

新規コレクチンは生体防御と形態形成に関する二重機能性分子である

1. はじめに

コレクチンは、コラーゲン様構造を内部に有するC型レクチンスーパーファミリーで¹⁾、MBP/MBL (マンナン結合タンパク質もしくはレクチン) の発見は、日本の生化学

学研究の中で特筆すべきものである。1970年代、レクチンは複合糖質を解析する優れた道具として評価されてきたが、川崎はAshwellとの肝臓レクチンの生化学的研究後、山科らと血中MBLを発見し、糖鎖生物学という新しい研究分野を開拓した^{2,3)}。その後コレクチンファミリーに属する2種の肺サーファクタントタンパク質A、D (SP-A、SP-D) が見いだされた^{4,5)}。SuperらはMBLが微生物に結合するオプソニン分子として働き、MBL遺伝子の一塩基多型 (SNPs) に由来するアミノ酸変異によるMBL欠損症が小児の易感染症を引き起こすことを証明し、MBLなどのコ

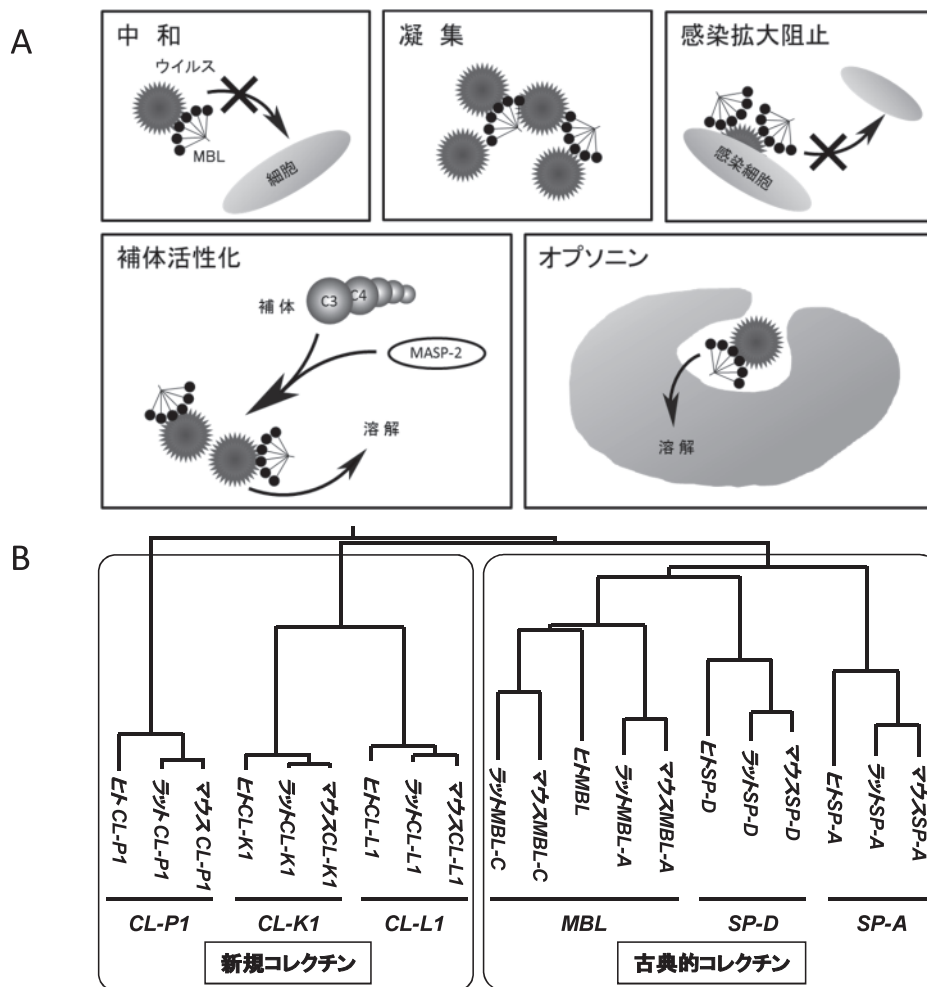


図1 コレクチンの自然免疫機能とヒト、マウス、ラットのコレクチンの系統樹

(A) 直接的な機能として、ウイルス感染の中和や凝集、ウイルス感染細胞から非感染細胞への感染拡大阻止があり、間接的な機能として補体活性化や異物のオプソニンとしての機能がある。

(B) 古典的コレクチンMBL、SP-A、SP-Dが一つのクラスターを形成し、その共通祖先から分岐する形で新規コレクチンCL-P1、CL-K1、CL-L1が別に進化してきたと考えられる。(文献8を改変)

レクチンが自然免疫の重要な分子であることを明らかにした⁶⁾(図 1A)。本稿では、筆者らにより逆遺伝学法を用いて発見された、CL-P1、CL-K1 の新規コレクチン分子研究の進展と、コレクチン関連分子の二重機能性について概説する^{7,8)}。

2. 新規コレクチンと古典的コレクチンの比較

三つの“新規コレクチン”(CL-P1, CL-K1, CL-L1) 遺伝子群は、遺伝子解析や生物学的特性から、既存の三つの“古典的コレクチン”(MBL, SP-A, SP-D) 遺伝子群とは明らかに異なる性質を有することより“新規コレクチン”遺伝子として区別して呼んでいる^{9,10)}。古典的コレクチンはその存在様式が全て分泌型であるのに対して、新規コレクチンは、膜結合型、細胞質型、分泌型と様々である。組織分布も古典的コレクチンはそれぞれ特定の臓器に局限しているのに対して、新規コレクチンは多様な組織に分布している点で異なる。糖鎖結合親和性は新規コレクチンでは単糖に対してあまねく低く、古典的コレクチンとは対照的である。これらのコレクチン遺伝子の構造およびアミノ酸配列に基づいて系統樹を作成すると、6種類のコレクチン遺伝子群は、三つの古典的コレクチンが一つのグループを形成し、これらの共通祖先から分岐する形で三つの新規コレクチンが位置している(図 1B)。この系統樹から、古典的コレクチンは、実は動物の進化に伴って後から誕生した「新生コレクチン」であり、新規コレクチン群が、コレクチンの先祖型に近い存在である可能性が考えられる。

3. 新規コレクチン CL-P1, CL-K1 研究の進展

CL-P1 は、膜タンパク質でそのタンパク質のドメイン構造と機能はスカベンジャー受容体 SR-A と酷似している。免疫組織染色では、マウス、ヒトとも、血管内皮に特異的に発現しており、SR-A のマクロファージを主とする発現とは大きく異なる^{7,11)}。筆者らは、CL-P1 の役割を明らかにする目的で、ヒト血管内皮細胞で発現している CL-P1 に対して、siRNA (small interfering RNA) を用いた遺伝子ノックダウン実験を行った。その結果、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を含む複数の血管内皮細胞において、CL-P1 自身が直接、酵母のファゴサイトーシスに関与することを明らかにした¹¹⁾。このスカベンジャー受容体様の機能は、微生物以外に動脈硬化の原因物質と考えられている酸化 LDL (低密度リポタンパク質) の除去にも関与することと、CL-P1 の発現部位と相まって血管における自然免疫機能として、何らかの役割を有することが示唆された。

次に筆者らは CL-P1 の個体での機能解析のために、ゼブラフィッシュをモデルとした実験を行った¹²⁾。まず、ゼブラフィッシュ受精卵において、リアルタイム PCR にて CL-P1 の mRNA 発現を継時的に解析した。その結果、受精早期から CL-P1 の遺伝子発現が認められ、その発現は受精後 24 時間をピークに増大することを観察した。また同時に、血管内皮増殖因子 (VEGF) やその受容体である KDR, Flt-1, Tie-2 の遺伝子発現を比較した結果、CL-P1 遺伝子の発現パターンは、Tie-2 遺伝子によく似た発現パターンを示し、CL-P1 発現のピークは血管構築の時期に一致していた。この CL-P1 の mRNA やタンパク質の発現局在は、マウスやヒトの組織発現と同様、主に血管組織に認められた。次にモルフォリノオリゴヌクレオチド (morpholino oligonucleotide) を用いた CL-P1 遺伝子ノックダウン実験の結果、ノックダウン胚では、背部大動脈、体節血管の欠損、心嚢浮腫を伴う、体幹形成の著しい異常形質が明らかになった(図 2)。本表現型異常は、CL-P1 mRNA 同時投与により、顕著な改善が見られたことから、CL-P1 発現が形態形成に関与することが推測された¹²⁾。さらに、CL-P1 遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュにおける、血管増殖関連因子の発現検討の結果、VEGF mRNA の低下が観察されたことで、CL-P1 遺伝子ノックダウン時 VEGF mRNA の同時投与を行い、形態異常の改善傾向を観察した。これらの実験結果から、硬骨魚類であるゼブラフィッシュでは、CL-P1 分子が初期発生において血管構築に何らかの役割を果たしその結果形態形成が順調に遂行されること、本初期胚発達のためのシグナル伝達経路には、直接 CL-P1 が関与する経路と一部 VEGF とその受容体を介する経路がある可能性が示唆された。

ゼブラフィッシュの CL-K1 遺伝子ノックダウン実験でも、形態異常の表現型は若干異なるが、異常を呈することが観察されている(未発表)。これらの実験事実は、自然免疫に関与する生体防御因子として捉えられている MBL, SP-A, SP-D などの古典的コレクチンと異なり、新規コレクチンが形態形成に関与している可能性を強く示唆している。ちなみに、コレクチンのオルソログにおけるアミノ酸配列の同一性をヒトとマウス間で解析してみると(表 1)、CL-P1 と CL-K1 では、その同一性が他のコレクチンと比較して、著しく高いことが認められる。これらのアミノ酸配列の同一性の比較について、Murphy らが、興味深い報告をしている¹³⁾。リボソームタンパク質や増殖因子や神経伝達因子などのある種のタンパク質は高い保存性(通常 10% 前後の配列相違性)を有するが、宿主の防御に関わ

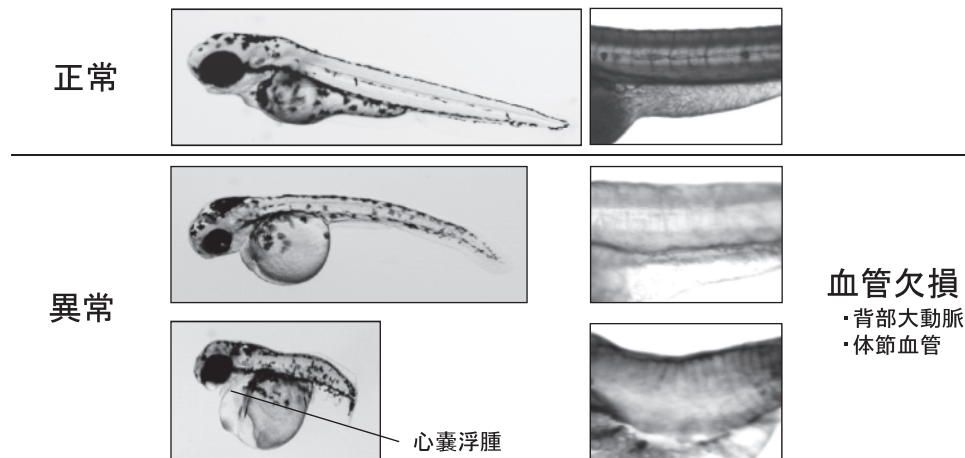


図2 *CL-P1* 遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュの幼魚

正常なゼブラフィッシュと比べて、*CL-P1* 遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュでは形態異常が観察された。体幹形成の著しい異常が見られ、心嚢浮腫を引き起こしている幼魚も見られた。右側の写真は、アルカリホスファターゼの基質による血管内皮染色の結果であるが、*CL-P1* 遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュでは背部大動脈や体節血管の欠損が観察された。*CL-P1* 分子が初期発生における血管構築に何らかの役割を担うことが示唆された。(文献 12 を改変)

表1 コレクチンのヒトとマウス間のアミノ酸配列の同一性の比較

	CL-P1	CL-K1	CL-L1	MBL	SP-A	SP-D
N 末端領域	95%	75%	72%	51%	37%	64%
コラーゲン様領域	94%	94%	88%	75%	82%	79%
ネック領域	82%	93%	90%	18%	61%	57%
糖認識領域	87%	97%	95%	60%	71%	76%
全領域	91%	92%	88%	60%	69%	75%

るリガンドや受容体では配列に多様性が見られ、保存性が高くないとしている(通常 30% 以上の配列相違性)。この観点から考えると、*CL-P1* と *CL-K1* は、増殖因子や個体形成など生体の恒常性維持に必須の遺伝子である可能性が推測される。マウスでは、*CL-P1* 遺伝子は受精直後の早期から発現していることや、*CL-P1* や *CL-K1* 遺伝子ノックアウトマウスでの予備的実験結果は哺乳類において、これらのコレクチン分子が胎児発生や胎児期の形態形成に密接に関与する可能性を示唆している。

さらに 2011 年、驚くべき報告が Rooryck らによってなされた。つまり、3MC 症候群と呼ばれる常染色体劣性遺伝病の 10 数例の家系において、次世代ゲノムシーケンサーを用いた遺伝子解析を行い、本疾患原因が *CL-K1*、*MASP-3* (*MBL associated serine protease-3*; 補体活性化経路のレクチン経路において、異物の糖鎖にレクチンが結合した後、活性化の最初の段階で関与するセリンプロテアー

ゼ) 遺伝子の変異によるどちらかのタンパク質欠損であることが報告された¹⁴⁾。3MC 症候群は両眼隔離、眼裂狭小、眼瞼下垂、球状眉、眼異形、頭蓋骨癒着、口蓋裂、前房欠損等の特徴とする遺伝病であり(図 3)、ホモ接合体マッピングによる解析は、*CL-K1* と *MASP* が連動してヒトの個体発生に重要な役割を果たす可能性を示唆している。このヒトでの研究事実、筆者らが硬骨魚類やマウスにおいて明らかにしたコレクチンの機能が、実際にヒトでも働いている可能性を示している。本邦では琉球大学の知念らによる 3MC 症候群の 1 症例報告があり、知念らと共同で日本における本遺伝病の実態把握を予定している。そこで、筆者らは *CL-K1* の疫学解析を進めるために、血中濃度測定のための ELISA システムの構築を行った。本 ELISA を利用した解析では、日本人における *CL-K1* の血中濃度は $0.34 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ であり、*MBL* の血中濃度 ($1 \sim 2 \mu\text{g/ml}$) よりも低いこと¹⁵⁾、さらに *MBL* では一塩基多型によって起こる血中濃度のばらつきが *CL-K1* では認められないこと、また性差や年齢による影響を受けないこと、*MBL* の血中濃度との相関性がないことを明らかにした¹⁵⁾。さらに、Rooryck らとの共同研究も始まっており、本 *CL-K1* 濃度測定 ELISA や *MASP* 測定系を組み合わせたアッセイ系を樹立して、本疾患を含めた *CL-K1*、*MASP-3* の過不足が関与する疾患の把握に役立つシステム構築を考えている。

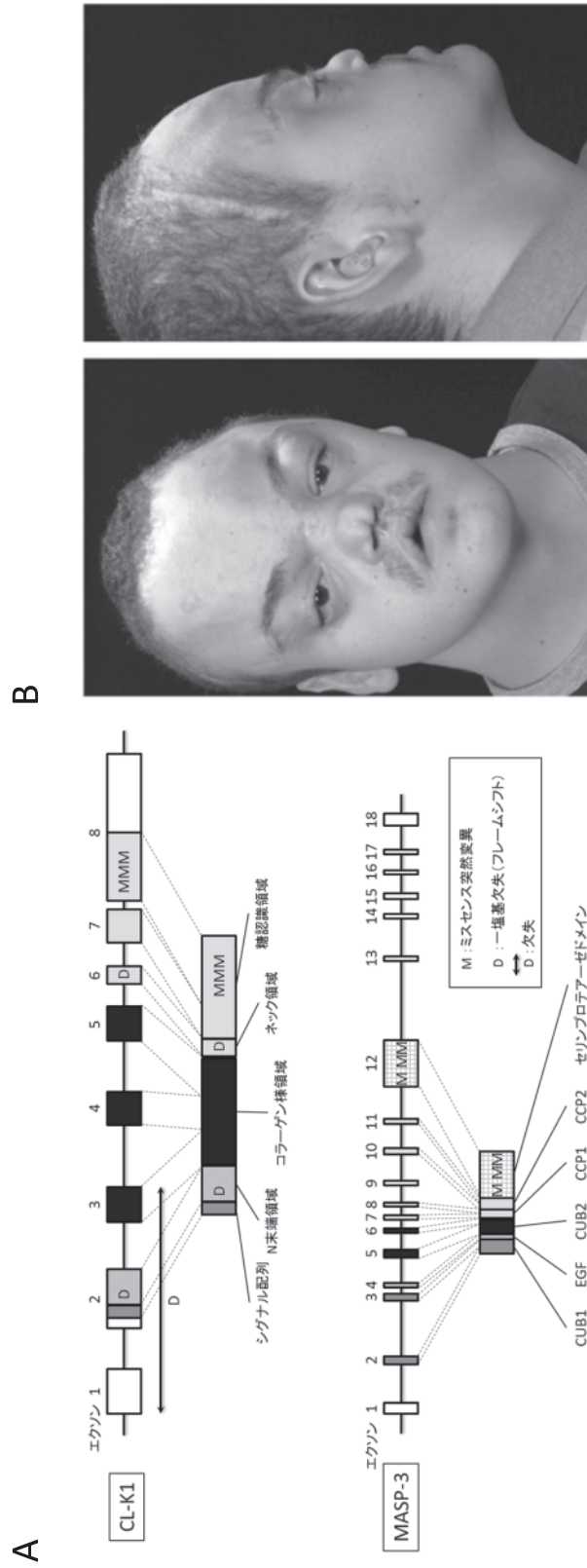


図3 3MC症候群はCL-K1およびMASP-3遺伝子の変異が原因である
 (A) CL-K1およびMASP-3遺伝子のゲノム構造と原因となる変異を示した。CL-K1には、N末端およびネットワーク領域にフレームシフトを伴う一塩基欠失とエクソン1~3の欠失および糖認識領域に3か所のミスセンス突然変異が存在した。MASP-3においてはセリンプロテアーゼドメインに3か所のミスセンス突然変異が見られた。
 (B) 3MC症候群の患者の典型的な顔の特徴。高く吊り上った眉、眼瞼下垂、下向きに曲がった口、非対称の頭蓋骨、頭蓋骨癒合症。(文献14を改変)

4. おわりに

名取俊二博士は、昆虫レクチンの機能について生体防御の概念を提唱された先駆者であるが、ショウジョウバエのToll様受容体が生体防御と形態形成の二重機能性を有することに言及している。我々はCL-K1とMASPが、哺乳類において自然免疫と形態形成に関与する二重機能性分子であると考えている。特に、コレクチンは分子内部に多様な機能ドメインを有しており、補体関連因子を含め、多様な生体内分子との結合が予想される。また、コレクチン遺伝子は、脊椎動物の原型といわれるナメクジウオにおいて、複数（60以上）発見されており、その先祖型コレクチン遺伝子がどのような分子進化をたどりながら、マウスやヒトのコレクチン遺伝子に進化してきたか、非常に興味を持たれる。新規コレクチン遺伝子の個体における新しい役割を分子レベルで明らかにできれば、これらの分子異常や欠損もしくは過剰発現によって起こる疾患の予防や治療に役立つばかりでなく、糖鎖生物学の新しい展開の一助になると期待している。

- 1) Drickamer, K. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 9557-9560.
- 2) Kawasaki, N., Kawasaki, T., & Yamashina, I. (1983) *J. Biochem.*, **94**, 937-947.
- 3) Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T., & Yamashina, I. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 7451-7454.
- 4) White, R.T., Damm, D., Miller, J., Spratt, K., Schilling, J., Hawgood, S., Benson, B., & Cordell, B. (1985) *Nature*, **317**, 361-363.
- 5) Persson, A., Chang, D., Rust, K., Moxley, M., Longmore, W., & Crouch, E. (1989) *Biochemistry*, **28**, 6361-6367.
- 6) Sumiya, M., Super, M., Tabona, P., Levinsky, R.J., Arai, T., Turner, M.W., & Summerfield, J.A. (1991) *Lancet*, **337**, 1569-1570.
- 7) 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. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 44222-44228.
- 8) Keshi, H., Sakamoto, T., Kawai, T., Ohtani, K., Katoh, T., Jang, S-J., Motomura, W., Yoshizaki, T., Fukuda, M., Koyama, S., Fukuzawa, J., Fukuoh, A., Yoshida, I., Suzuki, Y., & Wakamiya, N. (2006) *Microbiol. Immunol.*, **50**, 1001-1013.
- 9) Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Yamazaki, H., Shimada, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., & Wakamiya, N. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 13681-13689.
- 10) Ohtani, K., Suzuki, Y., & Wakamiya, N. (2012) *J. Biomed. Biotech.*, 493945.
- 11) Jang, S., Ohtani, K., Fukuoh, A., Yoshizaki, T., Fukuda, M., Motomura, W., Mori, K., Fukuzawa, J., Kitamoto, N., Yoshida, I., Suzuki, Y., & Wakamiya, N. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 3956-3965.
- 12) Fukuda, M., Ohtani, K., Jang, S-J., Yoshizaki, T., Mori, K., Motomura, W., Yoshida, I., Suzuki, Y., Kohgo, Y., & Wakamiya, N. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 1150-1159.
- 13) Murphy, P.M. (1993) *Cell*, **72**, 823-826.
- 14) Rooryck, C., Diaz-Font, A., Osborn, D.P., Chabchoub, E., Hernandez-Hernandez, V., Shamseldin, H., Kenny, J., Waters, A., Jenkins, D., Kaissi, A.A., Leal, G.F., Dallapiccola, B., Carnevale, F., Bitner-Glindzicz, M., Lees, M., Hennekam, R., Stanier, P., Burns, A.J., Peeters, H., Alkuraya, F.S., & Beales, P.L. (2011) *Nat. Genet.*, **43**, 197-203.
- 15) Yoshizaki, T., Ohtani, K., Motomura, W., Jang, S-J., Mori, K., Kitamoto, N., Yoshida, I., Suzuki, Y., & Wakamiya, N. (2012) *J. Biochem.*, **151**, 57-64.

大谷 克城, 若宮 伸隆
(旭川医科大学医学部微生物学講座)

Novel collectins play double roles in embryonic and fetal development as well as innate immunity
Katsuki Ohtani and Nobutaka Wakamiya (Department of Microbiology and Immunochemistry, Asahikawa Medical University, 1-1-1 Midorigaoka-Higashi 2, Asahikawa, Hokkaido, 078-8510, Japan)