

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	吉崎 隆之
学位論文題目 新規ヒトコレクチン CL-K1 の生化学的解析			
共著者名 森 健一郎, 張 成宰, 本村 亘, 大谷 克城, 福澤 純, 吉田 逸朗, 若宮 伸隆			
未公表			
研究目的			
<p>コレクチンは糖鎖パターン認識に関与する自然免疫機能分子の 1 つで, 微生物の侵入に対する防御の第一線で機能している. 分子内にコラーゲン様領域と糖認識領域 (CRD) を有する特徴的な構造を持ち, カルシウム依存的に糖に結合するレクチンの 1 種である. CL-K1 は最近報告された新規のコレクチンで, これまでに血液中に分泌されていること, フコースおよびマンノースなどの糖や, リボ多糖およびリポテイコ酸など細菌の糖脂質に結合すること, さらにマウス組織染色において消化管上皮, 気管上皮, 皮膚上皮など生体防御に重要な部分に多く発現していることなどが明らかにされている. そこで本論文では, CL-K1 のヒト個体における生理的意義を明らかにすることを目的とし, 糖リガンド結合測定 ELISA 系による 50% 結合阻害糖濃度の検討, ヒト組織由来 mRNA やヒト組織切片を用いた CL-K1 の組織発現の解析, ヒト血清 CL-K1 濃度測定のための ELISA 系構築を行ったので報告する.</p>			
材料・方法			
<p>1. Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いた組換えヒト CL-K1 (rhCL-K1) の作成</p> <p>rhCL-K1 の発現は CL-K1 遺伝子を導入した CHO 細胞により行った. 無血清培地でプロテアーゼ阻害剤と共に 7 日間培養し, 遠心分離により培養上清を回収した. これをマンナンアガロースに結合させ, 5 mM 塩化カルシウムおよび 0.1 M マンノースを含む Tris buffered saline で溶出を行い, ピーク画分を分取した.</p>			
<p>2. 使用した抗体</p> <p>モノクローナル抗体 (MoAb) は CL-K1 CRD を大腸菌で作成してマウスに免疫することにより作成した. 得られた 20 種類の MoAb 産生クローンから, それぞれ Protein G を使って CL-K1 MoAb-47, 118, 129, 145, 211, 325, 412, 611, 620, 710, 718, 821, 1011, 1311, 1412, 1516, 1520, 2711, 2814, 5112 を精製した. ポリクローナル抗体 (PoAb) は大腸菌組換え CL-K1 CRD に対する CL-K1 PoAb-CRD (既報) のほか, 精製した rhCL-K1 を抗原として CL-K1 PoAb-(日) および CL-K1 PoAb-(月) を作成した. CL-K1 PoAb は, 抗原カラムによるアフィニティー精製を行った.</p>			

3. 糖結合能の解析

精製した rhCL-K1 各 4 μg を、マンナンアガロース、*N*-アセチルグルコサミンアガロース、マルトースアガロース、*N*-アセチルガラクトサミンアガロース、フコースアガロースに 4°C で 4 時間結合させた。洗浄後、10 mM エチレンジアミン四酢酸を含む Tris buffered saline で溶出して、パススルー画分および溶出画分を SDS-PAGE およびウェスタンブロットニングに供した。

50% 糖阻害解析は 96 穴プレートを用いた ELISA にて行った。プレートに PV-Man (生化学工業) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を固着させ、ビオチン化した rhCL-K1 または組換えヒト MBL (rhMBL) をそれぞれ 400 ng/ml の濃度で各種糖阻害剤とともに結合させた。続いて VECTASTAIN[®] Elite ABC KIT (Vector Laboratories) および SureBlue (KPL) で発色し、450 nm の値を測定した。

4. 定量 PCR

ヒト RNA は Human Total RNA Master Panel II (Takara Bio) を使用し、逆転写反応で得た cDNA を使用した。ヒト CL-K1 の定量はエクソン 8 とエクソン 9 の間を伸張するプライマーセットを使用し、7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて定量 PCR を行った。内部標準として 18S rRNA を選択し、腎臓での CL-K1 mRNA 発現量を 1 として補正を行った。

5. 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色はヒト組織切片に FDA TMA (Folio Bioscience) を使用した。組織切片をキシレンおよびエタノールで脱パラフィン処理し、室温 1 時間でブロックングを行った。続いて抗 CL-K1 PoAb-CRD を添加して終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 4°C、オーバーナイトで反応させた。洗浄後、2 次抗体に Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen) を添加し室温 1 時間反応させ、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (Olympus Optical) で観察した。

6. ヒト血清中の CL-K1 の定量

ヒト血清 CL-K1 の定量は抗 CL-K1 抗体およびビオチン化抗 CL-K1 抗体を使用したサンドイッチ ELISA により行った。20 種類の抗 CL-K1 MoAb および 3 種類の抗 CL-K1 PoAb, そしてそれらをビオチン化した 2 次抗体の組合せから最も感度の高い組合せ、CL-K1 PoAb-(H) とビオチン化 CL-K1 MoAb-1011 を選別した。標準曲線は rhCL-K1 を 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 ng/ml の濃度で作成した。CL-K1 測定サンプルは健康人ボランティア 10 人から採取した血清各 500 μl をマンナンアガロースで濃縮し、ELISA に供した。

成 績

1. rhCL-K1 の作成

CHO 細胞を用いた rhCL-K1 の作成を行い、培養上清 360 ml から約 4.5 mg の精製 rhCL-K1 を回収した。精製した rhCL-K1 が還元条件での SDS-PAGE により約 33 kDa のほぼ均一なバンドであること、非還元条件では単量体の分子量から主に 3 量体、6 量体、9 量体の成分から構成されていることが認められた。ウェスタンブロッティングで血清由来 CL-K1 と比較したところ、還元条件では血清由来 CL-K1 と同じサイズであったが、非還元条件では血清由来 CL-K1 が主に 6 量体形成しているのに対し、rhCL-K1 では多数の多量体のバンドが観察された。

2. rhCL-K1 の糖特異性

rhCL-K1 を各種糖固定化アガロースに供した実験では、フコースアガロースに対する親和性が非常に強くほとんどの rhCL-K1 が結合すること、またマンナンアガロースおよび *N*-アセチルグルコサミンアガロースには結合がやや弱く、パススルー画分にもわずかに検出された。マルトースアガロースおよび *N*-アセチルガラクトサミンアガロースにはほとんど結合しなかった。

PV-Man に対する各種糖の 50% 阻害濃度は、L-フコースで 13.1 mM と強く阻害され、*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。rhMBL との比較では、rhMBL では *N*-アセチルグルコサミンで 5.0 mM と非常に強く阻害されるのに対し、rhCL-K1 では 46.2 mM と著しい差が見られた。その他の糖では、両者でほぼ同様の傾向を示した。

3. ヒト CL-K1 mRNA の発現解析

CL-K1 mRNA の定量 PCR による相対定量では、腎臓、肝臓、副腎で同程度の高い発現が認められ、精巣、心臓、甲状腺、胸腺と続いた。骨髄および骨格筋では発現量が非常に低かった。その他の組織では一定の発現が認められ、ほとんどの器官でユビキタスに発現していることが認められた。

4. 免疫蛍光染色

ヒト組織を使った免疫蛍光染色により、腎臓、肝臓、心臓、肺、食道、胃、小腸、大腸、精巣、扁桃腺、甲状腺、そして副腎など、すべての組織において CL-K1 の発現が観察された。染色のパターンはそれぞれ異なっているものの、共通の特徴として血管平滑筋と思われる細胞群の染色が観察された。

5. ヒト血清中の CL-K1 濃度の定量

健常人ボランティア 10 人のヒト血清 CL-K1 濃度は、9 – 40 ng/ml であった。血清 MBL 濃度と CL-K1 濃度の間に明確な相関は認められなかった。

考 案

本研究ではヒトにおける CL-K1 の機能を明らかにするため、真核細胞における組換えヒト CL-K1 の大量発現と精製、糖結合力の定量的解析、発現分布の解析および血中濃度測定系の樹立による血中濃度の決定を行った。

コレクチン分子は多量体構造をとることで、糖に対する高い結合力を保持することが明らかとなっている。組換え MBL については多量体構造を有するが、そのジスルフィド結合のパターンが均一でないことが報告されている(引用文献 1)。本 rhCL-K1 は 3 量体、6 量体、9 量体以上の多量体から形成されており、血清由来 CL-K1 は主に 6 量体と思われる多量体が観察された。このことは血清由来 CL-K1 が均一な分子間ジスルフィド結合を有し、rhCL-K1 はその会合が不均一であることを示している。発現細胞における適切な発現システムを確立しても、コレクチンのように高度な多量体を形成する分子では均一なジスルフィド結合を持つ組換えタンパク質を作成するのは容易ではないことが考えられた。

rhCL-K1 の各種糖固定化アガロースへの親和性や PV-Man に対する各種 50% 糖結合阻害濃度の解析では、MBL との比較で両者はほぼ同様の糖親和性を示したが、*N*-アセチルグルコサミンに対する高い親和性については rhCL-K1 にはみられず、糖リガンド結合に関わるアミノ酸の異同等が原因であることが推測された。

定量 PCR によるヒト CL-K1 mRNA の定量解析では、ほとんどのヒトの臓器でユビキタスに発現していること、マウス CL-K1 の定量 PCR の結果と比較しても同様の傾向が観察され、本分子の発現分布はヒトとマウスの間では高い相関性があると考えられた。ヒト組織の免疫染色によるタンパク質レベルでの局在解析においても広範な組織でユビキタスに発現していることがヒトにおいても明らかになった。これらの CL-K1 発現様式は、SP-D の発現分布様式に一部類似していることが明らかとなった(引用文献 2)。

本測定システムによる、CL-K1 の血中濃度は 9 - 40 ng/ml であり、この測定値は MBL に比べて低く、健常人 MBL の 100 分の 1 程度であると推測された。この値は SP-D の血清濃度 49 ± 24 ng/ml と近い値であった(引用文献 3)。血中 MBL 濃度の低いヒトでは代償的に CL-K1 の高い値を予想していたが、今回の実験数では両者の間で有意な相関性は認められなかった。

組織の分布パターンや血中濃度の特徴から、CL-K1 や SP-D は、組織特異的に発現する MBL や SP-A とは異なり、共通した自然免疫として働いている可能性が推測された。

結 論

新規ヒトコレクチン CL-K1 は他のコレクチンとは異なる糖親和性を有し、mRNA およびタンパク質レベルにおいて広範な組織でその発現が認められた。これらのことから CL-K1 は新しい生体防御因子として働いている可能性が明らかとなった。

引用文献

1. Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Yamamoto, S., Sakamoto, T. and Wakamiya, N. (1999) High-level and effective production of human mannan-binding lectin (MBL) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J. Immunol. Methods.* **222**: 135-144.
2. Herias, M. V., Hogenkamp, A., van Asten, A. J., Tersteeg, M. H., van Eijk, M. and Haagsman, H. P. (2007) Expression sites of the collectin SP-D suggest its importance in first line host defence: power of combining in situ hybridisation, RT-PCR and immunohistochemistry. *Mol. Immunol.* **44**: 3324-3332.
3. Nagae, H., Takahashi, H., Kuroki, Y., Honda, Y., Nagata, A., Ogasawara, Y., Abe, S. and Akino, T. (1997) Enzyme-linked immunosorbent assay using F(ab')₂ fragment for the detection of human pulmonary surfactant protein D in sera. *Clinica Chim. Acta* **266**: 157-171.

参考論文

1. Keshi, H., Sakamoto, T., Kawai, T., Ohtani, K., Katoh, T., Jang, S. J., Motomura, W., Yoshizaki, T., Fukuda, M., Koyama, S., Fukuzawa, J., Fukuh, A., Yoshida, I., Suzuki, Y. and Wakamiya, N. (2006) Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol. Immunol.* **50**: 1001-1013.
2. Motomura, W., Yoshizaki, T., Ohtani, K., Okumura, T., Fukuda, M., Fukuzawa, J., Mori, K., Jang, S. J., Nomura, N., Yoshida, I., Suzuki, Y., Kohgo, Y., Wakamiya, N. (2007) Immunolocalization of a novel collectin CL-K1 in murine tissues. *J. Histochem. Cytochem.* in press.
3. Ohhira, M., Motomura, W., Fukuda, M., Yoshizaki, T., Takahashi, N., Tanno, S., Wakamiya, N., Kohgo, Y., Kumei, S. and Okumura, T. (2007) Lipopolysaccharide induces adipose differentiation-related protein expression and lipid accumulation in the liver through inhibition of fatty acid oxidation in mice. *J. Gastroenterol.* in press.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	吉 崎 隆 之
<p style="text-align: right;">審査委員長 立野正敏 ㊞</p> <p style="text-align: right;">審査委員 若宮伸隆 ㊞</p> <p style="text-align: right;">審査委員 鳥本悦宏 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>新規ヒトコレクチンCL-K1の生化学的解析</p>			
<p>コレクチンは糖鎖認識に関与する自然免疫機能分子のひとつで、微生物の侵入に対する防御機構に重要な役割を果たしている。分子内に糖認識領域(CRD)とコラーゲン様領域を持ち、複合体を形成する。論文提出者らは新たなヒトコレクチンである CL-K1 についてその結合能、組織分布、血中に分泌されることなどを報告してきた。今回は、CL-K1 の生理的意義を明らかにする目的で、リコンビナントヒトコレクチン(rhCL-K1)を作成し、rhCL-K1 に対する新規抗体を作製し、それをを用いた血中 CL-K1 の測定系を開発した。また、阻害物質の検討を行い、さらにヒト各種臓器における CL-K1 の発現を mRNA レベルおよび組織レベルで検討した。</p> <p>論文提出者は CHO 細胞を用いて rhCL-K1 を精製し、その性状を検討したところ血清由来 CL-K1 が6量体を形成しているのに対し、rhCL-K1 は3量体・6量体・9量体の混合物であることがわかった。次に rhCL-K1 と各種糖質との結合阻害実験にて検討したところ、フコースに対する結合性が強く、次いでマンナンやアセチルグルコサミンに結合性を示し、マルトースやアセチルガラクトサミンには結合せず、いままで報告されてきたコレクチンとは異なる結合性を示した。次に大腸菌で作成した rhCL-K1 の CRD を免疫源として単クロン抗体を作製し、家兔を免役して多クロン抗体を得た。この単クロン抗体と多クロン抗体を組み合わせることで、CL-K1 測定 ELISA 法を開発した。健常人血清 CL-K1 濃度は 9-40ng/ml であり、臓器特異性の高いサーファクタント蛋白(SP)D に近い値であったが、ほかのマンノース結合蛋白(MBP)の 100 分の1であった。次にこの抗体と凍結組織を用いて組織発現を検討したところ、マウスと同様の組織分布を示し、肝臓では中心静脈へ分泌される染色像が得られ、MBL 類似の生産系にあると考えられた。</p> <p>CL-K1 は申請者の研究室で発見された新規コレクチンであり、未解明の部分が多く、これらの新規発見は CL-K1 研究におけるヒト CL-K1 の生理作用解明に、重要な役割を果た</p>			

すものとする。論文の構成・手法も適切であり、また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的な回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。