

結核菌糖脂質の免疫受容体 Mincle による認識機構の解明

～ワクチン開発に重要なアジュバントの効率的な開発への貢献に期待～

ポイント

- ・ NMR 法を用いて、Mincle の糖脂質認識機構を解明。
- ・ Mincle の糖脂質認識部位は揺らいだ構造を持っていることが判明。
- ・ 効果的な免疫賦活剤（アジュバント）の開発に期待。

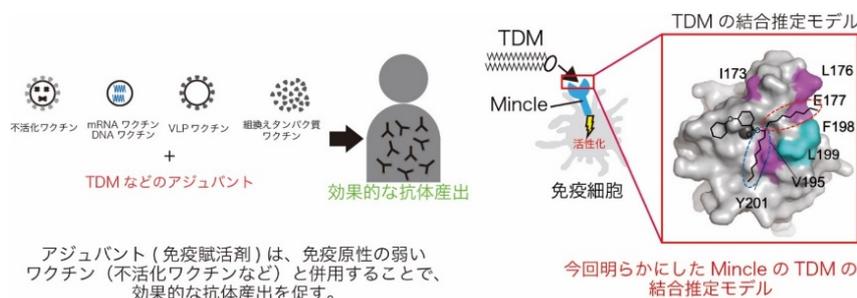
概要

北海道大学大学院薬学研究院の前仲勝実教授、古川 敦助教（現・金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授）らの研究グループは、北海道科学大学薬学部の齊藤貴士准教授、大阪大学微生物病研究所の山崎 晶教授らと共同で、免疫賦活剤（アジュバント）となる結核菌の表面に存在するトレハロースジマイコレート（TDM）など幅広い糖脂質を認識し、免疫の活性化に関わる Mincle の糖脂質認識機構を明らかにしました。

Mincle（Macrophage inducible C-type lectin）は免疫細胞の表面に発現するタンパク質です。結核ワクチンとして知られる BCG ワクチンに含まれ、免疫活性化効果のある結核菌由来の糖脂質と Mincle が結合して免疫活性を引き起こし、病原体を排除します。研究グループはこれまでに X 線を用いて Mincle の結晶構造を解明し、糖脂質認識機構を推定していましたが、糖脂質が結合した Mincle の構造や、Mincle が糖脂質を認識する機序は不明でした。そこで研究グループは、Nuclear Magnetic Resonance（NMR）法を用いて、Mincle の糖脂質認識機構を明らかにすることを目指しました。

NMR 法によって Mincle タンパク質の立体構造を解析した結果、溶液中の Mincle は、揺らぎが大きい構造を取っていることが解明されました。Mincle の糖脂質の結合部位を明らかにするために、水溶性の高い 1 本鎖の脂質を持つ糖脂質を滴下し、Mincle の化学シフト変化を観測しました。その結果、糖脂質の結合により、糖の結合部位を中心として幅広い範囲のアミノ酸で化学シフト変化を示すことが分かりました。糖部分のみの添加では、糖脂質ほど広範囲のアミノ酸での化学シフト変化は起こらなかったことから、脂質の結合部位が広範囲に渡っていることを示唆しました。Mincle を介した細胞の活性化能が強い 2 本鎖の脂質でも同様の結果が ELISA 法を用いて検証しました。その結果、2 本鎖の糖脂質の結合では、脂質部分の結合 1 本鎖で結合に関与が示唆されたアミノ酸に加え、他のアミノ酸が関与していることが示唆されました。この結果は、2 本鎖の脂質部分に結合した部位に化合物が結合するように設計することが、効果的なアジュバントのために重要であることを示唆します。

なお、本研究成果は、2023 年 6 月 21 日（水）公開の Structure 誌に掲載されました。



【背景】

近年、新型コロナウイルスをはじめとした感染症やがん領域などでワクチン開発が精力的に行われています。そのワクチンの成分の中に、抗体の産生能力増強を目的として、免疫賦活剤（アジュバント）を含むものが多くあります。アジュバントの中でも、結核ワクチンである BCG ワクチンに含まれる、糖脂質トレハロースジマイコレート（TDM）は強力なアジュバント作用を持つことが知られています。

これまでの研究で、免疫細胞に発現する Mincle（Macrophage inducible C-type lectin）と呼ばれる受容体分子が TDM に結合することで、免疫細胞を活性化することが明らかになっています。研究グループはこれまでに X 線を用いて Mincle の結晶構造を明らかにし、糖脂質認識機構を推定していました。しかし、糖脂質が結合した Mincle の構造はよく分かっておらず、どのように糖脂質を認識しているかは不明でした。国内外の多くの研究グループが Mincle に結合し、免疫活性化を引き起こす天然物、さらには人工合成した分子を発表していますが、その認識機構は不明なものが多く、合理的設計に基づく効率的な開発には、Mincle の糖脂質認識機構の解明が不可欠でした。

【研究手法】

研究グループは、Nuclear Magnetic Resonance（NMR）法を用いて、Mincle の糖脂質認識機構の解明を行いました。

まず、同位体標識した Mincle タンパク質を調製し、NMR 法で構造を解析しました。次に水溶性の高い糖脂質を用いた滴下し、Mincle タンパク質の NMR スペクトルの化学シフト変化を観測することで糖脂質の認識に関わるアミノ酸を特定しました。また、Enzyme-linked Immunosolvent Assay（ELISA）法やレポーター細胞を用いて、アジュバント活性の強い TDM の認識機構についても解明しました。

【研究成果】

Mincle の NMR スペクトルを測定し、得られたシグナルについて、アミノ酸の帰属を行いました。その結果、溶液中の NMR 構造は、以前研究グループが明らかにした X 線構造と同じようなタンパク質構造を取っていることが分かりました。しかし、結晶構造では分からなかった、糖脂質の結合に関わると考えられる部位周辺のアミノ酸には揺らぎが多いことも判明しました（図 1）。タンパク質構造の揺らぎが少ない場合、タンパク質は特定の分子に素早く強固に結合します。しかし、Mincle タンパク質はこれまでに幅広く糖脂質などの様々な分子に結合することが知られていました。今回明らかになった Mincle タンパク質の揺らぎが多い構造は、構造の異なる様々な分子の結合に重要であると考えられます。

Mincle タンパク質に水溶性の高い 1 本鎖の脂質を持つ糖脂質を加え、NMR を測定することによって、結合に関わる Mincle のアミノ酸の同定を試みました。通常の緩衝液中で Mincle タンパク質へ糖脂質の添加を行いました。その結果、糖脂質の添加量が増えるごとに Mincle の NMR シグナルの消失が見られ、糖脂質認識に関わるアミノ酸の同定が困難でした。そのため、研究グループは、Non-Detergent SulfoBetaine (NDSB)-195 と呼ばれるタンパク質安定剤の存在下で、糖脂質の滴定実験を行いました。その結果、NMR シグナルの消失は起こらず、結合に関わると考えられるアミノ酸の化学シフト変化を観測することができ、糖脂質認識に関わるアミノ酸を特定することに成功しました。

糖脂質の結合により、糖の結合部位近傍の L199 残基や Y201 残基を中心に幅広い範囲のアミノ酸で化学シフト変化を示すことが分かりました（図 2 左）。糖部分のみの添加では、糖脂質ほど広範囲のアミノ酸での化学シフト変化は起こらなかったため、脂質の結合部位が広範に渡ることが解明されました。

また、Mincle を介した細胞の活性化能が強い 2 本鎖の脂質でも同様の結果かどうか、ELISA 法やレポーター細胞を用いて検証しました。その結果、2 本鎖脂質の糖脂質の結合には、NMR によって脂質の結合

が示唆された青色の点線で示したY201を含むサイトに加え、NMRで揺らぎの大きさのため、帰属できなかった赤色の点線で示したL176やE177を含むサイトが重要であることが示されました（図2右）。

【今後への期待】

本研究の結果は、L176やE177を含むサイトに化合物が結合するように設計することが、効果的なアジュバント開発のために重要であることを表しています。今後、本研究の成果が、より効果的なアジュバントの開発に寄与することが期待されます。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科学研究費（課題番号 JP18K14633 及び 20H05873）、秋山財団、日本アレルギー協会、頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラム（S2701）、日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（20am0101093 及び 22ama121037）及びワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業（233fa627005）、北海道大学グローバルファシリティーセンター（GFC）Pharma Science Open Unit（PSOU）のサポートにより研究を行いました。さらに、大阪大学蛋白質研究所超高磁場 NMR 共同利用研究（採択課題番号 NMRCR-20-02）のサポートにより研究を行いました。

また、本研究は、大阪大学蛋白質研究所の藤原敏道教授、池上貴久准教授（現・横浜市立大学）、児嶋長次郎准教授（現・横浜国立大学）、宮ノ入洋平准教授、杉木俊彦特任助教（現・北里大学）らの協力により NMR の測定を行いました。

論文情報

論文名	Structural basis for glycolipid recognition of the C-type lectin Mincle（C型レクチン受容体 Mincle の糖脂質認識の構造学的基盤）
著者名	古川 敦 ^{1,2} 、須知佑介 ¹ 、Jiaqi Wang ¹ 、Pablo Adrian Guillen Poza ¹ 、石塚茂宜 ^{3,4} 、神子島未鈴 ¹ 、池野里紗 ¹ 、久米田博之 ⁵ 、山崎 晶 ^{3,4} 、松丸尊紀 ^{6,7} 、齊藤貴士 ^{6,8} 、前仲勝実 ^{1,6,9,10} （ ¹ 北海道大学大学院薬学研究院生体分子機能学研究室、 ² 金沢大学医薬保健研究域薬学系衛生化学研究室、 ³ 大阪大学微生物病研究所、 ⁴ 大阪大学免疫学フロンティア研究センター、 ⁵ 北海道大学大学院先端生命科学研究院、 ⁶ 北海道大学大学院薬学研究院創薬科学研究教育センター、 ⁷ 慶應義塾大学理工学部化学科、 ⁸ 北海道薬科大学、 ⁹ 北海道大学バイオサーフィス創薬グローバルステーション、 ¹⁰ 北海道大学ワクチン研究開発拠点）
雑誌名	Structure（一般科学誌）
DOI	10.1016/j.str.2023.05.018
公表日	2023年6月21日（水）（オンライン公開）

お問い合わせ先

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）

T E L 011-706-3970 F A X 011-706-4986 メール maenaka@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <http://convallaria.pharm.hokudai.ac.jp/bunshi>

配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

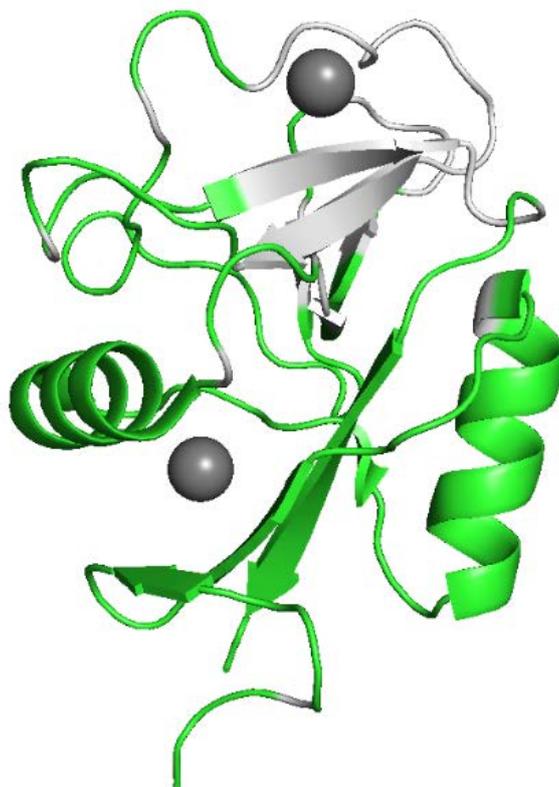
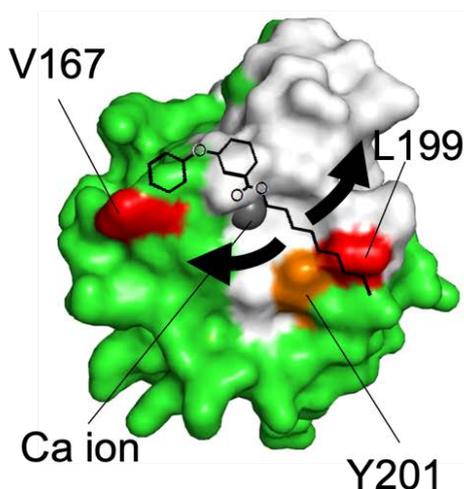


図 1. NMR により Mincle のシグナルが観測されたアミノ酸 (緑) と揺らぎなどにより観測されなかったアミノ酸 (灰色)。黒灰色の球はカルシウムイオン。

1 本鎖の脂質を持つ糖脂質の結合推定モデル



TDMの結合推定モデル

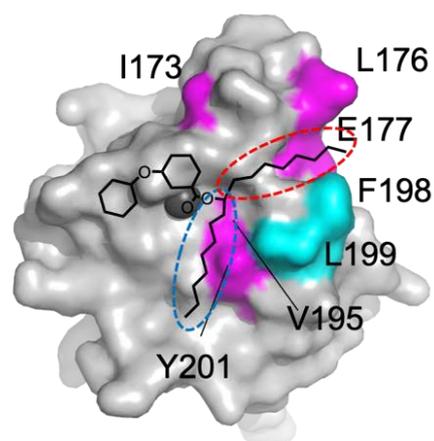


図 2. (左) 1 本鎖の脂質をもつ糖脂質の推定認識機構 (帰属ができたアミノ酸のうち、結合により化学シフトの大きかった順に赤、オレンジに色付けしている。緑色と灰色については、図 1 と同様。)、(右) 2 本鎖の脂質をもつ糖脂質の推定認識機構 (結合に直接関わっているアミノ酸をマゼンダ、結合に関与していないことが示唆されたアミノ酸を水色で示した)。