解説

川畑俊一郎

自己と非自己を見分ける 生体防御レクチン

抗体の多様性を利用できない無脊椎動物にとって、侵入する細菌に対する異物認識は、感染菌表層に存在する糖鎖を認識するレクチンと呼ばれる糖結合タンパク質によるところが大きい。これら生体防御レクチンの中には、細菌に特異的なものではなく、生物に普遍的に存在する単糖、あるいはその一部を認識するものがある。なぜ自己にも存在する糖を標的にして非自己を認識できるのであろうか。生体防御レクチンの糖結合の多価性とレクチンに複数存在する糖結合部位の距離に、その秘密が隠されている。

A Strategy to Distinguish between Self and Non-self by Lectins in the Innate Immune System
Shun-ichiro KAWABATA, 九州大学大学院理学研究科

脊椎動物の生体防御反応は、先天性免疫と後天性免疫から成り立っており、その複雑な免疫機構によって自己と非自己を識別し、異物排除を行なっている。たとえば、マクロファージや好中球は、侵入した細菌を異物として認識するとともに食作用により取り込み、抗菌物質を貯蔵している細胞内顆粒と融合させることで殺菌する。さらに、リンパ球の協力を得て多種多様の特異抗体を産生し、さらなる細菌の侵入に備えることも可能である。一方、無脊椎動物では、食細胞は存在するものの、抗体産生系が欠除しているために、レクチンや抗菌性タンパク質^(1,2)、フェノールオキシダーゼ系⁽³⁾などの先天性免疫が感染防御の主役となる。先天性免疫の分子認識の標的は、感染菌表層に存在する特有の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns) とされ、それを認識するタンパク質はパターン認識受容体 (pattern-recognition receptors) と呼ばれる⁽⁴⁻⁶⁾。パターンとは、無秩序やランダムとは異なる整然とした一定の型をなす類型のことである。

カブトガニの生体防御

古生代に繁栄をきわめた三葉虫を先祖とするカブトガニは、現在は、北アメリカ東岸と中米ユカタン半島沿岸、アジア大陸の東南海域沿岸に計4種が分布し、九州北部沿岸には *Tachypleus tridentatus* が棲息している。分類学的には、節足動物門、節口綱、剣尾目に属し、エビ、カニなどの甲殻綱よりもクモ形綱に近縁である。

一般に甲殻類の体液には、顆粒細胞、小顆粒細胞、無顆粒細胞の3種の血球が含まれているが、*T. tridentatus* の体液中に存在する血球のほとんどは顆粒細胞で占められ、生化学的解析を行なう上で大きな利点となっている。その顆粒細胞内には、大・小2つの顆粒があって、体液凝固因子、プロテアーゼインヒビター、レクチン、抗菌ペプチドなどが選択的に貯蔵されており、アミノ酸配列の判明しているものだけでも30を超える⁽¹⁾。カブトガニの顆粒細胞は、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharides; LPS) に鋭敏に反応して、体液の凝固をひき起こすとともに、様々な生体防御因子を細胞外へ放出することで、この動物の生体防御反応に深く関わっている^(1,7-9)。

生体防御に関わるカブトガニレクチン

筆者らのグループでは、カブトガニから精製したレクチンをタキレクチンと称して、精製の完了した順に番号

をつけており、名称自体にはレクチンの構造/機能上の意味はない。現在までに、顆粒細胞から4種のタキレクチンが精製されている。これらタキレクチンは、単糖に対する親和性は互いに異なっているが、グラム陰性菌やグラム陽性菌の細胞壁成分 (LPS やリポテイコ酸) の非自己成分を特異的に認識する。本稿では、タキレクチン-2 の糖鎖認識の分子機構を解説するとともに、非自己認識の機構について議論する。他のタキレクチンについては、原著および総説を参照されたい^(10~15)。

タキレクチン-2 の糖鎖認識のしくみ

1. タキレクチン-2 の性質⁽¹¹⁾

タキレクチン-2 は、単糖の中では、グルコースの2位の炭素に *N*-アセチル基が結合した *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に対する結合特異性が最も高く、ヒト A 型赤血球を特異的に凝集する。また、後述するように、糖結合にレクチン分子内の Trp 残基が関与しているため、リガンドと結合するとタキレクチン-2 の 330 nm における蛍光極大が 315 nm に青色シフトする。これを利用して GlcNAc に対する解離定数を求めると、0.051 mM である。タキレクチン-2 は、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) や *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc) も認識するが、それらに対する解離定数はそれぞれ 0.9 mM と 7.2 mM となって、親和性が大きく低下する。GlcNAc と GalNAc、および ManNAc の構造上の違いは、それぞれ4位、2位の炭素に結合している水酸基、*N*-アセチル基の立体配置のみである。また、タキレクチン-2 は、2糖である *N*-アセチルアロラクトサミン (Gal β 1 $\rightarrow$ 6GlcNAc) を GlcNAc と同等に認識するが、GlcNAc の4位の水酸基がグリコシド結合した *N*-

用語解説

レクチン (Lectin) : 植物種子、細菌、動物の体液や組織などに存在する糖結合性タンパク質。糖結合活性のある抗体はレクチンに含まれない。通常は、リガンドに対する結合価が2価以上で動植物細胞を凝縮させる活性をもつものをレクチンと定義するが、結合価が1価であってもレクチンと呼んだり、タンパク質分子内の糖結合ドメインをレクチンドメインと呼ぶ場合がある。ラテン語の legere (選び出す) に由来する。

先天性免疫 (Innate Immunity) : 自然免疫とも呼ばれ、すべての多細胞生物に先天的に備わっている細菌感染や異物に対する抵抗性。後天的免疫 (acquired immunity) が B および T リンパ球系を介した体細胞突然変異に基づく抗体の多様性を利用し、その発現に数週間を要するのに比べて、先天性免疫に関与するタンパク質群は生殖細胞系列 (germ line) にコードされており、異物侵入前にすでに体内に存在しているか、あるいは異物侵入後の数時間内に誘導される。

アセチラクトサミン (Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc) に対しては親和性を示さない。したがって、タキレクチン-2 の糖認識には、GlcNAc の2位の *N*-アセチル基と4位の水酸基が深く関わっていることがわかる。

血球凝集を示す多価性のレクチンは、水溶液中では多量体を形成している場合がほとんどであるが、タキレクチン-2 は、超遠心分析により単量体で存在していることが示されている。

2. タキレクチン-2 の一次構造⁽¹¹⁾

タキレクチン-2 は 236 残基からなる単純タンパク質で、その一次構造的特徴は、分子全体が47残基からなる5回の繰り返し配列で構成されていることである (図1)。分子内にジスルフィド結合はなく、糖鎖やその

図1 ■ タキレクチン-2 の一次構造

矢印は各葉 I から V までの β -ストランドを示し、円柱はヘリックスを示す。

図 2 ■ タキレクチン-2 の 5 葉 β -プロペラ構造

左側：タキレクチン-2 のリボンモデル。GlcNAc はボール&スティックモデルで示してある。右側：タキレクチン-2 の空間充填モデル。表面の正電荷は青色で、負電荷は赤色で示してある。

図 3 ■ タキレクチン-2 のトンネル構造とその内部にある水分子で形成される正十二面体のかご

矢印は各葉の β -シート第 1 ストランドを示す。第 1 ストランドに保存されている Phe 残基の側鎖が水かごを取り囲んでいる。

他の修飾をまったく受けていない。繰り返し配列間の類似性は 49 から 60% と高く、特に DNW や GXGGW, FXFLFF といった配列は繰り返し配列に完全に保存されており、機能的あるいは構造的に重要な役割を果たしている。現在までのところ、タキレクチン-2 と有意な配列類似性を示すタンパク質やレクチンの報告はない。

図 4 ■ 第 4 葉の糖結合部位

酸素原子は赤色、窒素原子は青色、炭素原子は灰色、水分子は水色で示した。

3. タキレクチン-2 の立体構造の鳥瞰

マックスプランク研究所 (MPI, Martinsried) において、タキレクチン-2 の X 線結晶解析が行なわれた⁽¹⁶⁾。タキレクチン-2 の立体構造は、一次構造の 5 回繰り返し配列を反映し、5 葉 β -プロペラ構造 (five-bladed β -propeller structure) である (図 2)。 β -プロペラ構造をもつファミリーの中では、初めての 5 葉構造の報告となった。加えて、レクチン-リガンド複合体の構造解析から、それぞれのプロペラに 1 個の GlcNAc が結合してい

ることが判明した。わずか 236 残基からなる単量体レクチンに、5 つもの糖結合部位が存在すること自体驚きである。その見事な対称性にしばし見とれていただこう。直径 48 Å, 高さ 25 Å, 一辺 28 Å の正五角形トラスである。

それぞれの葉は、タンパク質分子の中心から外側に向かって W の文字を描くように進む逆平行の 4 本ストランド β -シートで構成されている。この β -シートは、5 葉間で構造的に同等である。葉を重ねた際の、すべてのアミノ酸残基の C α 座標の偏差は、0.46 Å (root-mean-square; r.m.s.) に過ぎない。第 3, 第 4 ストランド間に 1 個の 1 回転ヘリックスがある (図 1, 図 2)。各々の β -シートの第 1 ストランドは同心円上に並ぶため、結果的に五角形の中心に直径 7~8 Å のトンネルを形成する (図 3)。興味深いことに、このトンネル内で、水分子 20 個が集まって水素結合により正十二面体のかごを形作る。それは、一種のクラスレートハイドレート (clathrate hydrates) であるが、その中は空っぽでゲストは包接されていない。かごの機能は不明である。水かごは、トンネル内で第 1 ストランドに保存されている数多くの Phe 残基の側鎖で取り囲まれている。

4. タキレクチン-2 の糖鎖結合部位

タキレクチン-2 が単量体で存在していながら、多量体のレクチンと同様に血球凝集や細菌凝集活性を示すのは、1 分子に 5 つもの糖結合部位を備える多価性のために他ならない。5 つ存在する糖結合部位は、結晶中で構造的に同等であることがわかっている。糖結合部位は、各葉の連結部分 (β -シート第 1 ストランドと前葉の β -シート第 4 ストランドをつなぐ部分) と第 3, 第 4 ストランド間のループで形成されている (図 1, 図 2)。リガンドが結合してもタキレクチン-2 分子全体の構造にはほとんど変化はなく、タキレクチン-2 とタキレクチン-2/GlcNAc 複合体の構造を重ねると、偏差はわずか 0.18 Å (r.m.s.) である。したがって、リガンド結合の協調性 (cooperativity) はないと考えられる。

第 4 葉の糖結合部位を例にして、リガンド結合様式を詳細に説明してみよう (図 4)。 β -シート間の連結部では、Ser 131 の主鎖窒素が GlcNAc の 3 位および 4 位水酸基と、Gly 132 の主鎖カルボニル酸素が GlcNAc の 2 位窒素原子と、Trp 134 のインドール環窒素が GlcNAc の 3 位水酸基とそれぞれ水素結合する。また、Trp 134 のインドール環は GlcNAc の 2 位 *N*-アセチル基内のメチル基と疎水結合する。この Trp (および他の相当する位置にある Trp) とリガンドとの相互作用が、前述の青

色シフトの原因であろう。一方、第 3, 第 4 ストランド間ループでは、Asn 165 の主鎖カルボニル酸素が GlcNAc の 4 位水酸基と、Trp 169 の主鎖窒素および Leu 170 の主鎖窒素が GlcNAc の 2 位 *N*-アセチル基のカルボニル酸素と、それぞれ水素結合している。また、Val 129 と Asp 167 が 1 個の水分子を介して GlcNAc の 3 位水酸基と水素結合している。したがって、糖認識の際にはリガンドの 2 位 *N*-アセチル基、および 4 位水酸基に加えて、3 位水酸基も関わっていることが明白となった。

余談になるが、 α, β -GlcNAc 2 種の異性体混在下で複合体を形成させたにもかかわらず、タキレクチン-2 の 5 つの糖結合部位に結合していたのは、奇妙なことにすべて α 型 (1 位の水酸基の立体配置が axial) であった (図 4)。GlcNAc の β 型の 1 位の水酸基 (equatorial) に対して、Asn 168 の側鎖の立体障害がない限り、認識には影響がないはずである。メチル配糖体を用いた実験では、リガンドがメチル基の分だけかさ張っている影響は避けられないが、タキレクチン-2 の α -メチル-GlcNAc に対する親和性に比べて β -メチル-GlcNAc に対する親和性は極端に減少する (永井と川畑, 未発表)。

5. タキレクチン-2 の非自己認識機構

タキレクチン-2 の GlcNAc に対する厳格なリガンド特異性は立体構造的にも支持され、他に感染菌特異的なリガンドを考える必要はない。ところが、GlcNAc は生物に普遍的に存在する糖であり、決して感染菌表面に特異的にみられる糖成分ではない。それでは、なぜ自己にも存在する糖を標的にして非自己を認識できるのだろうか。カプトガニに豊富に存在する自己成分のキチンは、GlcNAc の $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合からなる重合体である。しかし、タキレクチン-2 は、キチンにはまったく親和性を示さない。一つは、非還元末端を除いて認識に重要な遊離の 4 位水酸基が存在しないためであろう。また、タキレクチン-2 の糖結合部位はいわゆる“おちょぼ口”であり、多糖鎖の途中に食らいつくほどは口が広くない。非還元末端の糖は認識できそうであるが、キチンのような直鎖の多糖体では、全体に占める非還元末端に存在する糖の割合が極端に小さくなる。たとえタキレクチン-2 が非還元末端を見つけたとしても、1 つの結合部位で安定に結合しているのは不可能に違いない。そこで、非還元末端の GlcNAc を表面に高密度にもつ分子が標的となる。

タキレクチン-2 の隣り合う結合部位間の距離は 25 Å (結合部位が分子の中心に少し近くなるため、五角形の 1 辺よりわずかに短い) および 40 Å である (図 5)。この距離は、 α -ヘリックスでは、4.6 から 7.4 回転の長さに

図 5 ■ タキレクチン-2 の非自己認識機構のモデル

だ円形はグラム陰性菌であれば LPS の O-抗原の繰り返し単位, グラム陽性菌であればリポテイコ酸の繰り返し単位を表わしている。繰り返し単位から糖鎖が分岐し、非還元末端に GlcNAc が存在している。

相等する。異物表面に非還元末端の GlcNAc がこの距離内に存在すれば、タキレクチン-2 の複数の結合部位により“多価”で認識されて安定な結合となる。グラム陰性菌の表層成分である LPS には、オリゴ糖の繰り返し単位からなる O-抗原と呼ばれる部分があり、グラム陽性菌の表層成分であるリポテイコ酸にもグリセロールリン酸の繰り返し単位がある。これら繰り返し単位には分岐糖鎖を含むものがあり、その非還元末端が GlcNAc であれば、タキレクチン-2 の格好の標的になるはずである (図 5)。タキレクチン-2 は、ある種の LPS に対して結合活性があり、グラム陽性菌を凝集するとともにその表層成分であるリポテイコ酸に結合する^(11,13)。事実、このグラム陽性菌のリポテイコ酸の繰り返し単位には、GlcNAc が結合している⁽¹⁷⁾。

ここで紹介したレクチンの多価性とリガンドの密度を利用した非自己認識に関する議論は、筆者らのグループだけのものではない。脊椎動物の多量体レクチンであるマンノース結合レクチンは、各サブユニットの糖結合部位が 53 Å の距離で存在し、感染菌表面の糖鎖の繰り返し単位を認識すると考えられている^(18,19)。

*

筆者の知る限り、多細胞動物に普遍的にみられる先天性免疫の非自己認識の分子機構を説明する仮説としては、パターン認識説を超えるものはない。感染菌表面に形成される特異的な構造パターンとはどのようなものであるのか、現実的な物質的基盤を明らかにするために、詳細な生体高分子、特に感染菌表面構造の 3 次元的な理

解が不可欠となる。パターン認識という魅力的な概念に潜む本質の解明は開始されたばかりである。

タキレクチン-2 の X 線結晶解析は、H.-G. Beisel, R. Huber, W. Bode (Max-Planck-Institute, Martinsried) 各氏、および岩永貞昭先生 (現九州大学名誉教授) との共同研究である。謝辞：本稿執筆の機会をお与え下さいました九州大学農学部の今泉勝己先生に感謝申し上げます。また、カプトガニ採集に御協力いただいた福岡市漁協の浜崎今津支所の方々にこの誌面をかりて感謝の意を表したい。本研究の一部は、文部省科学研究費および CREST の援助によった。

文献

- 1) S. Iwanaga, S. Kawabata & T. Muta : *J. Biochem. (Review)*, **123**, 1 (1998).
- 2) J.A. Hoffmann, J.-M. Reichhart & C. Hetru : *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 8 (1996).
- 3) K. Söderhall & L. Cerenius : *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 23 (1998).
- 4) C.A. Janeway Jr. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **54**, 1 (1989).
- 5) R. Medzhitov & C.A. Janeway Jr. : *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 4 (1997).
- 6) R. Medzhitov & C.A. Janeway Jr. : *Cell*, **91**, 295 (1997).
- 7) T. Muta & S. Iwanaga : *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 41 (1996).
- 8) 川畑俊一郎 : 生化学, **68**, 1523 (1996).
- 9) S. Kawabata, T. Muta & S. Iwanaga : “New Directions in Invertebrate Immunology”, ed. by K. Söderhall, S. Iwanaga and G. Vasta, SOS Publication, Fair Haven, 1996, p. 255.
- 10) T. Saito, S. Kawabata, M. Hirata & S. Iwanaga : *J. Biol. Chem.*, **270**, 14493 (1995).
- 11) N. Okino, S. Kawabata, T. Saito, M. Hirata, T. Takagi & S. Iwanaga : *J. Biol. Chem.*, **270**, 31008 (1995).
- 12) T. Saito, M. Hirata, S. Iwanaga & S. Kawabata : *J. Biol. Chem.*, **272**, 30703 (1997).
- 13) K. Inamori, T. Saito, D. Iwaki, T. Nagira, S. Iwanaga, F. Arisaka & S. Kawabata : *J. Biol. Chem.*, **274**, 3272 (1999).

- 14) S. Kawabata : *Biomedical Perspectives*, 7, 68 (1998).
- 15) S. Kawabata & S. Iwanaga : *Dev. Comp. Immunol.*, 23, 391 (1999).
- 16) H.-G. Beisel, S. Kawabata, S. Iwanaga, R. Huber & W. Bode : *EMBO J.*, 18, 2313 (1999).
- 17) G.J. Ruhland & F. Fiedler : *Arch. Microbiol.*, 154, 375 (1990).
- 18) W.I. Weis & K. Drickamer : *Structure*, 2, 227 (1994).
- 19) M.W. Tumer : *Immunology Today*, 17, 532 (1996).

酒とワインと-3

原産地呼称

様々な酒類にはそれぞれ有名な産地がある。日本酒なら灘、伏見、広島、新潟、意外にも南国の高知、ややマニアックなところで但馬とか、知名度は異なっても、日本全国でそれぞれ特徴的な酒が造られている。しかし、商売を考えると有名産地が有利であることは否めず、たとえばブランド力の弱い播州や泉州の酒を、灘の大手メーカーのブランドで発売すれば売りやすいということは誰しも考えつくであろう。

ワインでも同じことで、無名産地のワインをボルドーとして売れば売りに決まっている。フランスではこういう不正を防ぐために早くから法律が整備されていて、ある程度上等なワインは原産地呼称統制 Appellation d'Origine Contrôlée (以下 A.O.C.) などの規則に従ってつくられる。たとえば Bordeaux という A.O.C. ワインはジロンド県内の指定された区域のブドウでつくられたものに限られ、栽培法や成分、できたワインの成分・特徴などが細かく規定されている。さらにボルドーの中でも上等なワインができる地区や村では独自の A.O.C. が定められている。A.O.C. といっても数県にまたがる広範囲のものから、数十メートル四方の小さな畑だけに限られるものまで様々である。

いずれにせよ、これらは伝統ある名前を汚さぬため、領域、つくり方、ワインの特徴などを細かく定めたもので、この考え方はイタリアやスペインをはじめ、EU 各国に広がっている。

では日本酒はどうであろうか。清酒の原産地表示に関する法律などは存在しない。しかし業界の自主基準は以前からあり、たとえば灘のメーカーが別の地域の工場で作った酒に「灘の清酒」などと表示することは禁止されているようである。

最近、日本酒の世界でもワインの A.O.C. と同様の規定を作る動きが起り、ある業界団体が S.O.C. (Sake Origin

Control 原産地呼称日本酒)なるものを定めた。これは外国産清酒をブレンドした「日本酒」を防ぐためにつくられたとのことであるが、恐らくはワインのソムリエの入れ知恵で A.O.C. にこだわり、また理想を追い求めて厳しすぎる基準をつくったため、実際にはほとんど機能していない。

S.O.C. の酒は国内産の米を使用し、その地域内の水を使用して、その地域内で醸造・貯蔵する。さらに厳しい基準の T.S.O.C. (伝統的 S.O.C.) ではその地域の米しか使用してはならない。ここまでは至極もつともである。また、T.S.O.C. では酵素剤による糖化や液化仕込みは禁止されている。

問題なのは、「醸造アルコール、糖類、酸味料の添加の無きもの」、さらには精白歩合は 70 % 以下、あるいはもっと厳しい、つまり米の 3 割以上は捨てろということになっている(捨てなくても米粉を和菓子屋に売ればよいが)。これはいわゆる純米酒の規定である。純米酒はアル添しだけでなく、米を贅沢に使っているから高価なのであるが、実は純米酒は清酒の 5 % 程度しか造られておらず、現状では 95 % もの清酒がこの点で S.O.C. の資格がない。フランスの A.O.C. の地域内ではほとんどのワインが A.O.C. であることを考えると、S.O.C. はまったく清酒の実状を無視した規定であり、実際 S.O.C. 参加蔵元でも S.O.C. は生産量のごく一部にしか過ぎないのである。

また、新潟県の業界団体が N.O.C. なるものを定めた。これは T.S.O.C. と似たような規定である。地元でつくった規定なので多少は普及しているが、やはり多くの醸造元が対応できなかった。米の 3 割以上を捨てては採算が合わないという人が多い一方で、大吟醸には兵庫県産の山田錦が不可欠だという人もいて、いずれにせよ N.O.C. は新潟の大多数の酒の現状には合っていなかったのである。さらには N.O.C. マークなんかつけても売れるものではないという人までいては身も蓋もない。

ワインの真似をして難しく考えるからいけないのである。アル添の有無や精白の表示基準はすでにあるから、「内地産米 100%」とか、「○○県産米 100%」とかの表示基準から順に整備してゆけばよいと思うが如何? (本多忠親)