

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

北海道医学雑誌 (2004.01) 79巻1号:3~7.

生体防御レクチンとしてのコレクチンファミリー

若宮伸隆, 吉田逸朗, 小笠原正洋, 福澤純, 大谷克城, 小山聡

生体防御レクチンとしてのコレクチンファミリー

若宮伸隆, 吉田逸朗, 小笠原正洋, 福澤純, 大谷克城, 小山聡

旭川医科大学医学部微生物学講座

Collectin family as a host defense lectin

Nobutaka WAKAMIYA, Itsuro YOSHIDA, Masahiro OGASAWARA, Jun FUKUZAWA, Katsuki OHTANI, Satoshi KOYAMA

Department of Microbiology and Immunochemistry
Asahikawa Medical College
Asahikawa 078-8510, Japan

要旨

コレクチン (collectin) は、内部に C 型レクチンとコラーゲン様構造を持つ動物レクチンのサブファミリーである。コレクチンは、血清マンナン結合タンパク (MBL)、肺胞分泌液中に存在する肺サーファクタント蛋白質 A, D (SP-A, SP-D) の3つの“古典的”コレクチングループが存在する。我々は、EST データベースを用いた方法により、3つのコレクチン遺伝子 (CL-L1, CL-K1, CL-P1) の存在を明らかにした。コレクチンの原型と推測される CL-P1 の構造と機能を説明しながら、生体防御レクチンとして分子進化を遂げた、コレクチン群の機能について概説する。

I. はじめに

コレクチンはレクチンと呼ばれる糖結合性蛋白質の一種で、自然免疫に携わっている因子の一つと考えられている。レクチンは最初植物の種子から血球を凝集する物質として見い出され、その後動物においても発見された。本稿で紹介するコレクチンは、1980年京都大学の川寄らにより初めて報告された¹⁾。その後しばらくコレクチンの生物学的意義は不明であったが、コレクチンの血中濃度が著しく低いヒトの一部がくり返し感染症に罹るという現象が発見され、コレクチンの生理的意義が感染に対する基礎免疫に関わっている可能性が示唆されている²⁾。

II. コレクチン分子の構造

コレクチンは、内部にコラーゲンに似た構造 (グリシン-Xアミノ酸-Yアミノ酸のくり返し) を持っているため、コラーゲン (Collagen) レクチン (Lectin) を縮めて、コレクチン (Collectin) と呼ばれている。モノマーポリペプチドは、N末端から高システイン領域、コラーゲン領域、ネック領域、糖認識領域の4つのドメイン構造をとっている。このモノマーポリペプチド3本が3重螺旋構造となり一つの基本単位を形成している。この基本単位がさらに2-6個会合して一つの巨大分子を形成する。現在コレクチンとしては、血清中に存在するマンナン結合レクチン (MBL)、コングルチニン (BKg)、コレクチン-43 (CL-43)、コレクチン-46 (CL-46) と肺のサーファクタントや羊水中に存在するサーファクタント蛋白質 A (SP-A)、サーファクタント蛋白質 D (SP-D) があり、これらの“古典的コレクチン”と我々が発見した3つの“新規コレクチン”が存在する。これらのうち電子顕微鏡観察等により構造が明らかとなっているものは MBL, BKg, SP-A, SP-D, CL-43 の5種

類である。MBLとSP-Aは花束様構造をとっており、SP-DとBKgは十字架様構造をとっている。またCL-43は3量体の基本構造のみで存在している (Fig. 1)。

III. コレクチンの生理機能

獲得免疫ばかりでなく、幅広い特異性を持った自然免疫機構(マクロファージ, NK細胞, 補体等)が感染症に対して大きな抑止力となっている。これらは特定の物質を高い特異性で認識するのではなく一定のパターンを持ったものを認識している。コレクチン分子は、糖鎖という繰り返すパターンを認識することで、パターン認識の代表例として報告されている³⁾。MBLは、糖認識領域で異物と結合し、これに蛋白質分解酵素であるマンナン結合レクチン関連セリンプロテアーゼ(MASP)が結合し、補体系を活性化することが近年明らかになり、レクチン経路と命名されている。この経路では補体第3因子(C3)、第4因子(C4)を介する経路とともに活性化できることが証明されている。また、コレクチンは、異物と結合してオプソニンとして働き、白血球などに異物を取り込ませ処理させることができると考えられている。オプソニン作用とともに重要なのは、原始的な凝集活性である。これは、レクチンの多価の結合手による結合で単に凝集塊を形成するだけでなく、病原体の密度を高めることで物理的に排除しやすい大きさに整えるものである。また、ウイルスに直接結合し中和を引き起こすとともにウイルス感染細胞からのウイルス出芽を阻害することにより感染の広がりを阻止することなどが推測されている(Fig. 2)⁴⁾。

IV 新規コレクチン遺伝子のクローニング

新規コレクチンは、蛋白質精製からのアプローチでは同定できず、ESTデータベースのスクリーニングから、コレクチンのCRD配列をもったヒト遺伝子クローンを数個発見する事ができた。その後クローンの発現場所から、CL-L1 (collectin liver 1), CL-K1 (collectin Kidney 1), CL-P1 (collectin placenta 1) と名付けた3つの遺伝子をクローニングした^{5,6)}。原始コレクチン遺伝子と推測されるヒトCL-P1cDNAは、742個のアミノ酸をコードする約2.2kbの塩基を有する遺伝子であり、予想されるアミノ酸配列からコラーゲン様領域とCRDを含むことより、コレクチンのファミリーであると考えた。続いてマウスCL-P1遺伝子をクローニングし、両者の推定されるアミノ酸配列を用いたアライメントから全長は完全一致し、アミノ酸レベルで92%という非常に高い同一性を示すことを明らかにした。従来のコレクチン分子群のCRDは、CRDは4つのシステイン残基で構成され1つのエクソンでコードされるが、CL-P1では通常型の6つのシステイン残基で構成され3つのエクソンでコードされていた。

V. CL-P1の構造とその分布

CL-P1は、cDNAから予想されるアミノ酸配列より、スカベンジャー受容体(SR-AI)と共通するのは、N末端から短い細胞内領域、膜貫通領域、コイルドコイル領域、コラーゲン様領域とC末端に続く球状蛋白質という全体の配列である。CL-P1では、C末端の球状蛋白質であるスカベンジャー受容体システインリッチ領域が、コレクチンCRDにおきかわっている(Fig. 3)⁶⁾。組織におけるCL-P1mRNAの局在は、ユビキタスであったが、CL-P1CRDに対する抗体を用いた免疫組織染色で、CL-P1は主に血管内皮に存在することが明らかになった。また血管内皮細胞株であるHUVECなどにおいても同様の膜蛍光が確認された。さらにCL-P1cDNAを、CHO細胞にトランスフェクトして得られた発現細胞での研究から、II型膜蛋白質であることが確かめられた。SDS-PAGE, ウェスタンブロットによりHUVEC表面蛋白質画分や胎盤の抽出液中に、糖鎖修飾を受けたブロードな約140 kDaの染色バンドを認めた。また膜貫通領域を除いたCL-P1蛋白質断片を作成し、ゲル濾過での挙動やSDS-PAGEでの移動度を解析した結果、3量体とし

て存在している可能性が推測された。

VI. CL-P1 の生物学的機能

スカベンジャー受容体としては、基本的に変性LDLを特異的に取り込むことが重要な機能であると考えられる。CL-P1cDNA をCHO細胞に発現させた細胞株を樹立し、親細胞との比較によって生物学的性質の検討を試みた。変性LDLへの結合では、アセチルLDLに結合せず酸化LDLのみに特異的に結合した。次にコレクチン本来の微生物に対する結合では、蛍光標識された大腸菌、黄色ブドウ球菌、酵母を用いて、CL-P1発現細胞株との結合を検討した。使用したすべての微生物は発現細胞表面に結合した。さらに酵母では、ファゴサイトーシスを認めた。

VII. コレクチンの分子進化

従来コレクチン遺伝子の分子進化としては、始めにCレクチンの源基遺伝子から、膜型レクチン、分泌型レクチン、コレクチンへの3つの進化パターンを R. Hill が提唱している。しかしながら、CL-P1 は、どのCレクチングループにも属さず、ちょうどグループ II の II 型レセプター型Cレクチンとグループ III のコレクチンのハイブリッドのような存在であることがわかる。私たちは、この CL-P1 遺伝子の存在から、始めに肝レクチン様の膜型レクチンができ、そこにコラーゲンエクソンの挿入とイントロン欠損が起こり、1つエクソン型 CRD が誕生して、コレクチン遺伝子の原型 (CL-P1) ができたという仮説を立てている (Fig. 4)。II 型レセプター型Cレクチンは、多量体構造によるエンドサイトーシスレセプターとして非常に有用であったのであろう。このレセプターに、コラーゲン様構造をコードするエクソンが進化の過程で取り込まれ、本コレクチンの原型である CL-P1 が誕生した。この分子は単にエンドサイトーシスばかりか微生物をファゴサイトーシスする能力を発揮し、一気に生体防御レクチンへの進化を遂げた。さらにその後コレクチン源基遺伝子の膜貫通エクソンは、シグナルペプチドエクソンに変化し、イントロン欠損による1つエクソン型 CRD への変化がおこり、現在の分泌型コレクチンへの進化を遂げたと推測している。

VIII まとめ

太古の時代は飢餓と微生物との戦いが動物の生命を存続させる上で最重要課題であったはずである。そのためには脂肪蓄積と微生物排除機能をもつスカベンジャー受容体は非常に有用であったのであろう。しかし飢餓からの開放ばかりか微生物の脅威も減少し、スカベンジャー受容体は、動脈硬化の悪者として再登場した。我々は分子生物学の恩恵を受け人類の進化と共に歴史の皮肉を知ったが、果たしてこの知識を生かして人類の存続へとポジティブな方向へ舵取りができるのであろうか、科学者の責務は重いと感じる。

文献

1. Kozutsumi Y, Kawasaki T, Yamashina I (1980): Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum. *Biochem Biophys Res Commun* **95**: 658-664.
2. Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW (1989): Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet* **2**: 1236-1239.
3. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318.
4. 鈴木定彦, 若宮伸隆 (2002): 感染防御とコレクチンファミリー. *Annual Review 免疫 2002* 矢田純一, 奥村康, 佐藤昇志編, 中外医学社, pp217-225.

5. Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Yamazaki H, Shimada T, Keshi H, Sakai Y, Fukuoh A, Sakamoto T, Wakamiya N (1999): Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *J Biol Chem* **274**: 13681-13689.
6. Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Keshi H, Sakai Y, Fukuoh A, Sakamoto T, Itabe H, Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Wakamiya N (2001): The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **276**: 44222-44228.

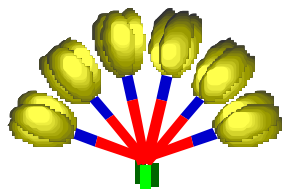
図説明

Fig.1 コレクチンファミリーの分子構造

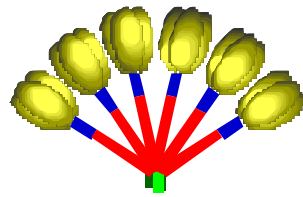
Fig. 2 コレクチンの生体防御における役割

Fig. 3 コレクチンとスカベンジャー受容体の構造

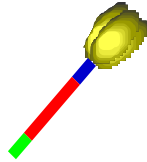
Fig. 4 コレクチンの分子進化の仮説



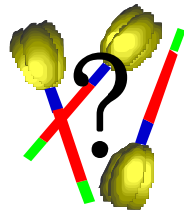
MBL



SP-A

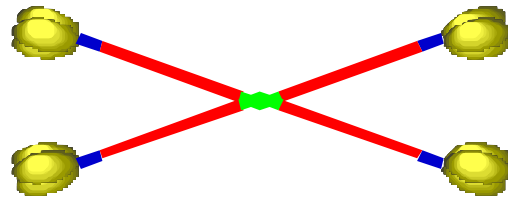


CL-43

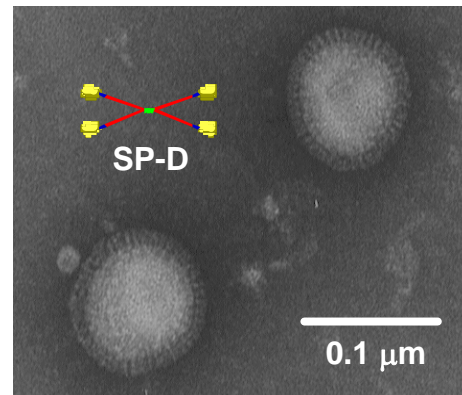
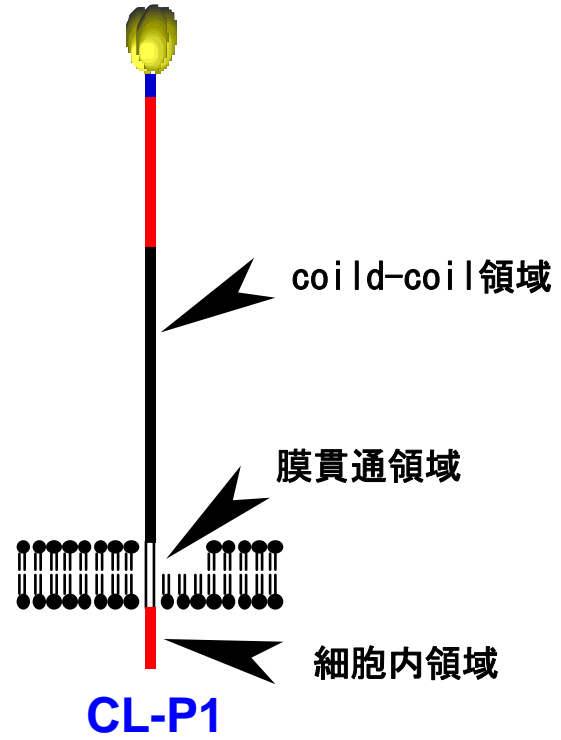


CL-L1

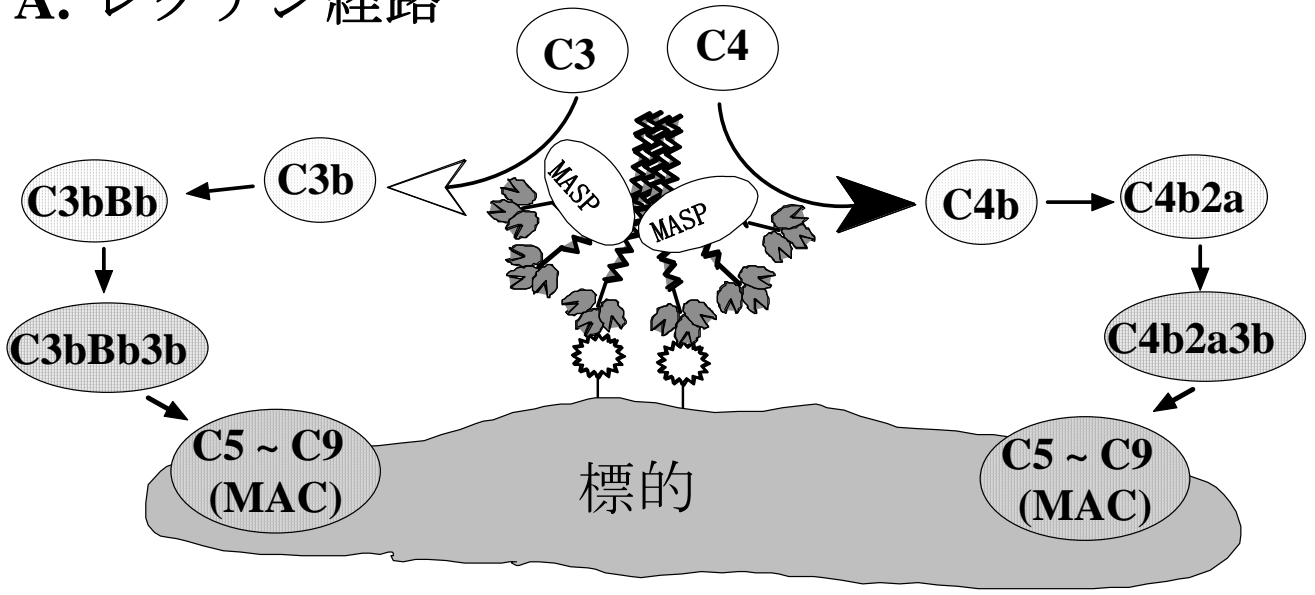
CL-K1



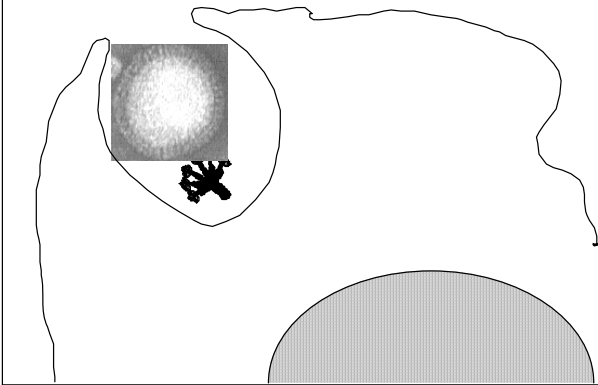
SP-D



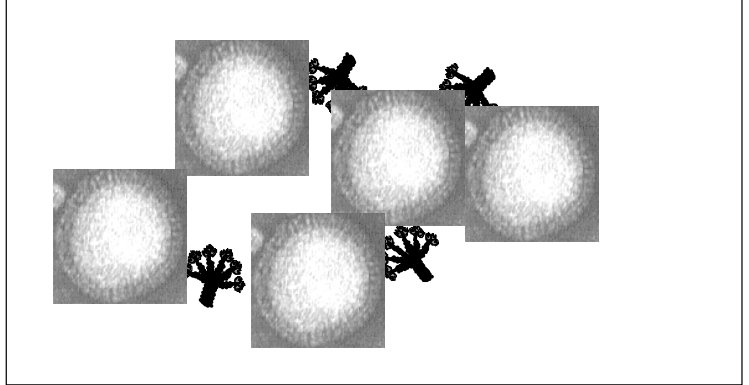
A. レクチン経路



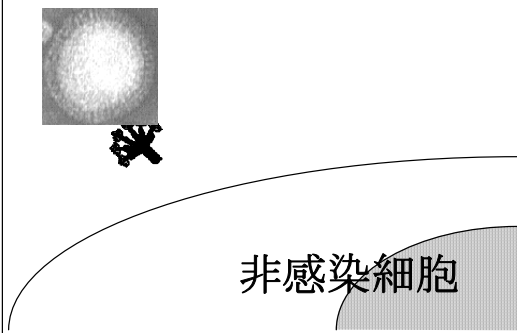
B. オプソニン



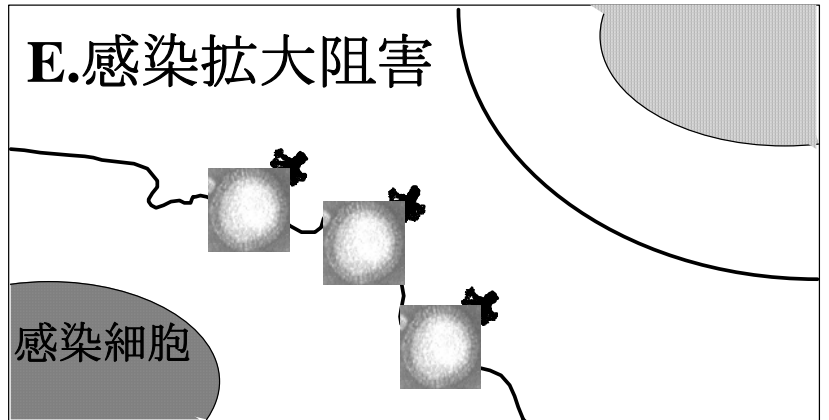
C. 凝集

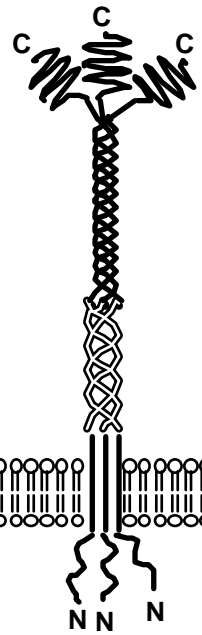
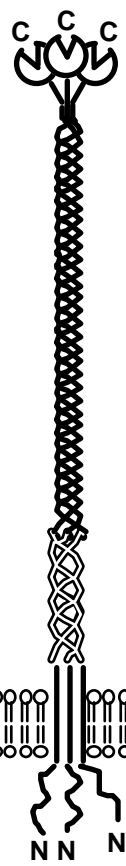
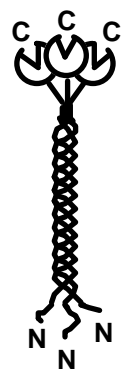
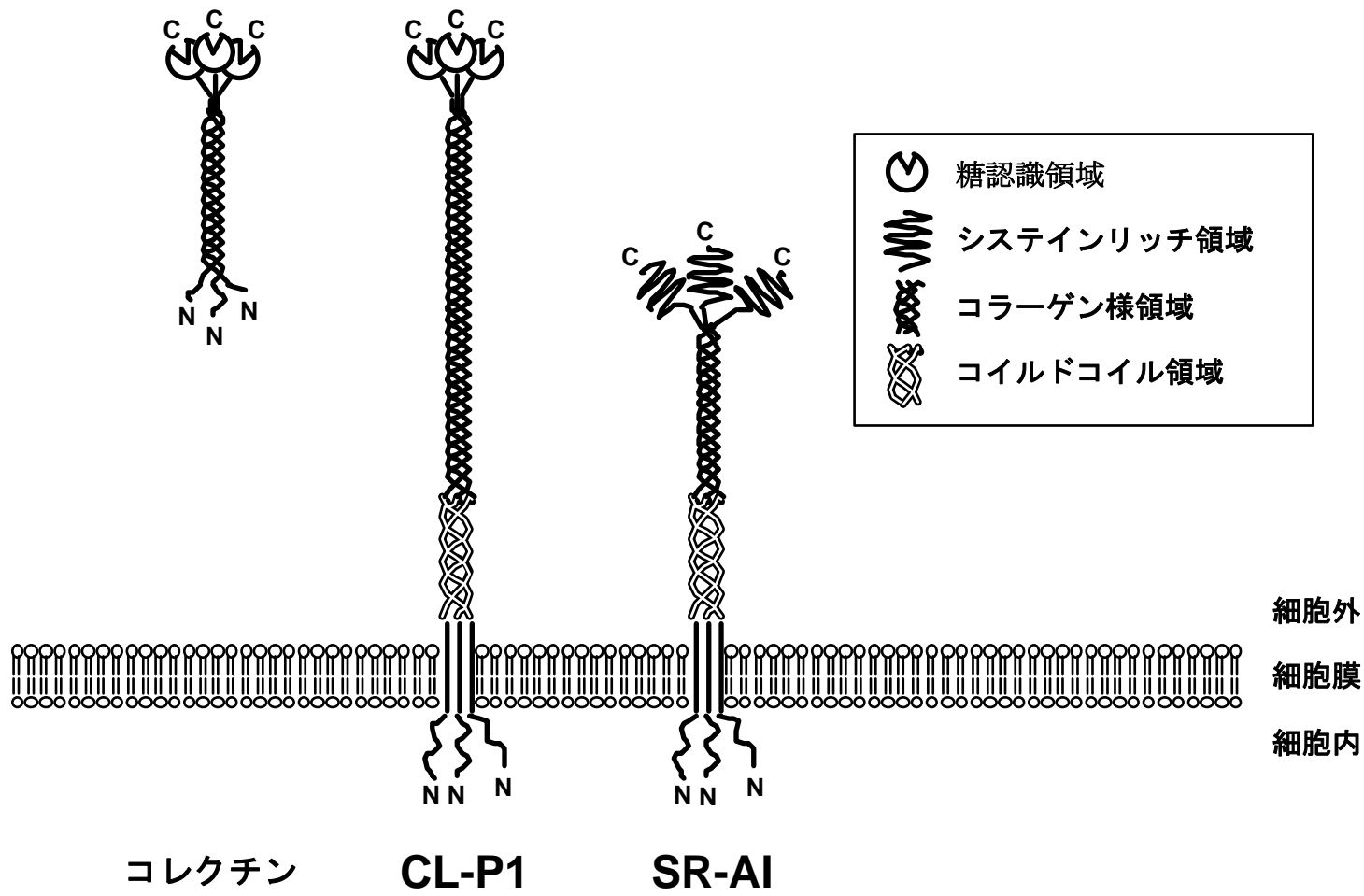


D. 中和



E. 感染拡大阻害



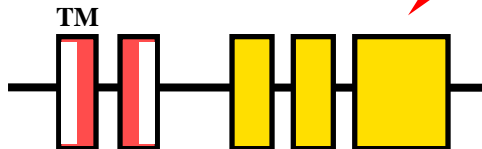


3 exons of CRD

クレクチンの源基

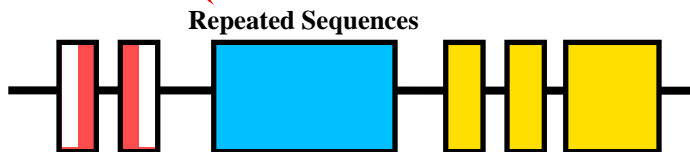
Association with Exons
Encoding Transmembrane (TM)
Domains

Association with Exons
Encoding Keratan Sulfate and
Chondroitin Sulfate Attachment
Domains



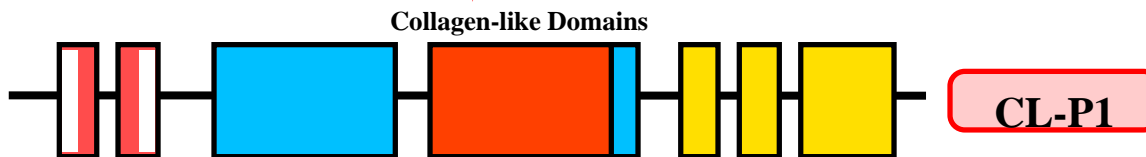
Integration of Exons between
Transmembrane Domains and
Carbohydrate Binding Domains

Proteoglycan Core Protein



Kupffer Cell Receptor
Rabbit Hepatocyte Lectin
IgE Fc Receptor

Association with Exons
Encoding Collagen-like Domains



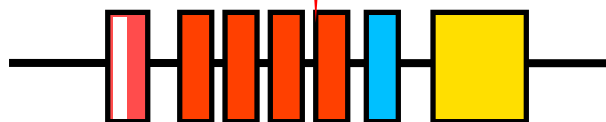
Collagen-like Domains

CL-P1

Intron Loss

CL-K1

CL-L1



“古典的”コレクチン