

## 学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	大 谷 克 城
学 位 論 文 題 目			
<p>The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells (膜型コレクチン CL-P1 は血管内皮細胞に発現するスカベンジャー受容体である)</p>			
共 著 者 名			
<p>鈴木定彦、江田宗司、河合高生、加瀬哲男、芥子宏行、酒井善典、福應 温、 坂本隆志、板部洋之、錫谷達夫、小笠原正洋、吉田逸朗、若宮伸隆</p>			
The Journal of Biological Chemistry Vol. 276, No. 47, Issue of November 23. pp. 44222-44228, 2001			
研 究 目 的			
<p>コレクチンは、植物レクチンに対応する動物レクチンの一部として、1980年川寄らにより初めて報告された。これら動物血清レクチンは、その内部にコラーゲン様構造と Ca<sup>++</sup> 要求性の糖認識領域 (CRD) をもち、コレクチン (collectin = collagen + lectin) と呼ばれており、生物学的機能として、微生物に対する自然免疫に関与していることが示唆されている。一方、スカベンジャー受容体 SR-AI は、コラーゲン様構造をもつ3量体膜結合型蛋白質で、コラーゲン様構造のポリチャージ部分によって変性 LDL や病原微生物と結合し、エンドサイトーシスやファゴサイトーシスによってそれらを中和したり破壊する機能を有した分子である。以上のことからコレクチンとスカベンジャー受容体との類似性に興味を持ち、両者の機能を兼ね備えた分子の存在を想定し、その遺伝子をクローニングし、その機能を明らかにすることを目的とした。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p>1. 膜型コレクチン CL-P1 のクローニング</p> <p>既知のコレクチン遺伝子の保存性の高い領域に着目し、その塩基配列をもとに EST データベースの検索を行い、未知のコレクチンの CRD 配列を持つ複数のクローンを見いだした。得られた塩基配列のデータをもとに DNA プローブをデザインし、それを用いてヒト胎盤 <math>\lambda</math>gt11 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、さらに mRNA の 5' 末端の塩基配列をヒト胎盤 Cap Site cDNA の Cap Site Hunting 法により決定し、完全長のヒト CL-P1 遺伝子をクローニングした。</p>			

## 2. ヒト各組織および臓器における CL-P1 の mRNA およびタンパク質発現の検討

26 種類のヒト組織および臓器 mRNA を用いて RT-PCR 法により、mRNA の発現を検討し、同時に他のコレクチンの発現パターンとの比較を行った。また 8 種類のヒト組織および臓器を用いてノーザンブロット法により、mRNA の発現量やその分子サイズを検討した。タンパク質の発現様式については、ヒト CL-P1 の CRD 部分を大腸菌に遺伝子導入して作製した組換え体を、ウサギに免疫することによって得られたポリクローナル抗体を用いて、免疫組織染色法により解析した。

## 3. CL-P1 タンパク質の分子生物学的検討

完全長のヒト CL-P1 遺伝子を CHO 細胞に遺伝子導入して、その発現様式を membrane immunofluorescence および flow cytometry により検討し、その分子量を SDS-PAGE、イムノブロットにより解析した。

## 4. CL-P1 遺伝子安定発現細胞におけるスカベンジャー受容体としての機能解析

スカベンジャー受容体の主な機能である変性 LDL との結合は、蛍光標識した LDL、アセチル LDL、酸化 LDL を、完全長のヒト CL-P1 遺伝子を CHO 細胞に遺伝子導入した安定発現細胞株の培地中に添加することにより検討した。さらに、蛍光標識した酸化 LDL と種々の阻害剤を共存させることにより酸化 LDL との結合様式を解析した。

## 5. CL-P1 遺伝子安定発現細胞における先天性免疫機能の解析

コレクチン本来の機能である微生物に対する結合は、蛍光標識した大腸菌、黄色ブドウ球菌、酵母を、CL-P1 発現細胞株に添加することにより検討した。また、酵母については、共焦点レーザー顕微鏡観察により結合後のファゴサイトーシスについて検討した。

## 成 績

1. 遺伝子クローニングの結果、得られたヒト CL-P1 の cDNA は 2628 塩基からなり、2226 塩基の ORF を有し、742 アミノ酸をコードする遺伝子であることが明らかとなった。
2. ヒト各組織および臓器における CL-P1 mRNA の発現は RT-PCR の結果、ほとんど全ての組織および臓器に発現しており、ノーザンブロット解析の結果、胎盤で高く、心臓、肺でも比較的高い発現であることがわかった。またマウスの心臓切片の免疫組織染色の結果、血管内皮細胞に強い発現を認めた。さらに、血管内皮細胞株である HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) や HUAEC (human umbilical artery endothelial cells) においても同様の抗体を用いて、flow cytometry や蛍光顕微鏡において未固定条件で、膜蛍光が確認されたことから、CL-P1 遺伝子の発現様式は、CRD 部分を細胞外に配した II 型膜タンパク質であることが明らかとなった。これら結果は、血管の多い臓器に mRNA が多いというノーザンブロットと RT-PCR の結果に、非常に良く合致した。

3. SDS-PAGE とイムノブロット解析において、細胞膜表面に発現する CL-P1 タンパク質は、糖鎖修飾を受けおよそ 140kDa の分子量をもつことが推測された。
4. スカベンジャー受容体としての機能である変性 LDL との結合については、酸化 LDL と特異的な結合が見られ、その結合は陰性荷電を有する nucleotide polymer である Polyguanylic acid (Poly G)、Polyinosinic acid (Poly I) で阻害されることから、この結合様式は電荷によるものであることがわかった。
5. 微生物との結合は、検討に用いたグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌、グラム陰性菌である大腸菌、真核細胞としての酵母のいずれにも認められ、酵母については細胞内部にファゴサイトーシスされることを見いだした。

## 考 案

これまでコレクチン分子は、分泌型タンパク質として考えられていたが、本研究により、膜結合型コレクチンの存在が明らかになった。クローニングした CL-P1 は II 型膜結合タンパクとして血管内皮にユビキタスに発現し、その構造はコレクチンのドメイン構造を維持しているだけでなく、スカベンジャー受容体である SR-AI と非常によく似たドメイン構造を持ち、その結合活性を担うコラーゲン様領域における陽性荷電を示すアミノ酸クラスターを保持していた。CL-P1 は、そのスカベンジャー受容体としての機能により本来の生理的リガンドである酸化 LDL と特異的に結合するだけでなく、コレクチンの先天性免疫の機能として微生物とも結合し、さらにスカベンジャー受容体 SR-AI や MARCO が結合できなかった高マンノースを多くもつ酵母とも結合、ファゴサイトーシスする多機能分子であると考えられた。

## 結 論

CL-P1 は II 型膜結合タンパクとして血管内皮に発現し、そのスカベンジャー受容体としての機能およびコレクチンとしての機能により、血管における自然免疫機能を担う分子であると考えられる。

## 引 用 文 献

- 1) Kawai, T., Suzuki, Y., Eda, S., Ohtani, K., Kase, T., Fujinaga, Y., Sakamoto, T., Kurimura, T. & Wakamiya, N. : Cloning and characterization of a cDNA encoding bovine mannan-binding protein. *Gene* **186**, 161-165, 1997
- 2) Itabe, H., Yamamoto, H., Suzuki, M., Kawai, Y., Nakagawa, Y., Suzuki, A., Imanaka, T. and Takano,




T. : Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. Analysis by monoclonal antibody against oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 271, 33208-33217, 1996

- 3) Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Yamashina, I. : Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum. *Biochem Biophys Res Commun.* 95 (2), 658-64, 1980

参 考 論 文

- 1) Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Yamazaki, H., Shimada, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T. and Wakamiya N. : Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1). *J. Biol. Chem.* 274, 13681-13689, 1999
- 2) Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Yamamoto, S., Sakamoto, T., and Wakamiya, N. : High-level and effective production of human mannan-binding lectin (MBL) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J. Immunol. Meth.* 222, 135-144, 1999

## 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	大谷 克城
<p>審査委員長 谷口 隆信 </p> <p>審査委員 伊藤 喜久 </p> <p>審査委員 若宮 伸隆 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells (膜型コレクチンCL-P1は血管内皮細胞に発現するスカベンジャー受容体である)</b></p> <p>共著者名：鈴木定彦、江田宗司、河合高生、加瀬哲男、芥子宏行、酒井善典、福應温、坂本隆志、板部洋之、錫谷達夫、小笠原正洋、吉田逸朗、若宮伸隆</p> <p>掲載学会誌名： J. Biol. Chem. 276 (47) ; 44222-44228 : 2001.</p>			
<p><b>審査結果要旨</b></p> <p>レクチンは糖鎖を認識して結合する蛋白質として、古くから知られその性質は蛋白質の分離精製にも応用されてきた。近年レクチンは極めて多様な蛋白質ファミリーであり、我々の体内において感染防御や異物除去、細胞接着などの重要な生理機能に深く関わっていることが明らかにされつつある。コレクチンはカルシウム依存性の糖鎖認識部位とコラーゲン類似構造部位を持った一群のレクチンサブファミリーであるが、本論文はこのサブファミリーでは初めての膜型コレクチンCL-P1の発見を報告している。</p>			

CL-P1は糖鎖認識部位とコラーゲン類似構造という基本的なコレクチン単位の他に膜貫通部位と細胞内ドメインを持つ2型膜蛋白であり、コレクチンサブファミリーでは他に例のない構造で、むしろ変性LDLリポ蛋白を結合するスカベンジャー受容体と類似した構造であった。著者はCL-P1に対する遺伝子プローブや特異的な抗体を用いて、この蛋白質が胎盤、心臓、肺に多く発現し、組織学的には主に血管内皮細胞に局在していることを明らかにした。この局在はコレクチンサブファミリーの他の分子種やスカベンジャー受容体とは異なったものであり、何らかの特異的機能を担っていることが予想された。

そこで著者はCL-P1とスカベンジャー受容体SR-BIを定常的に発現させたCHO細胞を用いて、それらの機能の比較を行った。CL-P1は酸化型LDLに極めて特異的な結合を示すのに対し、SR-BIは非酸化型及びアセチル型LDLに対しても同じように結合し、機能的には全く異なっていることを明らかにした。さらに、CL-P1は大腸菌、ブドウ球菌、酵母に対しても結合すると同時に、CHO細胞においてこれらの微生物を細胞内に取り込む貪食活性を付与することも示した。

本論文に示されたこれらの知見は、CL-P1が血管内に侵入した微生物を補足除去する生体防御システムや、酸化LDLを血管内皮上で特異的に結合することにより動脈硬化症の病態に深く関わっているのではないかとする結論を支持するものであり、今後の医学的応用に大いに期待できると考えられます。申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識/経験/見識は医学博士に相応しいものであると考えました。

以上、論文/諮問による審査の結果、論文博士に値すると判定したことを御報告いたします。