

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14633

研究課題名(和文) ナノディスクを用いた免疫受容体Mincleのコレステロール認識機構の解明

研究課題名(英文) Cholesterol Recognition mechanism of Mincle using nanodisc

研究代表者

古川 敦 (Furukawa, Atsushi)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：30727699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞などの抗原提示細胞に発現するMincleは結核菌の表面に特異的に存在するトレハロースジマイコレート(TDM)を認識するほか、コレステロール結晶などを認識し、免疫細胞を活性化する免疫受容体である。我々は、X線構造解析を行い、MincleのTDMの認識機構の解明を進めてきた。しかし、糖脂質やコレステロールについては水への溶解性が低いために解析が進んでいなかった。そのため、糖脂質やコレステロールを含む脂質二重膜を模倣した"ナノディスク"を作製し、結合実験を行なった。その結果、コレステロールを含む糖脂質では結合がみられなかったのに対し、糖脂質を含むものではMincleへの結合が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫受容体のMincleは強力な免疫活性化物質である結核菌表面に存在するTDMと呼ばれる分子と結合する。我々はX線構造解析によりMincleの立体構造を明らかにしたが、TDMの難水溶性のためにどのようにMincleがTDMを認識しているのか不明な点が多かった。今回、我々は実際のTDMが結核菌の表面にある状態を模した脂質二重膜にTDM類似体を埋め込んで、認識機構の解明を進めた。その結果、TDM類似体を含まない脂質二重膜はMincleに結合しなかった一方で、TDM類似体を含むものは結合することがわかった。今後、Mincleの認識機構を詳細に明らかにすることで、効果的な免疫活性化物質の探索を目指す。

研究成果の概要(英文)：Mincle is an immune receptor that is expressed in antigen presenting cells, such as dendritic cells, and recognizes trehalose dimycolate (TDM), which is specifically present on the surface of Mycobacterium tuberculosis and cholesterol crystals, and activates immune cells. We previously performed X-ray structural analysis of Mincle to elucidate the recognition mechanism of TDM. However, analysis of glycolipids and cholesterol has not progressed due to their low solubility in water. Therefore, we prepared "nanodiscs" that imitated lipid bilayer membranes containing glycolipids and cholesterol, and conducted binding experiments. As a result, no binding was found in glycolipids containing cholesterol, whereas binding to Mincle was found in those containing glycolipids.

研究分野：分子免疫学

キーワード：自然免疫受容体 免疫活性化 糖脂質 コレステロール ナノディスク NMR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Macrophage inducible C-type lectin (Mincle)は樹状細胞など抗原提示に発現している。これまでに Mincle は結核菌表面に存在し、強いアジュバント活性を示す糖脂質 TDM を認識することが明らかになっている。それに加え、近年、マラセチア菌の糖脂質、さらにはコレステロールやコレステロール硫酸など自己脂質を含めて様々な(糖)脂質にも結合することが明らかになっている(図1)¹⁻⁵。我々はヒト Mincle の細胞外ドメインの立体構造を X 線構造解析により決定することに成功し、変異実験により糖脂質認識に関わるアミノ酸残基を見出した⁶。また、同時期に Drickamer らもウシ Mincle の構造決定に成功しており、糖脂質の結合モデルを作成している^{7,8}。しかし、Mincle の糖脂質、特に脂質部分の認識機構は明らかになっていない。また、コレステロールなど自己脂質にも結合することが明らかにされたがその詳細も明らかになっていない。

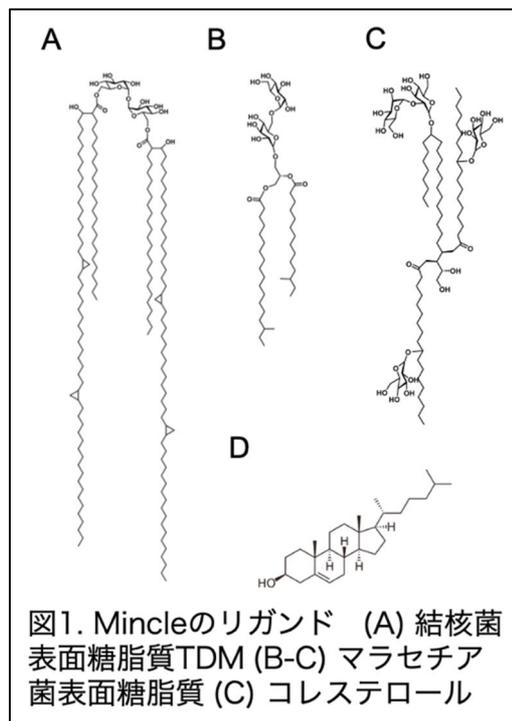


図1. Mincleのリガンド (A) 結核菌表面糖脂質TDM (B-C) マラセチア菌表面糖脂質 (C) コレステロール

2. 研究の目的

上記に述べたように Mincle の糖脂質を含めたリガンド認識機構は不明な点が多い。認識機構の詳細を理解することはワクチンの重要な成分である効果的なアジュバント開発に重要である。しかし、糖脂質の難水溶性のために詳細な生化学的・構造生物学的解析が進んでいない。本研究では、糖脂質やコレステロール等の難水溶性化合物をナノディスクに埋め込むことにより、生理的条件に近い状態脂質二重膜を調製する(図2)。そのナノディスクを用いて、Mincle との相互作用解析を行うことで詳細な認識機構の解明を進めることを目的とした。

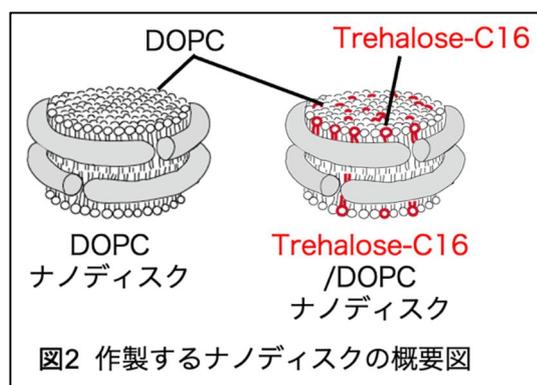


図2 作製するナノディスクの概要図

3. 研究の方法

Mincle タンパク質の調製

Mincle タンパク質は既報の方法を用いて行なった⁶。大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を用いて、Mincle の細胞外ドメインの糖脂質結合ドメインを発現コードする遺伝子を持つプラスミドでトランスフォーメーションし、IPTG による発現誘導を行うことで、封入体に目的タンパク質を得た。封入体を精製後、6M グアニジンを含む緩衝液で封入体画分を可溶化した。可溶化した変性タンパク質は希釈法による巻き戻しを行い、その後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製度は SDS-PAGE を行い、CBB 染色で検出することにより確認した。一方で、NMR 法により相互作用の実験の滴定実験に用いる ¹H、¹⁵N を含む Mincle タンパク質の調製は、大腸菌培地 CHL 培地を

用いて発現を行った。NMRの測定サンプルは、10% D₂O含有 10 mM HEPES (pH7.0), 20 mM CaCl₂ 溶液に調製した。

糖脂質やコレステロールを含むナノディスクの調製

TDMの類似体で脂質鎖の短い Trehalose-C16 と Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)を少量のメタノールを含むクロロホルムに溶解した。エバポレーターを用いて、Trehalose-C16/DOPC からなる脂質ラメラを作製した。作製した脂質ラメラを 20 mM tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl 溶液に懸濁し、Trehalose-C16/DOPC リポソームを得た。このリポソームと Membrane Scaffold Protein (MSP)を混合し、Bio beads を用いて過剰な脂質を除くことにより Trehalose-C16 を含むナノディスク(Trehalose-C16/DOPC ナノディスク)を作製した。ナノディスクはゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。SDS-PAGE さらには TLC を用いて、Trehalose-C16/DOPC ナノディスクの精製を確認した。また Trehalose-C16 を含まないコントロールとなるナノディスク (DOPC ナノディスク)やコレステロールを含むナノディスク(コレステロール/DOPC ナノディスク)も同様の方法で調製した。

結合実験

結合実験は表面プラズモン共鳴法および NMR を用いて行なった。

表面プラズモン共鳴 (SPR) 実験 SPR 実験は北海道大学大学院薬学研究院が所有する BiacoreT200 もしくは Biacore3000 を用いて実験を行なった。

上記で調製した Mincle を 10 mM acetate (pH 4.0), 5 mM CaCl₂ にバッファーを交換後、アミンカップリング法を用いて CM5 センサーチップに固定化した。調製した Trehalose-C16/DOPC ナノディスクおよび DOPC ナノディスクを Mincle タンパク質に 10 μl/min の流速で 1 分間インジェクションを行った。

また、上記の SPR 実験では、ナノディスクに Trehalose-C16 が複数存在する場合、多価効果によって、結合が見かけ上強くなることが考えられる。それを避けるために、C16/DOPC ナノディスクおよび DOPC ナノディスクを 10 mM acetate (pH 5.0) にバッファーを交換後、アミンカップリング法を用いて CM5 センサーチップに固定化した。アナライトとして、Mincle タンパク質に 10 μl/min の流速で 1 分間インジェクションを行った。

NMR 滴定実験 NMR 滴定は大阪大学蛋白質研究所が保有する 950 もしくは 600 MHz NMR を用いて行なった。Mincle タンパク質の ¹H-¹⁵N HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) の各シグナルのアミノ酸帰属は、HNCO、HN(CA)CO、CBCA(CO)NH および HNCACB の 3 次元 NMR スペクトル測定を用いて行った (現在、論文投稿中)。約 30 μM に調製した Mincle に約 10 倍量のコレステロール/DOPC ナノディスクを 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3 等量になるように滴定した。滴定後に ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル測定を行い、滴定に伴う化学シフト変化を観測した。

4. 研究成果

(1) 糖脂質やコレステロールを含むナノディスクの調製

認識機構の解明に必要な Trehalose-C16/DOPC ナノディスクの調製を行ない、SDS-PAGE および TLC を用いて純度の確認を行なった。その結果、他のナノディスクで報告されているような溶出位置にナノディスクは溶出された。この rehalose-C16/DOPC ナノディスクと推定される画分は MSP タンパク質および Trehalose-C16/DOPC が含まれていることを SDS-PAGE および TLC で確認

した。また、DOPC ナノディスクやコレステロール/DOPC ナノディスクも上記と同様の方法で精製を確認した。

(2) 結合実験

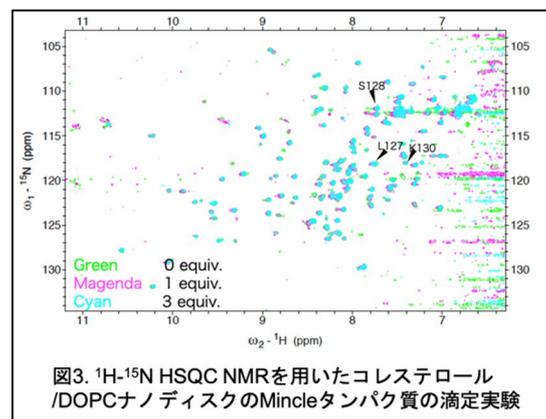
上記で調製したナノディスクおよび Mincle タンパク質を用いて、結合実験を行った。

SPR 実験

最初に Mincle タンパク質を固定化し、Trehalose-C16/DOPC ナノディスクおよび DOPC ナノディスクをインジェクトした。その結果、Trehalose-C16/DOPC ナノディスクをインジェクトした際には強い結合が見られたのに対し、DOPC ナノディスクでは結合が見られなかった。一方で、ナノディスクを固定化し、Mincle タンパク質をアナライトとして流した場合には、比較的弱い相互作用が見られた。このことからナノディスクをアナライトとしてインジェクションした時に見られる強い相互作用は、ナノディスクに固定化された Trehalose-C16 の多価効果であることが示唆された。

NMR 実験

図 3 に Mincle タンパク質への 1 および 3 等量のコレステロール/DOPC ナノディスク滴下後の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル測定を示した。いくつかの残基で化学シフトが見られた。しかし、これらの残基は pH 変化などの水溶液の環境変化にตอบสนองを示すアミノ酸であることがわかり、特異的にコレステロールを認識している可能性が低いことがわかった。



今後は、NMR を用いた Trehalose-C16/DOPC ナノディスクの滴下実験を行い、Mincle の糖脂質認識機構の詳細を明らかにする。さらには、今回得られたナノディスクの免疫活性化能を評価し、アジュバントとしての利用も検討を進める。コレステロールを含むナノディスクについては、SPR を用いた結合実験を行うとともに、コレステロール量を増やす等の検討を行い Mincle が強く結合できるナノディスクの作製を目指し、相互作用の解明を進める。

参考文献

- 1 Ishikawa, E. *et al.* Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* **206**, 2879-2888, doi:10.1084/jem.20091750 (2009).
- 2 Yamasaki, S. *et al.* C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1897-1902, doi:10.1073/pnas.0805177106 (2009).
- 3 Ishikawa, T. *et al.* Identification of distinct ligands for the C-type lectin receptors Mincle and Dectin-2 in the pathogenic fungus *Malassezia*. *Cell Host Microbe* **13**, 477-488, doi:10.1016/j.chom.2013.03.008 (2013).

- 4 Hattori, Y. *et al.* Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, Mincle. *J Biol Chem* **289**, 15405-15412, doi:10.1074/jbc.M114.566489 (2014).
- 5 Kiyotake, R. *et al.* Human Mincle Binds to Cholesterol Crystals and Triggers Innate Immune Responses. *J Biol Chem* **290**, 25322-25332, doi:10.1074/jbc.M115.645234 (2015).
- 6 Furukawa, A. *et al.* Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 17438-17443, doi:10.1073/pnas.1312649110 (2013).
- 7 Feinberg, H. *et al.* Mechanism for recognition of an unusual mycobacterial glycolipid by the macrophage receptor mincle. *J Biol Chem* **288**, 28457-28465, doi:10.1074/jbc.M113.497149 (2013).
- 8 Jégouzo, S. A. *et al.* Defining the conformation of human mincle that interacts with mycobacterial trehalose dimycolate. *Glycobiology* **24**, 1291-1300, doi:10.1093/glycob/cwu072 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furukawa Atsushi, Meguro Manami, Yamazaki Rika, Watanabe Hiroshi, Takahashi Ami, Kuroki Kimiko, Maenaka Katsumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Evaluation of the Reactivity and Receptor Competition of HLA-G Isoforms toward Available Antibodies: Implications of Structural Characteristics of HLA-G Isoforms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5947 ~ 5947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20235947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsumaru Takanori, Ikeno Risa, Shuchi Yusuke, Iwamatsu Toshiki, Tadokoro Takashi, Yamasaki Sho, Fujimoto Yukari, Furukawa Atsushi, Maenaka Katsumi	4. 巻 55
2. 論文標題 Synthesis of glycerolipids containing simple linear acyl chains or aromatic rings and evaluation of their Mincle signaling activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 711 ~ 714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8CC07322H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Rika, Furukawa Atsushi, Hirayasu Kouyuki, Yumoto Kohei, Fukuhara Hideo, Arase Hisashi, Maenaka Katsumi	4. 巻 295
2. 論文標題 Molecular mechanism of the recognition of bacterially cleaved immunoglobulin by the immune regulatory receptor LILRA2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9531 ~ 9541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Doi Ryohei, Shimizu Koji, Ikemoto Yuma, Uchiyama Masashi, Koshiba Mikiko, Furukawa Atsushi, Maenaka Katsumi, Watanabe Satoshi, Sato Yoshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Nickel Catalyzed Acyl Group Transfer of o-Alkynylphenol Esters Accompanied by C-O Bond Fission for Synthesis of Benzo[b]furan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemCatChem	6. 最初と最後の頁 2086 ~ 2092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cctc.202001949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川敦、山崎晶、前仲勝実
2. 発表標題 NMR analysis of Mincle with glycolipid reveals the detail molecular recognition mechanism
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rika Yamazaki, Atsushi Furukawa, Kouyuki Hirayasu, Hisashi Arase and Katsumi Maenaka
2. 発表標題 Bacterially cleaved immunoglobulin Recognition mechanism by the immune activation receptor LILRA2
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川敦、前仲勝実
2. 発表標題 免疫受容体PILR の糖ペプチド認識機構解明とその創薬への応用
3. 学会等名 第51回ペプチド夏の勉強会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川敦
2. 発表標題 免疫受容体のリガンド認識機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会 東北支部 第85回例会・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川敦、須知佑介、久米田博之、松丸尊紀、齊藤貴士、前仲勝実
2. 発表標題 NMRを用いた自然免疫受容体Mincleによる糖脂質認識機構の解析
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川敦
2. 発表標題 免疫細胞表面受容体のリガンド認識機構
3. 学会等名 第55回 日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎莉佳、古川敦、平安恒幸、黒木喜美子、荒瀬尚、前仲勝実
2. 発表標題 細菌によって分解された抗体と受容体 LILRA2 との相互作用機構の物理化学的解析
3. 学会等名 第55回 日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川敦、須知佑介、久米田博之、松丸尊紀、齊藤貴士、前仲勝実
2. 発表標題 NMRによる自然免疫受容体Mincleの糖脂質認識機構の解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎莉佳、古川敦、平安恒幸、黒木喜美子、荒瀬尚、前仲勝実
2. 発表標題 細菌によって分解された抗体と免疫活性化受容体 LILRA2 との特異的相互作用機構の解明
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川敦、山崎莉佳、平安恒幸、湯本航平、福原秀雄、荒瀬尚、前仲勝実
2. 発表標題 Molecular mechanism of the recognition of bacterially cleaved immunoglobulin by the immune regulatory receptor LILRA2
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王嘉琪、古川敦、山崎莉佳、平安恒幸、門松毅、尾池雄一、荒瀬尚、前仲勝実
2. 発表標題 免疫活性化受容体LILRA2のANGPTL6認識機構の解明
3. 学会等名 第141回日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------