



ワクチンの効果を高める免疫賦活剤に対する 免疫細胞受容体の構造解析

研究成果のポイント

- ・免疫賦活剤（アジュバント）である糖脂質の成分と結合するC型レクチン受容体 Mincle と MCL の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。
- ・Mincle と MCL では他の類似受容体では見られない疎水性領域が存在し、この領域が糖脂質との結合に重要である可能性が示唆された。
- ・変異体 Mincle を用いた実験によって、疎水性領域の重要性を確認した。
- ・今回得られた Mincle や MCL の立体構造情報を利用して、ワクチンの効果を高める高活性アジュバントの合理的設計が進むことが期待される。

研究成果の概要

Mincle (Macrophage inducible C-type lectin) や MCL (Macrophage C-type lectin) は免疫細胞の表面に発現するタンパク質です。結核菌ワクチンとして知られている BCG に含まれ、免疫活性化効果のある結核菌由来の糖脂質と Mincle や MCL は結合し、免疫活性を引き起こし、病原体排除に関与することが明らかになっています。Mincle や MCL は C 型 (カルウシウム依存型) レクチン受容体¹⁾ に分類されますが、他の C 型レクチン受容体はこのような免疫賦活剤の糖脂質に対して結合しないため、その分子メカニズムが明らかになっていませんでした。今回、我々は Mincle や MCL の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を決定し、そのメカニズムを明らかにすることを目指しました。

Mincle と MCL の単結晶を作製し、X 線構造解析を行いました。Mincle や MCL の構造と他の C 型レクチン受容体の構造とを重ね合わせた結果、糖認識部位の近傍に脂質を認識すると考えられる疎水性領域が Mincle と MCL に特異的に存在することがわかりました。これら疎水性領域が本当に脂質の認識に関わっているかを明らかにするために、この領域を他の C 型レクチン受容体のものに変えた変異体を作製しました。その変異体と糖脂質との結合を確認したところ、結合能が大きく下がっていることがわかりました。このことから、我々の考えた Mincle の糖脂質認識機構が正しいことが強く示唆されました。現在開発が進むワクチンにおいては、抗体産出能を上げるためにアジュバントが重要です。今回得られた Mincle や MCL の構造情報を利用してワクチンに必須な免疫賦活能の高い物質の設計が可能になることが期待されます。

なお、本研究成果は Proceedings of the National Academy of Sciences USA に掲載され、本研究は科学研究費補助金、戦略的創造研究推進事業 (科学技術振興機構) などの助成を受けて実施されました。

論文発表の概要

研究論文名 : Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL (糖脂質認識 C 型レクチン Mincle と MCL の構造解析)

著者・所属 : Atsushi Furukawa (古川敦^{1,2}), Jun Kamishikiryo (上敷領淳³), Daiki Mori (森大輝⁴), Kenji Toyonaga (豊永憲司⁴), Yuki Okabe (岡部由紀¹), Aya Toji (藤司亜也¹), Ryo Kanda (神田諒¹), Yasunobu Miyake (三宅靖延⁴), Toyoyuki Ose (尾瀬農之¹), Sho Yamasaki (山崎晶⁴), Katsumi Maenaka (前仲勝実^{1,2})

¹ 北海道大学大学院薬学研究院, ² 科学技術振興機構, ³ 福山大学薬学部, ⁴ 九州大学生体防御医学研究所

公表雑誌 : Proceedings of the National Academy of Sciences USA (米科学アカデミー紀要)

公表日 : 日本時間 (現地時間) 日本時間 2013 年 10 月 8 日 (火) 午前 4 時 (米国東部時間 10 月 7 日午後 3 時)

研究成果の概要

(背景)

免疫細胞に発現する C 型レクチン受容体はパターン認識分子²⁾ のうちの一つで、主に病原体表面に特異的に存在する糖や糖を含む物質 (糖脂質など) を認識します。その中で Mincle (Macrophage inducible C-type lectin) や MCL (Macrophage C-type lectin) は結核菌の表面に存在する糖脂質 (TDM, trehalose dimycolate, 図 1) に結合し、免疫細胞を活性化することが近年わかってきました。TDM は糖と脂質部分からなる分子ですが、これまでの研究によって糖と脂質部分両方が Mincle との認識に必要であることが示されています。TDM は別名コードファクターとも呼ばれ、ワクチンに免疫賦活剤として含まれる重要な分子です。Mincle や MCL は C 型レクチン受容体に分類されますが、これまで知られている他の C 型レクチンで TDM に結合するものはなく、なぜ Mincle や MCL が TDM を認識するかが不明でした。今回は、X 線構造解析を行い、Mincle や MCL の構造を明らかにすることでその特異性を明らかにすることを目指しました。

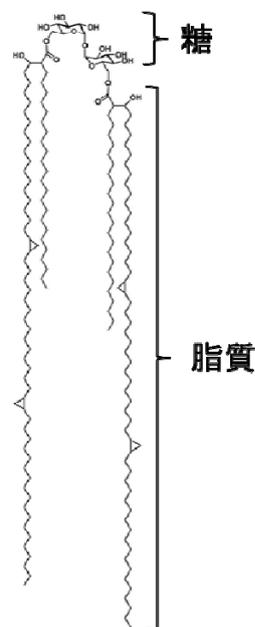


図1 TDMの構造式

(研究手法)

Mincle と MCL のタンパク質単結晶を作製しました。X 線結晶構造解析を行い、Mincle と MCL のタンパク質の立体構造を決定しました。その結果をもとに TDM が Mincle や MCL とどのように結合するかについて結合モデルを構築しました。その結果に基づき、Mincle の糖脂質認識に関わると考えられるアミノ酸残基に変異を導入したタンパク質を発現する細胞を作製し、TDM との結合をレポーターアッセイ³⁾系で評価しました。

(研究成果)

まず、Mincle と MCL の単結晶を作製しました。高エネルギー加速器研究機構や SPring-8 (大型放射光施設) でこの単結晶に X 線を照射し、構造解析を行いました。その結果、Mincle と MCL の全体構造は他の C 型レクチン (DC-SIGNR) に似ていることがわかりましたが、糖脂質認識部位に違いが見られました。Mincle や MCL がどのように糖脂質と結合するかを推測するために、モデリングを行いました。モデリングは Mincle や MCL と立体構造が近い DC-SIGNR のマンノース結合複合体を利用しました。その結果、TDM の脂質部位が存在しうる方向に Mincle や MCL で疎水性アミノ酸残基 (=脂質と親和性が

高い) が他の C 型レクチン受容体に比べて多く存在していることがわかりました。

この結果をもとに、疎水性残基や糖結合部分に近い重要と考えられる残基に変異を持つ Mincle を細胞で発現させ、レポーターアッセイ系で評価を行いました。その結果、変異導入した Mincle ではレポーター活性の減少を観察したことから、我々の予測の正しさの確認をしました。

今回の結果から、Mincle は他の免疫系受容体 (CD1- β 2m や TLR4-MD2 複合体) とは異なった方法で脂質認識をしていることが明らかになりました (図 2)。

(今後への期待)

上記に述べたとおり、Mincle や MCL は BCG に含まれる免疫賦活作用物質 (アジュバント) である TDM と結合するタンパク質です。ただ、TDM は局所炎症性が高いため、ワクチン投与後も炎症が続くという問題があります。現在、各種ワクチンに必要な成分である TDM に代わるアジュバント候補が実用化に向けて精力的に研究が進められ、一部は臨床段階にあります。いずれもこれまで知られている化合物の類似体です。今回、アジュバントを認識する重要な受容体の立体構造が明らかになったことにより、この立体構造情報を用いた *in silico*⁴⁾ 解析などを含む合理的設計に基づき、より強力な免疫活性化能をもつアジュバントの開発が期待されます。さらに Mincle は免疫制御に重要な Th17 細胞⁵⁾ の活性化に関与していることが知られており、より効果的な免疫療法開発につながる可能性があります。

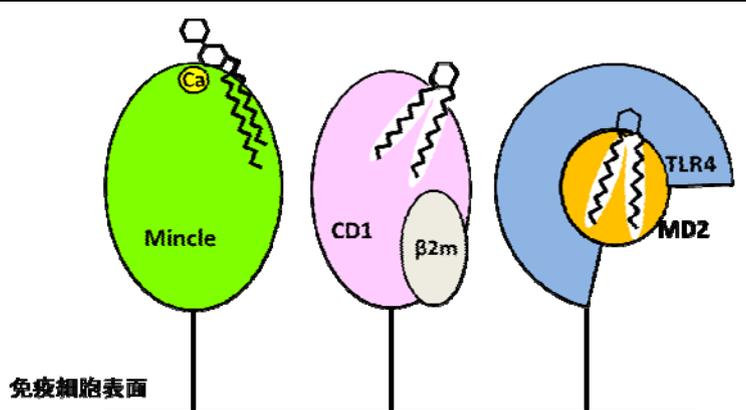


図2 MincleではCD1- β 2mやTLR4-MD2複合体で埋められる疎水性ポケット(溝)が埋められない。その代わりに表面の疎水性残基で脂質質の脂質部分で結合していると考えられる。

お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 教授 前仲 勝実 (まえなか かつみ)
TEL: 011-706-3970 FAX: 011-706-4986 E-mail: maenaka@pharm.hokudai.ac.jp
ホームページ: <http://convallaria.pharm.hokudai.ac.jp/bunshi/index.html>

用語解説

1) C 型レクチン受容体：

カルシウム依存的に糖に結合するタンパク質群。

2) パターン認識分子：

免疫系において大きく自然免疫と獲得免疫に大別されるが、元来ヒトなどの動物が病原体 (ウイルス、細菌、寄生虫など) を認識するために発達させた自然免疫のシステム。病原体が持つ共通部分 (=パターン) を認識して免疫を活性化する作用を持つ。

3) レポーターアッセイ：

ある刺激によって、その刺激がタンパク質の発現や表現型のアウトプットとして観察するシステム。

4) in silico :

コンピュータを用いた実験のこと。

5) Th17 細胞

ヘルパーT細胞(Th細胞)はこれまでに細胞性免疫を活性化するTh1細胞, 抗体産出細胞のB細胞を活性化するTh2細胞, 免疫細胞の過剰な活性化を抑えるTreg(抑制性T細胞), そしてTh17細胞が存在することが知られている。Th17の役割は不明な点も多いが, これまでの研究から, 好中球や上皮細胞の活性化をする役割があることが分かっている。好中球や上皮細胞の活性化によりTh17細胞が強く働きすぎると慢性炎症(リウマチやアトピー性皮膚炎など)を引き起こすが, 同時に皮膚など細胞外で増殖する細菌や真菌の排除に重要であることが分かっている。さらにTh17細胞として重要なこととして, ガンの排除に重要であることが最近分かってきている。