

8) コレクチン CL-P1 の発生における役割解明

研究代表者 大谷 克城

[研究の背景と目的]

コレクチンは、その構造の内部にコラーゲン様構造とカルシウム要求性の糖認識領域を持ち、糖認識領域によって微生物などの異物の糖鎖を認識して排除する自然免疫を担う分子である。ヒトにおいては、肝臓で産生され血液中に分泌される MBL、肺胞の構成成分である SP-A や SP-D が知られ、生体防御因子として、重要な役割を担っていると考えられている。我々は、コレクチンについての研究の過程において、新規コレクチン遺伝子 CL-P1 を発見した (Ohtani, K., et al. *J Biol Chem*, 2001)。従来知られているコレクチンは、何れも分泌蛋白であるが、CL-P1 は、膜結合型蛋白で、その構造、発現部位そして機能も異なることを明らかにした。CL-P1 の構造は、スカベンジャー受容体 SR-AI と非常に類似した構造をしており、血管内皮細胞に膜蛋白として恒常的に発現していることがわかった。*in vitro* での機能解析結果、コレクチンとしての機能であるカルシウム依存的な糖結合やスカベンジャー受容体としての機能として、酸化 LDL のエンドサイトーシス、酵母 (真菌) や細菌のファゴサイトーシス (Jang, S., Ohtani, K., et al. *J Biol Chem*, 2009) を明らかにしている。また、*in vivo* での機能解析の結果、ゼブラフィッシュを用いた遺伝子ノックダウンにより血管形成不全や形態形成不全を見出した (投稿準備中)。以上の解析結果から CL-P1 は、従来の自然免疫機能とは異なる生命に必須の重要な機能を有することが示

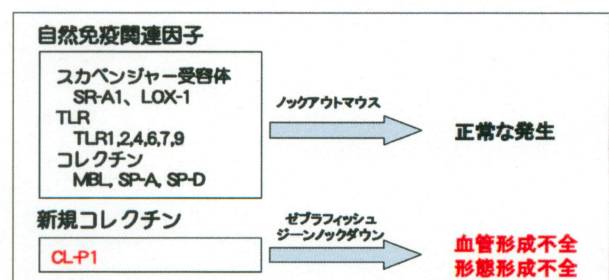
唆されることから、CL-P1 の生理的な役割を明らかにするためにノックアウトマウスの作製を試みた。

[研究方法]

1. CL-P1 遺伝子ノックアウトマウスの作製

129 マウスよりゲノム DNA を精製し、CL-P1 遺伝子を含む領域をクローニングしてエクソン-イントロンの構成を確認した。ターゲティングベクターに短腕側 2 kb、長腕側 5 kb 以上を目安にネオマイシン耐性遺伝子挿入箇所を検索し、ターゲティングベクターを作成した。制限酵素により直線化したターゲティングベクターを ES 細胞に遺伝子導入を行い、相同組換えを起こしたかどうかを PCR およびサザンブロットングで判定した。

ノックアウトされた遺伝子をもつ ES 細胞を培養し、胚盤胞期の受精卵にできる腔にマイクロマニピュレーターを用いて ES 細胞を注入し、キメラマウスを得た。得られたキメラマウスを C57BL/6J マウスと交配し、目的遺伝子が生殖系へ伝播したキメラの特定と、ヘテロマウスの獲得を行った。さらに



新規コレクチンCL-P1には自然免疫機能以外の生命に必須の重要な機能を有するのではないか

ヘテロマウス同士の交配を行い CL-P1 ノックアウトマウスの作成を試みた。

2. 胎生期の解析

胎生期の検討は交配後の妊娠子宮を取り出し、マウスの形態と胎盤の変化を顕微鏡観察するとともに、胚のゲノム DNA を用いて PCR およびサザンブロットリングにより遺伝子型解析を行った。

3. ノックアウトマウスの系の保存

ヘテロマウスを用いた受精卵および精子を凍結保存することにより系の保存を行った。

[結果]

129 マウス由来 ES 細胞への CL-P1 targeting vector 遺伝子の相同組換えに成功し、胚盤胞期の胚にマイクロインジェクションした結果 2 系統のキメラマウスを得た。ヘテロマウスは雌雄ともに、成長や形態はまったく通常マウスとの間に差異は見られなかった。さらにヘテロマウス同士の交配を行い CL-P1 ノックアウトマウスの作成を試みた結果、中期発生段階(7.5 日胚、10.5 日胚)において、CL-P1 欠損マウスを確認することが出来なかった。

[考察]

CL-P1 ノックアウトマウスの作成を試みたが、CL-P1 完全欠損マウスは、胎生致死であることが明らかになった。通常、血管や心臓などの形成不全による胎生致死は、10.5 日胚前後でおこることが報告されているが、7.5 日胚でも生存胚が得られなかったことから、7.5 日胚以前にすでに胎生致死がおこっていることが示唆された。初期発生段階で CL-P1 が重要な役割を担う事実は、ゼブラフィッシュを用いたジーンノックダウンにおける検討結果と矛盾せず、より高等な哺乳動物での CL-P1 遺伝子の新たな役割が明らかになる可能性を示唆していると考えられる。今後、胎生致死が本遺伝子の欠損によるものであることの裏付けのためにトランスジェニックマウスを作製し、交配による表現型の回復を確認する必要がある。また、さらなる個体レベルでの検討のため、胎生致死となる遺伝子でも検討可能な Cre-loxP システムによるコンディショナルノックアウト技術により再度ノックアウトマウス作製を試みる必要があると考えられる。

[参考文献]

- ・ Jang S, Ohtani K, Fukuoh A, Yoshizaki T, Fukuda M, Motomura W, Mori K, Fukuzawa J, Kitamoto 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 (6) : 3956-65, 2009
- ・ Suzuki Y, Ohtani K, Wakamiya N.: The novel collectins, CL-L1, CL-P1, CL-K1. Collagen-related lectins in innate immunity, *Research Signpost*, 85-102, 2007.
- ・ 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.: The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276 (47) : 44222-8, 2001.