

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	森 健一郎
<p>学位論文題目</p> <p>膜型コレクチン CL-P1 のリガンド結合領域の解析</p> <p>共著者</p> <p>大谷 克城、張 成宰、本村 亘、吉田 逸朗、金 然旭、若宮 伸隆</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>コレクチンはコラーゲン様構造を有する動物C型レクチンの総称であり、生体防御に関与することが知られている。多くのコレクチンは分泌型のタンパクとして存在するが、CL-P1 (collectin placenta 1) 遺伝子は、細胞内領域 (CD)、膜貫通領域 (TM)、コイルドコイルド領域 (cc)、コラーゲン様領域 (col)、ネック領域 (Neck)、糖認識領域 (CRD) の6つのドメイン構造を持つ膜タンパクとして発現する。これまでの研究で、CL-P1 CRD を用いた検討では糖鎖抗原ルイス X と高い親和性を示すことから、CL-P1 がコレクチン分子として糖鎖抗原を認識することが示されている。また、CL-P1 を過剰発現させた CHO (Chinese hamster ovary) 細胞においては、酸化 LDL に結合することでスカベンジャー受容体の機能を有すること、さらに蛍光標識された酵母、大腸菌、黄色ブドウ球菌等との結合が確認され、CL-P1 が生体防御にも直接的に関わっていることが明らかになっている。CL-P1 は構造上コレクチンファミリーに属するが、リガンド結合を司る領域は未だ不明である。そこで、CL-P1 の細胞外領域の欠失体や変異体を作成し、細胞上に発現させることで酸化 LDL、真菌、細菌、糖鎖抗原について細胞レベルでの結合解析を行い、リガンドとの結合様式の検討を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 細胞</p> <p>全ての検討は 5% FBS 添加 Ham's F12 培養液で培養した CHO/Id1A7 細胞を用いた。</p> <p>2. リガンド</p> <ul style="list-style-type: none"> ・真菌 : Texas-Red conjugated zymosan particle A (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) ・細菌 : グラム陽性菌 <i>S. aureus</i> (wood strain without protein A) BioParticles fluorescein conjugate とグラム陰性菌 <i>E. coli</i> (K-12 strain) BioParticles Fluorescein conjugate ・糖鎖 : Lewis-X-PAA-Fluoro <p>△ 酸化 LDL : 血液から LDL を精製、酸化反応を行い酸化 LDL として用いた。</p> <p>3. 抗体</p>			

・抗 myc モノクローナル抗体、Alexa 488 conjugated goat anti-mouse IgG、Alexa 488 conjugated rabbit anti-mouse IgG、Alexa 594 conjugated donkey anti-sheep IgG、Alexa 594 conjugated goat anti-mouse IgG、Sheep-Anti-Human Apolipoprotein B IgG、donkey anti-Mouse IgG、HRP conjugate を利用し、免疫染色、ウェスタンブロッティングを行った。

4. ヒト CL-P1 部分欠失体発現ベクター作成

7 種類の CL-P1 部分欠失体発現ベクター Δ CRD、 Δ col、 Δ col-CRD、 Δ cc、 Δ cc-CRD、 Δ cc-col、 Δ cc-col-CRD を作製した。

5. ヒト CL-P1 コラーゲン様領域陽性荷電部位変異体発現ベクター作成

コラーゲン様領域内 3 か所の陽性荷電クラスターは、そのアミノ酸とアミノ酸番号から R448R451R454、K466K469K472、R496K499K502 と命名した。各クラスター内の陽性荷電アミノ酸を中性アミノ酸アラニンに置換した 4 つの陽性荷電部位変異発現ベクター Col mutant I、II、III、IV を作成した。

6. CL-P1 部分欠失体、変異 CL-P1 一過性発現細胞の作成

1.2×10^5 個の CHO/d1A7 細胞を Lipofectamine LTX を用いて発現ベクターをトランスフェクションし、上記の CL-P1 一過性発現細胞を作成した。

7. 遺伝子発現した CL-P1 の分子構造解析

CL-P1 部分欠失体の多量体形成を検討するため、還元状態と Native 状態での PAGE を行い、ウェスタンブロッティングでその分子量を検討した。

8. LDL 精製および酸化反応

LDL は健常人から採血後、KBr 勾配超遠心法で精製した。その後、 $5 \mu\text{M}$ CuSO₄ を用いて酸化反応を行い、酸化 LDL として用いた。

9. リガンド結合検討

各リガンドは真菌： $100 \mu\text{g/ml}$ 、細菌リガンド： $50 \mu\text{g/ml}$ 、糖鎖リガンドルイス X： $10 \mu\text{g/ml}$ 、酸化 LDL： $10 \mu\text{g/ml}$ の終濃度で添加、結合検討を行った。CL-P1 タンパク質および、酸化 LDL は免疫染色法でその発現を確認した。

10. リガンド結合能評価

真菌と細菌リガンドの結合能は部分欠失体発現細胞数と、部分欠失体発現リガンド結合細胞数の比率により評価した。また、酸化 LDL の結合能は結合酸化 LDL と CL-P1 の蛍光輝度積算値の比率により評価した。

11. 統計解析

統計解析は、Student's *t* 検定で行った。 $p < 0.001$ を統計学的に有意な差があるとした。

12. 相同性検索

ヒト、ウシ、マウス、ラット、トリ、カエル、ゼブラフィッシュの各動物種の CL-P1 各領域のアミノ酸配列相同性と全アミノ酸配列の相同性検索を DNASIS にて行った。

成績

1. ヒト CL-P1 部分欠失体の作成と発現

部分欠失体発現ベクターを CHO 細胞にトランスフェクションし一過性発現細胞株を得た。膜免疫染色法により細胞膜上に Δ cc-col-CRD 以外の部分欠失体 CL-P1 の発現が確認した。また、ウェスタンブロットティングでこれらが多量体を形成し発現していることを確認した。

2. 糖鎖リガンド結合検討

糖鎖リガンドルイス X との結合検討では、CRD の欠失した CL-P1 とルイス X との結合が認められないことから、CRD を介して糖鎖リガンドと結合することが明らかになった。

3. 真菌、細菌リガンド結合検討

ザイモサン、大腸菌、黄色ブドウ球菌との結合検討の結果、コラーゲン様領域の欠失で、完全 CL-P1 と比較して結合が有意に低下することが明らかになった。真菌においては、CRD の欠失で、完全 CL-P1 と比較し結合が低下した (64.0%, $p < 0.001$)。細菌リガンドでは、CRD の欠失によるリガンド結合能の有意な低下は確認されなかった。

4. 酸化 LDL 結合検討

コラーゲン様領域とコイルドコイル領域の欠失でそれぞれ、結合が 18.0%、21.0% と有意に低下した ($p < 0.0001$)。また、CRD の欠失ではリガンド結合能の低下は確認されなかった。

5. コラーゲン様領域変異体とリガンド結合検討

コラーゲン様領域内に 3 か所存在する陽性荷電クラスターの変異体を用いた検討の結果、3 番目の陽性荷電クラスター R496K499K502 のアルギニン、リジンをアラニンに置換した変異体では、完全 CL-P1 との比較で、大腸菌、酸化 LDL の結合がそれぞれ 20.0%、44.3% と有意に低下することが認められた ($p < 0.0001$)。

考案

コレクチン分子は多様な病原体表面の糖鎖配列を認識し結合するパターン認識受容体と考えられているが、CL-P1 はルイス X 抗原を共通にもつ糖鎖リガンド類にのみ強い結合活性を示す。そして、本研究で細胞膜表面上に発現した CL-P1 においても、ルイス X 抗原リガンドと CRD を介して結合することが明らかになった。しかし、CRD の欠失により細菌、酸化 LDL との結合が有意に低下しないことから、CL-P1 では CRD が細菌や酸化 LDL との結合には直接関与しないことが示唆された。

また、CL-P1 でリガンド結合に主に関与すると考えられるコラーゲン様領域は、Gly-X-Y のアミノ酸配列が繰り返されることで形成されるドメイン構造であり、その内部に陽性荷電を持つ塩基性アミノ酸残基が、3 つおきに位置して構成される塩基性アミノ酸クラスター (陽性荷電クラスター) を形成し、このクラスターがスカベンジャー受容体のリガンド結合部位であると考えられている。本研究により、コラーゲン様領域が細菌、ザイモザン、酸化 LDL の各種リガンドの主な結合領域であることが明らかになった。さらに、コラーゲン様領域に 3 か所存在する陽性荷電クラスターの C 末端の CRD に近い 3 番目の陽性荷電クラスター R496K499K502 がリガンド結合に強く関与することが

明らかになった。

すなわち、膜型コレクチン CL-P1 のリガンドとの結合機構は、コレクチンの糖鎖配列パターン認識機構ではなく、スカベンジャー受容体に特徴的な電荷による異物認識であることが示唆された。

また、CL-P1 のコラーゲン様領域は哺乳類で 90%以上の相同性を示しており、さらに、コラーゲン様領域中の陽性荷電クラスターはヒトからトリまで広く保存されていた。さらに、生活環境の異なる両生類、魚類においても 3 か所の陽性荷電クラスターは 2 か所が保存されていることから、これらの部位を介したリガンドとの認識機構がほとんどすべての動物種で非常に重要な生物学的機能に参与していることが推測された。

結論




膜型コレクチン CL-P1 は糖鎖リガンドとは糖認識領域である CRD を介して結合するが、真菌、細菌とはコラーゲン様領域を介して結合する。しかし、酸化 LDL との結合においては、コラーゲン様領域とコイルドコイル領域の 2 つの領域がその結合に不可欠である。そして、コラーゲン様領域に存在する 3 番目の陽性荷電クラスター R496K499K502 がこれらのリガンド結合に強く関与する。

CL-P1 はその構造上の特徴よりコレクチンに分類されるが、その異物結合機構はスカベンジャー受容体に類似していることを明らかにした。

引用文献

1. Katsuki Ohtani, Yasuhiko Suzuki, Souji Eda, Takao Kawai, Tetsuo Kase, Hiroyuki Keshi, Yoshinori Sakai, Atsushi Fukuoh, Takashi Sakamoto, Hiroyuki Itabe, Tatsuo Suzutani, Masahiro Ogasawara, Itsuro Yoshida, Nobutaka Wakamiya. The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;47(23):44222-44228.
2. SeongJae Jang, Katsuki Ohtani, Atsushi Fukuoh, Takayuki Yoshizaki, Mitsuko Fukuda, Wataru Motomura, Kenichiro Mori, Jun Fukuzawa, Noritoshi Kitamoto, Itsuro Yoshida, Yasuhiko Suzuki, Nobutaka Wakamiya. Scavenger receptor Collectin Placenta 1 (CL-P1) predominantly mediates zymosan phagocytosis by human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2009;284(6): 3956-3965.
3. Peter J. Coombs, Sarah A. Graham, Kurt Drickamer, Maureen E. Taylor. Selective binding of the scavenger receptor C-type lectin to LewisX trisaccharide and related glycan ligands. *J Biol Chem* 2005;280(24):22993-22999.

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	森 健一郎
審査委員長 谷口 隆信  審査委員 伊藤 喜久  審査委員 若宮 伸隆 			
学 位 論 文 題 目 膜型コレクチン CL-P1 のリガンド結合領域の解析 共著者名 大谷克城, 張 成宰, 本村 亘, 吉田逸朗, 金 然旭, 若宮伸隆			
<p>膜型コレクチン CL-P1 は血管内皮細胞に存在し、病原微生物に対する免疫応答や酸化脂質に対する scavenger 機能など、様々な生理機能に関わっている。CL-P1 の細胞外ドメインには、細胞膜貫通部に近い方から、コイルドコイルドメイン、コラーゲン様ドメイン、糖鎖認識ドメインの 3 つのドメインが存在するが、本論文は、この細胞外ドメインの構造機能相関を、培養細胞に発現させた 8 種類の CL-P1 部分欠失体に対するリガンドの結合を解析することにより、明らかにしたものである。細菌や真菌などの菌体や、Lewis X 抗原、酸化 LDL の結合には、これらの 3 つのドメインが相互に影響し合っているという結果が示され、特に、魚類から哺乳類までよく保存された一次構造を持つコラーゲン様ドメインの陽性荷電クラスター領域の重要性が明らかにされた。これらの成果は、CL-P1 の生理機能あるいは病理機能の理解を進め、感染症や高脂血症などに対する新しい治療法の開発に道を拓くものと考えられる。更に、本研究が、CL-P1 の変異体を作成し発現させ、結合特性を解析するという、申請者の地道で精緻な研究の積重ねの結果であることを、審査委員会は評価している。</p> <p>査問においても、申請者は本論文の臨床的背景となる感染症免疫学や当該研究分野に関して確かな知識／経験／見識を具有していることが確認され、論文審査の結果と合わせて、合格と判定した。</p>			