

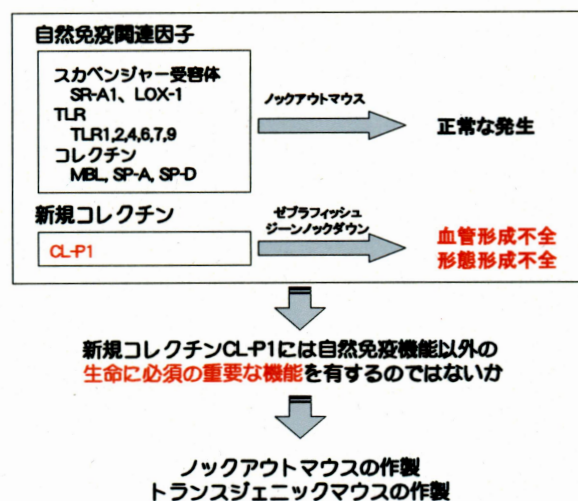
6) コレクチン CL-P1 の生体における機能解明

研究代表者 大谷 克城

[研究の背景と目的]

コレクチンは、コラーゲン様構造と糖認識領域を有しており、多量体を形成して異物の糖鎖をパターン認識し排除する自然免疫機能分子である。ヒトにおいては、肝臓から循環血液中へ分泌され補体活性化経路のレクチン経路を活性化する 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、コレクチンタンパク質の保存性の高いアミノ酸配列に着目し、この配列を用いてデータベースの検索を行い、得られた未同定の配列データをもとに cDNA から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ったが、CL-P1 は、膜結合型タンパク質で、その構造、発現部位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有しており、血管内皮細胞に II 型膜タンパク質として恒常的に発現していることがわかった。さらに、*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、ラットを用いた虚血/再灌流モデルにおいて、再灌流後の血管内皮細胞に CL-P1 の発現亢進が見られ (Koyama S, Ohtani K, et al. *Biochim Biophys Acta*, 2011)、ゼブラフィッシュを用いたジーン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 (Fukuda M, Ohtani K, et al. *Biochim Biophys Acta*, 2011)。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。その結果、ノックアウトマウスを得ることができず、胎生の初期において致死にいたることが明らかとなった。現在も、致死の原因について詳細な検討を行っているが、さらに、トランスジェニックマウス作製を試み、ノックアウトマウスの致死をレスキューすることができるか確認するとともに、CL-P1 の生体における役割を明らかにするために検討を行った。



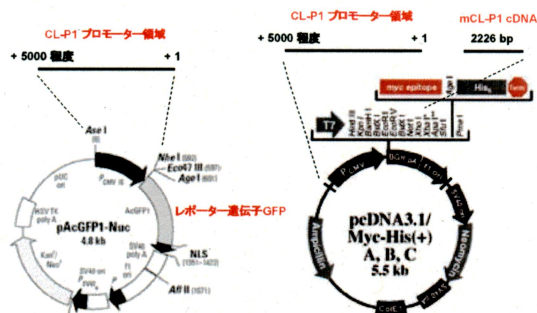
[研究方法]

CL-P1 遺伝子トランスジェニックマウスの作製と検討

① マウス CL-P1 遺伝子のプロモーター領域 + 蛍光蛋白質 GFP 遺伝子

マウス CL-P1 遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行い、レポーター遺伝子として蛍光蛋白質 GFP 遺伝子を含む pAcGFP-Nuc ベクター (タカラバイオ社製) に連結し、コンストラクトを構築した。大

腸菌にてプラスミドベクターを増幅させ、精製後、必要な部分を制限酵素にて切り出し、受精卵に導入した。一部の受精卵は蛍光顕微鏡で経時観察し、発生における動態について検討を行った。さらに、出生後、各組織における発現を蛍光顕微鏡で観察した。



トランスジェニックマウス作成に用いる2種のコンストラクトデザイン

② マウス CL-P1 遺伝子のプロモーター領域 + マウス CL-P1 遺伝子

マウス CL-P1 遺伝子に自身のプロモーター領域を連結させたコンストラクトを構築し、トランスジェニックマウスの作製を行った。各組織の mRNA をリアルタイム PCR にて定量的に評価し、抗 CL-P1 抗体を用いて免疫組織染色と HE 染色にて、その局在を①で作成した蛍光発現パターンと比較して確認を行った。

[結果]

マウス CL-P1 遺伝子のプロモーター領域と蛍光蛋白質 GFP 遺伝子またはマウス CL-P1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスをそれぞれ作製した。蛍光蛋白質 GFP 遺伝子を含むトランスジーンを導入した受精卵を蛍光顕微鏡で経時観察したところ、発生初期の卵割期において発現することを確認した。さらに、それぞれのトランスジェニックマウスの出生後の各組織における発現を抗 GFP 抗体および抗 CL-P1 抗体で反応後、蛍光顕微鏡で観察した結果、両者同様の発現パターンを示した。同時に各組織から mRNA 精製しリアルタイム PCR にて定量的に評価した結果、プロモーター領域のコントロールを受け発現誘導されていることを確認した。

[考察]

CL-P1 遺伝子ノックアウトマウスが胎生初期に致死に至ることから CL-P1 遺伝子トランスジェニックマウスの作製を試み、ノックアウトマウスの致死をレスキューすることが目的の一つであったが、結果が得られるに至らなかった。しかしながら、2種類のトランスジェニックマウスを用いて、CL-P1 遺伝子の発現を確認することができ、発生の初期より発現がコントロールされ、何らかの機能を発揮していることを予想できる結果が免疫染色および定量 PCR にて確認することができた。今後胎生致死となる遺伝子でも検討可能な Cre-loxP システムによりノックアウトマウス作製を試み、さらなる個体レベルでの検討を行い CL-P1 の生体における役割を明らかにする予定である。

[参考文献]

- Fukuda M, Ohtani K, Jang S, et al. : Molecular cloning and functional analysis of scavenger receptor zebrafish CL-P1. *Biochim Biophys Acta*. 1810 (12) : 1150-9, 2011
- Koyama S, Ohtani K, Fukuzawa J, et al. : The induction of human CL-P1 expression in hypoxia/reoxygenation culture condition and rat CL-P1 after ischemic/reperfusion treatment. *Biochim Biophys Acta*. 1810 (9) : 836-42, 2011
- Jang S, Ohtani K, Fukuoh A, et al. : 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, et al. : The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem*. 276 (47) : 44222-8, 2001.