

moto, Y., Naito, M., Nishio, K., Hishida, A., Wakai, K., Asai, Y., Niwa, K., Kamakura, K., Nonoyama, S., Sakurai, Y., Hosooya, T., Kanai, Y., Suzuki, H., Hamajima, N. & Shinomiya, N. (2009) *Sci. Transl. Med.*, 1, 5ra11

豊原 敬文<sup>1,2</sup>, 阿部 高明<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>東北大学病院腎高血圧内分泌科,

<sup>2</sup>京都大学 iPS 細胞研究所,

<sup>3</sup>東北大学大学院医工学研究科分子病態医工学,

<sup>4</sup>東北大学医学系研究科病態液性制御学)

Analysis of transporter function and development to clinical application

Takafumi Toyohara<sup>1,2</sup> and Takaaki Abe<sup>1,3,4</sup> (<sup>1</sup>Division of Nephrology, Endocrinology, and Vascular Medicine, Department of Medicine Tohoku University Hospital, 1-1 Seiryochō, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan, <sup>2</sup>Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, <sup>3</sup>Division of Medical Science, Tohoku University Graduate School of Biomedical Engineering, <sup>4</sup>Department of Clinical Biology and Hormonal Regulation, Tohoku University Graduate School of Medicine)

## C型レクチンによる「異常自己」と「非自己病原体」の認識と意義

### 1. はじめに

T細胞受容体, B細胞受容体に代表される獲得免疫受容体は, 受容体遺伝子そのものが再構成することによって多様性を獲得し, 自己を含むあらゆる抗原に対処できるようなセットを備えている. さらに, この多様な受容体一つ一つが, 複数の抗原の違いを見分けて異なった細胞応答を惹起できる多能的な受容体であることも知られている. この能力を付与するのが, 複数のチロシン残基からなる特有の活性化モチーフ, ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) であると考えられている. リガンド認識に伴い ITAM はリン酸化され, 下流の分子をリクルートして多様な細胞応答が誘導される.

一方 Toll 様受容体 (TLR), RIG-I 様受容体 (RLR), Nod 様受容体 (NLR) に代表される自然免疫に関わる受容体は, 病原体が有する普遍的構造 PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) を認識する性質を持ち, その認識普遍性と引き換えに受容体の種類はあまり多くない.

近年, C型レクチンレセプター (CLR) も, PAMPs を

認識する自然免疫受容体として有用であることが分かって来た. C型レクチンは  $Ca^{2+}$  依存的に糖鎖を認識するタンパク質として知られ, 脊椎動物でも極めて大きなファミリーを形成している. その多くは遺伝子上でクラスターを形成しており, 獲得免疫受容体に見られる「遺伝子再構成」以前の戦略として「遺伝子重複」によってそれなりの多様性を獲得してきたことがうかがえる. 近年, C型レクチンの中にも, ITAM を介してシグナルを伝える分子が多く発見され, 多様性と多能性を兼ね備えた新たな自然免疫受容体ファミリーとも考えられるが, その多くのリガンドや機能は未だに不明である. 本レビューでは, 筆者らが最近見出した C型レクチン Mincle のリガンドの詳細と認識機構, 及びそれに起因する生理的意義に関して概説したい.

### 2. ストレスに伴って誘導されるレクチン Mincle

いくつかの C型レクチンは, 様々なストレスに伴って発現が誘導されて来る. 有事にのみ動員されて働くという特殊な機能を担うのかも知れない. 我々は, ストレスに応答する遺伝子を調べる過程で, Mincle (macrophage inducible C-type lectin) に注目した. Mincle はその名の通りマクロファージに強く誘導される C型レクチンとして松本らによって報告され, C/EBP $\beta$  (nuclear factor of IL-6; NFIL6) による発現制御を受けることも判明していたが<sup>1)</sup>, その機能は 10 年以上不明のままであった. Mincle の細胞膜貫通領域に正電荷を有するアルギニンが保存されていたことから, 我々は, Mincle が負電荷を有する ITAM アダプターと会合するのではないかと考えた. 実際 Mincle は FcR $\gamma$  (Fc receptor  $\gamma$  chain) という ITAM 含有アダプターと会合することが判明した (図 1). モノクローナル抗体を作成してリガンドをミミックした抗体刺激を行うと, マクロファージから大量の炎症性サイトカインが産生されたが, この産生は FcR $\gamma$  欠損マクロファージでは消失した. すなわち, Mincle は, FcR $\gamma$  鎖をシグナルサブユニットとして用いる活性化レセプターであることが明らかとなった<sup>2)</sup>.

### 3. Mincle による損傷自己の認識

生理的リガンドを探索するために, 我々は次にリガンド認識を蛍光で検出できるインジケーター細胞の樹立を試みた. TLR の発現が低い T細胞株に, Mincle, FcR $\gamma$ , nuclear factor of activated T cells (NFAT)-GFP レポーターを導入したところ, リガンドをミミックする抗 Mincle 抗体刺激で顕著な GFP が検出されたことから, リガンド検出

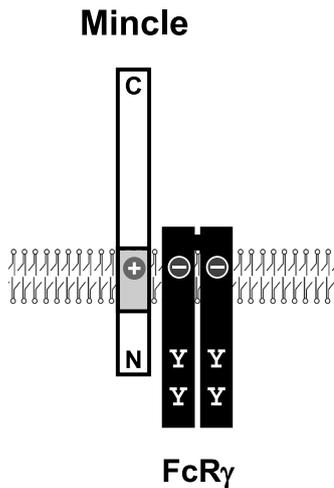


図1 Mincle と FcR $\gamma$  の会合様式

細胞として有用であることが判明した (図2)。驚いたことに、たまたまこの細胞を培地交換もせず数日放置していたところ、GFP 陽性細胞が異常に増えて来ることが分かった。何度もその「放置」実験を繰り返すうち、死細胞が周囲に大量に存在する時に GFP が光ることを見出し、Mincle が死細胞を認識しているかもしれないという仮説を持つに至った。実際、可溶性 Mincle を作製して死細胞を染めてみると、AnnexinV<sup>+</sup>propidium iodide (PI)<sup>+</sup>の所謂後期アポトーシス/ネクローシス細胞のみが染まることが判明した。そこでこの細胞画分を集めて抽出液を調整し、可溶性 Mincle カラムを作製して結合分子の精製を試みた結果、SAP130 (spliceosome associated protein 130) と呼ばれる核タンパク質が特異的に Mincle に会合することが判明した。SAP130 は全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患の自己抗原として良く知られる small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) の構成成分の1種であり、さらに、snRNP には、TLR7 によっても認識され得る、snRNA という特殊な一本鎖 RNA が巻き付いている。この SAP130 は、細胞死に伴って細胞外に放出され、Mincle による認識に糖鎖結合部位は必須でないことも判明した。このような「危険」なタンパク質の細胞外への放出を感知するという Mincle の機能は、生体を守る何らかの重要な役割を暗示する。実際、放射線で大量の胸腺細胞死を起こした際に起こる好中球の浸潤は、抗 Mincle ブロッキング抗体を投与しておくことで顕著に抑制されることも判明した。このように、Mincle は、損傷自己を認識して、炎症を促すような受容体であることが明らかとなった<sup>2)</sup>。この「死細胞認識に伴う炎症」は生理的にどのようなアドバン

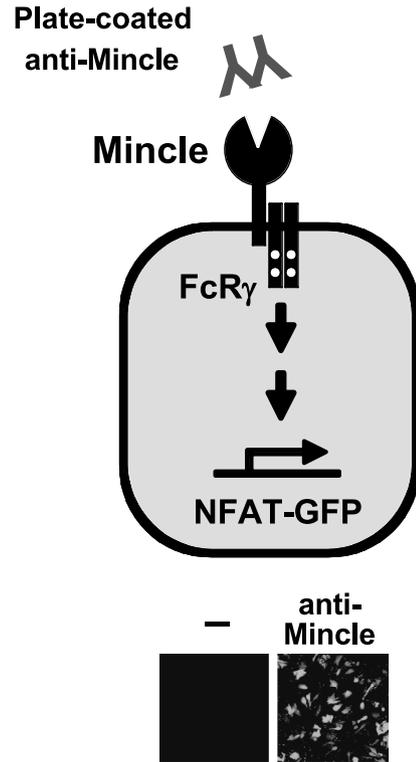


図2 リガンド活性を検出するレポーター細胞

テージを持つのか。一つの可能性として、損傷後の組織修復に寄与するような「有益な炎症」としての機能を想定して現在解析を進めている。

#### 4. Mincle による病原性微生物の認識

##### (1) 病原性真菌マラセチア

一方、C型レクチンレセプターの多くは、真菌などの微生物の特徴的な多糖類を認識することが知られている。そこで、Mincle もそのような病原体を認識するか否かを、先程の GFP を用いたレポーター細胞で様々な病原性真菌を調べてみることにした。面白いことに、マラセチアと呼ばれる一群の真菌のみが、選択的に Mincle に認識されることが判明した<sup>3)</sup>。マラセチアは皮膚常在菌であるが、特殊な状況下では皮膚疾患を誘起したり、乳幼児の敗血症の原因菌ともなり得ることが知られている。Mincle がマラセチアに含まれるどのようなリガンドを認識しているのかは未だ明らかではなく、こうした疾患の治療を考える上でも今後重要な課題である。

##### (2) 結核菌

リガンド構造に関するヒントは結核菌の解析から得られた<sup>4)</sup>。結核はいまだに世界人口の約 1/3 が感染している、

言うまでもなく脅威の感染症である。我々は、前述のインジケーター細胞を用いて、Mincleが結核菌を認識することを見出した。この活性は実験室株のみならず、BCG株、強毒株においても認められた。そこで様々な溶媒で結核菌を処理し、活性画分の単離を試みたところ、その活性は脂溶性のクロロホルム：メタノール画分に抽出され、最終的にトレハロースジミコール酸 (trehalose-6,6'-dimycolate, TDM) と呼ばれる糖脂質であることを見出した。

TDMは、コードファクターとも呼ばれ、古くから強い免疫賦活剤として知られていた結核菌由来の分子であった<sup>5)</sup>。実際、TDMをマウスに投与すると、血中サイトカイン上昇、肺肉芽腫形成などの炎症応答が惹起されるが、Mincle欠損マウスではこれらは全く誘導されなかった。MincleはTDM応答に必須の受容体であることも明らかとなった<sup>4)</sup>。

## 5. おわりに

「生体の危機」を感知する受容体の全貌は未だ明らかではない。Janewayらは、非自己病原体を認識する自然免疫受容体、Toll様受容体が危機の到来を生体に知らせ、獲得免疫応答を惹起するとする self vs. non-self 仮説を提唱し広く支持されてきた<sup>6)</sup>。ところが近年、Toll様受容体が機能しない状況下でも、獲得免疫が遜色無く発動することが判明し<sup>7)</sup>、新たな受容体の関与が示唆されていた。また、組織損傷や腫瘍に伴う「有害な自己」に対しては反応する必要がある一方、常在菌などの「無害な非自己」には寛容であるという免疫系の特性は、self vs. non-self 仮説には必ずしも合致しないものであった。このことから、免疫応答の惹起は、self vs. non-selfではなく、生体にとって「安全か vs. 危険か」という基準で決定されているという説 (danger 仮説) が提唱された<sup>8)</sup>。ストレスに伴って初めて誘導され、「自己」「非自己」双方に起因する生体の「危機」を感知する Mincle は、この概念をうまく説明する候補の一つとも考えられる。一方、こうした danger シグナルが誘導する獲得免疫応答は、免疫賦活物質 (アジュバント) の作用そのものでもある。実際、TDMは完全フロイントアジュバント (CFA) のコンポーネントであり<sup>9)</sup>、TDM及びその誘導体はアジュバントとしても広く用いられてきた<sup>10)</sup>。Mincleを始めたC型レクチンファミリーが、どのように様々な「danger」を感知しているのか、また多様な「danger」の認識に引き続いて起こる免疫応答の惹起に、ITAM特有の「多能性」がどのように発揮されているのか、Mincleをターゲットとした新たなアジュバントの可能性を含め、

今後明らかにしていきたい。

- 1) Matsumoto, M., Tanaka, T., Kaisho, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., & Akira, S. (1999) *J. Immunol.*, **163**, 5039-5048.
- 2) Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., & Saito, T. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 1179-1188.
- 3) Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Tateno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S., & Saito, T. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 1897-1902.
- 4) Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y.S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., & Yamasaki, S. (2009) *J. Exp. Med.*, **206**, 2879-2888.
- 5) Yamaguchi, M., Ogawa, Y., Endo, K., Takeuchi, H., Yasaka, S., Nakamura, S., & Yamamura, Y. (1955) *Kekkaku*, **30**, 521-524.
- 6) Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. (2002) *Science*, **296**, 298-300.
- 7) Gavin, A.L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B., & Nemazee, D. (2006) *Science*, **314**, 1936-1938.
- 8) Matzinger, P. (2002) *Science*, **296**, 301-305.
- 9) Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., & Besra, G.S. (1997) *Science*, **276**, 1420-1422.
- 10) Azuma, I. & Seya, T. (2001) *Int. Immunopharmacol.*, **1**, 1249-1259.

山崎 晶

(九州大学生体防御医学研究所)

Self and non-self recognition through C-type lectin receptors  
Sho Yamasaki (Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashiku, Fukuoka 812-8582, Japan)

## プロテインキナーゼ解析用ツールとしての網羅的抗体

### 1. はじめに

細胞分裂、分化、物質代謝、ストレス応答、アポトーシス、免疫機能、神経機能など生体内で起きるほとんどの生命現象は、タンパク質リン酸化反応により巧妙に制御されている。このタンパク質リン酸化反応を司る酵素がプロテインキナーゼ (PK) であるが、その多彩な機能を反映して、酵素の種類は非常に多く、高等生物では全遺伝子産物の約2%を占めると言われている<sup>1)</sup>。様々な生命現象の基本メカニズムにタンパク質リン酸化反応が重要な役割を果たしていることを示す論文が毎日のように出てくるが、こ