

機関番号：32661

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790544

研究課題名 (和文) キラーレクチン受容体の糖鎖リガンドの解析と細胞機能制御

研究課題名 (英文) Glycan ligands of killer lectin-like receptors and regulation of NK functions

研究代表者

梶貝 孝慈 (HIGAI KOJI)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：70297711

研究成果の概要 (和文)：

NK細胞上の Killer Lectin-like Receptors (KLRs: NKG2A, C, D, CD94) および Natural Cytotoxicity Receptors (NCR 1, 2, 3)に着目し、組換えタンパク質とその変異体を作成し、これらの分子の糖鎖結合特性や結合親和性の解析を行った結果、sialyl lewis X やグルコサミノグリカン、硫酸化多糖類に対する結合を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Using recombinant extracellular lectin-like domains of KLRs (rKLRs) and NCRs (rNCRs) on NK cells, we evaluated their ligands specificity and binding affinities. Our data resulted that rKLRs and rNCRs can bind to sialyl Lewis X, GAGs and sulfated polysaccharides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：NK細胞、Killer LRs、NCRs、sialyl Lewis X、

1. 研究開始当初の背景

炎症は、細菌やウイルス感染および外傷等による組織傷害に対する局所あるいは全身性の防衛反応である。その際 IL-1 や IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインが産生され、それらが単独あるいは相加・相乗的に作用して様々な作用を示す。肝臓においては、 α 1-酸性糖タンパク (AGP) や α 1-抗トリプシンなどの急性相タンパクの合成が誘導され、C反応性タンパクとともに臨床的に利用されている。一方、炎症部位への白血球の遊走には、白血球上の Sialyl Lewis X (sLeX :

Neu α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) と血管内皮細胞上の sLeX 結合レクチンである E-セレクトリンとの接着が重要であることが知られている。sLeX は白血球のみならず、癌細胞の分泌するムチンや細胞膜上などにも発現し、癌の転移や免疫系からの防御に関与すると考えられている。また、血清タンパク質にも sLeX が発現しており、炎症や癌などの病態により量的・質的に変化することから、私は、血清中 sLeX に注目し、その合成機構と構造変化などを明らかにすべく研究を行ってきた。糖鎖である sLeX は、糖転移酵素

により合成されるが、従来その発現制御機構については明らかにされていなかった。そこで、sLeX 合成に関与する sialyltransferase (ST)3Gal VI および ST6Gal I について、転写制御機構および新規糖転移酵素活性測定法を利用した酵素活性の差異を明らかにした。また、炎症やさまざまな病態下において、血清タンパク質などの分泌タンパク質上に sLeX が発現し、さらに糖鎖構造も変化することを明らかにした。さらに、炎症に関与する転写因子である NF- κ B が、大腸がん細胞で ST や FUT などの糖転移酵素の発現制御を行っていることを、明らかにした。一方、糖尿病患者の血清中で多く見られる糖化タンパク質が、sLeX リガンドである E-セレクトインを誘導することやその発現機構および糖化タンパク質や高血糖による糖尿病合併症への関与のメカニズムを明らかにした。

生体内において、重要な機能を果たす血清中 sLeX であるが、病態におけるその発現機構は未だ明らかとなっていないため、炎症モデルを作成し、sLeX の発現誘導は、sLeX 合成に関与する sialyltransferase IV (hST3Gal IV) および fucosyltransferase VI (FUT VI) の発現上昇によることを見出した。しかし、肝臓における、sLeX 合成関連糖転移酵素の発現メカニズムについては、明らかにされていなかったため、平成 19-20 年度日本学術振興会科学研究費補助金の援助により、肝がん細胞株 HepG2 をモデルとして、FUT VI の転写制御機構を世界で初めて明らかにした。

病態下においてこれら糖タンパク質上 sLeX 発現の変化が、どのような生体応答を引き起こすのかは重要な課題である。私は、sLeX の生体内における役割を明らかにするため、NK 細胞について注目した。NK 細胞は、癌細胞を異物として認識し排除する細胞であるが、近年糖鎖を認識するレクチンレセプターの発現が報告されている。そこで、NK 細胞の細胞傷害性に及ぼす sLeX の影響を検討した結果、NK 細胞は、sLeX 高発現細胞を強く認識し、その傷害性は sLeX を発現した分泌タンパク質で抑制された。また、NK 細胞上の sLeX 認識タンパクの解析を行った結果、CD94 や NKG2D などの KLRs (Killer lectin receptors) と呼ばれるレクチン様ドメインを持つ NK 受容体の関与することを明らかにした。一方で、NK 細胞による細胞傷害により引き起こされるターゲット細胞のアポトーシス過程で、細胞表面糖鎖変化が起こることを明らかにした。また、血清中 sLeX の機能として、NK 細胞による細胞傷害活性抑制が見出されているが、NK 細胞上のどのような分子に結合して NK 活性を抑制するのかは、明らかとなっていない。そこで、平成 19-20 年度日本学術振興会科学研究費補助金の援助により、血清 sLeX の生体内免疫応答

への関与を、NK 細胞上の KLRs (CD94, NKG2D, NKR-P1 など)に着目して、KLRs と糖鎖の結合を検討した結果、96-well plate を用いた EIA 法により、NKG2D と肝がん細胞株 HepG2 の分泌する sLeX 高発現トランスフェリン (HepTF) との分子レベルでの結合を明らかにした。このことは、近年がんの治療法に用いられている、LAK 療法に代表される免疫療法への応用が期待される重要な結果であると考えている。しかしながら、どのような糖鎖分子が NKG2D と結合しているのかは未だ明らかにされていない。また、NK 細胞の機能を考慮すると、sLeX が真のリガンドではなく、外来性の類似の多糖類である可能性も否定はできない。

2. 研究の目的

本研究では、H19-20 年度の日本学術振興会科学研究費により行った成果を受けて、KLRs と糖鎖の結合を詳細に解析し、結合糖鎖構造を明らかにする。また、類似の多糖類が、免疫賦活作用を示す可能性を探索する。

平成 21 年度には、未だ明らかとされていない NKG2D の糖鎖リガンドを同定する。さらに、KLRs である CD94 や NKG2D, NKG2A および CD94 の糖鎖リガンドも、同様の方法で同定する。NKG2D, CD94, NKG2A および CD94 のリコンビナントタンパク質発現系は、平成 19-20 年度日本学術振興会科学研究費補助金の援助により、構築済みである。そして、これら KLRs の糖鎖認識に関与する重要なアミノ酸の同定を、mutagenesis を利用して糖鎖との結合を指標に解析する。

平成 22 年度には、平成 21 年度の検討により、明らかとなったレクチン-糖鎖の結合活性について、速度論的解析を分子間相互作用解析装置・水晶素子マイクロバランスや EIA により詳細に解析するとともに、糖鎖結合部位の同定を行う。さらに、natural cytotoxicity receptors (NCRs) に関しても、同様の手法を用い、新規糖鎖リガンドを同定する。

3. 研究の方法

【平成 21 年度】

(1) リコンビナント NKG2D, CD94, NKG2A および NKG2C の作製

NK 細胞株由来 KHYG 細胞の cDNA から、活性化受容体である NKG2D および抑制性受容体である CD94, NKG2A, CD161 のレクチンドメインを含む細胞外領域を PCR でクローニングし、pGEX4-T1 ベクターに組み込み、塩基配列を確認後、このベクターをリコンビナントタンパク質発現用の大腸菌である BL21 にシャペロン発現用のベクターと一緒にトランスフォームする。これらシャペロン発現ベクターは、タンパク質の折りたたみに共同して働くことが知られている複数の分子シャペロンが

それぞれ一つのプラスミド上にコードされ、シャペロンチームとして効率よく発現するように設計されている。これらのシャペロンチームのいずれかと目的タンパク質を共発現させることにより、発現タンパク質の可溶化を促進することが期待される。平成 19-20 年度日本学術振興会科学研究費補助金の援助によりすでに、このシャペロンと pGEX4-T1 ベクターを用いて、NKG2D, CD94, NKG2A および NKG2C を、レクチン活性を保った状態で、発現することに成功している。そして、IPTG 誘導後、グルタチオンカラムにて、目的の KLRs-GST 融合タンパク質を得る。レクチンドメインのミュータントについては、inversed-PCR にて、他の C-type lectin である E-selectin や Dectin-1 のレクチンドメインのアミノ酸置換の成功例を参考に、同様に作成する。

(2) NKG2D, CD94, NKG2A および NKG2C の各種糖鎖との結合性の解析

結合解析は、96-穴プレートに、糖たんぱく質 (sLeX を多価で発現している HepG2 細胞由来トランスフェリンや市販の糖たんぱく質) を固相化し、糖鎖結合プレートを作成する。そのプレートに対して、rKLRs-GST をプローブとして添加後、結合した rKLRs-GST を anti-GST-POD にて解析する。また、認められた結合が糖鎖特異的であることを明らかにするため、シアリダーゼやフコシダーゼ消化した糖鎖に対する結合性の消失を確認する。また、96-穴プレートによるアッセイに対して、シアル酸やフコースなどの単糖、ラクトサミンやラクトースなどのオリゴ糖、ヘパリンやヘパラン硫酸などのグルコサミノグリカン、フコイダンやベータグルカン、アガリクス由来多糖などの多糖類で競合実験を行い、結合を阻害する糖類の同定を行う。

【平成 22 年度】

(1) KLRs と糖鎖リガンドの結合における速度論的解析

確立された各 KLRs と糖鎖との結合実験系を用い、結合の可能性のある組み合わせについて確認実験を行うとともに、定量的な結合実験系の構築を行う。水晶発振子マイクロバランスは物質間相互作用を微量で定量的に解析できるので、BSA 標識した糖鎖類を直接センサーに固定して、各 KLRs のレクチンドメインをプローブとすることにより、糖鎖との結合親和性を解析する。

(2) NCR s の新規糖鎖リガンドの同定とその結合における速度論的解析

確立された QCM および EIA による各 KLRs と糖鎖との結合実験系を NCR 応用し、結合の可能性のある組み合わせについて確認実験

を行うことで新規リガンドの探索を行うとともに、定量的な結合実験系の構築を行う。

以上の検討から、NK 細胞上 C 型レクチン様レセプターや NCRs についての分子レベルでの糖鎖リガンドとの結合性から性質や機能 を明らかにすることで、糖鎖の自然免疫系に関する知見が得られるものと期待される。また、NK 細胞による細胞傷害を調節する分子・物質に対する新しい知見は、創薬といった観点からも、免疫機能調節薬や免疫賦活薬への応用も期待される。

4. 研究成果

(1) KLRs (NKG2D, CD94, NKG2A および NKG2C) の各種糖鎖との結合性の解析

sLeX の生体内免疫応答への関与を、NK 細胞上の KLRs に着目して、KLRs と糖鎖の結合を解析した。BSA 結合 Heparin 結合プレートに対して、CD94 および NKG2D をプローブとして添加後、結合した rKLRs-GST を anti-GST-POD にて解析した。その結果、濃度依存的な CD94 および NKG2D が認められた。また、その結合に対するグルコサミノグリカン (GAG:Heparin, Heparan sulfate, Dermatan sulfate, Keratan sulfate, Chondroitin sulfate, hyaluronic acid) および多糖類 (Fucoïdan, carragenan, mannan) を競合させた結果、硫酸化 GAG である Heparin, Heparan sulfate および硫酸化多糖類である Fucoïdan, carragenan で結合の低下が認められた。また、これらの結合は、rNKG2D (Y152A, Y199A)、rCD94 (F114A, N160A, C166G) のミューテーションにより、低下したことから、糖鎖認識に重要なアミノ酸残基の一部を明らかにすることが出来た (論文⑤)。なお、NKG2A および NKG2C についても Heparin, Heparan sulfate に対する結合を認めた (論文③)。

また、sLeX などの異常糖鎖への結合性を解析した結果、CD94, NKG2A, C, D のいずれの受容体も sLeX を多価で発現している糖タンパク質に対して結合が認められた (論文③、⑥)。

これらの結果から、KLRs の多糖類やグルコサミノグリカン上の糖鎖リガンドを同定することに成功した。これらの結果は、多糖類やグルコサミノグリカンによる KLRs を介した NK 細胞の制御機構を明らかにした結果であり、自然免疫における糖鎖の重要性を示唆するものである。

(2) KLRs と糖鎖リガンドの結合における速度論的解析

上記 (1) で認められた結合に対して、その親和性を解析するため、EIA と QCM 両方での測定を試みた。その結果、両手法において、近似の値が得られたため (論文③) 以後は EIA による解析を行った。NKG2D の sLeX および Heparin に対する Kd 値は 0.3 μ M、1.19 μ M とな

った。また、CD94 および NKG2D の HepTf に対する Kd 値は 87nM および 200nM であった。一方、CD94 および NKG2D の GAG であるヘパリンに対する Kd は、32nM および 1110nM となり、同じ KLR でも親和性の異なることが明らかとなった（論文①、④）。

また、CD94 のカウンターパートナーである NKG2A および NKG2C の Kd 値を算出した結果、20nM および 40nM となった。そして、この結合は、2-o-脱硫酸化ヘパリンによって競合されないため、NKG2A/C と heparin の結合には、2 位の硫酸基が重要であることが明らかとなった（論文③）。また、NKG2A/C は、HepTf とともに結合が認められ、その Kd 値は、80nM および 114nM と算出された。以上の結果から、CD94 のみならず NKG2A/C も heparin や sLeX といった糖鎖を認識することが明らかとなった。そして、これらの Kd 値から、糖鎖リガンドがタンパク質リガンドに対して競合する可能性が示唆された。

(3) NCR s の新規糖鎖リガンドの同定とその結合における速度論的解析

Natural cytotoxicity receptors (NCRs) である NKp46 (NCR1)、NKp44 (NCR2) と NKp30 (NCR3) は、免疫グロブリン様ドメインを持ちアダプター蛋白を介して活性化シグナルを誘発する。NCRs はウイルスや細菌感染細胞や Heparin との結合が報告されているがリガンドの詳細は不明である。そこで NCR1 に着目し、細胞外ドメインの C 末に His×6 を融合させた NCR-H6 を調製して糖鎖リガンドを解析した。

表 1 KLRs および NCRs の糖鎖リガンドに対する Kd 値

	CD94	NKG2A	NKG2C	NKG2D
heparin	92	20	40	1110
heparan sulfate	191	212	164	6500
fucoidan	43	1.95	0.27	40
λ -carrageenan	50			20
HepTf	87	80	114	200
	NCR1	NCR2		
heparin	770	23		
heparan sulfate	850	180		
fucoidan	150	2.6		
λ -carrageenan	200	4.6		
HepTf	520	540		(nM)

NKp46-H6 は、Heparin や Heparan sulfate に結合するが他の GAG との結合がみられず、3-O-、6-O-と N-sulfate のいずれもが結合に重要であり、Fucoidan、 λ -Carrageenan や Dextrane sulfate とともに強い結合親和性を示し

た。また HepTf とともに結合するが AGP や NorTf との結合はみられなかった。これらの結合は R139Q、H142Q、R145Q、K149Q 変異で抑制がみられたことから、イオン結合が関与していた（論文②）。

以上、KLRs および NCRs の糖鎖リガンドに対する親和性を比較すると（表 1）、CD94 のカウンターパートナーである NKG2A および NKG2C は、ほぼ同じような特異性と親和性であることが明らかとなった。また、NCR1 には、NCR2 程の基質特異性が認められず、どのような GAG に対しても同じような親和性で結合することが明らかとなった。一方、NCR3 は N 結合型糖鎖上の sLeX とは結合できないことが明らかとなった。そして、これらの値は従来のタンパク質リガンドと比較して、小さく糖鎖リガンドがタンパク質リガンドに対して競合する可能性が示唆された。

本研究により、KLRs や NCRs の糖鎖リガンドを同定することに成功した。また、変異体による解析により糖鎖リガンド結合部位を同定することができた。これらのことから、生体内では、NK 細胞上の KLRs や NCRs がこれらの異常な糖鎖を認識し、がん細胞の増殖を抑制することが考えられる。

従来、腫瘍マーカーとして用いられてきた sLeX の自然免疫系における新たな役割と、それらを展開した結果である NK 細胞による細胞傷害を調節する分子・物質に対する新しい知見は、創薬といった観点からも、免疫機能調節薬や免疫賦活薬への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

①Higai K., Itoh A., Imaizumi Y., Suzuki C., Xin X., Azuma Y., Matsumoto K. : Binding properties of CD94 to sulfated glycans and α 2,3-NeuAc-containing glycoprotein and its mutagenesis analysis. The Open Biotechnology Journal. *inpress* (査読有)

②Ito K., Higai K., Sakurai M., Shinoda C., Yanai K., Azuma Y., Matsumoto K. : Binding of Natural cytotoxicity receptor NKp46 to sulfate- and α 2,3-NeuAc-containing glycans and its mutagenesis. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 406 (3):377-82 2011 (査読有)

③Xin X, Higai K., Imaizumi Y., Suzuki C, Ito K, Itoh A., Matsumoto S., Azuma Y, Matsumoto K: NKG2A and NKG2C bind to sulfated glycans and α 2,3-NeuAc-containing glycoproteins. *Biol. Pharm. Bull.* 34(4):480-485 2011. (査読有)

④Higai K., Suzuki C., Imaizumi Y., Xin Xin, Azuma Y. and Matsumoto K: Binding affinities of NKG2D and CD94 to sialyl Lewis X-expressing N-glycans and heparin. Biol. Pharm. Bull. 34(1): 8-12 2010 (査読有)

⑤Higai K., Imaizumi Y., Suzuki C, Azuma Y. and Matsumoto K.: NKG2D and CD94 bind to heparin and sulfate-containing polysaccharides. Biochem, Biophys. Res. Commun. 386:709-714 2009. (査読有)

⑥Imaizumi Y., Higai K., Suzuki C, Azuma Y, Matsumoto K.: NKG2D and CD94 bind to multimeric α 2,3-linked N-acetylneuraminic acid. Biochem, Biophys. Res. Commun. 382:604-608 2009. (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

①篠田 千尋、伊藤 健一郎、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎: NCR2 および NCR3 の糖鎖リガンドの解析(第 131 回日本薬学会年会, 震災により、DVD・冊子による発表, 2011. 3. 30)

②松本 宏治郎、櫻井 瑞葉、伊藤 健一郎、桧貝 孝慈、柳内 和幸、東 祐太郎: NCR1 の糖鎖リガンドの解析(第 131 回日本薬学会年会, 震災により、DVD・冊子による発表, 2011. 3. 30)

③桧貝 孝慈、鈴木 千穂、今泉 雄三、Xin Xin、東 祐太郎、松本 宏治郎: NKG2D および CD94 の sialyl Lewis X 発現 N 型糖鎖およびへパリンへの結合親和性(第 131 回日本薬学会年会, 震災により、DVD・冊子による発表, 2011. 3. 30)

④Xin Xin、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎: NKG2A および C の多分岐シアル酸およびへパリンへの結合(第 131 回日本薬学会年会, 震災により、DVD・冊子による発表, 2011. 3. 30)

⑤桧貝 孝慈、松本 宏治郎: Killer Lectin Receptor および Natural Cytotoxicity Receptor の糖鎖リガンド特異性(一般シンポジウム「糖鎖発現・機能の異常と疾患」第 131 回日本薬学会年会, 震災により、DVD・冊子による発表, 2011. 3. 31)

⑥Xin Xin、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎: NKG2A および C の多分岐シアル酸およびへパリンへの結合(第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2010. 12. 10)

⑦松本 早代、木村 恵、今泉 雄三、桧貝 孝慈、柳内 和幸、東 祐太郎、松本 宏治郎: NKG2D の多分岐シアル酸、GAG および硫酸化多糖類への結合(第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2010. 12. 10)

⑧伊藤 あゆみ、今泉 雄三、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎: CD94 の多分岐シアル酸、GAG および硫酸化多糖類への結合

(第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2010. 12. 10)

⑨松本 宏治郎、伊藤 健一郎、篠田 千尋、桧貝 孝慈、東 祐太郎: NCR2 および NCR3 の糖鎖リガンドの解析(第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2010. 12. 10)

⑩櫻井 瑞葉、伊藤 健一郎、桧貝 孝慈、柳内 和幸、東 祐太郎、松本 宏治郎: NCR1 の糖鎖リガンドの解析(第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2010. 12. 10)

⑪Imaizumi Y, Higai K, Suzuki C, Azuma Y, Matsumoto K: NKG2D and CD94 bind to multimeric α 2,3-linked N-acetylneuraminic acids (The 25th International Carbohydrate Symposium, Makuhari, Japan, 2010. 8. 3)

⑫Higai K, Imaizumi Y, Suzuki C, Azuma Y, Matsumoto K: NKG2D and CD94 bind to heparin and sulfate-containing polysaccharides (The 25th International Carbohydrate Symposium, Makuhari, Japan, 2010. 8. 3)

⑬桧貝 孝慈、伊藤 健一郎、東 祐太郎、松本 宏次郎: Natural cytotoxicity receptors の sialyl Lewis X との結合性(第 130 回日本薬学会年会、岡山、2010. 3. 31)

⑭桧貝 孝慈、今泉 雄三、鈴木 千穂、東 祐太郎、松本 宏治郎: NKG2D and CD94 bind to multimeric α 2,3-linked N-acetylneuraminic acid. (第 81 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10. 24)

⑮松本 宏治郎、○鈴木 千穂、今泉 雄三、桧貝 孝慈、東 祐太郎: NKG2D and CD94 bind to heparin and sulfate-containing polysaccharides. (第 81 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10. 24)

⑯Xin Xin, 鈴木 千穂、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎: NKG2A and NKG2C bind to multimeric N-acetylneuraminic acid and heparin. (第 81 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10. 24)

⑰Xin X, Suzuki C, Higai K, Azuma Y, Matsumoto K: Glycan ligands of NKG2A and NKG2C. (The 6th Seminar on Biomedical Sciences. Tokyo. 2009. 10. 12)

⑱鈴木 千穂、今泉 雄三、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎: NKG2D および CD94 の多分岐 α 2,3-シアル酸への結合(第 29 回日本糖質学会年会、飛騨、2009. 9. 10)

[図書] (計 2 件)

① 桧貝 孝慈、松本 宏治郎: 「5.5 組換え蛋白質: 組換え蛋白質の発現と糖鎖修飾」 「バイオマテリアルの基礎」 分担 202-208, 2010 (日本医学館)

② 桧貝 孝慈、松本 宏治郎: 「組換え蛋白質: 組換え蛋白質の発現と糖鎖修飾」 バイオマテリアル - 生体材料 - 特集「異分野融合の

ためのバイオマテリアルの基礎PART6」
Vol. 27, 246-253, 2009 (日本医学館)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶貝 孝慈 (HIGAI KOJI)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：70297711

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし