

AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:65-66.

平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 12) コレクチンCL-L1 の分子構造と組織局在に関する解析

松田 泰幸

当研究室で同定した新規コレクチン CL-L1 (collectin liver 1) について、これまで我々は、*in vitro* において CL-L1 の CRD 領域が糖鎖へ結合することを明らかにしたが、未だ生体内における CL-L1 の高次構造や局在について不明な点が多く、CL-L1 の生理的役割の解明には至っていない。

そこで、CL-L1 の分子構造や発現様式を明らかにするために、ウェスタンブロットおよび免疫組織染色により検討した。

【方法】

1) 培養細胞への遺伝子発現による分子構造および発現様式の検討

培養細胞に CL-L1 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間培養した後、4% パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。浸透化処理を行った後、蛍光抗体を用いて CL-L1 を検出し、共焦点顕微鏡により細胞内での局在を観察した。また、MERCCK の ProteoExtract SubCellular Proteome Extraction Kit を用いて、培養細胞の細胞分画（細胞質、膜&オルガネラ、核、細胞骨格の 4 画分）を行い、ウェスタンブロットより各分画サンプルからの CL-L1 の検出を行った。さらに、CL-L1 を発現させた培養細胞を無血清培地で 3 日間培養し、細胞、培養上清を回収した。還元状態と非還元状態での SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロットより CL-L1 の多量体形成について検討を行った。

2) 免疫組織染色による組織局在の検討

ヒト組織における局在を明らかにするために、パラフィン包埋切片を Super Bio Chips Laboratories より購入した。CL-L1 の検出には、一次抗体としてウサギ抗 CL-L1 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。核染色は TO-PRO-3 により行い、共焦点顕微鏡により蛍光観察を行った。

【結果】

培養細胞を用いた蛍光観察の結果、CL-L1 は、細胞質あるいは小胞体やゴルジ体と考えられる領域が染色されており、核領域は染色されなかった。また、培養細胞の細胞分画（細胞質、膜&オルガネラ、核、細胞骨格の 4 画分）を行い、各分画から CL-L1 の検出を試みたところ、CL-L1 は膜&オルガネラ画分から

12) コレクチン CL-L1 の分子構造と組織局在に関する解析

研究代表者 松田 泰幸

【目的】

コレクチンは、その分子内部にコラーゲン様領域とカルシウムイオン依存性の糖認識領域 (CRD) を持つ分子の総称である。コラーゲン様領域は三重螺旋構造を形成することによって、多量体形成に関与している。一方、CRD は細菌表面の構成成分である糖鎖を認識することで、1) 補体の活性化、2) 細菌のオプソニン化、3) 細菌の凝集、といった感染防御機能に寄与することが知られている。また、コレクチンは、一部を除き大半が分泌型であり、血液中や肺に存在している。

検出されたが、細胞質画分からは検出されなかった。さらに CL-L1 を遺伝子発現させた際の培養上清から CL-L1 が検出された。このことから分泌タンパク質であることが明らかとなった。非還元状態でウェスタンブロットを行ったところ、CL-L1 はジスルフィド結合を介して高次構造を形成していることがわかった。抗 CL-L1 抗体を利用したヒト組織の免疫組織染色の結果、CL-L1 は肝臓で発現が高く、また、胃、小腸、大腸、肺などの器官で発現していることが明らかとなった。

【考 察】

培養細胞で遺伝子発現させた CL-L1 は、ジスルフィド結合を介して高次構造を形成していた。このことから、生体内において、CL-L1 は他のコレクチンと同様に多量体を形成し、生理的役割を果たすと考えられた。また、顕微鏡観察や細胞分画の結果から CL-L1 の細胞内局在がオルガネラ画分であることがわかり、さらには培養上清中から CL-L1 が検出されたことから、CL-L1 は生体内において分泌型タンパク質として機能している可能性が推測された。

CL-L1 は、分泌型コレクチンとして報告されている CL-K1 と遺伝子構造が類似しており、CL-K1 は、*in vitro* において補体系を活性化するなど自然免疫に関与している可能性が示されている。このことから CL-L1 は、肝臓や消化器、肺などの各器官で合成、分泌され、CL-K1 と同様に感染防御に関与している可能性が考えられた。今後は、CL-L1 が感染微生物に対して、どのような感染防御機能を果たしているのか、その機能を解明していきたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Ohtani K, *et al.* Molecular cloning of a novel human collectin from Liver (CL-L1). *J. Biol. Chem.* 274: 13681-13689, 1999
- 2) Kawai T, *et al.* Molecular cloning of mouse collectin liver 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2134-2145, 2002
- 3) Axelgaard E, *et al.* Investigations on collectin liver 1. *J. Biol. Chem.* 288: 23407-23420, 2013
- 4) Henriksen M L, *et al.* Heteromeric complexes of native collectin kidney 1 and collectin Liver 1 are found in the

circulation with MASPs and activate the complement system. *J Immunol.* 191: 6117-6127, 2013