPS 受容体である TLR4-MD-2 の内因性リガンドの一つであることが明らかになりました。Gb4 の側からみると、TLR4-MD-2 はスフィンゴ糖脂質の糖鎖と特異的に反応する内因性リガンドの最初の例とも考えられます。1950 年代に東京大学の山川民夫教授らが発見した Gb4 の自然免疫における役割が、今日明らかになったことは、極めて興味深い点です。また、血管内皮細胞において TLR4-MD-2 と結合するスフィンゴ糖脂質を質量分析によって解析した結果、セラミド部分に直鎖の（飽和型）脂肪酸を有する Gb4 のみが結合することが判明しました。このことは、TLR4-MD-2 と結合する Gb4 の脂質部位（セラミド）にも反応特異性が存在することを示唆するものであり、生物学的にも治療応用の上でも注目すべき点です。



## 【論文名】

TLR4-MD-2 complex is negatively regulated by an endogenous ligand, globotetraosylceramide

※ 『米国科学アカデミー紀要(Proceeding of the National Academy of Sciences USA:PNAS)』の3月4日-8日の週の電子版に掲載

## 【用語説明】

**グロボテトラオシルセラミド (globotetraosylceramide)** : グロボ系糖脂質の代表的構造でGb4 と略す。ペロ毒受容体であるGb3 にGalNAcがbeta1,3 結合で付加して合成される。

**LPS (lipopolysaccharide)** : リポ多糖で、グラム陰性桿菌などのバクテリアの菌壁を構成する糖脂質。とくに構成成分であるlipid Aは強い毒性を有し、細胞障害作用の主要な原因である。

**スフィンゴ糖脂質** : おもに細胞膜表面に発現する糖脂質であり、脂質部位が脂肪酸と長鎖塩基(代表的にはスフィンゴシン)からなるセラミドに糖鎖が結合する両親媒性化合物である。

**セラミド (ceramide)** : 脂肪酸と長鎖塩基の結合により生成される脂質であり、スフィンゴ糖脂質およびスフィンゴミエリンの構成成分と成ることが多いが、単独でも皮膚などに存在して保水等の重要な役割を果たすと考えられる。

**A4galt** : ラクトシルセラミドを前駆体として、ガラクトースをalpha1,4 結合で付加してGb3 を合成する糖転移酵素遺伝子。遺伝的欠損によりlittle p型の血液型の原因となる。グロボ系糖脂質の合成経路の出発点に位置する。

**TLR4-MD-2** : 自然免疫(innate immunity) に関与する代表的分子であり、LPSの受容体である。LPSの結合によりMyd88などを介してNF- $\kappa$ B活性化を惹起するとともに、IRF3の活性を誘導する。

**エンドキシンショック** : グラム陰性桿菌による敗血症などにおいて、菌体成分が血中に大量に放出されることによって、血管内皮細胞や組織が障害されて末梢循環障害が惹起されショック状態に陥る。致死率が高いが有効治療法がない。

**ペロ毒素** : シガ様毒素(Shiga-like-toxin) ともよばれ、1 型、2 型が存在する。受容体であるGb3 に結合するBサブユニット5個と、毒素の本体であるAサブユニット1個から成り、A1B5 型毒素の一種である。病原性大腸菌から放出される外毒素であり、溶血性尿毒症症候群の原因物質である。