Molecular Cloning and Characterization of a Novel Mouse Macrophage C-type Lectin, mMGL2, Which Has a Distinct Carbohydrate Specificity from mMGL1

mMGL1 とは異なる糖特異性を有する新規マウスマクロファージ C タイプレクチン、
mMGL2 の分子クローニングと解析

Tsuiji, Makoto

Laboratory of Molecular Immunology, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021, U.S.A.
TEL: 212-327-8098, FAX: 212-327-8370, E-mail: tsuijim@mail.rockefeller.edu

Key Words : Galactose-type C-type lectin, Lewis X antigen, Tn antigen, Macrophage, Immature dendritic cell

Abstract

Protein-carbohydrate interactions serve a variety of functions in the immune system. A number of lectins mediate both pathogen recognition and cell-to-cell interactions using structurally related carbohydrate recognition domains (CRDs).

Macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) was previously believed to be derived from a single gene. However, we describe the properties of another novel MØ galactose-type C-type lectin, mMGL2. As an obvious consequence, the previous mMGL must now be called mMGL1. These lectins are highly homologous to each other except in their cytoplasmic domains and CRDs. The mMGL2 mRNA was also detected in mMGL1-positive cells. We found that mMGL2 has distinct carbohydrate specificity from mMGL1. These two lectins may function cooperatively as recognition and endocytic molecules on macrophages and bone marrow-derived immature dendritic cells.

要 約

免疫システムにおいて、タンパク質糖鎖相互作用は、様々な役割を果たしている。数多くのレクチンが、構造的に類似した糖鎖認識ドメイン (CRD) を利用し、病原体の認識や細胞間相互作用に関与している。

マクロファージガラクトースタイプ C タイプレクチン (MGL) は、今まで、一つの遺伝子に由来すると信じられてきたが、私たちは、新規のマクロファージガラクトースタイプ C タイプレクチンである mMGL2 を同定した。今までの mMGL は mMGL1 と命名し直すこととなった。これらのレクチンは、細胞内ドメインと CRD を除いたドメインにおいて高い相同性を有しているが、mMGL2 は、mMGL1 とは異なる糖特異性を有していた。mMGL2 の mRNA は、mMGL1 陽性細胞に検出された。従って、これらのレクチンは、認識分子およびエンドサイトーシス受容体として、マクロファージおよび骨髄由来未成熟樹状細胞上で、協調的に機能していると考えられる。

A. Introduction

Macrophages (MØs) and related cells are widely distributed throughout the body, displaying a morphological and functional diversity. They are found in the lymphoid organs, liver, lungs, gastrointestinal tract, central nervous system, serous cavities, bones, synovia, and skin. Resident MØs mediate clearance of senescent or apoptotic cells, produce and secrete cytokines, are involved in hematopoiesis and bone resorption, transport and present antigens, and regulate neuroendocrine processes. Activated MØs are recruited to sites of infection, tissue injury, inflammation, and neoplasia and play crucial roles in tissue repair and pathogenesis (1). The distribution and functional heterogeneity of MØs derive in part from their specialized plasma membrane receptors (2). Cell surface markers such as F4/80, sialoadhesin, MØ mannose receptor (MMR) and the scavenger receptor (SR-AI/SR-AII) have significantly contributed to the current understanding of MØ ontogeny and function (3). Yet, in

A. はじめに

マクロファージ (MØ) および関連細胞は、リンパ組織、肝臓、肺、消化管、中枢神経系、漿液腔、骨、滑液、皮膚など、広く体内に分布しており、形態学的にも機能的にも多様性を有している。常在性 MØ は、老化細胞やアポトーシス細胞のクリアランス、各種のサイトカインの分泌、造血や骨再吸収、抗原の輸送と提示、神経内分泌系の制御などに関与している。活性化 MØ は、感染、組織障害、新生物の局所に集積し、組織修復や病態形成に重要な役割を果たしている(1)。MØ の分布と機能の不均一性は、限定した細胞膜受容体由来する(2)。F4/80、シアロアドヘシン、MØ マンノース受容体(MMR)、スカベンジャー受容体 (SR-AI/SR-AII) などの細胞表面マーカーは、MØ の個体発生と機能の理解に大きく貢献してきた(3)。しかし、他の免疫細胞である B 細胞や T 細胞に比較すると、同定されてい

comparison with other immune cells such as B and T lymphocytes, relatively few MØ-restricted cell surface molecules have been identified. The physiological and pathological roles of these putative markers remain unknown.

Protein-carbohydrate interactions serve a variety of functions in the immune system. A number of lectins mediate both pathogen recognition and cell-to-cell interactions using structurally related CRDs. One of the most diversified families of these CRDs is Ca^{2+} -dependent and termed C-type CRDs (4, 5). MØs are known to express several subfamilies of C-type lectins: type 1 multilectin such as MMR, and lectins having type 2 transmembrane configurations such as MØ galactose-type (previously known as galactose/*N*-acetylgalactosamine-specific) C-type lectin (MGL). These lectins seem to mediate carbohydrate-specific endocytosis (6–11). Little is known regarding the expression of selectins, another subfamily of C-type lectins, in MØs.

B. Macrophage Galactose-type C-type Lectin (MGL), an Endocytosis Receptor and/or a Homing Receptor

MGL was previously cloned from rats, mice, and humans, and characterized. This lectin from mice was shown to have specific affinity for highly-branched N-linked carbohydrate chains with terminal β -galactosyl groups, and glycopeptides carrying three consecutive α -GalNAc-Ser/Thr (Tn-antigen) (12). A human MGL was also shown to have affinity for glycopeptides carrying three consecutive Tn-antigens (13). Surface plasmon resonance revealed that affinity of recombinant hMGL for immobilized glycopeptides increased in parallel with the number of GalNAc residues (14). Tn-antigen was known as a marker of malignant cells and MGL was shown to play a role as a recognition molecule on MØs for tumor cells (15–17). Immunohistochemical localization of mouse MGL (mMGL) with specific monoclonal antibodies revealed that this lectin has a strong association with MØs residing in connective tissue and those infiltrated into tumor tissues (18–20). Recently, mMGL1 was shown to be expressed on the cell surfaces of bone marrow-derived immature dendritic cells (21). hMGL is also shown to be expressed on monocyte-derived immature dendritic cells and monocyte-derived immature MØs in humans (22, 23). We have shown that mMGL1-positive cells migrate from dermis to regional lymph nodes during the sensitization phase of contact hypersensitivity (24). The migration was initiated by cytokine-mediated release of mMGL1-positive cells from the dermis (24–26). The cells homed to the boundary of the T-cell area in the regional lymph nodes, and the prevention of migration seemed to interfere with sensitization. This lectin has a role as a receptor for antigens and as an adhesion molecule for homing to suitable regions.

Because we wanted to make clarify the function of MGL in the physiological situation, we were able to produce the *Mgl1* deficient mice in collaboration with Dr. Stephen M. Hedrick in

る MØ に限局した細胞表面分子の数は少なく、マーカー分子として想定されている分子の生理学的、病態学的な機能について不明な点が残っている。

免疫システムにおいて、タンパク質糖鎖相互作用は、様々な役割を果たしている。数多くのレクチンが、構造的に類似した糖鎖認識ドメイン (CRD) を利用し、病原体の認識や細胞間相互作用に関与している。これら CRD のうち、もっとも多様性を有しているファミリーの一つとして、 Ca^{2+} 依存性であることから C タイプと呼ばれる CRD がある(4, 5)。この C タイプレクチンのうち、MMR などの I 型膜タンパクマルチレクチン、MGL などの II 型膜タンパクレクチンといった、いくつかのサブファミリーが、MØ に発現していることが知られている。これらレクチンは糖鎖特異的エンドサイトーシスに関与しているようである(6–11)。さらに、MØ に発現している他のサブファミリーであるセレクチンについては、分かっていることが少ない。

B. マクロファージガラクトースタイプCタイプレクチン(MGL)は、エンドサイトーシス受容体およびホーミング受容体である

MGL は、これまで、ラット、マウス、ヒトから遺伝子クローニングされ、解析されてきた。マウス MGL(mMGL) は、末端に β -ガラクトースを有する高分岐 N 結合型糖鎖や、3 個の連続した α -GalNAc-Ser/Thr (Tn 抗原) を有する糖ペプチドに特異的に親和性を有していることが示されている(12)。ヒト MGL (hMGL) についても、3 個の連続した Tn 抗原に親和性を有している(13)。その親和性は、表面プラズモン共鳴センサー (Biacore system) を用いた解析により、GalNAc の数に比例して増加することが明らかになった(14)。Tn 抗原は、腫瘍細胞のマーカーとして知られており、腫瘍細胞の認識に MGL が関与することが示されている(15–17)。

mMGL に対する特異的抗体を用いたマウス組織の免疫化学染色により、このレクチンは、全身の結合組織マクロファージ及び、腫瘍塊に浸潤しているマクロファージに強く発現していることが明らかになった(18–20)。最近、mMGL1 は、骨髄由来未成熟樹状細胞の細胞表面に発現していることが示された(21)。hMGL についても、単球由来未成熟樹状細胞および単球由来未成熟 MØ での発現が示された(22, 23)。接触皮膚炎モデルの抗原感作時に、mMGL1 陽性細胞が、真皮から所属リンパ節へ移動することが示され(24)、この真皮からの移動には、IL-1 α および IL-1 β などのサイトカインの関与がみられた(24–26)。これらの細胞は、所属リンパ節内の T 細胞領域の境界に現れることが観察され、この移動を阻害すると、感作成立に影響がみられた。このレクチンは抗原の受容体としてのみならず、適切な場所に移動するための接着分子としての役割も持っている。

このような、MGL の生理学的機能について、明らかにするために、*Mgl1* 遺伝子欠損マウスを、Hedrick 博士らとの共同実

UCSD. Whether mMGL1 is necessary for macrophage function, controlled thymic development, the loss of activated CD8 T cells, and the turnover of red blood cells was tested. Evidence indicates that mMGL1 may play a non-essential role in several of these macrophage functions (27).

C. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Mouse Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin, mMGL2, Which Has a Distinct Carbohydrate Specificity from mMGL1 (28)

During the step of producing deficient mice, we identified a novel lectin (mMGL2), which has distinct carbohydrate specificity from mMGL1. At first, this lectin was thought to have only one gene, but we found a highly cross-hybridized extra band which was seen in results of southern blot using probe of mMGL1 cDNA. So, we tried to search for homologous fragments from the EST database. A novel mouse macrophage galactose-type C-type lectin 2 (mMGL2) was identified by 5'- and 3'-RACE with cDNA fragments from database of expressed sequence tags.

The sequence of mMGL2 is highly homologous to the mMGL, which should now be called mMGL1. The open reading frame of mMGL2 contains a sequence corresponding to a type II transmembrane protein with 332 amino acids, having a single extracellular C-type lectin domain. The 3' untranslated region included long terminal repeats of mouse early transposon ETn. The *Mgl2* gene was cloned from a 129/SvJ mouse genomic library and sequenced. The gene spans 7,136 base pairs and consists of 10 exons, which is similar to the genomic organization of mMGL1. We identified the BAC clones, which coded the *Mgl2*, *Asgr1*, and *Asgr2* genes. The other clone encodes the *Mgl2* and *Mgl1* genes. Therefore, these four C-type lectin genes should be located within about 150 kb on mouse chromosome 11.

The RT-PCR analysis indicates that mMGL2 is expressed in cell lines and normal mouse tissues in a macrophage-restricted manner, also very similar to that of mMGL1. The mMgl2 mRNA was also detected in mMGL1-positive cells, which were sorted from thioglycollate-induced peritoneal cells with an mMGL1 specific mAb LOM-8.7. The mMGL1 null mice expressed epitopes reactive with mAb LOM-14, which is reactive with both mMGL1 and mMGL2, but not with mAb LOM-8.7. These two lectins may function cooperatively as recognition and endocytic molecules on macrophages and related cells.

The soluble recombinant proteins of mMGL2 exhibited carbohydrate specificity for α - or β -GalNAc-conjugated soluble polyacrylamides, whereas mMGL1 preferentially bound Le^x (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc)-conjugated soluble polyacrylamides in solid phase assays. These antigens were known as tumor-associated polysaccharide antigens or stage specific embryo antigens (SSEAs).

験で作製した。これまでに、M ϕ 機能と、胸腺での細胞分化、活性化 CD8+ T 細胞の除去、赤血球のターンオーバーにおける mMGL1 の重要性が解析されたが、mMGL1 は必要不可欠なものではなかった(27)。

C. mMGL1 とは異なる糖特異性を有する新規マウスマクロファージガラクトースタイプ C タイプレクチン、mMGL2 の分子クローニングと解析(28)

遺伝子欠損マウスの作製の過程で、私たちは、mMGL1 とは異なる糖特異性を有する新規レクチン (mMGL2) を同定した。始め、このレクチンは 1 つの遺伝子からなると考えられていたが、mMGL1 cDNA をプローブとして行ったサザンプロットの結果から、強くクロスハイブリダイズするエキストラバンドを見つけた。そこで、EST データベースから相同性を有する断片を探し、その断片の 5' 末端および 3' 末端 RACE にて全長の mMGL2 を同定した。

mMGL2 の配列は、mMGL1 と高い相同性を有しており、この遺伝子には、アミノ酸 332 残基からなり、1 つの膜貫通ドメインを持つ II 型膜タンパク質の open reading frame を有し、3' 末端の非翻訳領域には、マウスの early transposon の long terminal repeat 配列を含んでいた。*Mgl2* 遺伝子は、129/SvJ マウスゲノムライブラリーよりクローニングされ配列決定された。その結果、*Mgl2* 遺伝子は、全長 7136 bp であり、10 個のエクソンからなり、構造上 *Mgl1* 遺伝子と酷似であった。さらに、BAC クローンについても、*Mgl2* 遺伝子および、*Asgr1* 遺伝子と *Asgr2* 遺伝子を含むものと *Mgl1* 遺伝子と *Mgl2* 遺伝子を含むものが同定できた。ゆえに、これらの 4 つのレクチンは、マウス 11 番染色体上の約 150 kb 以内の領域に存在していることが分かった。

各種細胞株と正常マウス組織において、mMGL1 と類似したマクロファージでの mMGL2 の発現が、RT-PCR 解析により確認された。mMGL1 特異的抗体 LOM-8.7 の結合性によって、チオグリコレート誘導腹腔細胞より分画した mMGL1 陽性細胞に、mMGL2 mRNA が検出された。さらに、mMGL1 欠損マウスにおいて、LOM-8.7 抗体は結合しないが、mMGL1 と mMGL2 をともに認識する LOM-14 抗体のエピトープ (おそらく mMGL2) が発現していた。これら 2 つのレクチンは、マクロファージや関連細胞において協調的に機能していると考えられる。

固相化アッセイを用いた可溶性リコンビナントタンパク質の糖結合特異性の解析より、mMGL1 は、ルイス X 抗原 (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) が結合している可溶性ポリアクリルアミドに選択的に結合したが、mMGL2 は、 α -もしくは β -GalNAc の結合したポリアクリルアミドに対して特異性を有していた。これらの抗原は、腫瘍関連抗原およびステージ特異的胎児抗原 (SSEA) として知られているものである。

D. Conclusions

We found a novel MØ C-type Lectin, mMGL2, and characterized its genomic structure, expression patterns, and carbohydrate specificity. These lectins are highly homologous to each other except in their cytoplasmic domains and CRDs. mMGL2 has distinct carbohydrate specificity from mMGL1. The BAC clones, which coded the *Asgr1*, *Asgr2*, *Mgl2*, and *Mgl1* genes, were identified. Therefore, these four C-type lectin genes should be located within about 150 kb on mouse chromosome 11. These lectins seem to be expressed on the same cells at the single cell level and cooperatively functioned to recognize and uptake extracellular molecules. The *Mgl2*-deficient mice are being prepared. Involvement of coordinated functions of mMGL1 and –2 in such pathogenic processes should be the most important subject of future investigations.

These results indicated that there is another homologous gene in humans. We have tried a search in the genomic database, but we have not identified it. There is another possibility that the recognition systems in mouse and human are different.

E. おわりに

私たちは、新規マクロファージCタイプレクチン mMGL2を同定し、そのゲノム構造、発現パターン、糖特異性を解析した。これらのレクチンは、細胞内ドメインとCRDを除いたドメインにおいて、高い相同性を有していた。mMGL2の糖特異性はmMGL1とは異なっていた。*Asgr1* 遺伝子、*Asgr2* 遺伝子、*Mgl2* 遺伝子、*Mgl1* 遺伝子を含むBACクローンが同定され、これらの4つのレクチンは、マウス11番染色体上の約150 kb以内の領域に存在していることが分かった。これらのレクチンは、単一細胞レベルで同一の細胞に発現し、細胞外分子の認識と取り込みに、協調的に機能していると考えられる。*Mgl2* 遺伝子欠損マウスは現在作成中である。mMGL1とmMGL2の協調的機能の、病態形成の過程への関与を明らかにすることが、今後の研究の重大な課題である。

これらの結果は、ヒトにおける他の相同遺伝子の存在を示唆している。ヒトゲノムデータベースを検索したが、現在のところ、同定できていない。他の可能性として、ヒトとマウスでは認識システムが異なるのかもしれない。このことは、免疫システムの進化において興味深い問題点である。

References

- Lewis, C., and McGee, J. O. D. (1992) The macrophage: The Natural Immune System, IRL Press at Oxford University Press, Oxford
- Feizi, T. (2000) Immunol Rev **173**, 79–88
- McKnight, A. J., and Gordon, S. (1998) Adv. Immunol. **68**, 271–314
- Linehan, S. A., Martinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2000) Microbes Infect. **2**, 279–288
- Weis, W. I., Taylor, M. E., and Drickamer, K. (1998) Immunol. Rev. **163**, 19–34
- Stahl, P. D., and Ezekowitz, R. A. (1998) Curr. Opin. Immunol. **10**, 50–55
- Liu, Y., Chirino, A. J., Misulovin, Z., Leteux, C., Feizi, T., Nussenzweig, M. C., and Bjorkman, P. J. (2000) J. Exp. Med. **191**, 1105–1116
- Leteux, C., Chai, W., Loveless, R. W., Yuen, C. T., Uhlin-Hansen, L., Combarnous, Y., Jankovic, M., Maric, S. C., Misulovin, Z., Nussenzweig, M. C., and Ten, F. (2000) J. Exp. Med. **191**, 1117–1126
- Ozaki, K., Ii, M., Itoh, N., and Kawasaki, T. (1992) J Biol Chem **267**, 9229–9235
- Kawakami, K., Yamamoto, K., Toyoshima, S., Osawa, T., and Irimura, T. (1994) Jpn. J. Cancer Res. **85**, 744–749
- Valladeau, J., Duvert-Frances, V., Pin, J. J., Kleijmeer, M. J., Ait-Yahia, S., Ravel, O., Vincent, C., Vega, F., Jr., Helms, A., Gorman, D., Zurawski, S. M., Zurawski, G., Ford, J., and Saeland, S. (2001) J. Immunol. **167**, 5767–5774
- Yamamoto, K., Ishida, C., Shinohara, Y., Hasegawa, Y., Konami, Y., Osawa, T., and Irimura, T. (1994) Biochemistry **33**, 8159–8166
- Suzuki, N., Yamamoto, K., Toyoshima, S., Osawa, T., and Irimura, T. (1996) J. Immunol. **156**, 128–135
- Iida, S., Yamamoto, K., and Irimura, T. (1999) J. Biol. Chem. **274**, 10697–10705
- Sakamaki, T., Imai, Y., and Irimura, T. (1995) J. Leukoc. Biol. **57**, 407–414
- Ichii, S., Imai, Y., and Irimura, T. (1997) J. Leukoc. Biol. **62**, 761–770
- Ichii, S., Imai, Y., and Irimura, T. (2000) Cancer Immunol. Immunother. **49**, 1–9
- Imai, Y., Akimoto, Y., Mizuochi, S., Kimura, T., Hirano, H., and Irimura, T. (1995) Immunology **86**, 591–598
- Mizuochi, S., Akimoto, Y., Imai, Y., Hirano, H., and Irimura, T. (1997) Glycobiology **7**, 137–146
- Mizuochi, S., Akimoto, Y., Imai, Y., Hirano, H., and Irimura, T. (1998) Glycoconj. J. **15**, 397–404
- Denda-Nagai, K., Kubota, N., Tsuiji, M., Kamata, M., and Irimura, T. (2002) Glycobiology **12**, 443–450
- Higashi, N., Fujioka, K., Denda-Nagai, K., Hashimoto, S., Nagai, S., Sato, T., Fujita, Y., Morikawa, A., Tsuiji, M., Miyata-Takeuchi, M., Sano, Y., Suzuki, N., Yamamoto, K., Matsushima, K., and Irimura, T. (2002) J. Biol. Chem. **277**, 20686–20693
- Higashi, N., Morikawa, A., Fujioka, K., Fujita, Y., Sano, Y., Miyata-Takeuchi, M., Suzuki, N., and Irimura, T. (2002) Int. Immunol. **14**, 545–554
- Sato, K., Imai, Y., and Irimura, T. (1998) J Immunol. **161**, 6835–6844
- Chun, K., Imai, Y., Higashi, N., and Irimura, T. (2000) J. Leukocyte Biol. **68**, 471–478
- Chun, K., Imai, Y., Higashi, N., and Irimura, T. (2000) Int. Immunol. **12**, 1695–1703
- Ommi, T.M., Lin, M.-Y., Page, D.M., Reynolds, S. A., Katayama, C.D., Marth, J.D., Irimura, T., Varki, A., Varki, N., and Hedrick, S. M. (2002) Mol. Cell. Biol. **22**, 5173–5181
- Tsuiji, M., Fujimori, M., Ohashi, Y., Higashi, N., Onami, T. M., Hedrick, S. M., and Irimura, T. (2002) J. Biol. Chem. **277**, 28892–28901

Received on May 23, 2003, accepted on May 30, 2003

Profile of the Author

Makoto Tsuiji has been a postdoctoral associate (supervised by Professor Michel C. Nussenzweig) at the Laboratory of Molecular Immunology, The Rockefeller University since April, 2003. He graduated from The University of Tokyo in 1994, and received a Ph.D. in Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo in 2003. From 1998, he worked as an assistant professor (supervised by Professor Tatsuhiro Irimura), The University of Tokyo. His recent scientific interest is the biological roles of C-type lectins in the immune system.