

C-型レクチン受容体 DC-SIGN の糖鎖認識選択性の解析

Analyses of carbohydrate preferences of DC-SIGN

小島 直也¹⁾、蟹江 治²⁾

¹⁾東海大学工学部生命化学科、²⁾東海大学先進生命科学研究所

Naoya Kojima¹⁾ and Osamu Kanie²⁾

¹⁾ Department of Applied Biochemistry, Tokai University

²⁾ Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

DC-SIGN はヒトの樹状細胞に発現している C-型レクチン受容体のひとつであり、病原体の貪食に関わる分子である。本研究では DC-SIGN の糖鎖選択性について検討を行なった。DC-SIGN を発現している CHO 細胞は Le^x 糖鎖 (LNFP3) をもつ人工糖タンパク質には明確な接着性を示したが、Le^d 糖鎖 (LNFP1) および 2-フコシルラクトース (2FL) をもつ人工糖タンパク質には接着性を示さなかった。しかし、2FL をもつ人工糖脂質には明瞭な接着性を示した。そこで 2FL をもつ人工糖脂質糖鎖のモデルを構築して解析したところ、この糖鎖では還元端が開環することで、水酸基の配向性が変化し、Le^x 糖鎖と類似の立体構造を取ることが判明した。したがって、DC-SIGN は糖鎖の水酸基の配向性を認識していると推察された。

[Abstract]

We examined the carbohydrate preference of human DC-SIGN, which is a member of C-type lectin receptors expressed on dendritic cells. CHO cells that express DC-SIGN clearly bound to the neoglycoprotein with Le^x-pentasaccharide, but the binding of the cells to those with Le^d-pentasaccharide or 2-fucosyllactose (2FL) was not observed. In contrast, the cells clearly bound to the neoglycolipid with 2FL. Modeling analysis of the carbohydrate portion revealed that 2FL in the neoglycolipid showed similar conformation to Le^x-pentasaccharide, since the orientation of hydroxyl groups in the reducing end is altered by the reduction of the reducing end of 2FL in the neoglycolipid. Thus, DC-SIGN recognizes the orientation of hydroxyl groups of carbohydrates rather than the structure of the carbohydrates.

[Key Words]

DC-SIGN, C-type lectin, Lewis blood group oligosaccharides

1. はじめに

獲得免疫応答誘導には APC による抗原の取り込みおよび APC の活性化が必須であるが、これらの過程にパターン認識分子 (PRR) が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。PRR は病原体でよく保存された特徴的な分子パターンを認識して病原体の侵入を感知する分子群であり、最もよく知られている PRR として Toll-like receptor (TLR) ファミリーがある。近年の研究から APC には TLR の他に多様な C 型レクチン様レセプター (CLR) が PRR として発現していることが知られるようになってきた。CLR は抗原や微生物の表層糖鎖を認識しそれらの貪食に関わっていることから、CLR による微生物糖鎖の認識機構とその後の細胞応答

の理解はワクチン戦略を考える上で重要な意義を持っている。しかし、そのためには CLR が認識する糖鎖の特異性や選択性を理解する必要がある。

DC-SIGN はヒト樹状細胞に発現している CLR のひとつで、ルイス (Le) 血液型糖鎖や高マンノース型糖鎖を認識することが知られている。本研究では、DC-SIGN の接着分子としての糖鎖選択性を特にフコースを含むルイス血液型糖鎖に着目して、DC-SIGN を恒常的に発現している CHO 細胞を用いて検討した。

2. 結果の概要と展望

1) 人工糖タンパク質固定化固相上への細胞接着
人工糖タンパク質として Le^x (Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAβ1-4Galβ1-4Glc; LNFP3), Le^a (Galβ1-3

(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc, LNFP2), Le^d (Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc; LNFP1) および 2-fucosyllactose (Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc; 2FL) をもつ BSA をそれぞれプレートに固定化し、そこに DC-SIGN を恒常的に発現している CHO 細胞 (CHO-DC-SIGN) を加え反応後、非接着細胞を除去し、接着した細胞数を計測した。その結果、既報どおり CHO-DC-SIGN は LNFP3-BSA および LNFP2-BSA を固定化したプレートに効率良く接着した。しかし、LNFP1-BSA および 2FL-BSA を固定化したプレートには全く結合性を示さなかった。したがって、DC-SIGN は枝分かれしたフコース残基と末端ガラクトースを合わせて認識していると考えられた。

2) 人工糖脂質を固定化固相上への細胞接着

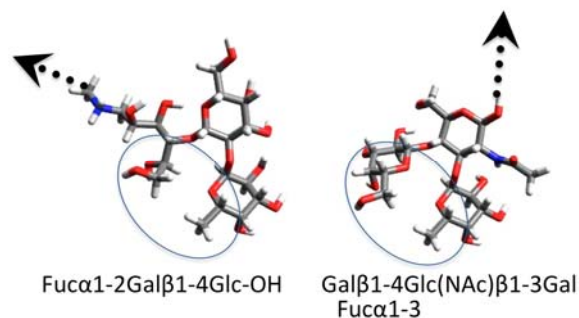
人工糖脂質として LNFP3-DPPE, LNFP2-DPPE, LNFP1-DPPE および 2FL-DPPE を用いた。いずれの糖脂質もオリゴ糖と DPPE (ジパルミトいるホスファチジルエタノールアミン) を還元アミノ化により縮合することにより合成・精製した。これら糖脂質の還元末端グルコースは還元アミノ化によってピラノース環が開いた状態になっている。これら糖脂質をプレートに固定化し、細胞の接着を検討したところ、LNFP3-DPPE, LNFP2-DPPE に対しては強い接着性を示したが、LNFP1-DPPE には接着性を示さなかった。この結果は人工糖タンパク質に対する結合選択性と一致した。一方驚くべきことに、CHO-DC-SIGN は 2FL-DPPE を固定化したプレートに対して非常に強く結合した。

3) モデルによる解析

2FL-BSA および 2FL-DPPE への CHO-DC-SIGN の接着性の矛盾を理解するため、モデルを構築し考察した。分子の安定配座は、Universal Force Field (UFF) 力場を用い、初期構造の安定化後に Dynamics を行って得られた安定配座中で Le^x 様の配座について再安定化して取得した。図に示すように、人工糖脂質の還元末端グルコースが還元アミノ化により開環することで、6 位水酸基の配向性が変化し、さらに環形成に携わっていた 5 位水酸基が遊離し、Le^x 糖鎖におけるガラクトースの 4 位と 6 位の水酸基と類似の配向性を示し、フコース 6 位のメチル基との空間的な配置が酷似する配座となることが示された。この結果から、DC-SIGN はこれらの水酸基の配向性を認識していると推察された。

本研究結果は、DC-SIGN は糖鎖構造そのものではなく、

糖鎖がもつ水酸基やその他の基の配向性を認識していることを示している。したがって、水酸基などの配向性を有機化学的に自在に操作することができれば、CLR に対して全く新しくかつ選択性の高いプローブを創生することが可能となり、それをを用いた抗原送達システムの構築も可能となることが期待できる。



3. 業績

【論文発表】

- 1) Matusoka Y, Takagi H, Yamatani M, Kuroda Y, Sato K, Kojima N. Requirement of TLR4 signaling for the induction of a Th1 immune response elicited by oligomannose-coated liposomes. *Immunol. Lett.* 178, 61-67.
- 2) Uto t, Fukaya T, Takagi H, Arimura K, Nakamura T, Kojima N, Makissen B, Sato K. Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity. *Nat. Commun.* 2016 7, 11273. doi: 10.1038/ncomms11273

【学会等発表】

- 1) Matsuoka Y, Kawauchi Y, Kawauchi K, Takagi H, Kojima N. *Ex vivo* generation of mature antigen presenting cells from inflammatory monocytes by oligomannose-coated liposomes. 16th International congress of immunology, Melbourne, Aug, 2016
- 2) 浅見悠里、河口優香、蟹江善美、蟹江治「立体特異的 TMS グリコシドの合成研究」第 35 回日本糖質学会年会、2016 年 9 月
- 3) 浅見悠里、蟹江治「ガラクトース誘導体の立体特異的な TMS 化反応」2016 年度糖質科学合同セミナー、2016 年 10 月