

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2014.02) 14巻1号:56～57.

平成23.24年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題  
11) 遺伝子改変マウスを用いたコレクチンCL-K1の形態形成における役割  
解析

研究代表者 森 健一郎

## 11) 遺伝子改変マウスを用いたコレクチン CL-K1 の形態形成における役割解析

研究代表者 森 健一郎

### [目的]

コレクチンは、その内部構造にカルシウムイオン依存性の糖認識領域と、コラーゲン様領域を持つタンパクの総称であり、自然免疫分子として広く研究が進められている。新規コレクチン CL-K1 (collectin kidney-1) は、細菌、真菌などと結合し、補体活性化を誘導することが報告されており、従来のコレクチン同様、自然免疫に関わる分子とであると考えられている。

CL-K1 と補体活性化因子 MASP-3 の遺伝子変異が口唇裂、口蓋裂、頭蓋骨癒合症、学習障害、生殖器や膀胱、腎臓の異常をきたす疾患、3MC 症候群の原因であると 2011 年に報告された。これは、自然免疫に関与する分子が、器官形成に寄与していることを示す、初めての報告であった。我々は、現在、CL-K1 ノックアウトマウスを作成し、器官形成期における、CL-K1 の機能解析を行っている。その中で、CL-K1 ヘテロマウス同士の交配で得られたノックアウトマウスは、同時期に誕生したワイルドマウス・ヘテロマウスと比較し、低体重であることを確認している。このことから、CL-K1 が哺乳動物の器官形成期において、自然免疫以外の機能を有していることを示唆している。

CL-K1 が器官形成期において、どのような働きをするかを明らかにするために、本研究では、胎生期における CL-K1 遺伝子発現を定量 PCR と免疫組織染色で検討した。

### [方法]

マウス胎生 7 日目、11 日目、17 日目及び成獣肝臓の CL-K1 mRNA の発現を定量 PCR により解析した。定量 PCR は、Premium Total RNA (タカラバイオ) から random hexamer を用いて cDNA 合成後、TaqMan® Gene Expression Assays を利用し、7500 Real Time PCR System (ライフテクノロジーズ) により行った。

胎生 17.5 日の胚切片は以下の方法で作成した。10 週齢 C57BL/6J 雌マウスに、妊馬血清性性腺刺激ホルモン腹腔投与 48 時間後、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを腹腔投与し、交配能を確認した雄マウスと共飼育

した。12 時間後臍栓を確認し妊娠 0.5 日とした。妊娠 17.5 日に母獣を安楽死後、胎仔を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで 48 時間固定した。脱水・脱脂、パラフィン包埋後、薄切、伸展し、スライドガラス上に密着させた。検出には一次抗体としてウサギ抗 CL-K1 ポリクローナル抗体を、二次抗体として Alexa488 conjugated goat anti-rabbit 抗体を用いた。核染は TO-PRO-3 により行い、BIOREVO (キーエンス) により蛍光観察を行った。

### [結果]

定量 PCR による遺伝子発現検討の結果、CL-K1 遺伝子は、胎生後期になるにつれ発現が亢進し、成獣肝臓においてさらに高値を示すことを確認した。また、CL-K1 同様肝臓で合成され血中に分泌されるコレクチン MBL は、胎生 11 日目をピークとする発現亢進が見られたが、それ以降の発現亢進は見られなかった。成獣肝臓での mRNA 量を比較すると、CL-K1 の発現量は MBL と比べ約 1/2 の発現量であることが分かった。

抗 CL-K1 抗体を利用した 17.5 日胚の免疫組織染色の結果、CL-K1 は鼻腔粘膜上皮、口蓋、口唇、心筋、血管平滑筋、消化管内腔等で発現が高く、また大脳、小脳、肺、肝臓、膵臓、腎臓、副腎などの器官で発現することが明らかとなった。

### [考察]

コレクチン CL-K1 は、成体において様々な微生物と結合し、感染防御に関与することが推測されているが、胎生期マウスは、無菌状態下の子宮内で着床後の原腸形成と器官形成を行うため、通常では胎仔が積極的に免疫分子を発現することはないと考えられている。

しかし、マウスの胎生期における CL-K1 mRNA の発現及び免疫組織染色の結果、CL-K1 遺伝子が器官形成期に発現していることが明らかになり、ヒトの遺伝子変異の報告同様、発生において器官形成に重要な役割を担う可能性が推測された。

現時点での予測される機能としては、原始線条期 (6.5 日) 以降の細胞移動、細胞分化への関与であり、胎生 11.5 日以降で始まる、骨格筋、顔面、口蓋、舌、食道、胃、腸、肝臓、膵臓等の各器官形成に関する機

能が考えられる。

CL-K1 は MASP と相互作用し、*in vitro* で補体系を活性化することにより、自然免疫に関与している可能性が報告されているが、*in vivo* の器官形成期におけるその分子メカニズムは明らかになっていない。今後 CL-K1 ノックマウスを用いて胎生期における CL-K1 の生理的機能を解明していきたいと考えている。

**[参考文献]**

- 1) Keshi H, *et al.* Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol. Immunol.* 50:1001-1013, 2006.
- 2) Hansen S, *et al.* Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunology.* 185: 6096-6104, 2010.
- 3) Yoshizaki T, *et al.* Comparison of human blood concentrations of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin. *J Biochem.* Epub ahead of print, 2011.
- 4) Rooryck C, *et al.* Mutations in lectin complement pathway genes COLLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nature Genetics.* 43: 197-203. 2011.