

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450186

研究課題名(和文) ヒト免疫細胞グルカン受容体を用いたハイスループット免疫賦活作用評価法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of high-throughput assays to evaluate immunostimulating activity using human immunocyte glucan receptor

研究代表者

氏田 稔(Ujita, Minoru)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：50340295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト免疫細胞グルカン受容体をカイコ-バキュロウイルス発現系により融合タンパク質として発現させ、その結合特異性を解析した。この組換えグルカン受容体は特異的にある種のグルカンに結合したが、他の糖質には結合しなかった。このグルカン結合は可溶性グルカンであるラミナリンやラミナリオリゴ糖によって阻害されたが、他の糖質では阻害されなかった。さらにヒトのグルカン受容体の首ドメインとオリゴ糖鎖はリガンド結合活性や結合特異性に影響を与えなかった。これらの結果は、本組換えヒトグルカン受容体が厳密な結合特異性を有するため、生体内のリガンドや免疫賦活糖質の同定のためのプローブとして有用であるということを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Human immunocyte glucan receptor was expressed as a fusion protein in a baculovirus-silkworm expression system and assayed for binding specificity. Recombinant glucan receptor specifically bound to some glucans, but not to other carbohydrates. The glucan binding was inhibited by laminarin, a soluble glucan, and by laminarioligosaccharides, but not by other carbohydrates. Furthermore, the neck domain and oligosaccharide chains of human glucan receptor did not affect the ligand binding activity and specificity of the receptor. These results suggest that recombinant human glucan receptor can be used as a useful probe in identifying ligands in humans and immunostimulating carbohydrates due to its strict binding specificity.

研究分野：生物化学

キーワード： -グルカン受容体 組換えタンパク質 免疫細胞 ヒト 結合特異性 免疫賦活作用

### 1. 研究開始当初の背景

健康な人でもがん細胞は1日に数千個発生するとされているが、免疫細胞ががん細胞を発生初期に消滅させており、増殖・悪性を防いでいる。近年、がんの治療においても免疫細胞を利用した方法が注目されており、これまでに免疫細胞を活性化する抗腫瘍性 $\alpha$ -グルカンがキノコから単離されている(レンチナン、クレスチン、シゾフィランなど)。抗腫瘍性 $\alpha$ -グルカンはがん細胞を直接攻撃するのではなく、マクロファージや樹状細胞などの免疫細胞を活性化することによって作用を示すことから、副作用の極めて少ない免疫賦活剤として前立腺がん・乳がん・肺がんの治療に使われ始めている。このような $\alpha$ -グルカンの免疫賦活作用には免疫細胞の $\alpha$ -グルカン受容体(Ujita, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009)が関与することもわかっている。

一方で健康食品としての $\alpha$ -グルカンの効果は誇張されることも多く、その評価を混乱させている。「健康食品としての $\alpha$ -グルカンが効くという科学的根拠はまだないが、効かないという根拠もない。」というのが実情であり、がん患者の半数以上が利用しているとされる高価な健康食品やサプリメントとしての $\alpha$ -グルカンに免疫賦活作用・抗腫瘍性があるかどうかを科学的に検証することは研究者の使命であると考えられる。また、日本における超高齢社会の出現に向けた、高齢者の免疫力向上の取り組みにとってもヒト免疫細胞 $\alpha$ -グルカン受容体の研究は重要であると言える。動物実験や臨床試験による取り組みも始まっているが、このようなインビボの実験だけでは $\alpha$ -グルカンの免疫賦活作用の分子メカニズムを完全には解明できない。さらに抗腫瘍性 $\alpha$ -グルカンの種類は多く、動物実験や臨床試験での検証だけでは費用や期間の点でも限界がある上、欧米先進国では医薬品・化粧品開発における動物実験を減らす方向に進んでおり、代替法を早急に開発すべきだという議論も盛んである。ヒトにおける $\alpha$ -グルカンの免疫賦活作用に不明な点が多い理由は、 $\alpha$ -グルカン受容体を介したヒト免疫細胞の活性化のメカニズムが解明されていないことと、科学的なインビトロの評価法が確立されていないことであると総括することができる。

### 2. 研究の目的

ヒトの免疫細胞の表面には $\alpha$ -グルカン受容体が存在し、特定の構造の $\alpha$ -グルカンと特異的に結合して情報が伝達され、免疫細胞が活性化される。この $\alpha$ -グルカンによる免疫賦活作用はがんの治療にも応用されているが、分子メカニズムには不明な点が多く、科学的に証明されているとは言い難い。本研究では、ヒト $\alpha$ -グルカン受容体の糖結合特異性を解明し、食品成分の科学的なハイスループット免疫賦活作用評価法の開発に応用

するとともに $\alpha$ -グルカン受容体と特異的に結合して免疫賦活作用を示すオリゴ糖を探索することを目的とする。

免疫細胞の $\alpha$ -グルカン受容体の研究はヒトでは進んでおらず、これまでは主にマウスで行われてきた。機能性食品成分としての $\alpha$ -グルカンの対象はあくまでヒトであり、マウスでの免疫賦活作用や抗腫瘍性のデータをそのままヒトに適用することはできない。すなわち、一般に広く知られている $\alpha$ -グルカンの免疫賦活作用とはマウスでの話であり、ヒトにおける分子メカニズムは実質上、未解明である。本研究では、マウスではなくヒトの $\alpha$ -グルカン受容体の機能を解析するところに新規性があり、インビトロのシステムであるため、細胞実験や動物実験に比べ、ハイスループット法であるという優位性がある。すなわち、本研究において初めてヒト $\alpha$ -グルカン受容体の糖結合特異性と情報伝達の仕組みが解明され、抗腫瘍性 $\alpha$ -グルカンの効果を科学的に実証・評価することができるようになるわけである。本方法は動物実験や臨床試験などのインビボ実験法や培養細胞を用いる方法と併用・共存するアッセイであるが、極めて簡便・迅速・安価・高感度の定量的なスクリーニング法として利用することにより動物実験を大幅に減らすこともできるという利点がある。

### 3. 研究の方法

組換えヒト免疫細胞 $\alpha$ -グルカン受容体を大量生産し、その糖結合特異性を解析した。この結果を利用し、免疫賦活糖鎖のハイスループット評価法を開発した。

#### (1) 組換えヒト免疫細胞 $\alpha$ -グルカン受容体の大量生産

ヒト免疫細胞 $\alpha$ -グルカン受容体をカイコ-バキュロウイルス発現系で大量発現させた。N末端側にヒスチジンタグあるいは緑色蛍光タンパク質(GFP)を付加したヒト $\alpha$ -グルカン受容体の細胞外領域(糖認識ドメイン)を可溶性組換えタンパク質として大量に発現させ、カイコ体液からこれらの組換えヒト $\alpha$ -グルカン受容体をアフィニティー精製した。

#### (2) インビトロ結合アッセイ系による糖結合特異性の解析

不溶性糖鎖ゲルを用いたプルダウンアッセイ(Ujita, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009, Ujita, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011)により組換えヒト免疫細胞 $\alpha$ -グルカン受容体(N末端ヒスチジンタグ)の糖結合特異性を解析した。

#### (3) 免疫賦活糖鎖のハイスループット評価法の開発

不溶性糖鎖ゲルを用いたプルダウンアッセイ(Ujita, M. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009, Ujita, M. et al., *Biosci.*

*Biotechnol. Biochem.* 2011) と可溶性糖鎖を用いた阻害実験を組み合わせることにより、組換えヒト免疫細胞  $\beta$ -グルカン受容体 (N 末端 GFP) の糖結合特異性を解析するとともに免疫賦活糖鎖のハイスループット評価法を開発した。

#### 4. 研究成果

様々なタグを有する組換えヒト  $\beta$ -グルカン受容体をカイコ-バキュロウイルス発現系により発現させ、アフィニティー精製を行った。これらの組換えタンパク質を用いて  $\beta$ -グルカン結合特異性を解析するためのインビトロ結合アッセイ系を確立し、食品中の免疫賦活糖鎖のスクリーニングへの応用を試みた。N 末端側にヒスチジンタグあるいは GFP を有する組換えヒト  $\beta$ -グルカン受容体は厳密な  $\beta$ -グルカン結合特異性を有し、ヒト  $\beta$ -グルカン受容体の細胞外領域に存在する首領域およびオリゴ糖鎖は結合活性および結合特異性に影響を与えないことが明らかとなった。これらの組換えヒト  $\beta$ -グルカン受容体を用いたインビトロ結合アッセイ系は免疫賦活剤や機能性食品の開発に応用できる可能性があることが示唆された。特に GFP-ヒト  $\beta$ -グルカン受容体を用いたインビトロ結合アッセイ系では蛍光を測定するだけで結合活性および結合特異性を評価できるため、簡便・迅速・安価・高感度で定量性に優れた  $\beta$ -グルカン結合特異性の解析法および免疫賦活糖鎖のスクリーニング法を開発したことになる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

由良裕城, 安藤 郷, 丸山和志, 山内陽介, 木落信郎, 犬飼彩美, 福村 藍, 奥村裕紀, 氏田 稔, グルカン認識タンパク質の結合アッセイ系の確立. 名城大総研紀要 20, 1-4 (2015). 査読無

中村友也, 岡田幸美, 山口舞子, 横井奈津子, 近藤礼奈, 小野江菜津美, 駒倉理恵子, 加藤佑果, 鈴木友貴, 渋川弘貴, 奥村裕紀, 氏田 稔, 組換えヒトチロシナーゼの酵素学的性質の解析. 名城大総研紀要 20, 9-12 (2015). 査読無

丹羽 将, 古橋達也, 廣瀬隆汰, 山田昌広, 海野博水, 春田美由樹, 奥村裕紀, 氏田 稔, キチン認識タンパク質の結合アッセイ系の確立. 名城大総研紀要 20, 41-43 (2015). 査読無

能勢充彦, 氏田 稔, 高谷芳明, 湊健一郎, 日坂真輔, 堀池愛一, 小原章裕, 春日井サボテンに含まれる生理活性の検索. 名城大総研総学研論文集 14, 1-10 (2015). 査読有

Okumura, H., Sato, T., Sakuma, R., Fukushima, H., Matsuda, T., and Ujita, M., Identification of distinctive interdomain interactions among ZP-N, ZP-C and other domains of zona pellucida glycoproteins underlying association of chicken egg-coat matrix. *FEBS Open Bio* 5, 454-465 (2015). 査読有  
DOI: 10.1016/j.fob.2015.05.005.

Ujita, M., Koike, S., Yamauchi, Y., Kiochi, N., Yura, H., Yamanaka, M., and Okumura, H., Functional expression of recombinant human macrophage beta-glucan receptor dectin-1 using baculovirus-silkworm expression system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1203-1205 (2014). 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2014.915734.

佐藤喬洋, 佐久間梨央, 塩谷乃理子, 福島英晃, 氏田 稔, 奥村裕紀, ニワトリ ZP 糖タンパク質の ZP domain N 末端隣接領域に対するポリクローナル抗体の作製. 名城大総研総学研論文集 13, 27-33 (2014). 査読有

[学会発表](計12件)

安藤 郷・由良裕城・丸山和志・高味聖周・都島万喜・野田沙樹・堀 公法・奥村裕紀・氏田 稔 (2015) グルカン認識タンパク質の結合アッセイ系の確立. 平成 27 年度日本食品科学工学会中部支部大会, 12月5日, 名古屋

伊豫田健・古橋達也・丹羽 将・會田好希・牧野 豊・奥村裕紀・氏田 稔 (2015) キチン認識タンパク質の結合アッセイ系の確立. 平成 27 年度日本食品科学工学会中部支部大会, 12月5日, 名古屋

渋川弘貴・中村友也・小出祐子・奥村裕紀・氏田 稔 (2015) TRPV1 のカプサイシン結合部位の同定に関する研究. 平成 27 年度日本食品科学工学会中部支部大会, 12月5日, 名古屋

奥村裕紀・佐藤喬洋・佐久間梨央・福島英晃・松田 幹・氏田 稔 (2015) ニワトリ ZP 糖タンパク質のドメイン間相互作用の解明と卵膜構造モデルの構築. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会), 12月3・4日, 神戸

佐久間梨央・岩本英莉・栗山 亘・西尾俊亮・松田 幹・氏田 稔・奥村裕紀 (2015) 単一遺伝子にコードされたニワトリ ZP3 の各アイソフォームにおける多様なアミノ酸置換の同定. BMB2015 (第 38

回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会), 12 月 1 日, 神戸

岩本英莉・佐久間梨央・栗山 亘・松田幹・氏田 稔・奥村裕紀 (2015) ZP3 アイソフォームが卵膜マトリックスの分子構造へ及ぼす影響の研究. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会), 12 月 1 日, 神戸

栗山 亘・佐久間梨央・岩本英莉・松田幹・氏田 稔・奥村裕紀 (2015) ニワトリ卵膜を構成する糖タンパク質 ZP1 の血液中における存在状態の解析. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会), 12 月 1 日, 神戸

小原章裕・高谷芳明・氏田 稔・堀池愛一・日坂真輔・湊健一郎・能勢充彦 (2015) 春日井サボテンに含まれる生理活性の検索. 日本食品科学工学会第 62 回大会, 8 月 29 日, 京都

佐久間梨央・佐藤喬洋・西尾俊亮・松田幹・氏田 稔・奥村裕紀 (2015) 脊椎動物卵膜形成機構の解明に向けたニワトリ ZP 糖タンパク質の存在形態に関する研究. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 3 月 28 日, 岡山

佐藤喬洋・佐久間梨央・松田 幹・氏田 稔・奥村裕紀 (2014) 鳥類卵膜マトリックスにおける ZP 糖タンパク質のドメイン間相互作用と卵膜形成機構の研究. 第 87 回日本生化学会大会, 10 月 16・17 日, 京都

佐藤喬洋・福島英晃・氏田 稔・奥村裕紀 (2014) 組換えタンパク質を利用したニワトリ卵膜マトリックス形成機構の解析. 日本農芸化学会 2014 年度大会, 3 月 29 日, 川崎

福島英晃・佐藤喬洋・今友里恵・氏田 稔・奥村裕紀 (2013) ZP1-ZP3 のドメイン間相互作用解析に基づくニワトリ卵膜形成機構の研究. 第 86 回日本生化学会大会, 9 月 11 日, 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

氏田 稔 (UJITA, Minoru)

名城大学・農学部・教授

研究者番号: 5 0 3 4 0 2 9 5