【解説】

結核菌を認識する新たなC型レクチンの同定

山崎 晶

レクチンは一般に糖を認識するタンパク質の総称である。そのファミリーは多岐にわたり、さまざまな種でさまざまな機能が報告されているが、近年免疫受容体としてのレクチン受容体が注目されるようになってきた。本稿では、結核菌を認識する新たなC型レクチン受容体 Mincle について概説するとともに、免疫受容体としてのレクチンの戦略に関しても議論したい。

はじめに

結核は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染によって引き起こされる脅威の感染症である。近年、若年者の感染や多剤耐性結核集団感染の報道も記憶に新しく、1999年には当時の厚生省から「結核はもはや過去の病気ではない」という結核緊急事態宣言が発表されるに至っている。われわれ宿主は結核菌を攻撃するさまざまな仕組みをもっているが、一方で結核菌はそれ以上にわれわれの攻撃を回避する戦術を身につけている。いまだに世界人口の約1/3が感染している実状を考えると、結核菌と宿主との攻防は依然として宿主に分が悪いとも

考えられる。結核菌認識受容体としては、Toll様受容体 (TLR) などの関与が報告されているものの、宿主の結核菌認識に関してはまだまだ不明なメカニズムが多く、その全貌の解明が望まれている。

Mincleは結核菌を認識する

筆者らは新たな免疫受容体を探索する過程で、ストレスに伴って著しく発現が誘導される Macrophage inducible C-type lectin (Mincle)⁽¹⁾ に注目した。Mincleは糖鎖認識領域を細胞外に有する膜貫通分子で細胞内領域に特別なモチーフは認められなかったが、活性化シグナルを伝達するアダプター Fcγ と会合して活性化受容体として働くことがわかった⁽¹⁾ (図1)。その後Mincleが損傷自己や病原性真菌を認識することが判明し、自己、非自己、双方に起因する生体の「危機」を察知するような受容体であることがわかってきた^(2,3)。そこで、Mincleのリガンド認識をNFAT-GFPの蛍光で検出できるようなレポーター細胞を作製し、さらに病原性細菌についても探索を進めた。その結果、結核菌と共培養したときにGFPが強く誘導されることが判明し、Mincleが結核菌

Identification of Novel C-type Lectin Receptor for Mycobacteria
Sho YAMASAKI, 九州大学生体防御医学研究所分子免疫学分野

図1 ■ Mincleの構造

CRD (carbohydrate recognition domain) を有するII型膜タンパク質で、膜貫通領域でシグナルサブユニットであるFcRγ 鎖と会合し、ITAMを介して活性化シグナルを伝達する。

を認識することが明らかとなった⁽⁴⁾。

では、Mincleは、結核菌のどのようなコンポーネントを認識しているのでしょうか。結核菌はさまざまな成分に覆われているため、さまざまな溶媒で菌体进行处理し、可溶性画分、不溶性画分についてレポーター細胞で活性の追跡を進めた。まず、菌体の活性はクロロホルム-メタノール (C:M) 処理により消失し、またC:M可溶性画分に活性が抽出されることが判明した。このことから、結核菌に存在するMincleリガンドは脂溶性物質であることが推察された。そこで、この画分をさらに薄相クロマトグラフィーで展開し、移動度ごとに回収した画分を再度抽出してレポーターアッセイに供した結果、一つのスポットに強い活性ピークが検出された。このスポットは、オルシノール染色と呼ばれる糖を検出する方法で紫色を呈したことから、リガンドは、「糖」か

図2 ■ Mincle リガンド活性画分の精製

クロロホルム-メタノール (C:M) をTLCで展開し、オルシノール染色を施した (左図)。各画分を抽出し、Mincle発現レポーター細胞でリガンド活性を測定した (右図)。

つ「脂質」、すなわち糖脂質であろうと予想された (図2)。 R_f 値より、結核菌が有する糖脂質のなかでトレハロースジミコール酸 (trehalose 6,6-dimycolate; TDM) が有力な候補と考えられた。実際、市販の精製TDMはTLC上で同様な挙動を示したことから、レポーター細胞で活性を調べたところ、Mincleリガンドであることが判明した。

TDMは、図3のように結核菌の細胞壁に存在するユニークな糖脂質である。50年以上前から、結核菌の脂溶性成分の一種が、非常に強い免疫賦活活性を有することが知られていた⁽⁵⁾。この画分はコードファクターと呼ばれていたが、後に構造決定され、TDMであることが判明した。

では、MincleはTDM応答に必要な不可欠な受容体なのだろうか。マクロファージをTDMで刺激すると、大

図3 ■ TDMの構造 (左図)、結核菌上のTDMの局在 (右図)

図4 ■ TDMを静脈内投与したマウス肺のHE染色図

肉芽腫形成はMincle欠損マウスでは認められない。

量の炎症性サイトカインや殺菌に働く一酸化窒素 (NO) が産生されるが、Mincle欠損マクロファージではこれらの応答が完全に消失した。 *in vivo* でTDMをマウスに静注すると、肺に結核に類似した肉芽腫が形成されることが知られている。肉芽腫は炎症細胞の集積を伴う組織の過形成であり、菌を封じ込める生体応答であると考えられている。ところが、Mincle欠損マウスではこの肉芽腫形成が全く起こらないことが判明した。すなわち、Mincleは、TDMによる自然免疫応答に必要な不可欠な受容体であり、さらに肉芽腫形成を誘導するユニークな機能を有することが明らかとなった⁽⁴⁾ (図4)。肉芽腫形成を伴う原因不明の疾患 (サルコイドーシス、ウェグナー肉芽腫症など) へのMincleの関与も興味をもたれるところである。

もう一つのMincleの特徴は、その発現パターンである。通常Mincleの発現はほとんど検出できないが、リ

ガンドのTDM刺激によって強く誘導される。このことは、恒常的に発現し、TDMに反応してMincleの誘導に寄与する新たな分子の存在を予測させる。実際、筆者らはごく最近、Mincleとは異なるC型レクチンが、恒常的に発現するTDM受容体として働き、Mincleの速やかな誘導を促していることを見いだした⁽⁶⁾。このように、結核菌を認識するさまざまなC型レクチン受容体が次々と見つかってきており、強力な病原体に対抗するために宿主が遺伝子重複と分子進化を繰り返してきた経緯が推察される。

獲得免疫とアジュバント

Mincleが結核菌TDMを認識して自然免疫応答を惹起することがわかってきた。ところが、結核菌は宿主の感染に伴い、TDMをGMM (glucose mono mycolate) に

図5 ■ 結核菌感染に伴う糖脂質の変換と宿主免疫応答

変換することがわかってきた⁽⁷⁾。このGMMはMincleの認識が減弱したことから、結核菌のMincleからのescapeの機構であろうと考えられる。興味深いことにこのGMMはCD1分子に提示され、ある種のT細胞の抗原になりうる、すなわち獲得免疫を活性化できることが知られている⁽⁸⁾ (図5)。TDMは古くから、獲得免疫応答を高める「アジュバント」活性を有することが知られ、がんやウイルス感染に対する獲得免疫を活性化させるツールとして研究が進められてきた。Mincleは、結核菌の自然免疫からのescapeに対抗して、獲得免疫によって逆襲を仕掛ける役割をもっているのかもしれない。マウスにTDMとともにタンパク質抗原(卵白アルブミン;OVA)で免疫すると、1週間後にOVA単独でチャレンジした際に顕著な抗原特異的抗体産生が誘導された。獲得免疫が効率よく発動していることを意味する。ところが、Mincle欠損マウスにおいては、この抗体産生が顕著に失われた。Mincleは結核菌に対する獲得免疫にも重要な役割をもっていることが判明した。

TDMの強力なアジュバント活性から、受容体不明なまま、新たな合成アジュバントとしてのアナログの合成展開も精力的に進められてきた。これらの化合物のなかに、強い活性を保持し、臨床でもCAF01としてワクチンアジュバントとして用いられている trehalose dibehenate (TDB) が知られている。筆者らはこのTDBもやはりMincleを介して作用していることを明らかにした⁽⁴⁾。

このように、結核菌に対する生体防御機構の解明は、新たな免疫賦活法の創成という領域にも重要な知見を供給するものと期待される。

免疫受容体としてのレクチン

免疫受容体は、大きく自然免疫と獲得免疫の2種類に大別される(図6)。このうち自然免疫に寄与する受容体は、Toll様受容体(Toll-like receptor), NOD様受容体(Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor; NLR), RLR(RIG-I-like receptor)がよく知られている。これらは数種の受容体で病原体に存在する普遍的なパターンを認識することで、あらゆる病原体に対処できることが知られている。一方、獲得免疫受容体は、受容体遺伝子そのものが再構成されることによっておびただしい多様性を造り出し、その数は 10^{14} とも試算されている。すなわち、多様な受容体が特異的な抗原を認識することで、免疫応答の特異性を造り出しているのである。これに対して、C型レクチン受容体(C-type lectin receptor; CLR)のファミリーも自然免疫受容体として重要であることがわかってきた⁽⁹⁾。CLRは遺伝子再構成こそできないものの、遺伝子重複を繰り返してゲノム上にクラスターを形成し、比較的大きい多様性を獲得している。すなわち、上記の自然免疫受容体、獲得免疫受容体の丁度中間的な位置づけに当たる戦略で、中程度の多様性と特異性を兼ね備えることで独特な役割を担ってきたのではないかと考えられる。実際、CLRは、さまざまなリガンドを比較的大く認識することが明らかになってきている(図7)。近年、CLRのなかに、異なるリガンド認識を適切な応答に変換する獲得免疫受容体特有のモチーフ、ITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)を用いてシグナルを伝達するものが見つかっていることもこのことを支持するものと考えられる。

CLRの広い認識特異性は、レクチン特有のその結合

図6 ■ 多様な外敵に対するさまざまな免疫受容体

図7 ■ ITAM共役C型レクチン受容体とそのリガンド

親和性の弱さに起因するのかもしれない。弱い認識が広い認識特異性を可能にしている例はほかのタンパク質相互作用においても見受けられる。多くのC型レクチンには、分子内／分子間で多量体化を促すような仕組みが備わっているが、それはおそらく弱い認識で十分な応答を惹起しうるだけのシグナルを確保するためであろうと考えられる。その方式は、紙よりのように束ねて12量体を形成する collagen-like domain, ねじれた疎水結合により3量体を形成する heptad repeat (3量体), 2量体化にかかわるS-S結合, など多岐にわたるが、それぞれ親和性 (affinity) を価数 (valency) で補い, 1分子では閾値に達しない弱いシグナルの増幅に寄与していると考えられる。

興味深いことにMincleには今のところこのような多量体化にかかわる配列は見つかっていない。実際, TDMやTDBは直接加えても刺激は入らず, *in vitro*, *in vivo* で刺激するのはプレートに固相化したり, エマルジョンを作ることが必要である。このことから, Mincleは多量体リガンドを認識することで初めて細胞表面で多量体を形成し, シグナルが伝達されるのではないかと考えられる。結核菌の菌体表層など, リガンドが多量体化している対象のみに対して応答し, 宿主に多く存在する類似の糖脂質への誤作動を防ぐような, いわば「自己」「非自己」の識別に寄与するメカニズムの一つであるかもしれない。

おわりに

以上, 新たな免疫受容体としてのC型レクチンに関し

て概説した。その多くは機能未知のままであるが, 本稿で紹介したように機能解析, リガンド探索の方法論がほぼ確立されてきたことから, 今後の研究の進展が大いに期待される。自然免疫と獲得免疫の中間に位置するファミリー「レクチン受容体」が担う生体防御機構に関する緻密な各論の解析が, 宿主免疫戦略の全体像の理解につながっていくことを期待したい。

文献

- 1) M. Matsumoto, T. Tanaka, T. Kaisho, H. Sanjo, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins & S. Akira : *J. Immunol.*, **163**, 5039 (1999).
- 2) S. Yamasaki, E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Hara, K. Ogata & T. Saito : *Nat. Immunol.*, **9**, 1179 (2008).
- 3) S. Yamasaki, M. Matsumoto, O. Takeuchi, T. Matsuzawa, E. Ishikawa, M. Sakuma, H. Tateno, J. Uno, J. Hirabayashi, Y. Mikami *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 1897 (2009).
- 4) E. Ishikawa, T. Ishikawa, Y. S. Morita, K. Toyonaga, H. Yamada, O. Takeuchi, T. Kinoshita, S. Akira, Y. Yoshikai & S. Yamasaki : *J. Exp. Med.*, **206**, 2879 (2009).
- 5) M. Yamaguchi, Y. Ogawa, K. Endo, H. Takeuchi, S. Nakamura, S. Yasaka & Y. Yamamura : *Kekkaku*, **33**, 12 (1958).
- 6) Y. Miyake, K. Toyonaga, D. Mori, S. Kakuta, Y. Hoshino, A. Oyamada, H. Yamada, K. Ono, M. Suyama, Y. Iwakura *et al.* : *Immunity*, in press.
- 7) I. Matsunaga, T. Naka, R. S. Talekar, M. J. McConnell, K. Katoh, H. Nakao, A. Otsuka, S. M. Behar, I. Yano, D. B. Moody & M. Sugita : *J. Biol. Chem.*, **283**, 28835 (2008).
- 8) D. B. Moody, T. Ulrichs, W. Mühlecker, D. C. Young, S. S. Gurcha, E. Grant, J. P. Rosat, M. B. Brenner, C. E. Costello, G. S. Besra *et al.* : *Nature*, **404**, 884 (2000).
- 9) M. J. Robinson, D. Sancho, E. C. Slack, S. LeibundGut-Landmann & C. Reis e Sousa : *Nat. Immunol.*, **7**, 1258 (2006).

プロフィール

山崎 晶 (Sho YAMASAKI)

＜略歴＞1993年京都大学大学院修士課程
農学研究科食品工学専攻修了／同年三菱化
成総合研究所／1999年千葉大学医学部助
手／2004年理化学研究所上級研究員／
2009年より九州大学生体防御医学研究所
分子免疫学分野教授＜研究テーマと抱負＞
免疫受容体を介する自己・非自己の認識機
構＜趣味＞サッカー，登山