様 式 Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９ （共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年 　６ 月 　３ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2014
課題番号：２６６７０２１３

研究課題名（和文）新たな病原体特異性を有するレクチン受容体ヘテロ二量体の戦略的探索

研究課題名（英文）Analyses on the heterodimer formation between different C-type lectin receptors

研究代表者
山崎　晶（Yamasaki, Sho）

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：４０３１２９４６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：結核菌のアジュバント活性を担うC型レクチン受容体MincleとMCLがヘテロ二量体を形成し、相互に細胞表面発現を上昇させると共に、タンパク安定化を促すことで、リガンドに対する応答を増強することを明らかにした。一般的にレクチン受容体はリガンド親和性が弱いため、同種受容体の凝集によってavidityを増大させる仕組みが見受けられる。今回見出したヘテロ二量体は、親和性の低い受容体が、生物学的に意味のある結合力を確保する上での新たな戦略と考えられる。また、この異なるレクチン受容体によるヘテロ二量体の形成によって、認識する病原体の多様性が広がることも期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrate that MCL interacts with Mincle to promote its surface expression. After LPS or zymosan stimulation, MCL-deficient bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) had a lower level of Mincle protein expression. Meanwhile, BMDCs from MCL transgenic mice showed an enhanced level of Mincle expression on the cell surface. MCL was associated with Mincle through the stalk region and this region was necessary and sufficient for the enhancement of Mincle expression. This interaction appeared to be mediated by the hydrophobic repeat of MCL, as substitution of four hydrophobic residues within the stalk region with serine (MCL(4S)) abolished the function to enhance the surface expression of Mincle. MCL(4S) mutant failed to restore the defective TDM responses in MCL-deficient BMDCs. These results suggest that MCL positively regulates Mincle expression through protein-protein interaction via its stalk region, thereby magnifying Mincle-mediated signaling.

研究分野：免疫学

キーワード：C型レクチン　結核菌　自然免疫　パターン認識受容体

１．研究開始当初の背景

レクチン受容体の研究は、ここ数年で著しい進展を遂げてきた。特に、病原体を直接認識するレクチン受容体の発見において本邦の寄与は大きく、我が国が世界をリードしている数少ない分野の１つである。申請者らは、レクチン受容体に属する Mincle、MCL が、それぞれ結核菌や病原性真菌特有の構造を認識する重要な受容体であることを相次いで明らかにしてきた（Yamasaki, ***Nat. Immunol.*** 2008; Yamasaki, ***PNAS.*** 2009; Ishikawa, ***J. Exp. Med.*** 2009; Ishikawa, ***Cell Host Microbe*** 2013; Miyake, ***Immunity*** 2013）。また、ごく最近 Mincle、MCL の結晶構造解析に成功し、糖脂質リガンドを認識するユニークな特性を説明する構造基盤を解明した（Furukawa, ***PNAS.*** 2013）。

これらのレクチン受容体の研究は、これまで個別のレクチンを対象として実施されてきた。ところが申請者らは本年、C 型レクチン Mincle と MCL がヘテロ二量体を形成する可能性を初めて示した（Miyake, ***Immunity*** 2013）。その後、異なるレクチン受容体がヘテロ二量体を形成し得る可能性が相次いで報告された（Xhu, ***Immunity*** 2013; Lobato-Pascual, ***Eur. J. Immunol.*** 2013）。こうした最新の知見は、レクチン受容体が異なるレクチン受容体分子と二量体を形成することにより、単体ではなし得ない、新たな機能を発揮できる可能性を予想させるものである（図１）。一方、生体防御応答を適切にコントロールする必要があり、これらのヘテロ二量体形成には、無秩序な会合を防ぐための一定の特異性が存在するはずである。ところが、この複合体形成の分子機構、会合する受容体の特異性、付与される新たな機能、に関しては全く解っていない。

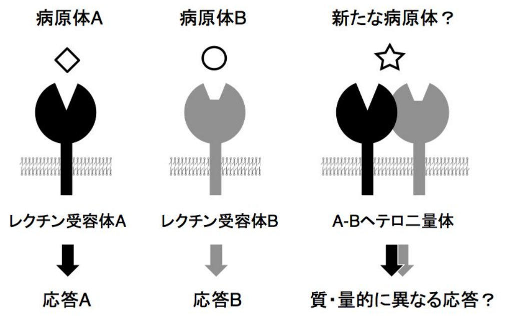

図１　レクチン受容体ヘテロ二量体仮説

２．研究の目的

近年、レクチン受容体が、病原体センサーとして重要な受容体ファミリーであることが明らかとなってきた。ここ数年の間に多くの病原体リガンドが発見されてきたが、我が国はこの分野で中心的な役割を担っており、申請者らもその進展に貢献してきた。これらの受容体は、１種類のレクチン受容体が単体でリガンドを認識するという前提のもとに解析が進められてきたが、本年、申請者らは、レクチン受容体が他のファミリー分子とヘテロ二量体を形成し、新たな機能的受容体として働く可能性を示唆する結果を得た。本研究は、未だ確立されていないこの概念に着目し、全ての組み合わせを発現する細胞ライブラリーを構築することによって、「新たな病原体特異性を持つレクチン受容体ヘテロ二量体」を戦略的に同定することを目的としたものである。

３．研究の方法

ヒト、マウスの保存された遺伝子クラスターに存在する全てのⅡ型Ｃ型レクチン受容体遺伝子を、異なる薬剤耐性マーカーでレポーター細胞に導入し、２種類のレクチン受容体を全ての組み合わせでランダムに発現する「細胞ライブラリー」を樹立する。得られたバルクの細胞集団を、様々なリガンド候補（病原性細菌、真菌、病原体成分、受容体不

明なアジュバント）で刺激し、NFAT-GFP レポーターが陽性に転じた細胞を分取する。刺激→GFP 陽性分取のステップを繰り返して GFP 陽性細胞を濃縮した後、シングルセルソートを用いて GFP 陽性クローンを得る。リガンドへの反応性を獲得したクローンから mRNA を抽出し、発現しているレクチン受容体を RT-PCR を用いて同定する。２種類の受容体が同定された場合は、単一受容体での反応性、受容体同士の物理的会合を個別に検討し、機能的ヘテロダイマーであることの確証を得る。

４．研究成果

結核菌のアジュバント活性を担うＣ型レクチン受容体 Mincle（Clec4e）と MCL（Clec4d）がヘテロ二量体を形成し、相互に細胞表面発現を上昇させると共に、タンパク安定化を促すことで、リガンドに対する応答を著しく増強することを明らかにした（Miyake, ***J. Immunol.*** 2015）。一般的にレクチン受容体はリガンド親和性が弱いため、同種受容体の凝集によって多価複合体を形成し、avidity を増大させる仕組みが見受けられる。今回見出したヘテロ二量体は、親和性の低い受容体が、生物学的に意味のある結合力を確保する上での新たな戦略と考えられる。また、この異なるレクチン受容体によるヘテロ二量体の発見によって、認識する病原体の多様性が広がり、病原体-宿主間の相互作用のメカニズムと生体応答が明らかになっていくと期待される。

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 17 件）

①Miyake Y, Oh-Hora M, Yamasaki S. C-Type lectin receptor MCL facilitates Mincle expression and signaling through complex formation. ***J Immunol.*** 査読有, 194(11): 5366-5374, 2015.
doi: 10.4049/jimmunol.1402429.

②Motomura Y, Kanno S, Asano K, Tanaka M, Hasegawa Y, Katagiri H, Saito T, Hara H, Nishio H, Hara T, Yamasaki S. Identification of pathogenic cardiac CD11c+ macrophages in Nod1-mediated acute coronary arteritis. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol.*** 査読有, 25(6): 1423-1433, 2015.
doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304846.

③van der Peet PL, Gunawan C, Torigoe S, Yamasaki S, Williams SJ. Corynomycolic acid-containing glycolipids signal through the pattern recognition receptor. ***Mincle. Chem Commun (Camb).*** 査読有, 51(24):5100-5103. 2015.
Doi: 10.1039/c5cc00085h.

④Wilson GJ, Marakalala MJ, Hoving JC, van Laarhoven A, Drummond RA, Kerscher B, Keeton R, van de Vosse E, Ottenhoff TH, Plantinga TS, Alisjahbana B, Govender D, Besra GS, Netea MG, Reid DM, Willment JA, Jacobs M, Yamasaki S, van Crevel R, Brown GD. The C-type lectin receptor CLECSF8/CLEC4D is a key component of anti-mycobacterial immunity. ***Cell Host Microbe.*** 査読有, 17(2):252-259. 2015.
Doi: 10.1016/j.chom.2015.01.004.

⑤Kanno S, Nishio H, Tanaka T, Motomura Y, Murata K, Ihara K, Onimaru M, Yamasaki S, Kono H, Sueishi K, Hara T.　Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates

atherogenesis in Apoe-/- mice. ***J Immunol.*** **査読有**, 194(2):773-780. 2015.
doi: 10.4049/jimmunol.1302841.

⑥Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Matsumura K, Matsumoto I, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Kanno E, Tachi M, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K. Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with Cryptococcus neoformans. ***Infect Immun.*** **査読有**, 83(2):671-681. 2015.
doi: 10.1128/IAI.02835-14.

⑦Behler F, Maus R, Bohling J, Knippenberg S, Kirchhof G, Nagata M, Jonigk D, Izykowski N, Mägel L, Welte T, Yamasaki S, Maus UA. Macrophage-inducible C-type lectin Mincle-expressing dendritic cells contribute to control of splenic Mycobacterium bovis BCG infection in mice.
Infect Immun. **査読有**, 83(1):184-196. 2015.
doi: 10.1128/IAI.02500-14.

⑧Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yamasaki S. 3-O-sulfo-β-D-galactose moiety of endogenous sulfoglycolipids is a potential ligand for immunoglobulin-like receptor LMIR5. ***Mol Immunol.*** **査読有**, 63(2):595-599. 2015.
doi: 10.1016/j.molimm.2014.07.023.

⑨Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. ***Nat Commun.*** **査読有**, 5:4982. 2014.
doi: 10.1038/ncomms5982.

⑩Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. ***Immunity.*** **査読有**, 41(3):402-413. 2014.
doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.005.

⑪Nakagawa Y, Sakuma T, Nakagata N, Yamasaki S, Takeda N, Ohmuraya M, Yamamoto T. Application of oocyte cryopreservation technology in TALEN-mediated mouse genome editing. ***Exp Anim.*** **査読有**, 63(3):349-355. 2014.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077765

⑫Giordano M, Roncagalli R, Bourdely P, Chasson L, Buferne M, Yamasaki S, Beyaert R, van Loo G, Auphan-Anezin N, Schmitt-Verhulst AM, Verdeil G. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. ***Proc Natl Acad Sci USA.*** **査読有**, 111(30):11115-11120. 2014.
doi: 10.1073/pnas.1406259111.

⑬Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yamasaki S. LMIR5 extracellular domain activates myeloid cells through toll-like receptor 4. ***Mol Immunol.*** **査読有**, 62(1):169-177. 2014.
doi: 10.1016/j.molimm.2014.06.012.

⑭Hattori Y, Morita D, Fujiwara N, Mori D, Nakamura T, Harashima H, Yamasaki S, Sugita M. Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, Mincle. ***J Biol Chem.*** **査読有**, 289(22): 15405-15412. 2014.
doi: 10.1074/jbc.M114.566489.

⑮Kawai Y, Ouchida R, Yamasaki S, Dragone L, Tsubata T, Wang JY. LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular CD3ζ but not of cell surface CD3ζ. ***Immunol Cell Biol.*** 査読有, 92(6):527-534. 2014.
doi: 10.1038/icb.2014.18.

⑯Roncagalli R, Hauri S, Fiore F, Liang Y, Chen Z, Sansoni A, Kanduri K, Joly R, Malzac A, Lähdesmäki H, Lahesmaa R, Yamasaki S, Saito T, Malissen M, Aebersold, R, Gstaiger M, Malissen B. Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. ***Nat Immunol.*** 査読有, 15(4):384-392. 2014.
doi: 10.1038/ni.2843.

⑰Toyonaga K, Miyake Y, Yamasaki S. Characterization of the receptors for mycobacterial cord factor in Guinea pig. ***PLoS One.*** 査読有, 9(2):e88747. 2014.
doi: 10.1371/journal.pone.0088747.

〔学会発表〕（計 14 件）

①Sho Yamasaki, Regulation of immune responses through C-type lectin receptors. The 6th International Symposium of IFReC, 2015. 2/23-24, Grand Front Osaka, Osaka.

②Sho Yamasaki, Recognition of fungal pathogens by C-type lectin receptors. Gordon Research Conferences 2015 Immunology of Fungal Infections, 2015, 1/18-23, Galveston, USA.

③山崎　晶, 損傷自己組織の認識と慢性炎症. 第43回日本免疫学会学術集会オーバービュートーク, 2014, 12/10-12, 国立京都国際会館, 京都.

④山崎　晶, アジュバントの認識と免疫応答. 第43回日本免疫学会学術集会アフィメトリクスランチョンセミナー, 2014, 12/10-12, 国立京都国際会館, 京都.

⑤山崎　晶, レクチン受容体による糖脂質認識と免疫応答. 第12回日本糖鎖科学コンソーシアム(JCGG)シンポジウム, 2014, 12/4-5, 東京医科歯科大学鈴木章夫記念講堂, 東京.

⑥山崎 晶, 結核菌を認識する受容体と免疫応答. 感染症研究グローバルネットワークフォーラム2014 , 2014, 11/15, 千葉大学医学部記念講堂, 千葉.

⑦山崎　晶，細胞死に伴って放出される内因性アジュバントの同定，新学術領域研究「細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明」キックオフシンポジウム，2014, 11/13，東京大学山上会館，東京.

⑧Sho Yamasaki, Recognition of mycobacterial adjuvants through C-type lectin receptors. 8th Vaccine and ISV Congress, 2014, 10/26-28, Philadelphia, USA.

⑨Sho Yamasaki, Immune responses against glycolipids through C-type lectin receptors. 第87回日本生化学会大会，2014, 10/15-18，国立京都国際会館，京都.

⑩Sho Yamasaki, Immune regulation through C-type lectin receptors. Novo Nordisk Innovation Summit, 2014, 10/1-2, 東京大学医科学研究所, 東京.

⑪ Sho Yamasaki, Recognition of bacterial adjuvants through C-type lectin receptors. 第13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2014, 9/23-26, 奈良県新公会堂, 奈良.

⑫Sho Yamasaki, Adjuvant recognition through C-type lectin Receptors. 2014 Cold Spring Harbor Asia Conference on Frontiers of Immunology in Health and Diseases, 2014, 9/2-6, Suzhou, China.

⑬山崎晶, Immune responses to pathogens through C-type lectin receptors. International Symposium of the Institute Network, 2014, 6/19-20. 大阪大学, Osaka.

⑭Sho Yamasaki, Adjuvant recognition through C-type lectin receptors. The 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2014, 6/2-3, 神戸商工会議所, Kobe.

〔産業財産権〕
○出願状況（計１件）

名称：Adjuvant
発明者：山崎　晶
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2014-173066
出願年月日：2014 年 8 月 27 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/molimm/

６．研究組織
(1)研究代表者
　山崎　晶（YAMASAKI, Sho）
　九州大学・生体防御医学研究所・教授
　研究者番号：40312946