

依頼論文

新規コレクチンの発見

大谷 克城* 鈴木 定彦** 若宮 伸隆*

【要 旨】

コレクチンは、コラーゲン様ドメインを内部構造にもつ、C型レクチンのスーパーファミリーであり、自然免疫に重要な役割を果たすと考えられている。我々は、従来の生化学的アプローチでは得ることができなかった新しいコレクチンファミリー（新規コレクチン）を、リバーズジェネティクスを活用したアプローチにより、初めてクローニングすることに成功した。本稿では、3つの新規コレクチンのクローニングと構造および機能に関する最新の知見を紹介する。

キーワード コレクチン、コラーゲン、自然免疫、糖鎖結合活性

1 はじめに

コレクチンは、その蛋白質がコラーゲン様領域と糖鎖認識領域（CRD）の2つの特徴的な構造を持つことから、「コラーゲン」と「レクチン」を短縮し、「コレクチン」と呼ばれるようになった¹⁾。ヒトを含め、多くの生物のゲノム解析が進み、本遺伝子は、脊索動物から哺乳動物まで保存される動物C型レクチンの一遺伝子であることが明らかになっている²⁾。コレクチンの最初の発見は、ウシコングルチニン（BKg）であり、その後1980年代に入って、マンナン結合レクチン（MBL）グループ、肺サーファクタント蛋白質A（SP-A）グループおよび肺サーファクタント蛋白質D（SP-D）グループの3つのコレクチングループが明らかになった。これらのうちMBLは肝臓から分泌され、補体成分と共同するかあるいはコレクチン受容体を介して微生物を排除する、自然免疫に携わる事が知られている³⁾。一方、肺サーファクタント蛋白質を欠損させたマウス（ノックアウトマウス）を用いた感染実験の結果から、SP-Aが肺感染症を引き起こす種々の病原体防御において重要な役割を果たしている事⁴⁾、

また、SP-Dは肺機能維持のためのサーファクタントの恒常性維持に重要な働きをしている事が示されている⁵⁾。最初に発見されたコングルチニンはウシ科の動物のみに見られるSP-Dファミリーの一員であるが、血清βインヒビターとしてインフルエンザAウイルスに結合して、その赤血球凝集活性（HA）を阻害するとともに、同ウイルスを中和する事が報告されている⁶⁾。また、SP-Dファミリーの一員としてコレクチン-43（CL-43）とコレクチン-46（CL-46）がウシにおいて、近年発見されている⁷⁻⁸⁾。以上のコレクチンは、全て分泌型コレクチンであり、その高い糖結合力により精製され、その性状と機能が明らかとなり、他のコレクチン同様自然免疫に関与しているものと考えられている。

一方、大谷らは、上記の方法とは異なる、リバーズジェネティクス（逆遺伝学）手法を活用したアプローチにより、新しいコレクチンファミリー群と考えられる蛋白質をコードするcDNA断片の一部をヒトの組織のESTデータベースから探索発見後、この部分配列情報を用いてそれらの遺伝子をクローニングした。これらのコレクチンは、最初にcDNA断片が単離さ

*旭川医科大学 医学部微生物学講座 **北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター国際疫学部門

れた組織の名前を拝してそれぞれ肝臓コレクチン 1 (Collectin Liver 1: CL-L1)、胎盤コレクチン 1 (Collectin Placenta 1: CL-P1)、腎臓コレクチン 1 (Collectin Kidney 1: CL-K1) と命名し、その機能についての研究を開始した。これら発見された 3 種のコレクチンは進化系統樹上では、独立した 3 つの新たな系統を形成しており、上記の古典的な 3 つのコレクチングループ「古典的コレクチン」に対比して、「新規コレクチン」と呼んでいる。本稿では、これら新規コレクチン CL-L1、CL-K1、CL-P1 の特徴について解説する。

1. 新規コレクチン遺伝子のクローニング

1) 遺伝子クローニング方法

目的の蛋白質をコードする cDNA のクローニングは主として 4 つの方法で実施されている。最も古典的な方法は、精製蛋白質を出発材料とするもので、部分アミノ酸配列が決定されると、それを基に DNA プローブを合成し cDNA ライブラリーに対してハイブリダイゼーションすることにより目的とする cDNA をクローニングする。第 2 の手法は、精製蛋白質を出発材料とするものであるが、精製蛋白質の免疫により得られた抗血清あるいは抗体をスクリーニングに用いる方法である。第 3 の手法は塩基配列の類似性に着目し、cDNA ライブラリーをスクリーニングし、新規の cDNA をクローニングするものである。従来のコレクチンは上記の何れかの手法によりクローニングされてきた。第 4 の手法は、リバースジェネティックと呼ばれるものである。本法は、現在では一般的になっているが、目的とする蛋白質中にあると予想される特異的配列を用いて、DNA 配列を収載したデータベースを検索する方法により、新規コレクチン遺伝子をクローニングしようとするものであり、3 つの新規コレクチン cDNA は全て第 4 の手法によってクローニングされた。

2) EST データベースより新規コレクチン関連 DNA 配列の発見

我々は古典的コレクチンの糖認識領域 (CRD) 間で保存されているアミノ酸配列を用いてプローブを作成し、米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) の expressed sequence tags (EST; 発現配列タグ) データベースをスクリーニングし、コレクチンの CRD と類似性を有する cDNA 断片の探索を試みた。

検索を始めて 1 年以上経ち、EST データベースが充実してきた頃、古典的コレクチンである MBL、SP-A、SP-D やアジアロ糖蛋白質受容体、マクロファージマンノース受容体、セレクチンなどの他の C 型レクチンをコードする cDNA に加えて、性状が明らかにされていない複数の未知の cDNA が発見されるようになった。次に、新規コレクチンをコードする cDNA を選択するために、その翻訳産物がコラーゲン様構造 (Gly-X-Y repeats: グリシン-任意アミノ酸-任意アミノ酸の繰り返し) を併せ持ったものを選択した。得られた複数の cDNA はすべて部分配列であったため、Cap Site cDNA (ニッポンジーン社) を用いて全長の cDNA 遺伝子を得て、3 つの新規コレクチン CL-L1、CL-K1、CL-P1 をコードする cDNA のクローニングに成功した。

2. コレクチン CL-L1

1) CL-L1 遺伝子クローニング

我々は、前述の方法により、新規コレクチン CL-L1 をコードする cDNA を世界で最初にクローニングし、その性状を明らかにした⁹⁾。CL-L1 の名称は、最初に cDNA を単離した組織 (肝臓: Liver) に因んで名付けた。得られた CL-L1 cDNA は 277 個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。ノーザンブロットティングの結果は、CL-L1 が古典的コレクチンのように特定の臓器に発現が限定されていることはなく、肝臓を主として、胎盤、副腎、肺、小腸および前立腺においても発現している事を示す興味深いものであった。

2) 細胞質に局在する CL-L1

クローニングした cDNA から類推される CL-L1 蛋白質は、システイン残基を含む N 末端領域、コラーゲン領域、ネック領域、糖鎖認識領域からなる典型的なコレクチンの構造を示していた。しかしながら、分泌型蛋白質に存在するシグナルペプチドと考えられる、疎水性のアミノ酸配列が、N 末端に認められず、CL-L1 が細胞質蛋白質である可能性が推測された。肝臓組織を用いて、細胞成分の分画を行い、組換えヒト CL-L1-CRD ペプチド (rhCL-L1-CRD) を過免疫して得たウサギ抗血清を用いて、細胞内分布の解析を実施した。その結果、CL-L1 は、膜分画や培養上清ではなく、細胞質のみに存在するという、ユニークな性質を示すものであった。同一抗血清を用いた初代ヒト肝臓

培養細胞を用いた、免疫蛍光染色においても CL-L1 が細胞質に局在する事が観察された。

3) CL-L1 の生化学的性状

コレクチン分子のレクチン活性を明らかにするために、大腸菌を宿主として rhCL-L1-CRD を作成した。本組み換えコレクチンは、マンナン-アガロースカラムおよびマルトース-アガロースカラムへの結合性は認めなかったが、メンブレン上での糖鎖プローブへのカルシウムイオン依存性の結合活性を示した。糖鎖プローブを用いた ELISA による解析では、マンノース、フコースおよびガラクトースに対して結合親和性を示し、N-アセチルグルコサミンには弱い親和性を、N-アセチルガラクトサミンには更に低い親和性を示した。また、マウス肝臓 cDNA ライブラリーのスクリーニングにより得られたマウス (m)CL-L1cDNA から作製した mCL-L1-CRD も rhCL-L1-CRD と同様な糖鎖結合活性が観察された¹⁰⁾。

CL-L1 は、これらの性状に加えて、カルボキシ末端に塩基性アミノ酸リジンが4個連続して存在するユニークなクラスターを形成している特徴を有していた。同様の4残基連続のリジンクラスター (lysine rich cluster = LRC) は酵母アミノアシル tRNA 合成酵素においても観察され、蛋白の核への局在に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている¹¹⁾。また、ヒト細胞質メチオニル tRNA 合成酵素 (hMRS) においても、カルボキシ末端に4残基連続リジンのクラスターが報告されており¹²⁾、メチオニンと tRNA を連結する hMRS が多種多様な細胞分化シグナルに呼応して核へ移行する事実に関与すると考えられている。以上のことから、カルボキシ末端に4残基連続リジンのクラスターを有する CL-L1 は、細胞質から核へと輸送される可能性があるとして推測されるが、その証明やその輸送の生理的意義については、本分子の新たな可能性を示すものとして注目され、今後の詳細な研究が待たれる。

一方、mCL-L1 の研究においては、マウス胚発生の時期と CL-L1 のメッセンジャー RNA (mRNA) の関連性を検討した。その結果、mCL-L1 mRNA は胚発生の極初期からすでに発現しており、日令を経る毎にその発現量が増加し、12.5日目に最高に達することを観察している¹⁰⁾。CL-L1 が胎児肝臓、胚体外膜、羊膜および卵黄嚢で発現しているという事実を考えあわせると、

CL-L1 が胚発生において何らかの重要な役割を果たしている可能性はあると考えられるが、直接的な証明はなされていない。

3. コレクチン CL-K1

1) CL-K1 遺伝子クローニング

CL-L1 と同様の方法により得られた新規コレクチンは、由来臓器より腎臓コレクチン-1 (CL-K1) と命名した¹³⁾。CL-K1 は、CL-L1 遺伝子クローニングの際に、近縁の遺伝子の存在が、ゲノミックサザン解析により推測されていた。

2) CL-K1 遺伝子の特徴

813塩基のオープンリーディングフレームよりなる CL-K1 をコードする cDNA はシステイン残基を含むアミノ末端領域、コラーゲン様領域、ネック領域、CRD よりなる典型的なコレクチン構造を有する271アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。CL-L1 と CL-K1 の共通した特徴はコラーゲンエキソンの長さにある。従来型コレクチンのコラーゲンエキソンが100塩基対以上であるのに対して、CL-L1 および CL-K1 では54塩基対あるいは72塩基対しかない。また、多価の陽性電荷を有するアミノ酸クラスター (GXKKGXK) はスカベンジャー受容体である SR-AI および CL-P1 のコラーゲン様領域において特徴的であり、酸化 LDL、酵母、細菌の様な微生物への結合部位として推測されている^{13,17)}。CL-K1 のコラーゲン様領域には塩基性アミノ酸を含んだクラスター (GXKKGXKGYGRHGK(R)XGXYGXX) が不完全であるが存在しているが、その役割については不明である。

3) 分泌型コレクチンである CL-K1

CL-K1cDNA 配列から予想されるアミノ酸配列では、N末端付近に25アミノ酸よりなる疎水性アミノ酸を多く含むシグナルペプチド配列が見いだされ、CL-K1 は分泌蛋白質と予想された。また、CL-K1 遺伝子のC末端に myc 配列を付加した cDNA を CHO 細胞へ導入した CL-K1/CHO 細胞では、抗 myc 抗体とゴルジ体特異的マーカーで BODIPY TR による2重染色において、これら2分子の共局在が証明され、CL-K1 が小胞体-ゴルジ体に局在することが認められた。また、ウェスタンブロット分析でも CL-K1 は細胞溶解物よりもむしろ培養上清中に大量に検出され (リコンビナ

ントヒト CL-K1=rhCL-K1)、ヒト血清中のマンナン結合画分および CL-K1/CHO 細胞培養上清中に34kDa の蛋白質が検出された。更に、血清由来の34kDa 蛋白質の部分アミノ酸配列分析から、これが全長の CL-K1 である事が判明し、CL-K1 が分泌蛋白質である事が証明された。

3) CL-K1 の生化学的性状

ビオチン化糖鎖プローブを用いた糖鎖プロット実験と糖鎖を結合させたアガロースへの結合実験から、CL-K1 がD-マンノース、L-フコースに比較的強く結合し、N-アセチルガラクトサミンに弱く結合する事が判明した。一方、N-アセチルグルコサミン 又はD-グルコース には、カルシウム依存的な結合活性を示さなかった¹³⁾。糖鎖結合に関与するレクチンフレームと呼ばれる5つのアミノ酸残基 (EPN-E-WND) はカルシウムイオン依存性に、糖鎖結合に重要な役割を果たしていることが知られている^{14,15)}。レクチンフレームにおいて、この前方のアミノ酸残基 EPN が QPD に置換された場合、MBL の糖鎖結合性はマンノース型からガラクトース型へと変化することが認められており、この2つのアミノ酸残基が重要な役割をもつと考えられている¹⁵⁾。CL-K1 のレクチンフレームは MBL と同様に EPN 型である。このレクチンフレームの結合特異性は、マンノース、グルコース、フコースおよびN-アセチルグルコサミンを示すものであるが、CL-K1 はフコースおよびマンノースには結合するもののN-アセチルグルコサミンへは結合性を示さない。CL-K1 では、コレクチンファミリー糖鎖認識領域における基盤フレームである4個のシステインと14個のアミノ酸残基は従来型コレクチンと一致しているが、Tyr231/Asn233 の2個のアミノ酸は CL-K1 において Phe225/Lys227 に置換されていた。この置換がN-アセチルグルコサミンへの結合活性の弱さに関与している可能性があるとして推測している¹³⁾。

4) CL-K1 の組織分布とその予想される生物学的機能

マウスの様々な臓器から抽出した RNA を用いて定量 PCR 分析を実施した。その結果最も高い発現は心臓で見られ、肝臓、睪丸、白色脂肪組織、脳および腎臓でも比較的高い発現が確認された。これらの結果は CL-K1 抗体を用いた組織染色の結果と良く一致していた¹⁶⁾。組織染色においては、CL-K1 は腎臓の近位

尿細管、細気管支腺、消化管粘膜において発現しており、CL-K1 がこれら様々な組織の内腔へ分泌されている事が予想された。SP-A および SP-D に類似した、この発現様式は尿路、呼吸器及び消化器を侵略する微生物に対する防御において重要な役割を果たしている可能性を示している。定量 PCR と免疫組織染色の結果から、MBL と同様に CL-K1 が肝細胞で産生され、中心静脈を通過して血流中に分泌されるものと考えられる。膵臓では CL-K1 は主に腺房細胞および膵島細胞に発現が見られた。特に、膵島での CL-K1 発現はソマトスタチン産生細胞に見られ、胃粘膜においても同様な現象が観察された。ソマトスタチンは内分泌系を制御し、様々な2次ホルモンの放出を阻害する事で知られているペプチドホルモンである。最近、ソマトスタチンの自然免疫への関与に関する報告もあり、ソマトスタチンが CL-K1 と相まって宿主防御において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。小腸においては、同様のペプチドであるディフェンシンが、抗微生物活性を有し小腸の粘膜バリアーにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになっており、パネート細胞がディフェンシンを分泌している。組織染色において、パネート細胞に CL-K1 の高い発現が見られた。CL-K1 はディフェンシンと共同して小腸における自然免疫の一端を担っている可能性があるとして推測できる。

CL-K1 のレクチン活性を利用したレクチンプロット解析では、CL-K1 は大腸菌・肺炎桿菌のリポポリサッカライド (LPS) や出芽酵母のマンナンに対する結合活性を示した¹³⁾。古典的コレクチン MBL では微生物への結合は補体活性化の引き金となり抗微生物活性が発動される。MBL は MASP (MBL-associated serine protease) に相当する分子とそのコラーゲン領域で結合し、補体活性化能を惹起することが考えられており、CL-K1 も同様の方法で、抗微生物活性を発揮する可能性が考えられるが、現在のところ CL-K1 と MASP の結合や補体活性化については、明らかになっていない。

4. コレクチン CL-P1

1) CL-P1 遺伝子クローニング

CL-P1 遺伝子のクローニングは、CL-L1、CL-K1 両遺伝子と同様の方法で、CL-P1cDNA 断片からクロー

ニングした。得られた cDNA をプローブとしたノーザンブロット分析の結果から CL-P1 をコードする mRNA が、胎盤において大量に発現していることと、発見された cDNA 断片の由来臓器が胎盤であったため、胎盤コレクチン 1 (Collectin Placenta 1: CL-P1) と命名した¹⁷⁾。また、同時に中村らにより酵母 2 ハイブリッドシステムを用いて LIM-Kinase 2 と会合する分子としてクローニングされた蛋白質は我々の報告したものと同一のもので、スカベンジャー受容体構造を有する C 型レクチン (Scavenger Receptor C-type Lectin: SRCL) と命名している¹⁸⁾。

2) CL-P1 の生化学的性状

大谷らの検討により、Real time PCR 法と免疫染色により、CL-P1 をコードする mRNA はヒト血管内皮細胞やマウス心臓切片の微小血管内皮にその存在が確認された。また、flow cytometry による検討において、

ヒト血管内皮細胞の初代培養株 HUVEC および HUAEC の表面に CL-P1 の発現が確認された。つぎに、組換えヒト CL-P1-CRD ペプチド (rhCL-P1-CRD) を免疫することによって得られた免疫血清を用いて、CL-P1cDNA をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に形質導入して得られた細胞や HUVEC および胎盤膜抽出物に対するウエスタンブロット分析を行った。結果、CL-P1 は還元条件下では 140kDa の分子量を示し、非還元条件下の CL-P1 は、さらに高分子量の蛋白質として検出された。さらに、CHO 細胞で発現させた膜貫通領域を欠いた CL-P1 分子はゲル濾過分析において約 300kDa という、3 量体構造がもつ分子量サイズを示した (未発表)。以上の事実とその構造上の特徴から、CL-P1 はコラーゲン領域とコイルドコイル領域で 3 量体のオリゴマー構造を形成していると推測されている。通常、コレクチンは分泌型蛋白質で、

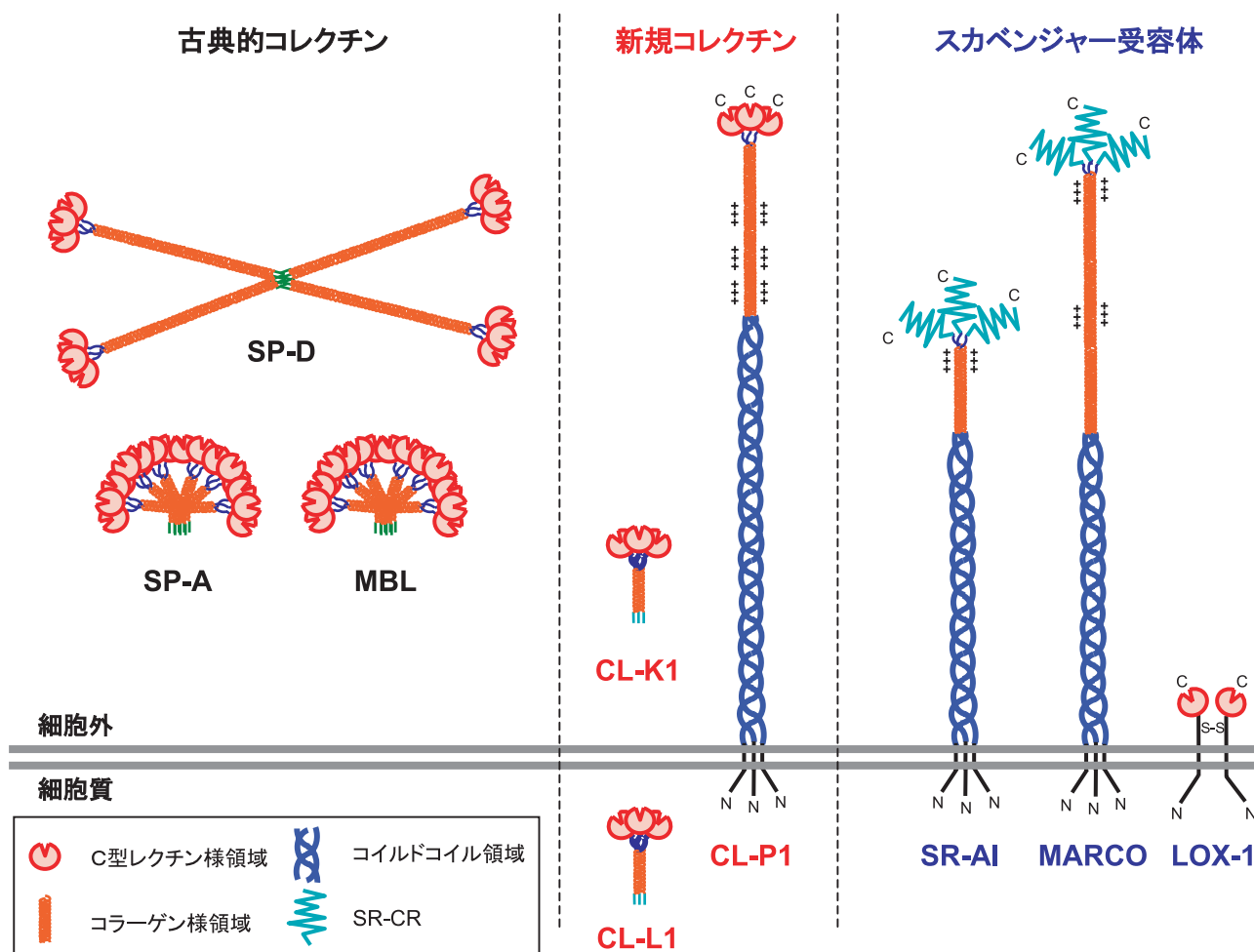


図1 コレクチン分子とスカベンジャー受容体の構造の比較

N: アミノ末端領域、C: カルボキシ末端領域、+++ : 陽性荷電、S-S : ジスルフィド結合、SR-CR : スカベンジャー受容体システインリッチ領域

細胞外に分泌されて3量体が1つのサブユニットとなり、それらがN末端に存在するシステインによりジスフィド結合で多量体を形成し存在することが明らかになっている。図1に、CL-P1の予測される構造上の特徴を示した。

3) 膜結合型蛋白質であるコレクチン CL-P1

CL-P1cDNAの塩基配列から予測されるCL-P1のアミノ酸配列から、CL-P1が742個のアミノ酸からなる事が判明し、その全体構造が、ロイシンジッパー様構造を有する細胞質領域、膜貫通領域、コイルドコイル領域、コラーゲン様領域、ネック領域および糖認識領域(CRD)であることがわかった。この全体構造は、CL-P1がコレクチンの特徴(コラーゲン様構造+C型レクチン)を有するII型膜貫通蛋白質である可能性を示していた。そこで、C末端部分にmycタグ配列を付加したCL-P1cDNAを強制発現させたCHO細胞(CL-P1/CHO)を作成し、CL-P1分子の局在を検討した。その結果、CL-P1はmycタグ抗体とCL-P1-CRD抗体により同時染色され、細胞膜上にその存在が確認された。また、上述のごとく、CL-P1-CRD抗体によりヒト正常細胞株であるヒト血管内皮細胞HUVEC表面にCL-P1が発現されている事実から、CL-P1が膜結合型コレクチンである事が強く推測された。

4) CL-P1の生物学的機能

図1で見られるように、CL-P1の予測される構造がスカベンジャー受容体-A1(SR-A1)およびMARCOの構造と酷似している事から、CL-P1がスカベンジャー受容体に類似の機能を有している可能性が考えられたため、CL-P1/CHO細胞を用いて、各種低密度リポ蛋白質(LDL)の結合性を検討した。その結果、酸化LDLはCL-P1/CHO細胞へ結合したが、アセチル化LDLおよび非修飾LDLは結合せず、CL-P1/CHO細胞と酸化LDLの結合が特異的なものであることが示された¹⁷⁾。また、CL-P1/CHO細胞への酸化LDLの結合はポリI、ポリGや硫酸デキストランの様な多価の陰性荷電した基質により阻害された。これらの結果はCL-P1が、荷電による結合能を有するスカベンジャー受容体として機能する可能性を示唆するものであった。また、その活性がコラーゲン様領域の3か所に存在する塩基性アミノ酸のクラスターを介する可能性が示唆された。森らによる予備的検討では、細胞外

領域に存在するドメイン構造の結合解析により、酸化LDLや細菌はコラーゲン様領域で主に結合すること、糖鎖抗原は糖認識領域(CRD)で結合されること、酵母は主にコラーゲン様領域で結合するが、コイルドコイル領域により結合が抑制されることを見出している(未発表)。また、本結果のように、CL-P1は、酵母に結合するが近縁のSR-AやMARCOは酵母に結合せず、スカベンジャー受容体のリガンド認識機構がそれ程単純ではないことが推測される。従来型コレクチンは細胞外へ分泌されるが、CL-P1は膜結合型であり、血管内腔側においては細菌や酵母ばかりでなく、酸化LDLにも結合してこれらを取り込みその量を調節しているものと考えられる。さらに近年、ヒト血管内皮細胞(HUVEC, HUAEC, HAEC)においてはCL-P1の発現抑制を行うと、酵母のファゴサイトーシスが低下することより、血管内皮細胞における微生物のファゴサイトーシスに、CL-P1が一義的に重要な役割を果たすことを明らかにした¹⁹⁾。これらの事実は、CL-P1は血管系で主に働き、生体防御に重要な役割を果たす可能性があること示唆している。

吉田らは、リコンビナントCL-P1がN-アセチルガラクトサミン、T抗原(Gal β (1-3)GalNAc α Ser/Thr)およびTn抗原(GalNAc α (1-O)Ser/Thr)に結合する事を示した²⁰⁾。最近になって、CoombsらはCL-P1がヒト多型核白血球や乳がん、大腸がん、ホジキンリンパ腫などの様々な腫瘍細胞に発現している糖鎖複合体Lewis^x抗原(Le^x)に結合する事を報告している。これは、腫瘍細胞上のLe^xが血管内皮細胞上のCL-P1を介して相互作用し、腫瘍細胞の転移に重要な役割を果たしている可能性を示唆している^{21,22)}。一方、アルツハイマー病モデルトランスジェニックマウスのアミロイド陽性血管内皮細胞上ではCL-P1の発現上昇が見られ、同様の現象がアルツハイマー病患者の組織でも観察された。これらの組織ではアミロイドとCL-P1の共局在が細胞内で観察され、CL-P1がアミロイド排除において重要な役割を果たしている可能性を示唆している²³⁾。

遺伝子多型解析の結果も興味深いものである。日本人ボランティア10人においてCL-P1遺伝子のハプロタイプ解析が実施され、遺伝子の5'上流域に1つ、イントロン2に2つ、エキソン5に1つ、エキソン6に2つの、合計6つの異なった1塩基多型(SNPs)

が見いだされた²⁴⁾。現在のところ、CL-P1 蛋白欠損症やゲノムの遺伝子の部分欠失の報告はなされていないが、これらのハプロタイプ情報は免疫学的攪乱やアテローム性動脈硬化へのCL-P1の関与に関する研究において重要な意義をもつと考えられる。中でも、エクソン6における2つのSNPsはアミノ酸置換に繋がり、特に重要なものと考えられる。生体におけるCL-P1の役割については、現時点では情報はあまりなく、哺乳動物での欠損モデル動物の作成が待たれる。その他、初期発生における機能、血管の恒常性における機能、バイオマーカーとしての可能性も考えられるが、現時点では予備的解析段階で、詳細は大谷らの総説²⁵⁾に譲る。

5. 新規コレクチンと古典的コレクチンの比較

コレクチンの名称には、歴史的にいくつかの命名が独自にされているが、この名前とは別に、HUGO (Human Genome Organization) からの委託で、若宮を中心にこの遺伝子ファミリー名が検討され、現在では *Colec* という遺伝子名に統一された。新規コレクチン群はその遺伝子登録の順番から、CL-L1(*Colec10*)、CL-K1(*Colec11*)、CL-P1(*Colec12*)、という遺伝子名になっている。これらを踏まえて、表1には新規コレクチンと古典的コレクチンの比較を示した。1つの大きな特徴の差異は古典的コレクチンではその存在様式が全て分泌型と一定であるのに対して、新規コレクチン

では、その蛋白質の局在が、膜結合型、細胞質型、分泌型と様々な点にある(図1)。組織分布においても、古典的コレクチンではある特定の組織に局限しているのに対して、新規コレクチンでは多様な組織に分布している点で異なっている。糖鎖結合親和性は新規コレクチンでは単糖ではそれほど高くなく、古典的コレクチンの高い糖鎖結合親和性と非常に対照的である。

いくつかの特徴の差異を見せている新規コレクチンと古典的コレクチンであるが、遺伝子の構造およびアミノ酸配列の比較による系統解析からもこれらの分子の違いがわかる。図2に示した遺伝子構造の特徴で、CL-P1だけ別の特徴を有している。細胞質領域、膜貫通領域、コイルドコイル領域を有している点で他のコレクチンと大きな差異を見せているばかりか、コラーゲンエクソン、CRD エクソンにおいてもその内部の構成が異なっている。つまり、通常コレクチンでは、コラーゲンエクソンは、複数の短いエクソンから構成されているのに対して、CL-P1では、1つの長いエクソンが存在するのみである。これとは逆に、通常コレクチンではCRD領域が、1つのエクソンより構成されているのに対して、CL-P1は3つ+1つのエクソンというコレクチン以外の全C型レクチンに特徴的であるエクソン数より構成されている。図3に示したCRD領域のアミノ酸配列の比較による系統解析の結果からも3種の新規コレクチンが古典的コレクチンとは異なった分子進化を経て誕生したことが推測できる。

表1 新規コレクチンと古典的コレクチンの特徴

	新規コレクチン			古典的コレクチン		
	CL-L1	CL-K1	CL-P1	MBL	SP-A	SP-D
(遺伝子名)	<i>Colec10</i>	<i>Colec11</i>	<i>Colec12</i>	<i>Colec1</i>	<i>Colec4</i>	<i>Colec7</i>
染色体ヒト(マウス)	8 (15)	2 (12)	18(18)	10(MBL-A:14 MBL-C:19)	10(14)	10(14)
存在様式	細胞質型	分泌型	膜結合型	分泌型	分泌型	分泌型
主な組織分布	ユビキタス	ユビキタス	血管内皮細胞	肝臓	肺	肺
レクチンフレーム	Y-N-EPS-E-WND	F-K-EPN-E-WND	Y-N-QPD-E-WND	Y-N-EPN-E-WND	Y-N-EPA-E-WND	Y-N-EPN-E-WND
糖鎖結合選択性	Man, Fuc, Gal	Fuc > Man	Gal, GalNAc, Le ^x	GlcNAc > Fuc, Man	ManNAc > Fuc, Mal	Mal > Man, Glc
糖鎖結合親和性	低	低	低	高	高	高
生物学的活性	不明	自然免疫?	自然免疫 スカベンジャー受容体	自然免疫	自然免疫	自然免疫 肺サーファクタント の恒常性維持

糖鎖: Gal; ガラクトース、GalNAc; N-アセチルガラクトサミン、Le^x; ルイス X、Man; マンノース、Fuc; フコース、GlcNAc; N-アセチルグルコサミン、ManNAc; N-アセチルマンノサミン、Mal; マルトース、Glc; グルコース

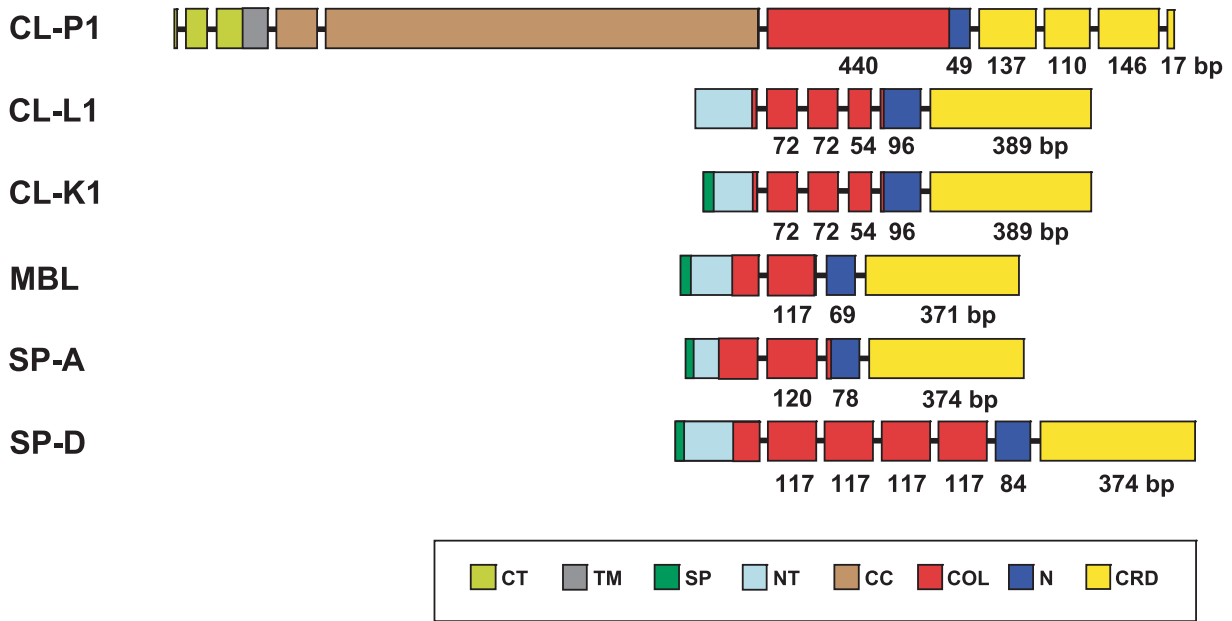


図2 ヒトコレクチン遺伝子ファミリーの構造とその多様性

CT：細胞質領域、TM：膜貫通領域、SP：シグナルペプチド領域、NT：アミノ末端領域、
CC：コイルド-コイル領域、COL：コラーゲン様領域、N：ネック領域、CRD：糖鎖認識領域。

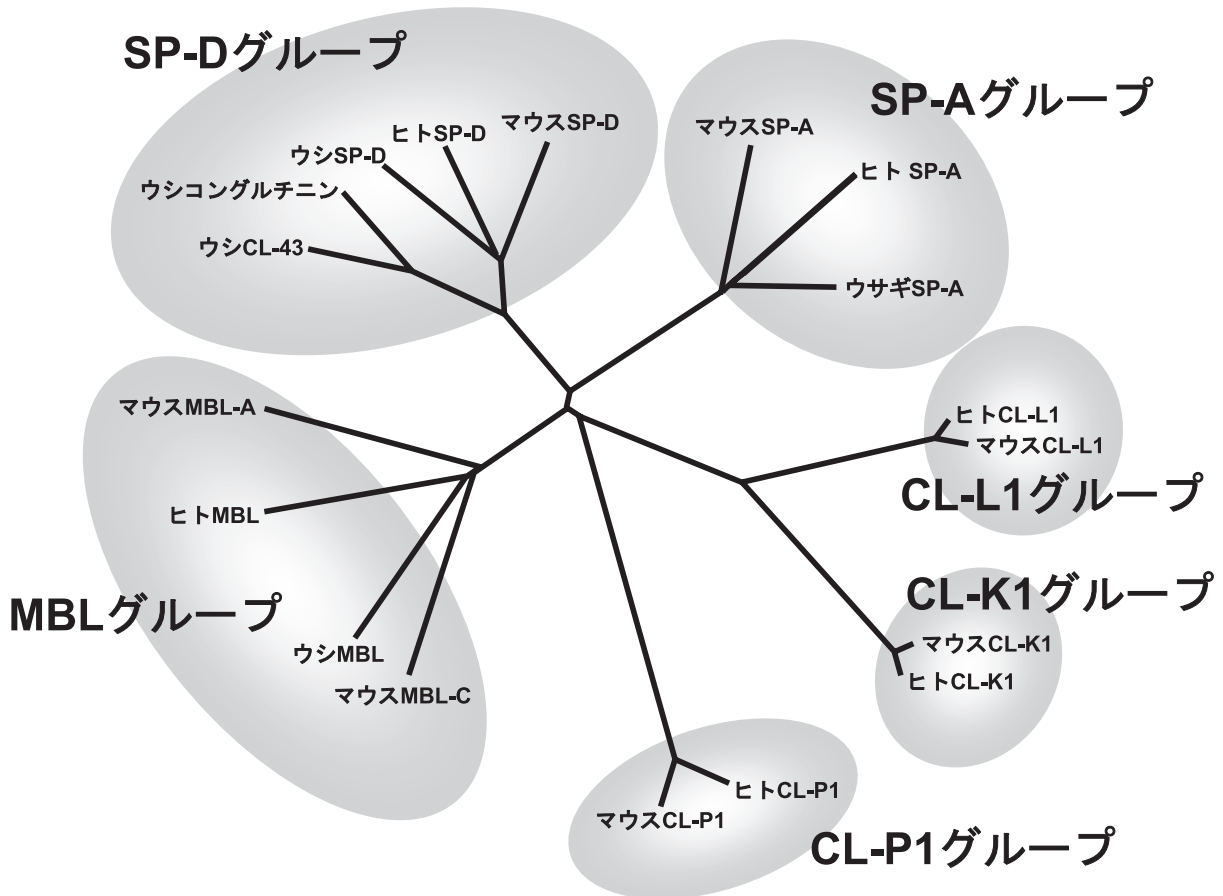


図3. コレクチンファミリーに属する蛋白質の系統樹

コレクチンの糖鎖認識領域アミノ酸配列を用いて Clustal W 法にて解析し樹形図を作成した。

この系統樹をみると、CL-L1とCL-K1の遺伝子進化は、かつて2つの分子が同じ仲間から進化していることを示しており、この2つの遺伝子群ではマウスとヒト間の遺伝子の進化があまり進んでいないことがわかる。さらに、別途C型レクチンの系統樹を作成すると、CL-P1分子は、上記の5つのコレクチン群とは異なる、C型レクチン系統樹の別のグループ内に位置する。この事実から、CL-P1が別の進化系列でコラーゲンエキソンとCRDエキソンの融合がおり、別の祖先遺伝子より進化して創られたと考えるのが現時点ではもっとも妥当であると推測している。

おわりに

本総説では、MBL、SP-A、SP-Dの3つの古典的コレクチンと異なる、新規コレクチンCL-L1、CL-K1、CL-P1のクローニングとその性状解析における最新の報告データを示した。これらの新規コレクチンは、いずれも種間の同一性が非常に高く、種の進化による遺伝子の多様性獲得と逆のバイアスが働いて、遺伝子が高度に保存されてきた可能性が高い。このような特徴をもつ遺伝子群は、基本的には細胞の不可欠遺伝子が多く、自然免疫や生体防御に関わる遺伝子配列の多様性が基本的特徴である、遺伝子群のグループに属する古典的コレクチンとは全く異なると考えられる。しかし現時点では、そのゲノムの存在と基本的な関連情報が明らかになったばかりで、そのグループ全体での生物における役割や機能についてはほとんど何も分かっていない。

これらの新規コレクチンに関する研究は今後も更なる進展を見せるものと思われるが、生物学的機能の解明には、ノックアウトマウスの作出と解析を初めとした様々なアプローチによるデータの蓄積が必要不可欠であり、今後の研究の進展に期待したい。

引用文献

- 1) Malhotra R, Haurum J, Thiel S, et al: C1q receptor with lung surfactant protein A. *Eur J Immunol* 22: 1437-45, 1992
- 2) Ohtani K, Suzuki Y, Azumi K, et al: Molecular cloning and characterization of novel ascidian collectins. 11th Congress of the ISDCI 132, 2009
- 3) Sumiya M, Super M, Tabona P, et al: Molecular basis

- of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 337: 1569-70, 1991
- 4) McCormack FX: New concepts in collectin-mediated host defense at the air-liquid interface of the lung. *Respirology*: S7-10. 2006
- 5) Botas C, Poulain F, Akiyama J, et al: Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11869-11874, 1998
- 6) Wakamiya N, Okuno Y, Sasao F, et al: Isolation and characterization of conglutinin as an influenza A virus inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1270-1278. 1992
- 7) Lim BL, Willis AC, Reid KB, et al: Primary structure of bovine collectin-43 (CL-43). Comparison with conglutinin and lung surfactant protein-D. *J Biol Chem* 269:11820-11824. 1994
- 8) Hansen S, Holm D, Moeller V, et al: CL-46, a novel collectin highly expressed in bovine thymus and liver. *J Immunol* 169:5726-5734. 2002
- 9) Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, et al: Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *J Biol Chem* 274, 13681-13689. 1999
- 10) Kawai T, Suzuki Y, Eda S, et al: Molecular cloning of mouse collectin liver 1. *Biosci. Biotechnol Biochem* 66, 2134-2145. 2002
- 11) Wang CC, Morales AJ, Schimmel P.: Functional redundancy in the nonspecific RNA binding domain of a class I tRNA synthetase. *J Biol Chem* 275, 17180-17186, 2000
- 12) Kaminska M, Shalak V, Mitande M.: The appended C-domain of human methionyl-tRNA synthetase has a tRNA-sequestering function. *Biochemistry* 40, 14309-14316. 2001
- 13) Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, et al: Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol* 50:1001-1013. 2006
- 14) Weis WI, Kahn R, Fourme R, et al: Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 254:1608-1615. 1991

- 15) Drickamer, K: Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 360, 183-186. 1992
- 16) Motomura W, Yoshizaki T, Ohtani K, et al: Immunolocalization of a novel collectin CL-K1 in murine tissues. *J Histochem Cytochem* 56:243-252. 2008
- 17) Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, et al: The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 44222-44228. 2001
- 18) Nakamura K, Funakoshi H, Miyamoto K, et al: Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1028-1035. 2001
- 19) Jang S-J, Ohtani K, Fukuoh A, Yoshizaki T, Fukuda M, Motomura W, Mori K, Fukuzawa J, Kitamaoto N, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N.: Scavenger receptor collectin placenta 1 (CL-P1) predominantly mediates zymosan phagocytosis by human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 284, 3956-65. 2009.
- 20) Yoshida T, Tsuruta Y, Iwasaki M, et al: SRCL/CL-P1 recognizes GalNAc and a carcinoma-associated antigen, Tn antigen. *J Biochem* 133, 271-277. 2003
- 21) Coombs PJ, Graham SA, Drickamer K, et al: Selective binding of the scavenger receptor C-type lectin to Lewisx trisaccharide and related glycan ligands. *J Biol Chem* 280:22993-22999. 2005
- 22) Elola MT, Capurro MI, Barrio MM, et al: Lewis x antigen mediates adhesion of human breast carcinoma cells to activated endothelium. Possible involvement of the endothelial scavenger receptor C-type lectin. *Breast Cancer Res Treat* 101:161-174. 2007
- 23) Nakamura K, Ohya W, Funakoshi H, et al: Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J. Neurosci Res* 84, 874-890. 2006
- 24) Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, et al: Haplotype analysis of the human collectin placenta 1 (hCL-P1) gene. *J Hum Genet* 48:82-85. 2003
- 25) 大谷克城, 鈴木定彦, 若宮伸隆. ヒト胎盤コレクチン1. *臨床検査* 51:1714-1718. 2007

Discovery of three new collectin families

OHTANI Katsuki* SUZUKI Yasuhiko** WAKAMIYA Nobutaka*

Summary

Collectins are C-type animal lectins having two characteristic structures, a collagen-like domain and a carbohydrate recognition domain (CRD). The collectin is known to be involved in innate immunity directly or through collaboration with the complement system or by opsonization via its receptors. We did molecular cloning and analyses of new collectin families by using the reverse genetic approach. Here, we introduce the characteristics of gene, structures, and functions on the novel collectins, CL-L1, CL-K1, and CL-P1.

Key words Collectin, Collagen, Innate immunity, Lectin, Complement, Scavenger receptor

*Asahikawa Medical College, Department of Microbiology and Immunochemistry

**Hokkaido University, Zoonosis Research Center