

## 血管内皮にのみ存在する膜型コレクチンの スカベンジャー機能を解析する

平成13年度	5,500	0	
平成14年度	3,000	0	
平成15年度	3,000	0	(13470139)
計	11,500	0	

### 平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）研究成果報告書

平成16年5月

研究代表者 若 宮 伸 隆  
(旭川医科大学医学部教授)

Chen, K., Suzuki, Y., Ito, H., Wakamiya, N., & Shimizu, T. (2001). The membrane-type collectin (CL-P1) is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 276(47), 44222-44228, 2001.

Takami, A., Suzuki, K., Wakamiya, N., Ichimaru, H., & Kohno, T. (2001). Mannose-binding lectin-2 is a scavenger receptor for oxidized lipoproteins in atherosclerosis, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Cell Death Differ.*, 7, 29-36, 2001.

Wang, J., Jensen, T., Sorensen, E., Jensen, U.B., Schenck, W., Kawasaki, T., Ma, Y., Uemura, K., Wakamiya, N., Olsen, L.F., Takahashi, K., Izdehovic, A.D., Thiel, S., Jensenius, J.L. (2001). Reconstituted expression of human mannose-binding lectin 2c. *Immunology*, 114(3), 477-487, 2001.

Matsuda, Y., Yoshida, M., Seki, M., Wakamiya, N., & Shimizu, T. (2001). Mannose-binding lectin 2c is a scavenger receptor for oxidized lipoproteins in atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, 276(47), 44229-44235, 2001.

Zhao, H., Wakamiya, N., Suzuki, Y., & Shimizu, T. (2001). Identification of human mannose-binding lectin (MBL) recognition sites for oxidized lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 276(1), 25-35, 2001.

Fukunaga, J., Nishimura, I., Hasebe, N., Hamada, T., Oishi, J., Sato, T., Wakamiya, N., & Fukui, K. (2001). Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular matrix activation by oxidized lipoproteins in atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, 276(20), 20809-20815, 2001.

Kawai, T., Suzuki, Y., Ito, S., Kase, T., Ohno, K., Sato, Y., Kato, H., Fukui, A., Sakamoto, S., Nozaki, M., Cleveland, N.G., Jenkins, D.A., Wakamiya, N. (2001). Molecular cloning of a mouse collectin Ly-2. *J. Biol. Chem.*, 276(10), 2144-2148, 2001.

## はしがき

本研究の大きな目標としては、CL-P1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた種々の個体レベルの研究を行うことであるが、そのための基礎実験をこの3年間で蓄積する事が非常に重要であると捉えている。まず細胞レベルの遺伝子発現株を用いた研究により、受容体の機能解析を中心に行い、また正常発現細胞株 HUVEC での発現誘導の発見があり、常在型でありながら特殊な環境では、著しくその発現が増強する事実も明らかになった。本研究は現在やっと基礎研究の土台が整った段階であり、個体レベルの CL-P1 のスカベンジャー機能解析への展開に続いていくと考えている。平成13～15年度の研究成果としては以下の如く、7つのプロジェクトがめざましく進展した。

(1) 血管内皮細胞存在型コレクチン遺伝子 CL-P1 の遺伝子クローニングが終了した。

1. ヒト CL-P1cDNA のクローニング
2. マウス CL-P1cDNA のクローニング
3. ラット CL-P1cDNA のクローニング
4. アフリカツメガエル CL-P1cDNA のクローニング
5. ゼブラフィッシュ CL-P1cDNA のクローニング
6. 遺伝子ターゲティング用マウス CL-P1 ゲノム DNA のクローニング
7. ヒト CL-P1 ゲノム DNA のクローニング

(2) ヒト、ゼブラフィッシュ CL-P1 遺伝子永久発現細胞株の樹立

1. 永久発現株細胞の樹立・発現レベルの異なる株を得た。
2. 部分遺伝子発現細胞株の樹立を行った。

(3) 分泌型 CL-P1 作成とその欠損や点変異蛋白質の作成

1. 分泌型 CL-P1 の発現系の探索
2. 上記の発現系を用いて、コラーゲン部分、レクチン部分、coiled coil 部分の機能ドメイン欠損蛋白質の作成
3. 分泌型蛋白に結合実験のための ELISA システムの樹立

(4) CL-P1 細胞内領域に結合する蛋白質の探索

1. 酵母 two hybrid システムを用いた結合タンパク質のクローニング
2. クローニングした AP2M2 蛋白と CL-P1 蛋白の結合実験

(5) 酸化の異なる変性 LDL の作成とその解析

(6) コレクチン発現誘導にかかる promoter 解析

(7) ヒト血管内皮細胞の正常細胞株である HUVEC における常在型 CL-P1 の発現誘導の検討

## 研究組織

- 研究代表者: 若宮 伸隆 (旭川医科大学医学部教授)  
研究分担者: 吉田 逸朗 (旭川医科大学医学部助教授)  
研究分担者: 小笠原正洋 (旭川医科大学医学部助手)  
研究分担者: 福澤 純 (旭川医科大学医学部助手)  
研究分担者: 鈴木 定彦 (鳥取大学医学部助教授)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	6,500	0	6,500
平成14年度	3,000	0	3,000
平成15年度	3,000	0	3,000
総計	12,500	0	12,500

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 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.: The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276(47): 44222-44228, 2001.
- Tsutsumi, A., Sasaki, K., Wakamiya, N., Ichikawa, K., Atsumi, T., Ohtani, K., Suzuki, Y., N., Koike, T., Sumida, T.: Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogrens syndrome *Genes Immun* 2: 99-104, 2001.
- Vorup-Jensen, T., Sorensen, E.S., Jensen, U.B., Schwaeble, W., Kawasaki, T., Ma Y, Uemura K, Wakamiya, N., Jensen, T.G., Takahashi, K., Ezekowitz, A.B., Thiel, S., Jensenius, J.C.: Recombinant expression of human mannan-binding lectin. *Int. Immunopharmacol.* 1(4):677-87, 2001.
- Hokozaki, Y., Yoshida, M., Sekiyama, K., Seike, E., Iwamoto, J., Mitani, K., Masafumi, M., Morizone, T., Ohtani, K., Suzuki, Y., Wakamiya, N.: Mannose-binding lectin and the prognosis of fulminant hepatic failure caused by HBV infection. *Liver* 22(1): 29-34, 2002.
- Zhao H., Wakamiya, N., Suzuki, Y., Hamonko, M.T., Stahl, G.L.: Identification of human mannose binding lectin (MBL) recognition sites for novel inhibitory antibodies. *Hybridoma and Hybridomics* 21(1): 25-36, 2002.
- Fukuzawa, J., Nishimura, J., Hasebe, N., Haneda, T., Osaki, J., Saito, T., Nomura, T., Wakamiya, N., Kikuchi, K.: Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 277(28): 24889-24895, 2002.
- Kawai, T., Suzuki, Y., Eda, S., Kase, T., Ohtani, K., Sakai, Y., Keshi, H., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Nozaki, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Wakamiya, N.: Molecular cloning of a mouse collectin liver 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(10): 2134-2145, 2002.

8. Ohmori, H., Makita, Y., Funamizu, M., Chiba, S., Ohtani, K., Suzuki, Y., Wakamiya, N., Hata, A.: Haplotype analysis of the human collectin placenta 1 (hCL-P1) gene. *J. Hum. Genet.* 48: 82-85, 2003.
9. Suzutani T, Ishioka K, De Clercq E, Ishibashi K, Kaneko H, Kira T, Hashimoto KI, Ogasawara M, Ohtani K, Wakamiya N, Saijo M.: Differential Mutation Patterns in Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes of Herpes Simplex Virus Type 1 Clones Passaged in the Presence of Acyclovir or Penciclovir. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(5): 1707-1713. 2003.
10. Saito, T., Fukuzawa, J., Osaki, J., Sakuragi, H., Yao, N., Haneda, T., Fujino, T., Wakamiya, N., Kikuchi, K., Hasebe, N.: Roles of calcineurin and calcium /calmodulin-dependent protein kinase II in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J. Molecular and Cellular Cardiology.* 35(9): 1153-1160. 2003.
11. Takahashi, R. Tsutsumi, A. Ohtani, K. Goto, D. Matsumoto, I. Ito, S. Wakamiya, N Sumida, T.: Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus *Clinical and Experimental Immunology* (in press).
12. Takahashi, R. Tsutsumi, A. Ohtani, K. Mukai, Y. Goto, D. Matsumoto, I. Wakamiya, N Sumida, T.: Association of mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* (in press).
13. 若宮伸隆、鈴木定彦：新規血管内皮細胞型スカベンジャー受容体 CL-P1。生化学 73(3):205-208, 2001.
14. 大谷克城、若宮伸隆：Collectin family. *Surgery Frontier* 8(3): 301-305, 2001.
15. 若宮伸隆、鈴木定彦：MBL(mannan-binding lectin)その機能と生理学的意義 中国四国支部会誌 17:2-12, 2002.
16. 若宮伸隆、吉田逸朗、小笠原正洋、福澤純、大谷克城、小山聡：生体防御レクチンとしてのコレクチンファミリー。北海道医学雑誌 79(1):3-7, 2004.
17. 若宮伸隆：自然免疫において MBL はどのような役割を果たすのか 分子消化器病 (印刷中)

## (2) 口頭発表

### 国内学会

1. 大谷克城、鈴木定彦、坂本隆志、芥子宏行、福應温、若宮伸隆：新規膜型コレクチン CL-P1 のクローニングと機能解析。日本免疫学会 (大阪) 2001
2. 芥子宏行、河合高生、鈴木定彦、大谷克城、福應温、若宮伸隆：肝臓由来新規コレクチン(CL-K1) のクローニング。日本免疫学会 (大阪) 2001
3. 大谷克城、鈴木定彦、坂本隆志、芥子宏行、福應温、若宮伸隆：コレクチンの分子進化について。日本分子学会 (横浜) 2001
4. 芥子宏行、河合高生、鈴木定彦、大谷克城、福應温、坂本隆志、若宮伸隆：新規コレクチン CL-K1 遺伝子のクローニングとその解析。日本分子学会 (横浜) 2001
5. 福應温、大谷克城、坂本隆志、芥子宏行、鈴木定彦、福澤純、小山聡、高下圭一、小笠原正洋、吉田逸朗、若宮伸隆：血管内皮細胞特異的スカベンジャー受容体 CL-P1 の細胞内領域結合分子の解析。日本生化学会 (京都) 2002

6. 吉田匡伸、若宮伸隆、中田博：スカベンジャー受容体へのムチンへの結合を介したマウス腹腔マクロファージにおける COX-2 の誘導 日本生化学会（京都）2002
7. 鈴木定彦、大谷克城、坂本隆志、江田宗司、河合高生、福應温、芥子宏行、若宮伸隆：新規コレクチン遺伝子群のクローニングとその分子進化について。日本糖質学会（横浜）2002
8. 大谷克城、鈴木定彦、坂本隆志、江田宗司、河合高生、福應温、芥子宏行、若宮伸隆：血管内皮に発現するスカベンジャー受容体様コレクチン CL-P1 のクローニングと機能の解析。日本糖質学会（横浜）2002
9. 高橋令子、堤明人、村木祥文、後藤大輔、松本功、村田秀行、大谷克城、若宮伸隆、住田孝之：全身性エリテマトーデス患者における Mannose binding lectin 遺伝子の多型性。日本免疫学会（東京）2002
10. 若宮伸隆：新規コレクチン遺伝子群の発見とその分子進化について。日本生化学会北海道支部例会（札幌）2003.
11. 若宮伸隆、吉田逸朗、小笠原正洋、福澤純、大谷克城、小山聡：生体防御レクチンとしてのコレクチンファミリー。北海道医学大会総会（札幌）2003.
12. Ohtani, K., Koge, K., Koyama, S., Jang, S-J, Fukuzawa, J., Wakamiya, N.: Molecular characterization of CL-P1. 日本生化学会（横浜）2003.
13. Furukawa, K., Fukuda, M., Uchida, T., Suzuki, E., Matsumoto S., Kondo, Y., Ohtani, K., Wakamiya, N.: Isolation of zebrafish CL-P1 gene. 日本生化学会（横浜）2003.
14. 大谷克城、高下圭一、小山聡、張成宰、福澤純、若宮伸隆：膜型コレクチン CL-P1 の細胞外領域の機能解析。日本糖質学会（横浜）2003
15. 福田光子、古川健太、内田司、鈴木映未由、松本哲、近藤祐地、大谷克城、若宮伸隆：ゼブラフィッシュ CL-P1 のクローニングと構造および機能解析。日本糖質学会（横浜）2003
16. 大谷克城、福田光子、古川健太、内田司、鈴木映未由、松本哲、近藤祐地、張成宰、若宮伸隆：ゼブラフィッシュ CL-P1 のクローニングと構造および機能の解析。日本分子生物学会（神戸）2003
17. 高橋令子、堤明人、後藤大輔、松本功、大谷克城、若宮伸隆、住田孝之：全身性エリテマトーデス患者における抗 Mannose binding lectin (MBL) 抗体の検討。日本免疫学会（福岡）2003

#### 国際学会

1. K. Ohtani, Y. Suzuki, S. Eda, T. Kawai, A. Fukuoh, H. Keshi, T. Sakamoto, N. Wakamiya: Molecular cloning and characterization of a novel collectin CL-P1. International Symposium on Glycoconjugates. (Den Hague) 2001
2. H Keshi, T Kawai, Y Suzuki, K Ohtani, A Fukuoh, T Sakamoto, N Wakamiya: Molecular cloning and characterization of a novel collectin CL-K1. International Symposium on Glycoconjugates. (Den Hague) 2001
3. H Keshi, Y Suzuki, K Ohtani, T Sakamoto, N Wakamiya: The new collectin CL-K1 has several spliced

variants. Biochemical Society Transactions. (York) 2001.

4. K Ohtani, Y Suzuki, J Fukuzawa, K Furukawa, Y Kondo, A Fukuoh, H Keshi, T Sskamoto, N Wakamiya.: Molecular evolution of collectin genes. International Lectin Meeting. (Copenhagen) 2002.
5. Nobutaka Wakamiya, Katsuki Ohtani, Hiroyuki Keshi, Atsushi Fukuoh, Takashi Sakamoto, Yasuhiko Suzuki: The membrane type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. IenterLec (Copenhagen) 2002
6. Nobutaka Wakamiya.: Roles of the membrane type collectin CL-P1 in vascular endothelial cells. Glycobiology (Boston) 2002.
7. Wakamiya.N: The membranetype collectin CL-P1 is a scavenger receptor conserving in vertebrates. The 16<sup>th</sup> Naito conference (kanagawa) 2003.

### (3) 出版物

1. 鈴木定彦、若宮伸隆：感染防御とコレクチンファミリー。Annual Review 免疫 2002 217-225, 2002.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし