

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05733

研究課題名（和文）自然免疫受容体Mincleのリガンド合成を基盤とした分子認識および細胞内挙動解析

研究課題名（英文）Synthesis and immunomodulatory functions of the ligands of C-type lectin receptor Mincle

研究代表者

松丸 尊紀（Matsumaru, Takanori）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・助教

研究者番号：90636549

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては、自然免疫受容体Mincleの複合脂質リガンドの合成法の確立および関連分子の合成を行うとともに、得られた化合物に対する生物活性評価より、特にリガンド脂質部位とMincleの構造活性相関を明らかにすることを目指した。また確立したリガンド合成手法を応用した蛍光標識プローブの創製と生細胞イメージング解析によって、Mincleおよびリガンドの細胞内挙動の解析を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Mincleの複合脂質リガンドの合成法を確立し、天然型構造および誘導体を合成した後、活性評価を行うことで構造活性相関を明らかとした。また確立したリガンド合成手法を用いて蛍光標識分子プローブを合成し、生細胞イメージング解析へと展開した。本研究によって生体防御の理解に繋がる自然免疫受容体Mincleの機能の一端を明らかにしたと考えている。特にリガンドおよびMincleの細胞内挙動解析は免疫機構の理解と制御に関わる重要な成果と考えており、自己・非自己に対応して免疫を制御するMincleの分子レベルでの理解に貢献出来たと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established synthetic methods for complex lipid ligands of the innate immune receptor Mincle and evaluated the biological activities of the compounds to understand the structure-activity relationship between the lipid moiety of the ligand and Mincle. In addition, we developed fluorescence-labeled probes based on the established synthetic method of Mincle ligand and analyzed the intracellular behavior of Mincle and its ligand by live-cell imaging analysis.

研究分野：生物有機化学

キーワード：C型レクチン受容体 Mincle 複合脂質 糖脂質 自然免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C型レクチン受容体 (CLR) の一種である Mincle は、主にマクロファージ等の免疫細胞表層に発現する自然免疫受容体であり、微生物由来の複合脂質や、自己の損傷細胞由来の代謝物等を認識して自然免疫を制御する。強力な Mincle リガンドとして、結核菌由来のトレハロースジミコール酸 (TDM) が報告されている他、TDM の脂質部位を単純化した誘導体であるトレハロースジベヘネート (TDB) や脂質部位に芳香環を有する Brartemicin などがトレハロースジエステル型 Mincle リガンドとして報告されている。複合脂質リガンドと Mincle の相互作用については、リガンドの極性部位が Mincle 表層付近に存在するカルシウムイオンおよびその周辺残基に認識されることが糖-Mincle の X 線結晶構造解析によって示されている。一方、リガンド脂質部位はカルシウムイオン近傍に存在するいくつかの疎水性アミノ酸残基で形成される Mincle 表層部位と相互作用する可能性が示唆されているが、その詳細は不明であった。これまでに報告者はモノアシルグリセロールが脂質鎖長依存的に Mincle を介したシグナル活性を示すことを明らかにしている (Matsumaru, T. et al. Chem. Commun. 2019)。さらにグリセロ脂質と Mincle の分子シミュレーションにより脂質認識部位の解析を行い、リガンド脂質部位が相互作用することが予想される Mincle 表層は疎水性のアミノ酸残基のみならず、いくつかの極性アミノ酸残基が存在していることを見出した。また細胞表層の受容体によるリガンド内在化は、シグナル伝達等との関連が予想されるものの、Mincle のリガンド認識における受容体やリガンド分子の細胞内挙動についての詳細は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では自然免疫において重要な役割を担う Mincle と複合脂質リガンドの機能、特にリガンド脂質部位と Mincle 表層の相互作用と Mincle およびリガンドの細胞内挙動の解明を目的とした。その鍵となるリガンド分子としては、非常に特異な構造を有するマンニトール脂質 "44-2" および、極性部位と Mincle の配位構造が知られており脂質部位設計のための基礎情報が得られるトレハロースエステルを基幹構造とした化合物の合成法を確立し、ライブラリ構築、分子プローブ合成に展開することにより機能解析を行うことを目指した。

3. 研究の方法

Mincle および複合脂質リガンドの機能解析を目指し、下記3つの項目について研究を行った。

(1) 特徴的な脂質構造を有する真菌由来糖脂質の合成ルートの確立と構造活性相関解析

強力な Mincle リガンドであり、特徴的な脂質構造を有するマンニトール脂質 "44-2" の合成法を確立するとともに、確立した合成手法を応用することで種々の誘導体を合成した後、活性評価へ展開することで、マンニトール脂質 "44-2" の Mincle に対する構造活性相関解析を行った。

(2) 脂質修飾型トレハロースエステル誘導体の合成と構造活性相関解析

Mincle と複合脂質リガンドの相互作用において、複合脂質の脂質鎖中の極性基が相互作用に影響を与える可能性を考慮し、種々の脂質修飾型トレハロースエステル誘導体を合成し、活性評価を行うことで構造活性相関解析へと展開した。

(3) 蛍光標識分子プローブの創製と細胞内挙動解析

リガンド認識時のリガンド分子および受容体の細胞内挙動を解析するため、リガンドの標識化、あるいは標的タンパク質の標識化を可能とする分子プローブを創製し、生細胞イメージング解析を行った。

4. 研究成果

(1) マンニトール脂質 "44-2" (図1) は、マウス Mincle を介した強力なシグナル伝達能を有するとして、マラセチア真菌より単離された天然物である。その構造は L-マンニトールをコア構造とし、1, 3, 4 位にアシル鎖を有するトリアシル構造である。アシル部位としては他に類を見ない β -マンノース修飾ヒドロキシ脂肪酸を有しており、ヒドロキシ基の立体化学は不明である。そこでヒドロキシ基部位のジアステレオマー誘導体を含む種々の誘導体を合成し、構造活性相関の解析を行った。

まず、糖含有脂肪酸部位の合成を行った。ヒドロキシ脂肪酸エステルの両エナンチオマーを効率的に得るために、ラセミ体のヒドロキ

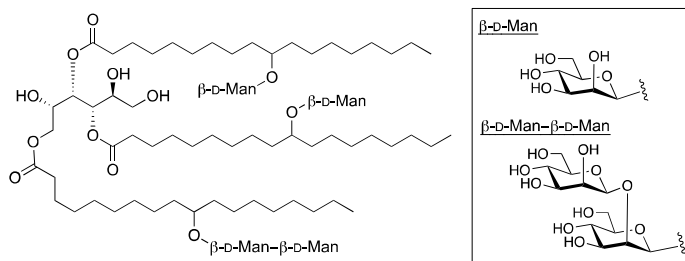


図1 β -Mannosyloxymannitol glycolipid "44-2"

シ脂肪酸エステルに対する光学分割法を確立し、両エナンチオマー体の容易な取得を可能とした。得られたキラルなヒドロキシ脂肪酸エステルに対して、単糖あるいは二糖構造を 選択的に導入することで糖含有脂肪酸の合成を達成した。続いて、適切な位置に保護基を導入した L-マンニトール誘導体を調製した後、単糖含有脂肪酸を縮合させることでジエステル体とした。さらに、中性条件による保護基の除去によって得られたジエステル中間体のマンニトール部位 1 位に対して、二糖含有脂肪酸を選択的に縮合することで、マンニトール脂質"44-2"の合成法を確立した。確立した合成法を用いて種々の誘導体合成へと展開した。

得られた誘導体に対して Mincle を介したシグナル活性評価を行うことで、リガンド脂質部位のヒドロキシ基の立体化学や糖部位が活性に与える影響を含め、マンニトール脂質"44-2"の構造-Mincle を介したシグナル活性相関を明らかとした (Matsumaru, T. et al. *Eur. J. Org. Chem.* 2022)。

(2) 脂質鎖中に極性基を有するマンニトール脂質"44-2"が強力な Mincle を介したシグナル活性を示すことから、糖脂質の脂質鎖中の極性基は Mincle との相互作用において許容されると考えた。また Mincle とトレハロースエステルの結合モデルを基とした相互作用解析より、トレハロースエステルの脂質部位が相互作用することが予想されている Mincle 表層の近傍に極性アミノ酸残基が存在していることを見い出しており、その極性アミノ酸残基の機能解析を目指した。

まず、脂質部位に極性基を有する種々のトレハロースエステル誘導体 (図 2) を合成した。得られた誘導体に対して Mincle を介したシグナル活性評価を行ったところ、官能基の種類および導入位置によって、活性に影響を与える結果が得られた。またドッキングシミュレーションより、脂質部位の 10 位にヒドロキシ基を有するトレハロースエステル誘導体は Mincle 表層付近の極性残基と相互作用する可能性が示唆される結果を得た。さらに脂質部位に極性基を導入した誘導体は脂質部位を無修飾の構造と比較して、極性溶媒に対する溶解性が向上することを見い出した (Matsumaru, T. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2022)。

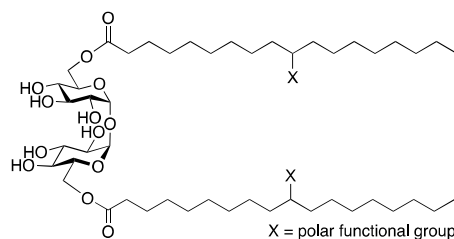


図 2 Trehalose diesters containing a polar functional group-modified lipid moiety

(3) Mincle およびリガンドの細胞内挙動の解析を志向し、2 種類の新規蛍光標識分子プローブを合成し細胞内挙動解析へと展開した。1 つ目の分子プローブは Mincle リガンドの標識化を行った分子プローブであり、細胞内におけるリガンドの挙動の解析を目指した。2 つ目の分子プローブは標的タンパク質表層の極性残基に対する反応性基を有する構造とし、Mincle 表層の標識化を目指した。分子設計は Mincle とトレハロースエステルの結合モデルより、Mincle 表層の極性残基と反応しうる位置として脂質部位に反応性基を導入した。これらの分子プローブの合成については、既に確立したリガンド合成手法を応用することで達成した。得られた分子プローブが Mincle を介したシグナル活性を有することを明らかにした後、生細胞イメージングへと展開することで、リガンドおよび Mincle の細胞内挙動を明らかとした。

以上、本研究において報告者は種々の Mincle リガンド合成法の確立を達成した。さらに、確立した合成手法を応用することで誘導体合成や新規蛍光標識分子プローブの創製を行い、構造活性相関解析や、リガンドおよび Mincle の細胞内挙動解析へと展開することによって機能解析に成功した。これらの知見は今後の自然免疫の機構解明において重要な結果であり、関連分野発展の基盤構築に大きく貢献したと考えている。

以上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumaru Takanori, Sakuratani Kasumi, Yanaka Saeko, Kato Koichi, Yamasaki Sho, Fujimoto Yukari	4. 巻 2022
2. 論文標題 Fungal Mannosyloxymannitol Glycolipids and Their Analogues: Synthesis and Mincle Mediated Signaling Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 e202200109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ejoc.202200109	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 Matsumaru Takanori, Sueyoshi Kodai, Okubo Kana, Fujii Shusuke, Sakuratani Kasumi, Saito Ryota, Ueki Kazunari, Yamasaki Sho, Fujimoto Yukari	4. 巻 75
2. 論文標題 Trehalose diesters containing a polar functional group-modified lipid moiety: Synthesis and evaluation of Mincle-mediated signaling activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117045 ~ 117045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2022.117045	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 Takanori Matsumaru	4. 巻 34
2. 論文標題 Lipid Conjugates as Ligands for the C-type Lectin Receptor Mincle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E1-E5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.2029.1E	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15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Takanori Matsumaru, Kana Okubo, Kasumi Sakuratani, Kodai Sueyoshi, Shusuke Fujii, Juri Takayama, Sho Yamasaki, Yukari Fujimoto
2. 発表標題 Innate immune receptor Mincle ligands: Synthesis and biological functions
3. 学会等名 Future Drug Discovery Empowered by Chemical Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takanori Matsumaru
2. 発表標題 Synthesis and Immunomodulatory Activities of Microbial Glycolipids and Their Analogues through C-type Lectin Receptor Mincle
3. 学会等名 Keio international symposium on Glycoscience: Innovative Synthesis and Chemical Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山珠理、大久保花菜、松丸尊紀、藤本ゆかり
2. 発表標題 自然免疫受容体Mincleの細胞内挙動観測を志向した蛍光標識分子プローブの開発:合成と機能解析
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松丸 尊紀、大久保 花菜、櫻谷 香澄、末吉 耕大、藤井 秀輔、高山 珠理、山崎 晶、藤本 ゆかり
2. 発表標題 C型レクチン受容体Mincleリガンドおよび標識プローブとしての糖脂質:合成と機能解析
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takanori Matsumaru, Kasumi Sakuratani, Kana Okubo, Kodai Sueyoshi, Shusuke Fujii, Sho Yamasaki, Yukari Fujimoto
2. 発表標題 Syntheses and immunomodulatory activities of microbial glycolipids and analogues through C-type lectin receptor Mincle
3. 学会等名 30th International Carbohydrate Symposium (ICS2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松丸尊紀、大久保花菜、藤本ゆかり
2. 発表標題 C型レクチン受容体Mincleの蛍光標識分子プローブの合成と機能解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保 花菜、松丸 尊紀、藤本 ゆかり
2. 発表標題 自然免疫受容体Mincleの蛍光標識分子プローブの合成と機能解析
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takanori Matsumaru, Kasumi Sakuratani, Kana Okubo, Kodai Sueyoshi, Shusuke Fujii, Yukari Fujimoto
2. 発表標題 Chemical synthesis and functions of lipid conjugates as the ligands of C-type lectin receptor Mincle
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takanori Matsumaru, Kasumi Sakuratani, Yukari Fujimoto
2. 発表標題 Synthesis and immunomodulatory activity of mannitol lipids
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takanori Matsumaru, Kasumi Sakuratani, Kana Okubo, Kodai Sueyoshi, Shusuke Fujii, Sho Yamasaki, Yukari Fujimoto
2. 発表標題 Synthesis and signaling activity of b-mannosyloxymannitol glycolipids through innate immune receptor Mincle
3. 学会等名 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松丸 尊紀、櫻谷 香澄、大久保 花菜、末吉 耕大、藤井 秀輔、山崎 晶、藤本 ゆかり
2. 発表標題 マンニトール複合脂質の合成と自然免疫受容体Mincle活性化
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保花菜、松丸尊紀、藤本ゆかり
2. 発表標題 自然免疫受容体Mincleの機能解明を目指した蛍光標識分子プローブの合成と機能解析
3. 学会等名 GlycoTOKYO2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻谷 香澄、松丸 尊紀、藤本 ゆかり
2. 発表標題 自然免疫受容体Mincleリガンドとしての糖修飾脂肪酸を含む複合脂質の合成研究
3. 学会等名 日本化学会第101 春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保 花菜、荒井 洋平、松丸 尊紀、藤本 ゆかり
2. 発表標題 免疫調節機能解析を指向したリゾ型イノシトールリン脂質の合成
3. 学会等名 日本化学会第101 春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松丸 尊紀、櫻谷 香澄、大久保 花菜、末吉 耕大、藤井 秀輔、藤本 ゆかり
2. 発表標題 ヒドロキシン脂肪酸含有複合脂質の合成とMincleを介した免疫賦活活性
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学理工学部化学科生体分子化学研究室ホームページ http://www.chem.keio.ac.jp/~fujimoto-lab/

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
---------	---------