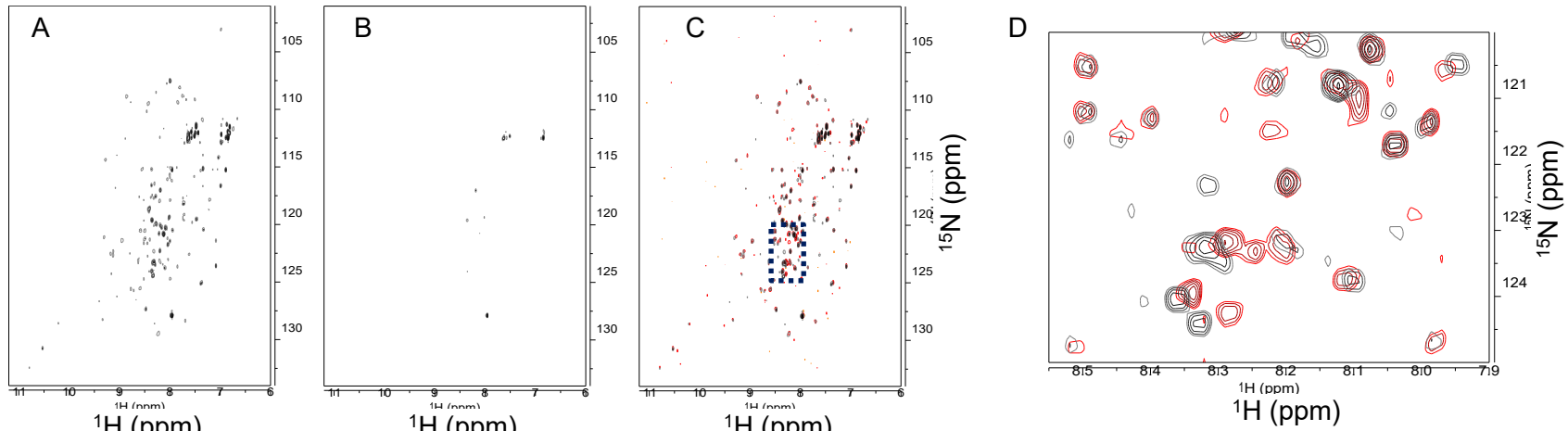
先端研究課題　利用報告書(概要)

実施課題名：パターン認識受容体とリガンド糖鎖の相互作用解析

【背景】 外因性の病原体を非自己と認識して発動する免疫システムの多くは、病原体の表面に存在する種特異的なβグルカンなどの多糖(糖鎖)を認識することで開始される。哺乳類がβグルカンを認識する際の、多様なリガンド受容のメカニズムや高親和性の発揮機構は、ほとんど解明されておらず解決すべき課題も多く残っている。本課題では、βグルカン受容体としてDectin-1のレクチン様ドメインを使用し、安定同位体標識を施したDectin-1レクチン様ドメインとβグルカンを混和し、各種NMR測定により、βグルカン認識機構の解明を目指した。

【実施内容】 これまでの大腸菌を宿主とした組み換えDectin-1発現では、マウス由来のDectin-1を利用していた。一方、ヒトにおけるDectin-1の遺伝性変異による機能不全は、真菌症(膣イースト感染症や爪白癬、黒色菌糸症)と関連することが報告されている。そのため、ヒトDectin-1の構造生物学解析を進めるために、ヒトDectin-1大量発現法の確立を行った。また、確立した発現方法を用いて、均一^{15}N標識を施したヒトDectin-1レクチンドメインを対象としたNMR解析を行った。得られた^{15}N標識ヒトDectin-1について、2D ^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定して、ヒトDectin-1とリガンド糖鎖との結合を調べた。その結果、リガンド糖鎖を加えることにより、高次の複合体が形成され、ほとんどのNMRシグナルのブロードニングが観察された(Fig.1 A,B) 。さらに、^{15}N標識ヒトDectin-1にEDTAを添加したところ、Dectin-1由来の特定のNMRシグナルにおいて化学シフト変化が観察された(Fig.1 C,D)。このことより、ヒトDectin-1はCa^{2+}と直接的に相互作用していることが判明した(Chiba H, Manabe N. et al., *Protein Expression Purif.*, **229**, 106668, 2025.)。

Fig. 1



^{15}N標識ヒトDectin-1レクチンドメインのNMR測定.
(A) ^{15}N均一標識ヒトDectin-1レクチンドメイン2D ^{1}H-^{15}N HSQCスペクトル (B) 50当量のラミナリンを加えた^{15}N均一標識ヒトDectin-1レクチンドメイン2D 1H-15N HSQCスペクトル (C) 1 mM EDTAの有(赤)、無(黒)のスペクトル重ね合わせ像. (D) (C)の選択範囲の拡大図

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF22-01-054			
利用課題名	パターン認識受容体とリガンド糖鎖の相互作用解析			
所属機関	東北医科薬科大学			
所属部署	分子生体膜研究所 糖鎖構造生物学教室			
役職・氏名	役職	講師	氏名	真鍋 法義
利用実施時期、及び期間	2022 年 11 月 1 日～2024 年 12 月 31 日 総利用日数: 27 日 ☒当初計画どおり・□当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

外因性の病原体を非自己と認識して発動する免疫システムの多くは、哺乳類のパターン認識受容体が、病原体の表面に存在する種特異的なβグルカンなどの多糖(糖鎖)を認識することで開始される。糖鎖の構造は多種多様であるにも関わらず、限られた数のレクチン受容体が各糖鎖リガンドへの親和性を獲得している機構は学術的に興味深く、原子レベルで解明すべき事柄である。申請者らは、パターン認識受容体の中で哺乳類レクチン受容体の病原体認識機構を分類し、βグルカン受容体による認識について報告してきた (Manabe et al., *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 2021、Manabe et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 2021)。このβグルカン受容体による多様なリガンド受容のメカニズムや高親和性の発揮機構は、ほとんど解明されておらず解決すべき課題も多く残っている。

そこで本課題では、多様なβグルカンを受容しつつも高い親和性を発揮するレクチン受容体の巧妙な受容メカニズムを、構造生物学的に明らかにすることを目的とした。それにより、標的糖鎖の分岐構造・立体構造や受容体の協同性の視点から外来糖鎖認識メカニズムを解明し、免疫システムにおける多糖認識機構の礎を築くことを目指した。

2. 成果の概要

実施内容

本課題では、多様なβグルカンを受容しつつも高い親和性を発揮するレクチン受容体の巧妙な受容メカニズムを、構造生物学的に明らかにすることを目的とした。そして、対象とするレクチン受容体には、Dectin-1 のレクチン様ドメインを選定した。これまでの大腸菌を宿主とした組み換え Dectin-1 発現では、マウス由来の Dectin-1 を利用していた。一方、ヒトにおける Dectin-1 の遺伝性変異による機能不全は、真菌症と関連することが報告されている。そのため、ヒト Dectin-1 の構造生物学解析を進めるために、ヒト Dectin-1 大量発現法の確立を行った。また、確立した発現方法を用いて ^{15}N 均一標識を施したヒト Dectin-1 レクチンドメインを対象とした NMR 解析を行った。得られた ^{15}N 標識ヒト Dectin-1 について、2D ^{1}H–^{15}N HSQC スペクトルを測定して、ヒト Dectin-1 とリガンド糖鎖との結合を調べた。

ヒト Dectin-1 の大量発現方法の最適化を行うことと平行して、^{13}C や ^{15}N 均一標識を施したモデルタンパク質を用いて、各種 NMR 測定を行った。行った測定は、2D ^{1}H-^{15}N HMQC スペクトル（文献 2）、ペプチド主鎖の帰属のための BEST タイプの各種3次元 NMR 測定（BEST-HNCO, BEST-HN(CA)CO, BEST-HNCA, BEST-HN(CO)CA, BEST-HN(CO)CACB, BEST-HNCACB など）となる。また、リガンド糖鎖上の相互作用部位を検出するための STD-NMR, 結合状態のリガンド糖鎖のコンフォメーション解析を行うための NOESY 実験（NOESY, ^{1}H-^{13}C HMQC-NOESY など）を行った。その結果、感度よく測定できることを確認した。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

本課題では、病原真菌が持つβグルカンを認識し、免疫システムを惹起するβグルカン受容体である Dectin-1 による構造生物学的な認識機構を明らかとすることを目的として研究を行った。当初掲げた目標の多くは達成できたと考えているが、安定的なヒト Dectin-1 の大量発現法の最適化は予想以上に困難であり、βグルカンリガンドと直接結合しているアミノ酸残基の同定までには至らなかった。以下に、本課題により得られた代表的な例を示す。

樹立した大量発現法を用いて、^{15}N 均一標識を施したヒト Dectin-1 レクチンドメインを取得した。このヒト Dectin-1 を用いて、NMR 解析を行った。その結果、リガンド糖鎖を加えることにより、高次の複合体が形成され、ほとんどのNMRシグナルのブロードニングが観察された。さらに、^{15}N 標識ヒト Dectin-1 に EDTA を添加したところ、Dectin-1 由来の特定のNMRシグナルにおいて化学シフト変化が観察された。このことより、ヒト Dectin-1 は Ca^{2+}と直接的に相互作用していることが判明した（文献 1）。また、モデルタンパク質としてゴーシェ病に関連する CHIT1 を使用し、哺乳細胞により発現させた ^{13}C 均一標識を施した CHIT1 の修飾糖鎖の構造を、2 次元 ^{1}H-^{13}C HMQC 測定を利用することで、*N*-型糖鎖だけでなく *O*-型糖鎖の存在も明らかとした。シアリダーゼ処理したサンプルではシグナルの減衰（^{13}C～104 ppm/^{1}H～4.5 ppm）を示し、*N*-型糖鎖中にシアル酸が存在することも示した。（文献 2）。

成果発表

論文発表

（1） Bacterial expression, purification and characterization of the human Dectin-1 lectin domain for structural and functional studies

Hanako Chiba, Noriyoshi Manabe, Junko Naito, Norihisa Nishida, Naohito Ohno, Yoshiki Yamaguchi

Protein Expression Purif., **229**, 106668, 2025.

（2） 3D structural insights into the effect of *N*-glycosylation in human chitotriosidase variant G102S

Xiao Xu, Noriyoshi Manabe, Shiho Ohno, Sachiko Komatsu, Tsutomu Fujimura, Yoshiki Yamaguchi

Biochim Biophys Acta, Gen Subj., **1869**, 130730, 2025.

学会発表

・レクチン受容体 Dectin-1 の不溶性βグルカン結合における構造特異性

千葉 花子, 真鍋 法義, 内藤 淳子[a], 西田 典永[a], 髙橋 円[a], 大野 尚仁[b], 山口 芳樹

([a]神鋼環境ソリューション、[b]東京薬科大学薬学部)

日本薬学会第 143 年会, 北海道, 2023 年 3 月, 演題番号 26P1-pm1-089S

・ヒト免疫グロブリン A1 の Fc 結合糖鎖の構造と機能

潘 順麗, 真鍋 法義, 小松 祥子, 藤村 務, 山口 芳樹

第 62 回日本薬学会東北支部大会，仙台，2023 年 10 月，要旨集 p.17

・ヒト IgA および J 鎖を修飾する N-結合型糖鎖の構造と機能
潘　順麗，真鍋　法義，小松　祥子，藤村　務，山口　芳樹
第 17 回東北糖鎖研究会，群馬，2023 年 11 月，O-1

・Dectin-1 レクチンドメインの大量発現および β グルカンとの結合試験
真鍋　法義，山口　芳樹
第 17 回東北糖鎖研究会，群馬，2023 年 11 月，演題番号 O-9

・リガンド結合により形成される Dectin-1 オリゴマーの物理化学的解析
真鍋 法義，大崎 暁斗，兒玉 篤治[a] 、内山 進[a,b]，内橋 貴之[a,c]，加藤 晃一[a,d]，山口 芳樹
([a] 自然科学研究機構 生命創成探究センター (ExCELLS)、[b] 大阪大学大学院 工学研究科、[c] 名古屋大学大学院 理学研究科、[d] 名古屋市立大学大学院 薬学研究科)
第 7 回東北医真菌研究会，仙台，2023 年 12 月，演題番号 2

・ヒト Dectin-1 レクチンドメインの大量発現方法の検討とその性状解析
千葉 花子，真鍋 法義，内藤 淳子[a]，西田 典永[a]，大野 尚仁[b]，山口 芳樹
([a] 神鋼環境ソリューション、[b] 東京薬科大学薬学部)
日本薬学会第 144 年会，横浜，2024 年 3 月，29P-am181S

・Dectin-1 のリガンド結合指向性とオリゴマー形成過程の解析
真鍋　法義，大崎　暁斗，兒玉　篤治[a]，山口　祐希[b]，内山　進[a,b]，内橋　貴之[a,c]，加藤　晃一[a,d]，山口　芳樹
(ExCELLS[a]，阪大院[b]，名大院[c]，名市大院[d])
第 18 回東北糖鎖研究会，仙台，2024 年 10 月，演題番号 O-6

・ヒトキトトリオシダーゼバリアント G102S における N-グリコシル化の立体構造的影響
徐　瀟，真鍋　法義，大野　詩歩，小松　祥子，藤村　務，山口　芳樹
第 18 回東北糖鎖研究会，仙台，2024 年 10 月，演題番号 P-6

・組換え Dectin-1 の哺乳細胞による発現と修飾糖鎖および β グルカン結合能の解析
真鍋　法義，中野　総星，佐藤　健太，山田　有紗，山口　芳樹
第 8 回東北医真菌研究会東北支部会，仙台，2024 年 12 月

今後の展開

本課題において、論文化には至らなかったものの、ペプチド主鎖の帰属のための BEST タイプの各種3次元 NMR 測定（BEST-HNCO, BEST-HN(CA)CO, BEST-HNCA, BEST-HN(CO)CA, BEST-HN(CO)CACB, BEST-HNCACB など）や、リガンド糖鎖上の相互作用部位を検出するための STD-NMR、結合状態のリガンド糖鎖のコンフォメーション解析を行うための NOESY 実験（NOESY, ^{1}H-^{13}C HMQC-NOESY など）を、感度よく測定できることを確認できている。これらを使用することで、本課題の当初目標であった β グルカンリガンドと直接結合しているアミノ酸残基の同定につなげていきたい。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題は基礎研究が中心であり、得られた成果がすぐに社会・経済に波及し還元できる訳ではありません。しかしながら、外来病原菌が有するβグルカンなどの多糖（糖鎖）を限られた数のレクチン受容体で認識し、免疫機構を開始するシステムの解明は、幅広くかつ高い親和性を有するレクチン受容体の設計につながり、疾病の診断や治療に貢献することが期待されます。これら、NMR 法により得られた知見は、パターン認識受容体および繰り返し構造を有するそのリガンドに広く応用できる可能性があります。

4. 利用における感想（改善要望等を含む）

サンプルの送付や受取り、さらには遠隔操作とそのデータの受渡しがスムーズにさせて頂くことができました。さらには、これらの作業が安全に確実に行うことができたと感じております。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

多くのマシンタイムを頂くことができ、大変満足しております。この NMR 共用プラットフォームのシステムが継続され、今後の研究においても再度申請させて頂けたら幸いです。

6. 成果公開延期の希望の有無

（　）あり　：　（ ○ ）なし

「あり」の場合理由：

7. その他

特にありません。

8. 利用施設

東北大学

溶液 800 MHz

利用期間 1: 2023 年 03 月 20 日～2023 年 03 月 22 日

利用期間 2: 2023 年 03 月 30 日～2023 年 04 月 03 日

利用期間 3: 2023 年 12 月 01 日～2023 年 12 月 04 日

利用期間 4: 2024 年 01 月 05 日～2024 年 01 月 09 日

利用期間 5: 2024 年 08 月 22 日～2024 年 08 月 26 日

溶液 600 MHz

利用期間 6: 2023 年 08 月 04 日～2023 年 08 月 08 日

9. その他の利用施設

東北大学では核磁気共鳴（NMR）装置利用講習会があり、参加させていただきました。

また、生命創成探究センターにおける AFM や native MS の測定とも連携しており、その支援を受けました。