

## 論文内容の要旨

### 論文題目: Natural killer gene complexにコードされる オーファンレセプターのリガンドについての研究

氏名: 赤塚 明宣

#### 【序論】

免疫系は、細菌やウイルスといった病原体や、がん細胞のように異常な自己細胞を認識し、排除することで、我々の体の恒常性を維持する。免疫系を担当する白血球は、種々のレセプターからのシグナルによって標的を認識する。

ヒト 12 番染色体には、Natural killer gene complex (NKC) と呼ばれるゲノム領域が存在し、多数の C 型レクチン、および、C 型レクチン様レセプターがコードされている (図 1)。NKC にコードされるレセプター群は、主に NK 細胞やマクロファージ、樹状細胞 (DC) といった自然免疫系の細胞に発現し、その標的認識に関わると考えられる。しかしながら、それらの中には、リガンドが未知のもの (オーファンレセプター) も多く、そのため、生理的な機能が明らかでないものが残されている。本論文では、NKC にコードされるオーファンレセプターの中から Killer cell lectin-like receptor F1 (KLRF1) および、Blood dendritic cell antigen-2 (BDCA-2) に着目し、リガンドを同定した。本文では両方について記述するが、要旨では、BDCA-2 について取り上げる。

BDCA-2 は、Plasmacytoid DC (pDC) 特異的なマーカーとして同定された分子である。樹状細胞の一種である pDC は、Toll 様レセプターの TLR7 や TLR9 といったパターン認識レセプターを介して、ウイルスなどの分子パターンを認識し、I 型インターフェロンを多量に放出する。pDC 表面の BDCA-2 をモノクローナル抗体で架橋すると、インフルエンザウイルス抗原で刺激した際に生じる I 型インターフェロンの産生が抑制される。しかし、BDCA-2 はリガンドが不明であるため、この抑制メカニズムが生体内のいかなる状況下で働くか、また、どのような意味を持つかについては明らかでない。そこで本研究では、BDCA-2 リガンドを同定し、その生理的機能を解明することを目的とした。



図 1. Natural killer gene complex (NKC)  
ヒト NKC にコードされるレセプター群。左側がテロメア側を示す。

## 【結果】

### 1. BDCA-2 リガンドは CHO レクチン耐性変異株に発現する

BDCA-2 リガンドを同定するため、まず、BDCA-2 レポーター細胞を用いて、BDCA-2 リガンドを発現する細胞株を探索した。BDCA-2 レポーター細胞は、BDCA-2 細胞外領域と CD3 $\zeta$  細胞内領域を融合したキメラレセプターを発現し、ターゲット細胞表面の BDCA-2 リガンドを認識すると、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを産生する (図 2)。24 種類のヒト培養細胞株、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞、および、CHO レクチン耐性変異株の Lec 細胞を、BDCA-2 レポーター細胞と共培養し、レポーター細胞による  $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生を測定した。その結果、CHO レクチン耐性変異株の一つ、Lec2 細胞が、BDCA-2 レポーター細胞の反応を誘導した (図 3)。Lec2 細胞は、CHO 細胞に由来するシアル酸トランスポーターの欠損株であり、細胞表面の糖タンパク質に付加する N 型糖鎖として、非還元末端にガラクトースを持つアシアロ糖鎖を発現する。主にシアル酸が付加した N 型糖鎖を発現する CHO 細胞や、高マンノース型糖鎖の Lec1 細胞、非還元末端に N-アセチルグルコサミンを持つアガラクト糖鎖の Lec8 細胞に対して、BDCA-2 レポーター細胞が反応しなかったことから、BDCA-2 は、細胞表面に発現するアシアロ糖鎖を認識する可能性が示された。

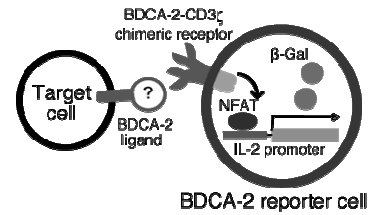
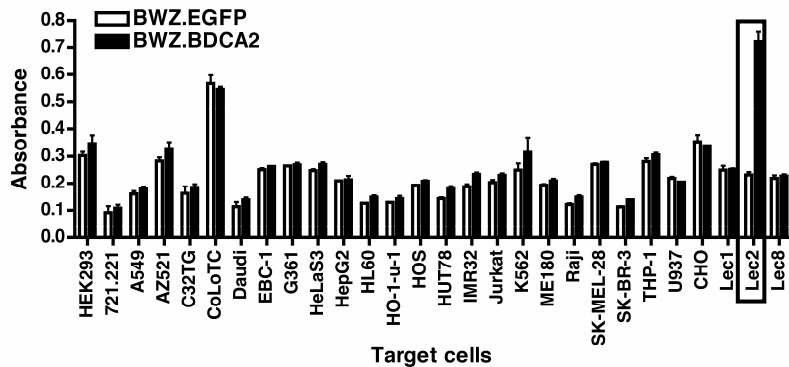


図 2. BDCA-2 レポーター細胞  
BDCA-2 リガンドを認識すると、 $\beta$  ガラクトシダーゼを産生する。

### 図 3. BDCA-2 レポーターアッセイ

図に示したターゲット細胞と BDCA-2 レポーター細胞 (黒いバー)、またはコントロール細胞 (白いバー) を共培養した後、 $\beta$  ガラクトシダーゼ基質を添加し、分解に伴って生じる 570nm の吸光を測定した。



### 2. BDCA-2 の結合は $Ca^{++}$ 依存 的である

BDCA-2 は C 型レクチンドメインを持つ。既知の C 型レクチンは、カルシウムイオン ( $Ca^{++}$ ) 依存的に結合性を示すことから、BDCA-2 でも同様の性質を示す可能性を考えた。しかし、レポーターアッセイは生細胞を用いる系なので、キレート剤などを用いた実験ができない。そこで、大腸菌発現系で可溶性 BDCA-2 組替えタンパク質を作製して用いた。作製した可溶性 BDCA-2 組替えタンパク質を酵素的にビオチン化し、フィコエリスリン標識ストレプトアビジン (SA-PE) と結合させて四量体とした後に、Lec2 細胞に対する結合をフローサイトメトリーで解析したところ、BDCA-2 四量体は  $Ca^{++}$  存在下で Lec2 細胞に強く結合し、 $Ca^{++}$  キレート剤の EGTA 存在下ではその結合が完全に消失した (図 4)。これにより、BDCA-2 とリガンドの結合が、既知の C 型レクチンと同様、 $Ca^{++}$  依存的であることが示された。

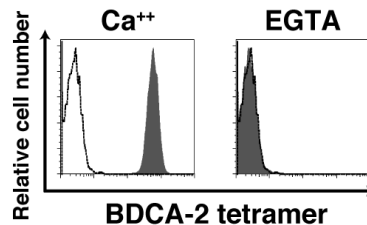


図 4. BDCA-2 四量体の Lec2 細胞に対する結合  
1mM  $CaCl_2$  (左) または 5mM EGTA (右) 存在下で  $1 \mu g/mL$  BDCA-2 四量体 (塗りつぶし) もしくは SA-PE (実線) で Lec2 を染色し、フローサイトメトリーで解析した。

### 3. BDCA-2 の結合は単糖によって阻害され、EPNモチーフが関与する

一般的に、糖鎖に対するレクチンの結合は、単糖の共存によって阻害される。そこで、BDCA-2 の結合が、単糖によって阻害されるかどうか調べた。BDCA-2 四量体を種々の単糖の存在下で Lec2 細胞に対して結合させ、フローサイトメトリーで解析した結果、BDCA-2 の結合は、マンノースとフコースの存在下で強く阻害された (図 5)。一方、ガラクトースや N-アセチルガラクトサミンでは、ほとんど阻害されなかった (図 5)。BDCA-2 は、C 型レクチンドメイン内に、マンノースやフコース結合性レクチンに保存される Glu-Pro-Asn (EPN) モチーフを持つ。このことから、BDCA-2 のリガンドに対する結合も、EPN モチーフを介する可能性が考えられた。

そこで、BDCA-2 の EPN モチーフを EPN 類似の Glu-Pro-Ser (EPS)、もしくはガラクトース結合性レクチンに保存される Gln-Pro-Asp (QPD) に変異させた変異体タンパク質を作製し、Lec2 細胞に対する結合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、EPS 変異体では結合活性が 1/10 程度に低下し、QPD 変異体では結合活性が完全に消失した (図 6)。以上の結果から、BDCA-2 のリガンドに対する結合には EPN モチーフが関与することが示された。

### 4. BDCA-2 リガンドはアシアロ構造を持つ N 型糖鎖である

BDCA-2 の糖結合特異性を明らかにするため、作製した可溶性 BDCA-2 組換えタンパク質を用い、産業技術総合研究所 平林博士らの協力のもと、Frontal affinity chromatography (FAC) 解析を行った。FAC 解析は、固相化したレクチンカラム内にリガンド候補となる糖鎖を通し、リガンド流出の遅延から、糖鎖とレクチンの結合を測定する方法である。132 種類の糖鎖構造をスクリーニングした結果、25 種類のアシアロ糖鎖、および、3 種類のアガラクト糖鎖に対する結合が検出された (図 7)。この結果から、BDCA-2 はアシアロ糖鎖およびアガラクト糖鎖に直接結合することが明らかとなった。そこで、アシアロ糖鎖を持つ糖タンパク質である Asialofetuin をコートしたプレートを用いて BDCA-2 レポーター細胞を刺激したところ、コントロールと比較して  $\beta$  ガラクトシダーゼ産生の増加が見られた (図 8)。この結果から、BDCA-2 はアシアロ糖鎖をリガンドとして認識し、シグナルを伝達することが示された。

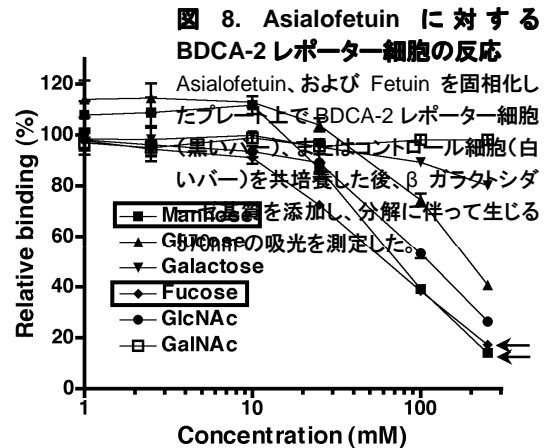


図 5. 単糖による BDCA-2 四量体の結合阻害  
1mM CaCl<sub>2</sub>、および図に示した濃度と種類の単糖存在下で 1  $\mu$ g/mL BDCA-2 四量体を Lec2 に結合させ、フローサイトメトリーで解析した。単糖で阻害しない条件の平均蛍光強度を 100% とし、3 重試験の平均値と、標準偏差の値を示す。

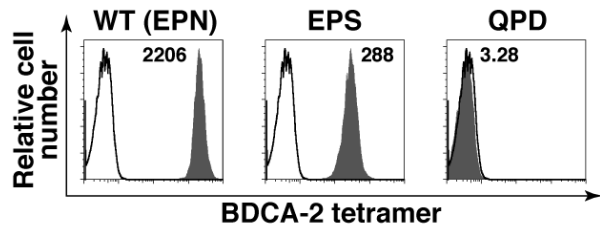


図 6. BDCA-2 変異体の Lec2 細胞に対する結合  
1mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で、図に示した自然型、および変異体 BDCA-2 四量体 (1  $\mu$ g/mL) を Lec2 に結合させ、フローサイトメトリーで解析した。数字は平均蛍光強度を示す。

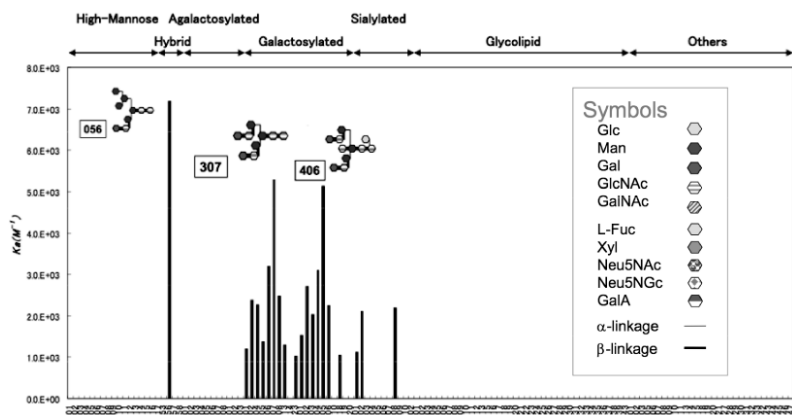


図 7. BDCA-2 の Frontal affinity chromatography  
132 種類の糖鎖をそれぞれ BDCA-2 固相化カラムに流し、糖鎖の溶出の遅延から算出した結合定数(Ka)を示す。

## 5. BDCA-2 リガンドはT細胞に発現し、活性化刺激によって増加する

樹状細胞は、ナイーブ T 細胞を活性化させる働きを持つ。pDC も例外ではなく、抗原提示に関わる MHC class II の他に、CD80 や

CD86 といった、T 細胞に対する共刺激分子を発現している。一方で、T 細胞は、活性化にともなって、アシアロ糖鎖の発現が増加することが知られている。そこで、活性化した T 細胞では BDCA-2 リガンド糖鎖が増加する可能性を考えた。ヒト末梢血 T 細胞に対する BDCA-2 四量体の結合をフローサイトメトリーにより解析したところ、T 細胞に対して結合が見られた (図 9, 左)。また、T 細胞マイトジェンであるコンカナバリン A (ConA) を用いて T 細胞を刺激したところ、BDCA-2 四量体の結合は平均蛍光強度で約 4 倍に増加した (図 9, 右)。このことから、活性化した T 細胞では、平常時に比べて BDCA-2 リガンドとなるアシアロ糖鎖の発現が増加することが示された。

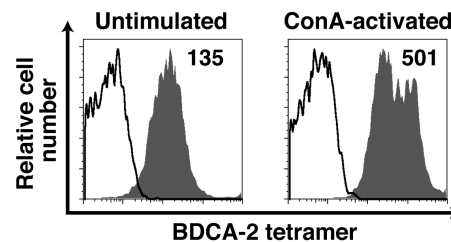
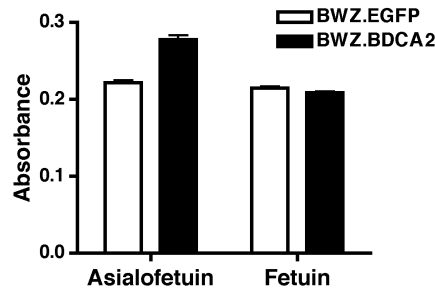


図 9. ヒト末梢血 T 細胞に対する BDCA-2 の結合  
ヒト末梢血白血球をコンカナバリン A (ConA) で刺激し、CD3 陽性の T 細胞集団について BDCA-2 四量体の結合をフローサイトメトリー解析した。数字は平均蛍光強度を示す。

### 【考察】

本研究により、BDCA-2 が、アシアロ糖鎖をリガンドとして認識することが明らかとなった。BDCA-2 の結合は既知の C 型レクチンと同様に  $Ca^{++}$  依存的であり、EPN モチーフが関与すると考えられる。BDCA-2 が N 型糖鎖に結合するためには、糖鎖の非還元末端にガラクトースが露出している必要がある。しかし、EPN モチーフがガラクトースではなくマンノースに対する結合に重要だと考えられていること、また、BDCA-2 四量体の結合が、ガラクトースによってほとんど阻害されなかったことから、BDCA-2 はアシアロ糖鎖の非還元末端のみを認識するのではなく、糖鎖構造全体を認識している可能性が考えられる。一方で、BDCA-2 リガンド糖鎖は、T 細胞表面に発現しており、活性化に伴って発現が増加した。本研究の結果から、BDCA-2 は、T 細胞の活性化により増加したアシアロ糖鎖を認識し、pDC による I 型インターフェロンの産生を抑制するという、負のフィードバック機構を担う可能性が考えられる。

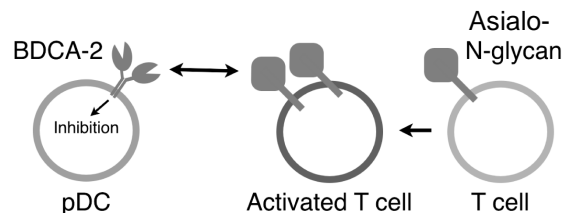


図 10. BDCA-2 による負のフィードバック機構  
BDCA-2 は活性化した T 細胞で増加したアシアロ糖鎖を認識し、pDC による I 型インターフェロンの産生を抑制する