

The 41th Complement Symposium

August 2004, Tokyo



平成16年8月
東京

補体研究会

The Japanese Association for Complement Research

第41回補体シンポジウム参加案内

講演会場 東京大学山上会館 2階大会議室

受付 第1日 8月20日(金) 午前9時より
山上会館2階ロビーにて

参加費 一般 5,000円
学生 2,000円
懇親会費 4,000円

発表方法 すべて口頭発表で行います。一般演題は討論も含めて15分を予定しています。図表の映写には、液晶プロジェクターを一台用意しますので、PowerPointで作成したファイルをCDまたはUSBメモリーにてお持ち下さい。スライドプロジェクターを希望される方は、あらかじめ集会長までお知らせ下さい。
ファイルの受付は発表30分以上前までにお済ませ下さい。

運営委員会 第1日 8月20日(金) 12:30-13:30 (202号室)

総会 第2日 8月21日(土) 13:00-13:30 (大会議室)

懇親会 第1日 8月20日(金) 18:00-20:00
日比谷松本楼(工学部2号館)

年会費 会員の方で年会費を未納の方、および新たに入会される方は、当日の年会費受付にてご納入下さい。

年会費 一般 5,000円、学生 3,000円

補体研究会事務局

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

進化多様性生物学大講座 野中 勝

Tel/Fax: 03-5800-3397

E-mail: hotai@biol.s.u-tokyo.ac.jp

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/meneki/hotai/>

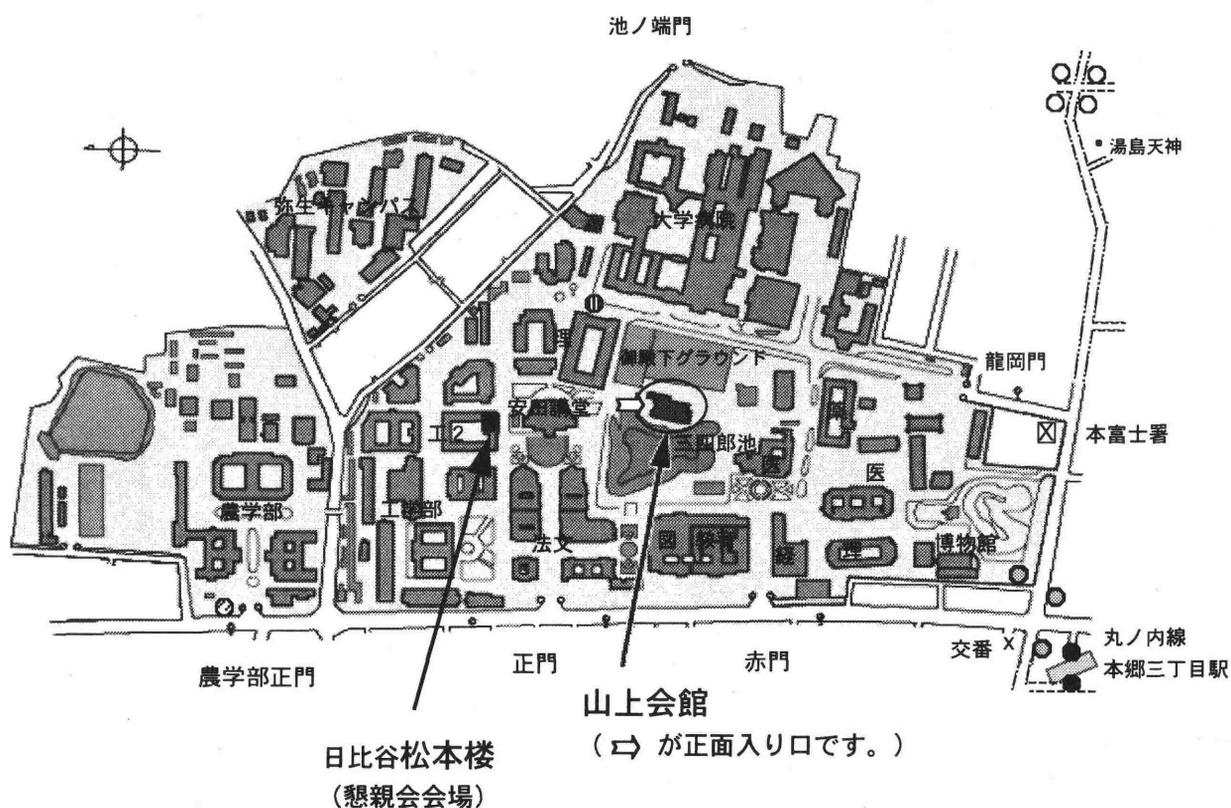
会場案内

東京大学^{さんじょう}山上会館

東京都文京区本郷 7-3-1

Tel : 03-3818-3008

東京大学本郷キャンパス構内および周辺図



会場への交通手段

東京駅より ● 地下鉄丸ノ内線池袋行き 本郷三丁目駅下車 徒歩10分
(全所要時間約30分)

その他の ● 地下鉄大江戸線 本郷三丁目駅下車 徒歩10分

最寄り駅 ◎ 地下鉄南北線 東大前駅 徒歩10分

○ 地下鉄千代田線 湯島駅下車 徒歩15分

⑩ J Rお茶の水駅より学バス(聖橋上) 東大構内下車 徒歩2分

日 程 表

8月20日(金)

9:00開場

| | | |
|-------------|----------------------|----------------------|
| 9:30-9:35 | 開会の辞 | 野中 勝 |
| 9:35-10:50 | セッションA:レクチン経路I | 座長 堀内孝彦、松下 操 |
| 10:50-11:05 | コーヒープレイク | |
| 11:05-12:20 | セッションB:レクチン経路II、制御因子 | 座長 松本美佐子、遠藤雄一 |
| 12:20-13:45 | 昼 食 | (12:30-13:30 運営委員会) |
| 13:45-14:45 | 教育講演 | 演者 富田基郎 座長 木下 タロウ |
| 14:45-15:45 | セッションC:GPIアンカー、エイズ | 座長 岡田則子、山本哲郎 |
| 15:45-16:00 | コーヒープレイク | |
| 16:00-17:30 | セッションD:C5a、腎臓 | 座長 大井洋之、松尾清一 |
| 18:00-20:00 | 懇 親 会 | |

8月21日(土)

9:00開場

| | | |
|-------------|------------|---|
| 9:30-10:45 | セッションE:進化 | 座長 藤田禎三、中尾実樹 |
| 10:45-11:00 | コーヒープレイク | |
| 11:00-12:00 | 特別講演 | 演者 Wenchao Song 座長 瀬谷 司 |
| 12:00-13:00 | 昼 食 | |
| 13:00-13:30 | 総 会 | |
| 13:30-16:30 | 臨床補体シンポジウム | 「疾患における補体の役割:病態生理から治療まで」 オルガナイザー・座長 南学正臣 |
| 16:30-16:35 | 閉会の辞 | 野中 勝 |

第41回補体シンポジウム・学術プログラム

第1日 8月20日(金)

セッションA: レクチン経路I

9:35-10:50

座長 堀内孝彦、松下 操

A-1 マウスフィコリンによるレクチン経路活性化

松下 操¹⁾²⁾、小出駿一¹⁾、高橋 実³⁾、菅野和子³⁾、千葉朋希¹⁾、中田宗宏¹⁾²⁾、藤田禎三³⁾
^{1)東海大・工・生命化学、^{2)糖鎖工学研究施設、^{3)福島県立医大・医・二生化}}}

A-2 リコンビナントマウスフィコリンAおよびフィコリンBの構造と機能

遠藤雄一、中澤なおみ、菅野和子、Yu Liu、岩城大輔、高橋実、松下操¹⁾、藤田禎三、
福島県立医大・医・生化学第二、CREST、^{1)東海大学・工・生命化学}

A-3 Distinct ontogenic patterns and expression cell types of mouse ficolin A and ficolin B

Yu Liu¹⁾, Yuichi Endo¹⁾, Shunsaku Homma²⁾, Kazuko Kanno¹⁾, Hiroyuki Yaginuma²⁾,
Teizo Fujita¹⁾

<sup>1)Department of Biochemistry and <sup>2)Department of Anatomy, Fukushima Medical University
and CREST, Japan Science and Technology Agency</sup></sup>

A-4 sMAP ノックアウトマウスの解析

岩城 大輔、菅野 和子、高橋 実、遠藤 雄一、松下 操¹⁾、藤田 禎三
福島県立医科大学・医・生化学第二、CREST、^{1)東海大学・工・生命化学}

A-5 Mannose-binding lectin (MBL) 欠損症

—易感染性との関連の検討と欠損症頻度の全国調査—

堀内孝彦、塚本浩、宮川弘、小山貴子、三苫弘喜、民本泰浩、宮城友豪、木本泰孝、
内野愛弓、長藤宏司、原田実根、林健志¹⁾、岡村精一²⁾

九州大学大学院病態修復内科学分野(第一内科)、<sup>1)九州大学生体防医学研究所、
^{2)国立病院機構九州医療センター}</sup>

セッションB: レクチン経路II、制御因子

11:05-12:20

座長 松本美佐子、遠藤雄一

B-1 コイ補体レクチン経路で機能する2種のMBL様レクチン

中尾実樹、加治屋貴之、畑中大作、中田宗宏^{a)}、松下 操^{a)}、藤田禎三^{b)}、矢野友紀
九州大学大学院農学研究院、^{a)東海大学工学部生命科学科、^{b)福島県立医科大学第2生化学}}

B-2 ヤツメウナギ MBL の構造と機能の解析

高橋百恵、岩城大輔、松下亜紀子、松下操¹⁾、遠藤雄一、藤田禎三
福島県立医科大学 医学部 生化学第二講座、CREST、<sup>1)東海大学 工学部 生命化学科、
糖鎖工学研究施設</sup>

セッションD：C5a, 腎臓

16:00-17:30

座長 大井洋之、松尾清一

- D-1 C5a 阻害ペプチドのアセチル化効果についての検討
堀田彩、朝井鈴佳、三浦典子¹、大野尚人¹、岡田秀親^{2,3}、岡田則子
名古屋市立大学大学院生体防御学分野、¹東京薬科大学薬学部免疫学、²(株) 蛋白科学研究所、³福祉村病院長寿医学研究所
- D-2 S19 リボソーム蛋白二量体の C5a リセプターを介した線維芽細胞アポトーシス亢進作用
西浦 弘志¹、渋谷 陽子²、山本 哲郎¹
¹熊大・院・医薬研究部・分子病理、²医・付属病院・中検
- D-3 白血球の C5a リセプター依存性活性酸素種産生における S19 リボソーム蛋白二量体のアゴニスト・アンタゴニスト両面作用
イヴェット・レヴォヨ、西浦弘志、山本哲郎
熊本大学大学院医学薬学研究部分子病理学分野
- D-4 血液透析患者における赤血球膜補体レセプター(CR1)の検討
—糖尿病性腎症と他腎疾患との比較—
玉野まり子、若林道郎、恩田紀更、眞野 訓、大井洋之、富野康日己
順天堂大学医学部腎臓内科
- D-5 尿中補体活性化産物は蛋白尿を有する糸球体疾患において腎予後推定に有用な指標である
森田良樹、丸山彰一、湯澤由紀夫、松尾清一
名古屋大学大学院病態内科学講座免疫応答内科学
- D-6 腎虚血再灌流障害における補体制御蛋白 CD55 と CD59 による腎保護作用
山田耕永、南学正臣¹、三輪隆史、藤田敏郎¹、Wenchao Song
Center for Experimental Therapeutics and Department of Pharmacology,
University of Pennsylvania School of Medicine、¹東京大学医学部腎臓内分泌内科

第2日 8月21日(土)

セッションE：進化

9:30-10:45

座長 藤田禎三、中尾実樹

- E-1 コイのアナフィラトキシンの単離と機能解析
加藤陽子、中尾実樹、矢野友紀
九州大学大学院農学研究院
- E-2 軟骨魚類サメの C3/C4/C5 遺伝子
林 晋平、寺戸 勅雄¹、木村 博¹、野中 勝
東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻、¹滋賀医科大学医学科基礎医学系放射線基礎医学

E-3 補体 C3 遺伝子の起源と進化

杉本早苗、藤戸尚子、野中勝

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

E-4 尾索動物カタユレイボヤにおける MHC Class III 補体遺伝子の単離および物理的連鎖解析

吉崎史子、井川俊太郎¹、佐竹正延¹、佐藤矩行²、野中勝

東大・院理・生物、¹東北大・加齢医学研究所、²京大・院理・動物

E-5 補体系後期成分の起源を探索する

木村 鮎子、遠藤 一如、吉崎 史子、宮沢 清太、瀬谷 司¹、野中 勝

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻、¹北海道大学大学院医学研究科病態解析学講座

特別講演

座長 瀬谷 司

11:00-12:00

"Membrane complement regulatory proteins: immunobiology and roles in autoimmune and inflammatory tissue injury"

Wenchao Song, PhD

Center for Experimental Therapeutics, University of Pennsylvania

臨床補体シンポジウム

13:30-16:30

「疾患における補体の役割：病態生理から治療まで」

オーガナイザー・座長 南学正臣

S-1 腎疾患と補体

松尾清一、森田良樹、丸山彰一、湯沢由紀夫

名古屋大学大学院病態内科学講座免疫応答内科学分野

S-2 心血管病と補体

上杉 憲子、阿部 正義¹、坂田 則行

福岡大学医学部病理、¹同薬理

S-3 臓器移植の現況と展望

白倉良太

大阪大学大学院医学系研究科・組織再生医学講座臓器置換学研究部

S-4 呼吸器疾患と補体

阿部 正義

福岡大学医学部薬理学呼吸器疾患と補体

S-5 膠原病と補体

佐藤由紀夫、深谷悦子、渡辺浩志

福島県立医科大学医学部内科学第2講座

S-6 癌と補体

川崎 敏祐、川崎 伸子¹、Khoo Kay-Hooi²

京都大学薬学研究科、¹京都大学医学部保健学科

²Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica

Membrane complement regulatory proteins: immunobiology and roles in autoimmune and inflammatory tissue injury

Wenchao Song, Ph.D.

Center for Experimental Therapeutics, University of Pennsylvania School of Medicine,
Philadelphia, PA 19104

Complement plays an important role in host defense; however, activated complement is a double-edged sword that has the potential to cause significant damage to host tissues. To prevent complement-mediated autologous tissue injury, host cells express a number of soluble and membrane-anchored complement regulatory proteins. Among the membrane-bound regulators are two glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: decay accelerating factor (DAF) and CD59. DAF inhibits complement activation at the C3 cleavage step, while CD59 prevents formation of the membrane attack complex (MAC). These two proteins may also regulate adaptive immunity through complement-independent mechanisms. For example, GPI-anchored molecules including DAF and CD59 may participate in lymphocyte signal transduction as lipid rafts components. Furthermore, DAF has been identified as a ligand for an activation-associated, seven-transmembrane lymphocyte antigen CD97.

To evaluate the roles of DAF and CD59 *in vivo*, we have created DAF and CD59 knockout mice and used them to probe the functions of membrane complement regulators in autoimmune and inflammatory tissue injury. Our studies have revealed the following: 1) Both DAF and CD59 offer protection from complement-mediated end organ injury in models of autoimmune and inflammatory injury. This protective effect is especially evident in the case of DAF deficiency, as lack of DAF exacerbates nephrotoxic serum nephritis, lupus dermatitis and renal ischemia reperfusion injury (IRI). Deficiency of CD59 also exacerbated lupus dermatitis although it alone did not affect renal

IRI. However, CD59 deficiency in the context of DAF deficiency caused greater renal IRI. 2). Membrane regulators with apparently overlapping activities *in vitro* display differential activities in the regulation of classical vs alternative pathway complement activation *in vivo*. Thus, although both DAF and Crry, a transmembrane complement regulator uniquely expressed in the mouse and rat, are expressed on mouse erythrocytes and are both known to inhibit classical as well as alternative pathways, Crry but not DAF is indispensable in preventing murine erythrocytes from alternative pathway complement-mediated destruction. 3). Membrane complement regulatory proteins may not only protect end organs from complement attack but also negatively regulate T/B cell responses to self and foreign antigens. In regards to this, we found that deficiency of either DAF or CD59 caused increased lymphoproliferation and autoantibody production in the lupus-prone MRL/lpr mouse. Furthermore, DAF knockout mice exhibited enhanced T cell responses to antigen immunization. Collectively, our data suggest that membrane complement regulatory proteins are important mediators of autoimmune and inflammatory tissue injury and may represent novel therapeutic targets in the treatment of these diseases.

血液タンパク質群はどのようにハーモニーを奏でるのか

富田 基郎
昭和大学薬学部生理化学

How do plasma proteins play harmony?

Motowo Tomita

Department of Physiological Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University

[はじめに]

血液タンパク質は、ヒトでは数千種類に達し、ものすごい種類のタンパク質が血中をひしめき合いながら血管内を流れている。ところが各タンパク質が所定の機能を発揮するには、大体において他のタンパク質を正確に見分けて、タンパク質・タンパク質の相互作用が必要とされる。

当然、交通事故的なぶつかり合いが起こって人体にとって時々有害症状が発現するのだが、健常者では疾病となるまでには至らず処置されている。

すなわち、血液タンパク質群は、全体として壮大なハーモニーを奏でており、雑音が聞こえたときが有害事象の発症と考えればよい。このハーモニーを奏でる指揮者、奏者、楽器はどのようなものであるかについて、私がこの10年間研究対象にしている3種類の血液タンパク質を例にしながら考察したい。

[血液タンパク質の一般的特徴]

ここでいう血液タンパク質とは、細胞が正常な状態で細胞外に分泌し、かつ、血液中に出現するものをいう。例えば分泌タンパク質であっても、コラーゲンのように細胞外マトリックス (ECM) に留まるものは含めない。同様に細胞がネクロシスを起こして、細胞内タンパク質が血中に漏出した場合も、それらのタンパク質はここでいう血液タンパク質には含めない。

血液タンパク質は、細胞内タンパク質と比べると、次のような一般的特徴がある。

① ほとんどが糖タンパク質である。血液タンパク質

と細胞表面膜タンパク質はほとんどが糖鎖修飾されているが、糖鎖の役割は水溶性を高めるため、及び分子標識のためである。その他に水溶性を付加する修飾反応としては水酸化、硫酸化などがある。

細胞質内の細胞質タンパク質も血液タンパク質と同じく水溶性である必要があるが、糖鎖、水酸化、硫酸化などはみられず、主役はリン酸化である。細胞内では多数の代謝反応が進行しているために、それらを利用した修飾反応は多数知られており、修飾反応の少なさが、血液タンパク質の特徴でもある

② ジスルフィド結合をもつ。細胞内は還元状態であるためにジスルフィド結合は存在しない (小胞体とゴルジ装置をのぞく)。逆に血液タンパク質のほとんどの Cys 残基はジスルフィド結合している。ジスルフィド結合することにより高次構造が安定化する。

③ 分子量が 60 kDa 以上のものが多い。これ以下の分子量では腎糸球体でろ過されてしまい、血中半減期が短くなってしまふ。逆に血液タンパク質であってもホルモンやサイトカインでは、半減期を短くするために分子量を小さくしていると考えられる。

[研究中の3種類の血液タンパク質の概略]

十数年前、当教室の三浦は、補体の液相膜攻撃複合体 s MAC の構成成分として、タンパク質を見出したが、それはすでに腎炎障害部に蓄積するタンパク質 SP40,40 (現在はアポリポタンパク J、Apo J と呼ばれることが多い) として報告されていたものであった。ヒト Apo J を多量に調製することを目的に、高 LDL 血症患者への LDL アフェレーシス療法後のデキストラン硫酸カラムから、吸着タンパク質

を溶出し、精製した。この精製過程で、多数の血液タンパク質が吸着していることに興味をもち、タンパク質を同定していったところ、新規タンパク質を見出し、そのタンパク質をcDNAクローニングにより、アミノ酸配列を決定したところ、Inter- α -Trypsin Inhibitor (ITI) Heavy Chain と相同性をもつために、IHRP (ITI Heavy Chain-Related Protein) と命名した。

[IHRP]

IHRP は偶然にも当時、補体研究仲間であった長澤教授グループ (北大・薬) が、カリクレインによって非常に分解されやすい血液タンパク質として発見した KP120 と同一であることが分かり、1994 年にほぼ同時に論文発表した。私が補体研究を行っていた当時のなつかしい思い出のタンパク質である。

IHRP は、902 アミノ酸残基からなり、N 末端側 70% は ITI 重鎖と相同性をもち、その中央部にフォンウィルブランド (VW) ドメインをもつ。その後カリクレインなどのプロテアーゼに非常に弱い領域 (我々は Bait 領域と呼ぶ) があり、C 末端の 30 kDa 断片は ATPase の一部分と相同性がある。

ITI 重鎖は、ゴルジ装置内で Asp-Pro 間で切断されると同時に、ITI 軽鎖に結合しているコンドロイチン硫酸鎖の GalNac の 6 位水酸基と Asp のカルボキシル基がエステル結合して成熟 ITI 分子になる。ITI のトリプシン阻害活性は軽鎖のクニツドメインがもっており、重鎖が付くと阻害活性はかえって弱くなる。すなわち、重鎖が外れることが阻害活性発現に重要であることを示唆する。IHRP は ITI の成分とはならないが、重鎖と同じ遺伝子ファミリーに属することは、ヒト染色体 3p14 上に重鎖 HC1 と HC3 と接近して遺伝子が存在することからも裏付けられた。しかしながら、肝心の本来の生理活性はまだ不明であり、機能が未知のタンパク質の機能を解明することの難しさを感じている。

[PHBP]

IHRP を硫酸化多糖との結合活性から見つけたの

で、別のプロテオグリカンに結合する血液タンパク質がないかに興味をもち、ヒアルロン酸結合タンパク質を探したところ、新規タンパク質を見出した。

cDNA クローニングによって全アミノ酸配列を決定したところ、N 末端側から 3 個の EGF ドメイン、1 個のクリングルドメイン、セリンプロテアーゼドメインからなっていた。そのドメイン構造からは、肝細胞増殖因子活性化因子 HGFA、および血液凝固因子 X II に相同性が高い。

構造から予想されるように血液中ではプロテアーゼ活性がない一本鎖タンパク質 75 kDa として存在する。精製するにしたがって自己活性化能が高まり、単離するとセリンプロテアーゼ阻害剤を添加しておかないと自己活性化後に速やかに自己分解していく。プロテアーゼとしての基質特異性は、X-Arg 間を切断する性質を示す。

そのドメイン構成から、何らかのカスケード経路の構成因子と予測されるため、血液タンパク質の中で、活性化 PHBP によって切断されやすいものを探しているが、多くのものを切断してしまい特異的な基質を見つけることにまだ成功していない。ドイツグループより血液凝固系の TF 切断活性が、その機能の本態であるという報告があるが、それほど特異的ではないために支持されていない。

[アディポネクチン]

さらに味を占めて、今度は ECM の主要タンパク質であるコラーゲンに結合する血液タンパク質を見つめるべく、ゼラチンカラムに結合するものを解析した。結合タンパク質の主成分は予測したとおりフィブロネクチンであったが、副成分の一つに新規タンパク質を見出し、28 kDa のサブユニットからなるゼラチン結合活性タンパク質という意味から、GBP 28 (Gelatin-binding Protein of 28 kDa) と命名した。ついでこのタンパク質の cDNA クローニングを試みたが成功しなかった。ちょうどその時期に、松沢教授 (大阪大・医) グループは脂肪組織に特異的に発現する mRNA を同定し、apM1 と命名してデータバンクに登録した。この塩基配列は GBP28 の部分アミノ酸配列と一致した。我々が cDNA クローニ

ングに失敗したのは、まさか脂肪細胞が合成しているとは予想もせず、肝臓や血球細胞のcDNAライブラリーをクローニングする原料にしていたためである。

本タンパク質は、後日、松沢によりアディポネクチンと命名し、これが現在の一般名となっている。

アディポネクチンは、28 kDa サブユニットのN末端側がコラーゲンドメインからなり、C末端側が球状のプロコラーゲンC末端ドメインに相同性を示す。このサブユニットがコラーゲンと同じく3本鎖ヘリックス構造を形成する。さらにこの3量体がジスルフィド結合を介してオリゴマーを形成して、血中での主要成分は240 kDa以上の分子量を示す。

この構造は、補体因子C1q、コレクチンファミリー、フィコリンファミリーと相同性をしますが、コラーゲンドメインが極端に短いコラーゲンVIとも考えられる。コラーゲンVIは脂肪組織の主要ECM成分であるため、我々はコラーゲンVIのメッシュ構造形成を制御する因子であると予想し、あまり明確な生理機能はもたないと予想した。

驚いたことに3年前にLodish(ロックフェラー大)らによって、アディポネクチンのC末端側断片が血中遊離脂肪酸濃度を顕著に低下させる活性があることを報告し、一躍注目を浴びた。その後、門脇ら(東大・医)によりインスリン抵抗性改善活性があることが報告され、糖尿病薬として可能性が示されるなど、いわゆるメタボリックシンドローム(死の四重奏、シンドロームX)の主役に躍り出ている。門脇は最近、その受容体のクローニングにも成功し、その生理活性を疑う研究者はいなくなった。

しかし、我々はまだLodish/門脇ホルモン説に完全に同意しているわけではなく、むしろ本来の機能は脂肪細胞がもつ炎症制御活性にあるのではないかと考えている。その炎症制御活性の二次機能として代謝活性が上昇し、血中グルコースや遊離脂肪酸の細胞取り込みが上昇しているのではないかと。

ともかく、まだまだアディポネクチンの生理機能解析に関する研究は一山二山あるであろう。

【おわりに】

タイトルのハーモニーをいかに奏でるかの本論にはまだ入れないが、筆者が解明をしたいと考えている旗印であることをご理解いただきたい。

すなわち、この10年間、補体から離れて機能未知の新規タンパク質を発見して、そのタンパク質の分子レベルでの性質を解明すれば、そのタンパク質とハーモニーを奏でるタンパク質群は芋蔓方式に親和性で引っ掛けてくれるという作業仮説は甘かったと反省している。

しかし、血液タンパク質の機能解析には夢があることを確かめることができたとは感じており、まだ機能未知のIHRPとPHBPに関して、ハーモニーを奏でるタンパク質群をどのようにして同定しようかと、その方策を考えているところである。

腎疾患と補体

松尾清一、森田良樹、丸山彰一、湯沢由紀夫
名古屋大学大学院病態内科学講座免疫応答内科学分野

Complement and Kidney Diseases
Seiichi Matsuo, Yoshiki Morita, Shoichi Maruyama, Yukio Yuzawa
Division of Clinical Immunology, Department of Internal Medicine,
Nagoya University Graduate School of Medicine

[はじめに]

補体は腎障害の様々なステージで重要な関与をしていることがこれまでの研究で明らかになっている。抗原抗体反応に伴う補体の活性化による直接的な腎障害や免疫複合体の補足による直接的な腎障害（標的は主に糸球体）、虚血再灌流時における腎障害、蛋白尿における腎障害などが挙げられる。本発表では、このうち抗体ないし免疫複合体による糸球体障害と蛋白尿による尿細管障害を取り上げ、補体による腎障害のメカニズムの解析と近未来における治療への応用可能性について考える。

[抗体ないし免疫複合体による糸球体障害]

腎糸球体構成成分、特に糸球体基底膜に対する抗体や抗原抗体複合体の補足による糸球体局所での補体の活性化が糸球体障害を惹起するという古典的なスキームは、様々な糸球体腎炎モデルにおいて、可溶性1型補体レセプター（SCR1）投与や膜補体制御因子Crry過剰発現マウスなど抗補体物質により抑制できることや、また、抗体などを用いて膜補体制御因子機能を抑制しておくこと糸球体障害が増悪する、等の知見から、抗体もしくは抗原抗体複合体による糸球体の障害に補体が重要な関与をしていることがあらためて明らかにされてきている。

[蛋白尿による尿細管障害]

腎障害進行のリスクファクターとして、高血圧と

ともに重要な要素は蛋白尿である。即ち一部の特殊な病態（微小変化型ネフローゼ）を除いて、蛋白尿の程度が腎機能の予後を規定する独立した危険因子となっている。また、ここ10数年の研究から、蛋白尿は糸球体障害の指標としてだけではなく、尿蛋白そのものが尿細管障害を惹起して腎障害の進展に寄与していることが明らかにされている。蛋白尿が腎障害を進展させる機序については諸説があるが、イタリアのD'Amicoらは高分子の蛋白（例えばIgGが一つの目安となる）が尿中に漏出することが、腎間質・尿細管障害を惹起することにつながることを見いだしている。即ち蛋白尿の選択性が悪い（低い）ことが蛋白尿による腎障害の際に重要である。蛋白尿中には多くの血漿蛋白が含まれるが、これまで、尿細管障害を来すことが実験的に報告されているのは、アルブミン、トランスフェリン、リポ蛋白、補体などである。このうち、分子量が大きいものは補体蛋白で、C3、C5等は分子量がIgGより大きい。補体は尿中に漏出した後、尿細管腔でアンモニアなどの作用により活性化され、尿細管障害を惹起することが示されている。また、Nangakuらはラットに5/6腎摘出を行って蛋白尿を惹起させ進行性の腎障害を起こさせるモデルにおいてC6欠損ラットは腎障害が大幅に軽減されることを明らかにしている。これらの事実から、尿中に漏出してくる血漿タンパク質の

うちで補体は有力な障害因子であると推測されている。このことをさらに裏付けるために我々は尿中補体活性化産物を測定して、各種臨床パラメータと比較した。この研究により尿中補体活性化産物は腎機能低下の独立した危険因子となることが明らかになり、蛋白尿による尿細管障害の原因の主要なものは尿中での補体活性化によるものである可能性がより明確になった。

[補体活性化制御による腎疾患治療の可能性]

以上のように、腎臓においては糸球体、尿細管・間質の両者にわたって、補体が障害の重要な因子であることが明らかになっている。補体活性化の制御によって腎障害を軽減しようとする試みは動物モデルにおいて数多く試みられている。可溶性CR1、H因子、C5a受容体拮抗ペプチドなど実験的には良好な成績がえられているものもあるが、ヒトの慢性腎障害に応用するにはまだまだ克服すべき課題が多い。すなわち、耐用性(Tolerability)、安全性(Safety)、効果(Efficacy)、経済性(economy)、持続性(Durability)、特異性(Specificity)の各関門を克服する必要がある

[文献]

- 1) Morita, Y et al., J Am Soc Nephrol 11:700 (2000)
- 2) Nangaku, M et al., J Am Soc Nephrol 13:928 (2002)
- 3) Matsuo, S. et al., Contr Nephrol 139:20 (2003)
- 4) Morita, Y. et al., Mol Immunol 41:273 abst (2004)

心血管病と補体

上杉 憲子、阿部 正義¹、坂田 則行

福岡大学医学部病理、同薬理¹

Complement and circulation disease

Noriko Uesugi, Masayoshi Abe¹, Noriyuki Sakata

Department of Pathology and Pharmacology¹, School of Medicine, Fukuoka, University

臓器内動脈硬化と補体：

動脈は、一般に内膜、中膜、外膜からなり、その大きさにより、弾性動脈（直径 1cm 以上。中膜に弾性線維が発達）、筋型動脈（0.1-10mm, 中膜平滑筋が発達）と細小動脈（10-100 μ m）に分けられる。動脈硬化は動脈の大きさにより、表現型が異なる。弾性動脈では、内膜を障害の場とする粥状硬化とそれに引き続き、中膜の萎縮がみられ、筋型動脈では、内膜の線維化や中膜の萎縮と石灰化、小血管の内膜線維性肥厚や硝子化に分けられる。動脈硬化は、病理学的には変性疾患に分類されるが、炎症性疾患と考える一派もある^{1), 2)}。粥状硬化巣では、炎症細胞浸潤とともに補体の沈着が認められ³⁾、補体が病変の進展に寄与していることが示唆されている。細小動脈の硝子様変性部には補体の沈着がみられる。しかし、筋型動脈の障害については、あまり検討はされていない。筋型動脈は、その発達した平滑筋の収縮や伸展により、臓器あるいは臓器内での血流の調節を行うとされ、臓器の循環に重要な役割をになっている。今回は、動脈硬化の標的臓器の一つである腎臓内の筋型動脈の障害について、高血圧患者や糖尿病患者の標本を用い、動脈障害と補体の関与についての検討とともに、動脈硬化の促進因子として重要な酸化ストレスと補体の活性化との関連についても

検討をおこなったので、報告する⁴⁾。

心筋障害と補体：

補体の活性化は、冠動脈硬化による急性心筋梗塞巣における炎症反応の促進因子としても重要で、予後や梗塞巣の大きさに密接な関係があることは以前より指摘されている⁵⁾。最近では急性心筋虚血後の intervention における再還流障害での補体の関与が重要視されている。実際に抗 C5 による治療が、心筋梗塞の予後の改善に効果があるという報告もある⁵⁾。虚血性心疾患あるいは再還流障害では、心筋細胞の機能が変化し、不整脈が誘発されたり、収縮力の低下が認められる⁶⁾。その原因に、最近では、心筋細胞間の gap junction を作る膜蛋白である connexin⁷⁾や、心筋外へ Ca をくみ出しにより心筋細胞の収縮を担う Na-Ca exchanger の発現異常⁸⁾が注目されている。われわれは、最近、connexin 43 と Ca-Na exchanger の発現と補体による心筋障害をヒト心筋梗塞巣について検討をしたので、その結果も含め、心筋障害と補体の関与について解説をしたい。

1) Rohde LE, Semin Vasc Med 3(4): 347-54 (2003)

2) Libby P, Am J Med 22; 116 Suppl 6A: 9S-16S (2004)

3) Torzewski M, Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 (11):

2448-52 (1997)

- 4) Uesugi N, Am J Kid Dis, in press
- 5) Lagrand WK, Circulation 95(1): 97-103 (1997)
- 6) Verrier ED, JAMA. 291(19):2319-27 (2004)
- 7) Dupont E, Circulation 97(7): 651-60 (1998)
- 8) Shigekawa M, Circ Res 88(9): 864-76 (2001)

臓器移植の現況と展望

白倉良太

大阪大学大学院医学系研究科
組織再生医学講座臓器置換学研究部

The present and perspective of clinical organ transplantation.
Ryota Shirakura
Division of Organ Transplantation, Department of Regenerative Medicine,
Osaka University Graduate School of Medicine.

腎臓移植が世界で初めて行われて 50 年余りになるが、その間、臓器移植の成績が向上しただけでなく、経済効率的にも QOL の面からも優れた治療法として世界的に認知されるに至っている。我が国においては、1997 年 10 月「臓器の移植に関する法律」が施行され、31 年のブランクの後 1999 年 2 月 28 日に漸く再開第 1 例目(本邦第 2 例目)の脳死移植が行われた。その後本年 7 月 5 日までに、国内で 30 例の臓器提供があり、119 例の患者に臓器移植が行われた。5 年で 30 例の臓器提供はいかにも少ないが、世界的に見ても、最大の問題は移植を希望する人に比べて臓器提供が絶対的に不足している点である。今後医療が発達すればするほど脳死者の数が減少することはあっても増加する可能性はないので、大幅な提供増は考えられず、人工臓器の開発や異種移植の臨床応用も考えなければならない。

このような移植医療の中で“補体”に関連して興味ある試みが 2 つある。一つは、長い間禁忌とされてきた ABO 血液型不適合間の腎移植の普及である。普通に移植すると全例超急性拒絶反応で移植腎の機能は廃絶する。免疫吸着や二重濾過分離による血液型抗体除去、脾臓摘出、A または B 血液型物質(糖鎖)投与による抗体中和、などにより計画的に ABO 血液型不適合間の腎移植が行われるようになった。1989 年以来、すでに 500 例近い移植が行われており、生着率は 1 年で 81%、3 年で 78%、5 年で 68% に達している。免疫抑制は軽減されてきているとはいえ、ABO

型を一致させた血縁者間の生体腎移植に比べると、脾臓を摘出し、局所 X 線照射や抗リンパ球抗体投与を付加するなど抗体産生系を嚴重に抑制する必要がある。急性期はもちろん、遠隔期の拒絶反応に抗体、補体が関与している点も ABO 一致腎移植とは異なる。血液型が違うが故に、腎臓を提供できない家族にとっては朗報で、生体腎移植の恩恵にあずかる人が 1.3 倍になるという試算もある。

もう一つの試みは、ブタからの異種移植である。1988 年に移植臓器細胞上の補体制御蛋白に種差があるため異種の補体を制御できず、移植臓器は宿主の補体に攻撃されることが明らかになった。これを受けて、*in vitro* の実験で種々のヒト補体制御蛋白遺伝子が異種細胞に導入され、ヒトの補体による細胞障害が抑止されることが報告された。当初、動物の蛋白や糖鎖など全てが抗原性を持つはずだから抗原性をなくしたり、抗原特異的に抗体産生を制御することは無理だという考えが根底にあり、ブタなど異種移植に使えないわけがないと考えられていた。故に補体制御蛋白の種差が細胞破壊の直接原因であることが発表されるとすぐ(1993 年)、小動物による実験を飛び越えてヒト補体制御蛋白 DAF を遺伝子導入したブタ(hDAF ブタ)が作製され、ヒヒへの移植実験が行われた。腎臓移植では、世界各地の共同研究施設で行われた Imutran 社製の hDAF ブタを用いた臓器移植の成績が集計された。245 頭の life-supporting kidney transplantation

(hDAF 234, controls 11) では、102 例が4日以内に死亡したが、超急性拒絶反応はみられなかった。平均生着期間は1ヶ月、長い例で90日。一方、心臓移植を見ると、この2年間で生着期間は飛躍的に良くなっており、平均2ヶ月、最長4ヶ月半のレベルになっている。我々の試作したホモ接合体の hDAF-TG ブタの心臓も、免疫抑制を全く行わないで、カニクイザルに6日間生着した。CD46 を高発現したブタでは超急性拒絶反応

(HAR) が回避されたといえるであろう。

また、1980年代後半になって、異種抗原が α Gal, 1-3Gal という構造を末端にもつ糖鎖であること、ヒトはこの糖鎖に対する自然抗体を持っていること、移植臓器の血管内皮細胞上の異種抗原と自然抗体が結合することにより補体系の活性化が起こり血管内皮細胞の障害が起こること、そのために血管がつまって虚血に陥るため移植臓器が超急性に機能を廃絶すること、が明らかになった。そして、この α -galactosyl epitope は大部分の哺乳類の細胞に大量発現しているが、旧大陸サル、類人猿とヒトには全く発現していない。この差が α -galactosyl epitope を生合成する糖転移酵素 (α 1,3 galactosyltransferase; 以下 α 1,3 GT とする) の有無によること、進化の過程で旧大陸サル以降の動物にこの遺伝子が失活していることが判明した。つまり、無数にあると考えられたターゲット (異種抗原) が1つに絞られることがわかってきた。当然、 α 1-3 GT をノックアウトしたブタ (GT-KO ブタ) の開発が行わ

れ、2001年9月と12月に別々の会社でヘテロ接合体ながら GT-KO ブタが誕生した。そして、2002年6月にホモ接合体の GT-KO ブタがうまれた。ホモ接合体の GT-KO ブタの腎臓と心臓をヒヒに移植した実験成績が、2003年の国際異種移植学会で発表された。心臓が最長例で62日、腎臓が81日生着したという報告だった。現在、遺伝子改変ブタを開発している会社、研究所は、hDAF 遺伝子を持った α 1,3 GT ノックアウトブタの産出しのぎを削っている。ヒヒに移植して平均生着期間が3ヶ月、最長6ヶ月以上のブタが量産されるようになる (数年以内) と臨床応用の話が出てくるであろう。

しかし、慎重論も多い。ブタは内因性レトロウイルス (PERV) を持っており、免疫抑制が必要な移植患者に感染するかもしれないという危惧がある。PERV は各種動物の培養細胞には容易に感染するが、動物からヒトまで、個体には感染しないとする論文が多い。しかし、正常のブタ細胞から複製される PERV は Gal α 1-3 Gal epitopes を持つが故に、自然抗体・補体系が関与して除去されるとすると、GT-KO ブタにおいては、ウイルスのエンベロープが Gal α 1-3 Gal epitopes を持たないことになるので、補体系による感染防御が機能しない可能性がある。同様のことは、ヒト補体制御因子を強発現したブタ細胞についても考えられる。WHOは50年間 PERV の追跡調査を世界的規模で行うシステムを作るよう勧告している。

呼吸器疾患と補体

阿部 正義

福岡大学医学部薬理学

Contribution of Complement to Respiratory Diseases

Masayoshi Abe

Department of Pharmacology, School of Medicine, Fukuoka University

[はじめに]

呼吸器(肺臓)は気道を介して外界と接し、異物や病原体の侵入経路となっているため、非自己認識機構である補体系が重要な役割を演じている臓器の一つと考えられる。肺での補体活性化は血管系で起これば Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) に代表される様な重篤な呼吸不全病態をもたらす一方、気道系で起これば気管支喘息で代表される慢性難治性の気道炎症の重要なトリガー因子として働いていると考えられる。前者の病態では補体活性化で産生されるアナフィラトキシンの一つである C5a が重要な役割を演じていると考えられ、本拮抗薬が新規の急性肺傷害の治療薬の標的として研究が進められている¹⁾。

一方、気管支喘息の病態に気道局所での補体活性化の関与が注目されているが、本病態ではアナフィラトキシンの C3a が気道過敏性に重要であるという説²⁾と C5a が気道炎症並びに気道過敏性の形成に重要であるという説³⁾とが提唱されている。

[方法]

卵白アルブミン(OVA)で能動感作したラッ

トに反復抗原暴露する *In Vivo* 実験並びに感作ラットから肺組織を摘出し抗原チャレンジする *In Vitro* 実験で解析した。更に、肺癌患者から摘出された肺組織から正常部分を切り出し(術前に許可を得た症例のみ)、ヒト IgE で受け身感作を行った後、抗 IgE 抗体で刺激し産生される Cysteinyl-leukotrienes を定量し検討した。

[結果・考察]

1) OVA 感作ラットに抗原(OVA)を経気道的に繰り返しチャレンジすると遅発型気道収縮が起こった。肺組織を病理学的に検討すると気管支粘膜下組織に好酸球、好中球を中心とした炎症細胞の浸潤を認め、また抗 C5aR 抗体陽性細胞の浸潤がみられた。肺組織より総 RNA を抽出しノーザンブロット法で C5aR-並びに C3aR-mRNA の発現を調べると、C5aR-mRNA は増加していたが、C3aR-mRNA には有意の変化は認められなかった。これらの変化は補体活性化を上流で阻害する sCR1 並びに C5aR 拮抗剤のいずれの前投与でも抑制された。一方、経気管支的に微量

の C5a を投与すると、アナフィラキシー反応による肺での Cysteinyl-leukotrienes 産生は増強した⁴。更に、マウスを用いた実験でも Crry-Ig を投与して補体を抑制すると喘息性気道炎症を抑制することが示された⁵。以上より、喘息のとくに効果期の病態に C5a が重要な役割を演じている事が動物実験で示唆された。そこで Krug 等は軽症喘息患者を用いて臨床研究を行い、気管支ファイバー下に抗原チャレンジすると24時間後の肺胞洗浄液中に C3a、C5a が有意に増加したが、正常コントロール群では不変であったと報告している⁶。更に、他のグループは喘息並びに慢性閉塞性肺疾患患者(COPD)で調べると、喀痰中に C5a が有意に増加していたが、C3a 並びに C4a は変わらず、ヒトの喘息と COPD の病態に C5a が関与していることを示唆した⁷。本シンポジウムではヒト並びにラット摘出肺組織を用い、アレルギー反応でのアナフィラトキシンの作用メカニズムと臨床応用への可能性を論じる予定である。

- 5) Taube C. et al. Am J Respir Crit Care Med 168: 1333 (2003)
- 6) Krug N. et al. Am J Respir Crit Care Med 164: 1841 (2001)
- 7) Marc MM. et al. Am J Respir Cell Mol Biol (in press) (2004)

[文献]

- 1) Riedemann NC. et al., Nat Med 9: 517 (2003)
- 2) Humbles AA. et al., Nature 406: 998 (2000)
- 3) Abe M. et al., J Immunol 167: 4651 (2001)
- 4) Kodani M. et al. Immunopharmacol. 49: 263 (2000)

膠原病と補体

佐藤由紀夫、深谷悦子、渡辺浩志
福島県立医科大学医学部内科学第2講座

Collagen Diseases and Complement
Yukio Sato, Etsuko Fukaya, Hiroshi Watanabe
Department of Internal Medicine II, Fukushima Medical University

〔はじめに〕

膠原病は種々の疾患が含まれ、その病態も多様である。膠原病において、補体の異常な活性化が病態に関与していることは明らかである反面、補体の欠損も病態に関与しているという paradoxical relationship が認められ、病態機序の解明を困難なものにしている。一方、近年の補体学の進歩はめざましく、レクチン経路の発見や補体遺伝子ノックアウトマウスを用いた実験により、複雑な機序の解明が進んできている。

日常診療に有用な検査という視点から、全身性エリテマトーデス (SLE) 疾患活動性マーカーとしての補体の研究を行っている。SLE の活動性のマーカーとしては、C3、C4、CH50 が昔から使われてきた。しかし、活動期の SLE 患者の半数近くが血中 C3 濃度が正常であったという報告もあり、C3、C4 濃度が SLE の活動性を反映していないケースもあると思われる。近年の報告では、補体の活性化に伴う分解産物 (C3d、C4d、Bb など) がより鋭敏に疾患活動性を反映するという可能性が示唆されている。

〔方法〕

今回我々は、補体第二経路の key protein である補体 B 因子およびその分解産物である Bb について、活動性のマーカーとしての有用性を ELISA を用いて検討した。

〔結果〕

SLE における病態を腎炎 (40 名)、神経精神症状 (8 名)、腸炎 (9 名)、それ以外 (23 名) にわけ、補体 B 因子濃度および補体 Bb 濃度を ELISA で検討したところ、腎炎患者において B 因子濃度および Bb 濃度ともに高値を示した。(血中 B 因子濃度 \pm SD: 腎炎グループ 291 \pm 418 mg/ml, 神経精神ループスグループ 166.5 \pm 90.3, 腸炎グループ 648 \pm 672, その他のグループ 162 \pm 74.2, 血中 Bb 濃度 \pm SD: 腎炎グループ 15.2 \pm 9.7 μ g/ml, 神経精神ループスグループ 9.3 \pm 5.4, 腸炎グループ 12.4 \pm 8.0, その他のグループ 9.0 \pm 4.2)。

次に、ループス腎炎患者 40 名 (42 検体) を活動群 (29 名) と非活動群 (13 名) にわけ、血中 Bb 濃度が腎炎の活動性を反映するか検討したところ、活動性腎炎群では血中 Bb 濃度は有意に上昇を示していた (活動群 14.5 \pm 8.4, 非活動群 7.6 \pm 5.8)。さらに、活動性の高い腎炎を示すにもかかわらず C3 が変動しなかった症例において血中 Bb 濃度が活動性に平行して変動することを確認した。

〔考察〕補体 Bb はループス腎炎における活動性マーカーとして有用であり、特に C3 が活動性を反映しないケースにおいても鋭敏なマーカーになりうることを示唆された。

癌と補体

川寄 敏祐、川寄 伸子¹、Khoo Kay-Hooi²京都大学薬学研究科,¹京都大学医学部保健学科²Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica

Cancer and Complement

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, ¹School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Kyoto University²Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica

[はじめに]

わたしたちは、補体レクチン経路の活性化因子である血清レクチン、マンナン結合タンパク質(MBP)が外来性異物としての病原微生物の他に、生体内で生じる異常糖鎖をもつ細胞もまた、MBPの認識対象となる可能性を検討してきた。その結果、ヒト結腸癌細胞株 SW1116 など幾種かの細胞株が MBP と良く結合することを見出した。そこで、ヌードマウスに SW1116 を移植し、これにワクシニアウイルスをベクターとしてヒト MBP 遺伝子を投与したところ、顕著な癌細胞増殖抑制作用を示すことを見出した^{1,2}。本研究はこの MBP の識別するがん細胞表面の糖鎖構造を明らかにすることを目的とした。

[方法] MBP と SW1116 細胞の結合に対する各種植物レクチンおよび糖鎖認識抗体による阻害を測定することにより、糖鎖の大まかな特徴を推定した。次に、SW1116 細胞のトリトン X-100 抽出物より糖ペプチドを調製し、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離させ、ピリジルアミノ化 (PA) オリゴ糖鎖を得た。この PA オリゴ糖鎖を固定化 MBP カラムに掛け、MBP 結合性のオリゴ糖鎖を単離し、その糖鎖構造を質量分析により解析した。

[結果]

SW1116 細胞に対する FITC-MBP の結合はマンノース結合レクチン、ガラクトース結合レクチンにより阻害されず、フコース結合レクチンにより強く阻害された。また、この結合は、ルイス b 抗体、ルイス a 抗体により強く阻害され、ルイス x 抗体、ルイス y 抗体、シアリルルイス a 抗体によりほとんど阻害されなかった。完全メチル化 PA オリゴ糖鎖の MALDI-TOF MS, nano ESI-MS 解析などにより、本糖鎖が、ルイス a 糖鎖抗原がタンデムに繰り返した新規な高分子糖鎖を持つことを明らかにした。

[考察]

本研究で見出された糖鎖は新たな癌特異的糖鎖であると同時に、自然免疫におけるパターン認識の良い例である。

[文献]

1. Ma, Y. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 96: 371 (1999)
2. Kawasaki, T., Biochim Biophys Acta, 1473 :186 (1999)

マウスフィコリンによるレクチン経路活性化

松下 操¹⁾²⁾、小出駿一¹⁾、高橋 実³⁾、菅野和子³⁾、千葉朋希¹⁾、中田宗宏¹⁾²⁾、藤田禎三³⁾

¹⁾東海大・工・生命化学, ²⁾糖鎖工学研究施設, ³⁾福島県立医大・医・二生化

Activation of the lectin pathway by mouse ficolin

Misao Matsushita, Shun-ichi Koide, Minoru Takahashi, Kazuko Kanno, Tomoki Chiba, Munehiro Nakata, Teizo Fujita

¹⁾Department of Applied Biochemistry and ²⁾Institute of Glycotechnology, Tokai University,

³⁾Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

〈はじめに〉

フィコリンはコラーゲン様ドメインとフィブリノーゲン様ドメインを持つレクチンのファミリーである¹⁾。現在までに哺乳類、両生類、原索動物より単離されている。ヒト血清中のフィコリンには MASP が結合しており補体レクチン経路を活性化する。このことから、フィコリンは自然免疫に働く生体防御レクチンであると考えられている。マウス血清中には *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に結合性を持つ ficolin-A が存在する²⁾。今回我々は ficolin-A がレクチン経路を活性化することを見い出した。

〈方法〉

- 1) GlcNAc-agarose カラムと Mono Q を用いて、マウス血清より ficolin-A を精製した。
- 2) ficolin-A, マウス MASP-1, MASP-2 の一部のリコンビナント蛋白を作製し、これらをウサギに免疫して抗血清を得た。
- 3) 人工糖脂質の GlcNAc5-DPPE をコートした ELISA プレートを用いて ficolin-A による C4 活性化を検討した。

〈結果〉

- 1) マウス血清を GlcNAc-agarose に添加後まずマンノースで MBL が溶出、次に GlcNAc により ficolin-A が溶出した。Mono Q によ

り更に精製を行い ficolin-A を単離した。ficolin-A は 40kDa のサブユニットから成るオリゴマーであり、サイズに多様性が見られた。

- 2) イムノプロットの結果、ficolin-A 画分に MASP-1, MASP-2, sMAP があることがわかった。
- 3) ELISA プレートにコートした GlcNAc5-DPPE に ficolin-A が結合して、C4 を活性化した。
- 4) ficolin-A 画分を EDTA 存在下透析後、GlcNAc-agarose による分画を行うと、MASP-1, MASP-2, sMAP は非吸着画分に得られた。

〈結論〉

ヒト血清フィコリンと同様に、マウスの血清フィコリンにも MASP が結合しており、複合体がレクチン経路を活性化する。

参考文献

- 1) Matsushita, M. and Fujita, T.
Immunol. Rev. 180, 78-85, 2001.
- 2) Fujimori, Y. et al.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 244,
796-800, 1998

リコンビナントマウスフィコリン A およびフィコリン B の 構造と機能

遠藤雄一、中澤なおみ、菅野和子、Yu Liu、岩城大輔、高橋実、松下操¹、
藤田禎三、
福島県立医大・医・生化学第二、CREST、¹東海大学・工・生命化学

Structure and function of mouse recombinant ficolin A and ficolin B

Yuichi Endo, Naomi Nakazawa, Kazuko Kanno, Minoru Takahashi,
Misao Matsushita¹ and Teizo Fujita,

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine and CREST, Japan
Science and Technology Agency, and ¹Institute of Glycotechnology and Department of Applied
Biochemistry, Tokai University

〈はじめに〉

ヒト L-および H-フィコリンは補体レクチン経路の認識分子として働いている^{1,2)}。また、ヒト M-フィコリンは単球に存在することが報告されている。マウスではフィコリン A とフィコリン B が同定されており、フィコリン A はヒト L-フィコリンに、フィコリン B は M-フィコリンに相同であると考えられる。今回、マウスフィコリンをリコンビナントタンパクとして作成し、その構造と機能を調べた。また、現在解析中であるフィコリン A 欠損マウスの表現型を再構成することを目的とした。

〈方法〉

- 1) フィコリン A、今回新たに見いだされたフィコリン A バリエント、およびフィコリン B の cDNA コンストラクトをショウジョウバエ S2 細胞で発現させ、細胞外に分泌されたタンパクを GlcNAc アガロースで精製した。
- 2) タンパク分子量を還元下および非還元下でのウェスタンブロットで測定した。
- 3) 糖鎖結合の特異性はマンナンアガロース1、GlcNAc アガロース等への結合により調べた。

〈結果〉

- 1) 還元下でフィコリン A は 37kDa、フィコリン A バリエントは 36kDa、フィコリン B は 35 と 33kDa の分子量を示した。非還元下ではともにオリゴマーをとして観察された。
- 2) 酵素処理の結果、三者はともに糖鎖をもつことがわかった。
- 3) 三者はともに GlcNAc を特異的に認識した。

〈考察〉

ショウジョウバエ発現系を用いて作成したリコンビナントマウスフィコリンは、ともにオリゴマーを形成し、GlcNAc を認識した。これらはフィコリンに共通する特徴と考えられた。フィコリン A とフィコリン B は、個体発生のパターンや発現組織が異なり (Liu et al. 昨年の本シンポジウム)、その生理的役割は異なると考えられる。両者の機能的違いをさらに明らかにすることがその解明に繋がると考える。

〈参考文献〉

- 1) Fujita, T. 2002. *Nat. Rev. Immunol.* 2:346-353.
- 2) Matsushita, M. and T. Fujita. 2002. *Immunobiology* 205:490-497.

Distinct ontogenic patterns and expression cell types of mouse ficolin A and ficolin B

Yu Liu¹, Yuichi Endo¹, Shunsaku Homma², Kazuko Kanno¹,
Hiroyuki Yaginuma², Teizo Fujita¹

¹Department of Biochemistry and ²Department of Anatomy,
Fukushima Medical University and CREST, Japan Science and
Technology Agency

<Background>

Ficolins are a group of proteins with lectin activity, which play roles in host defense by binding to carbohydrates on microorganisms, enhancing the opsonic activity of neutrophils and activating the lectin pathway¹⁾. They have been identified in various species, including human, rodents, pig, mouse, hedgehog, and also ascidians²⁾. Little is known about the ontogeny of ficolins and how closely mouse ficolins relate to human ficolins. In this study, we elucidated the ontogeny and responsible cell types of the mouse ficolins.

<Methods>

1) Semi-quantitative RT-PCR was carried out for detecting the

expression levels of ficolin A, B, Masp1, and Masp2 of mouse embryos from embryonic (E) 9.5 to E15.5, livers from E16.5 to adults, and spleens from newborns to adults.

2) *In situ* hybridization combined with immunohistochemistry was performed to clarify the cell types synthesizing ficolins A and/or B mRNA in embryos and tissues using digoxigenin-labeled riboprobes.

3) Magnetic assisted cell sorting was carried out to prepare single cell lineage from bone marrow by using specific lineage antibodies. Subsequently, RT-PCR on purified cell lineages was carried out for clarifying the expression of ficolin B in bone marrow.

<Results>

The ontogeny of ficolin A was nearly the same with those of Masps, suggesting their concurrence and collaboration as the components of the lectin complement pathway, and probably ficolin A being the homologue to human L-ficolin. The cell types producing ficolin A mRNA were identified as macrophages by *in situ* hybridization in both adult liver and spleen. Distinct ontogeny pattern of ficolin B was found to be similar to the hematopoietic course. The cell type producing ficolin B mRNA was identified as myeloid cell lineage in bone marrow.

<Conclusion>

Mouse ficolin A and ficolin B are expressed in monocyte-macrophage lineage. The difference in spatial-temporal expression patterns between ficolin A and ficolin B suggests their specific roles in pre- and post-natal stages.

<Reference>

- 1) Fujita T., Nat. Rev. Immunol., 2:346 (2002)
- 2) Holmskov, et al., Annu. Rev. Immunol., 21 :547 (2003)

sMAP ノックアウトマウスの解析

岩城 大輔、菅野 和子、高橋 実、遠藤 雄一、松下 操¹、藤田 禎三
 福島県立医科大学・医・生化学第二、CREST、¹東海大学・工・生命化学

Attenuation of C4 cleavage activity in sMAP-deficient mice

Daisuke Iwaki, Kazuko Kanno, Minoru Takahashi, Yuichi Endo, Misao Matsushita¹, Teizo Fujita

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University and CREST, Japan Science and Technology Agency, and ¹Institute of Glycotechnology and Department of Applied Biochemistry, Tokai University

[はじめに]

sMAP は alternative splicing により生じる MASP-2 の短縮型タンパク質であり、N 末端から EGF 様ドメインまでの MASP-2 共通領域と C 末端の sMAP 特異的な 4 残基アミノ酸配列からなる^{1) 2)}。MASP-2 と sMAP は、MBL-MASP 複合体の構成成分であり、MBL 糖鎖認識による MBL-MASP 複合体活性化の際に MASP-2 は C4 を活性化することが明らかになっているが、sMAP の機能については不明である。本研究では、sMAP および MASP-2 の生体内における役割を明らかにする目的で、sMAP の C 端 4 残基をコードする sMAP 特異的エクソンを欠失させた *sMap*^{-/-}マウスを作製し、解析を行なった。

[方法]

- 1) *sMap* 特異的エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換した *sMap*^{-/-}マウスを作製した。
- 2) マウス血清とマンナンアガロースをインキュベーションした後、マンナンアガロースと共沈する MBL-MASP 複合体に含まれる Masp および *sMap* をウエスタンブロッティングにより確認した。
- 3) マンナンを固相化し、マウス血清とインキュベーション後、ヒト C4 の沈着量を ELISA により測定した。

[結果]

sMap^{-/-}マウスにおける *sMap* の発現はノーザンブ

ロッティングで確認されず、血清中にも *sMap* は検出されなかった。一方、*Masp-2* はノーザンブロッティングでは野性型と同一のバンドは確認されず、異なるサイズのバンドが検出された。RT-PCR により *Masp-2* の発現量を確認したところ、H 鎖領域における *Masp-2* の発現量は野性型の 18%であった。マンナンアガロースと共沈した MBL-MASP 複合体に *Masp-1* は確認されたが、*sMap* と *Masp-2* は検出されなかった。*sMap*^{-/-}マウス血清による C4 沈着量は野性型の 20% 以下であった。リコンビナント *Masp-2* の血清への添加により C4 沈着量は増加したが、リコンビナント *sMap* の添加では C4 沈着量は回復しなかった。

[考察]

今回作製した *sMap*^{-/-}マウスは、*Masp-2* の発現量が減少したことにより、レクチン経路における C4 活性化能が低下したと推測される。今後、*sMap*^{-/-}マウスの血清中における *Masp-2* 存在量と病原微生物に対する感受性について検討する予定である。

[文献]

- 1) Takahashi, M. et al., Int. Immunol. 11: 859 (1999)
- 2) Stover, C. M. et al., J. Immunol. 162: 3481 (1999)

Mannose-binding lectin (MBL) 欠損症 —易感染性との関連の検討と欠損症頻度の全国調査—

堀内孝彦、塚本浩、宮川弘、小山貴子、三苦弘喜、民本泰浩、宮城友豪、
木本泰孝、内野愛弓、長藤宏司、原田実根、林健志¹、岡村精一²
九州大学大学院病態修復内科学分野（第一内科）、

¹九州大学生体防医学研究所、²国立病院機構九州医療センター

Mannose-binding lectin deficiency

-Increased risk of infection and the nation-wide study for the frequency of MBL deficiency in Japan-

Takahiko Horiuchi, Hiroshi Tsukamoto, Hiroshi Miyagawa, Takako Koyama,

Hiroki Mitoma, Yasuhiro Tamimoto, Yugo Miyagi, Yasutaka Kimoto, Ayumi Uchino, Koji Nagafuji,

Mine Harada, Kenshi Hayashi¹, Seiichi Okamura²

Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, ¹Medical

¹Institute of Bioregulation, Kyushu University,

²Clinical Research Center, National Kyushu Medical Center Hospital

[はじめに]

Mannose-binding lectin (MBL) は、innate immunity に重要な役割を果たしており、免疫抑制状態にある患者や小児において、感染症の大きなリスク因子になることが明らかにされつつあり注目されている。

我々は、自己末梢血幹細胞移植 (auto-peripheral blood stem cell transplantation; autoPBSCT) を併用して超大量の化学療法を施行した悪性腫瘍患者について、易感染性と MBL 欠損症の関連について検討した。また日本各地の一般健常人の中に占める MBL 欠損症の頻度について初めて明らかにした。

[方法]

1) 対象: 九州大学病院第一内科において 1990 年から 2002 年までの間に autoPBSCT を併用して超大量化学療法を施行した 113 名の患者で内訳は、悪性リンパ腫 66 名、白血病 35 名

などであった。移植時から 100 日以内の各種感染症の頻度について、MBL 欠損症との関連を検討した。健常人は北海道から九州まで全国 7 地域の各 300-400 名について検討した。

2) 遺伝子解析: MBL の血中濃度に大きな影響を与える翻訳領域ならびにプロモーター領域の変異計 3 ケ所について、頻度を解析した。

[結果ならびに考察]

autoPBSCT 施行患者において、MBL 欠損症は敗血症、肺炎などの重症細菌感染症の発症に有意に関連していることが明らかになった。また今回の大規模な調査で、日本全国の 7 地域において MBL 欠損症は、ほぼ同等に高頻度に存在することが初めて明らかになった。宿主側の易感染性に関わる因子として MBL 欠損症は重要であると考えられる。

[文献]

Horiuchi T, et al. *Genes Immun* 1: 464 (2000)

コイ補体レクチン経路で機能する2種のMBL様レクチン

中尾実樹、加治屋貴之、畑中大作、中田宗宏^a、松下 操^a、藤田禎三^b、矢野友紀
九州大学大学院農学研究院、^a東海大学工学部生命科学科、^b福島県立医科大学第2生化学

Two MBL-like lectins functioning in the lectin pathway of carp complement.

Miki Nakao, Takayuki Kajiya, Daisaku Hatanaka, Munehiro Nakata^a, Misao Matsushita^a, Teizo Fujita^b, Tomoki Yano

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

^aInstitute of Glycotechnology & Department of Applied Biochemistry, Tokai University, Japan

^bDepartment of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine, Japan

<はじめに>

Mannose-binding lectin (MBL)はN末端にコラーゲン様構造を持つ collectin の一種で、哺乳類の血清中でセリンプロテアーゼ(MASP)と複合体を形成し、異物認識と補体レクチン経路の活性化を担っている。硬骨魚類では、数種のコイ科魚類からMBL様のcDNA配列¹がクローニングされているが、それらはガラクトース特異的レクチン(GalBL)であると推定され、哺乳類のMBLに直接相当する分子ではない。一方、MASPについては、硬骨魚類からはMASP3²とC1r/C1s/MASP2³のホモログがクローニングされているのみで、レクチン経路の活性化を担うプロテアーゼは同定されていない。本研究は、コイにおいてMBLとGalBLの両方が成熟タンパク質として発現し、補体レクチン経路で機能するかどうかを明らかにすることを目的とした。さらに、コイMBLとGalBLによるレクチン経路の活性化を媒介するプロテアーゼの同定を試みた。

<方法>

1. コイ血清をGlcNAc-アガロースおよび酸処理アガロースを用いたアフィニティークラムにかけ、

MBLおよびGalBLを精製した。

2. コイMBLのcDNAをRT-PCRおよびRACE法によって単離した。

3. 精製コイMBLおよびGalBLによる補体活性化能を、ヒトC4分解活性を指標として解析した。

4. 精製コイMBLに会合しているセリンプロテアーゼを2次元SDS-PAGEによって分離し、そのN末端アミノ酸配列をもとにRT-PCRを行ない、cDNAを単離した。

<結果>

上記アフィニティークロマトグラフィーによって、還元条件下のSDS-PAGEで30kDaのバンドを与えるMBLと32kDaのバンドを示すGalBL様タンパク質が精製された。MBLの推定アミノ酸配列は、コラーゲン様領域とC-タイプレクチンドメインから成り、マンノース/GlcNAcに結合特異性を示す配列モチーフを含んでいた。一方、精製GalBLのN末端アミノ酸配列は、コイGalBLの推定アミノ酸配列(既報)によく一致した。さらに、精製MBLとGalBLはヒトC4をC4bに分解した。以上の結果から、コイには糖鎖認識の特異性が異なる2種

の MBL 様レクチンが存在し、それらが補体レクチン経路で機能することが示唆された。コイ MBL に会合しているプロテアーゼの cDNA は、哺乳類の MASP2 に高い相同性を示した。したがって、MASP2 は硬骨魚類の出現以前に MASP1/3 から分岐したことが示唆された。

<結論>

1. コイには糖鎖特異性の異なる 2 種の MBL ホモログ (MBL と GalBL) が存在し、両者がレクチン経路で機能する。
2. コイのレクチン経路で C4 の分解を触媒するのは MASP2 である。

<文献>

- 1) Vitved, L. et al., Immunogenetics, 51: 955 (2000)
- 2) Endo et al., J. Immunol., 161: 4924 (1998)
- 3) Nakao et al., Immunogenetics, 52: 255 (2001)

ヤツメウナギ MBL の構造と機能の解析

高橋百恵、岩城大輔、松下亜紀子、松下操¹、遠藤雄一、藤田禎三
 福島県立医科大学 医学部 生化学第二講座、CREST
¹東海大学 工学部 生命化学科、糖鎖工学研究施設

Characterization and cloning of lamprey mannose-binding lectin (MBL)
 Momoe Takahashi, Daisuke Iwaki, Akiko Matsushita, Misao Matsusita¹,
 Yuichi Endo and Teizo Fujita

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University, CREST

¹Department of Applied Biochemistry and Institute of Glycobiology, Tokai University

<はじめに>

補体レクチン経路は、MBL やフィコリンなどのレクチンが微生物上の糖鎖を認識することにより活性化するため、これらのレクチンは自然免疫において重要な役割を担っている¹⁾。昨年の本シンポジウムにおいて、円口類のヤツメウナギに MBL が存在することを報告した。今回はこの MBL の全一次構造の決定と、さらに詳細な機能解析や発現などについて報告する。

<実験方法>

- 1) GlcNAc-agarose カラムと MonoQ カラムを用いて、ヤツメウナギの血清から MBL 様レクチン (p25) を精製した。
- 2) 精製した p25 フラクシオンに MASP が会合しているかを MCA 酵素活性と MASP-A 抗体によるイムノブロットングで検討した。また、C3 の活性化の有無を検討した。
- 3) 気相プロテインシーケンサーによって部分アミノ酸配列を決定し、この配列をもとにした合成 DNA プライマーを用いて RT-PCR を実施した。得られた cDNA クローンをプローブとして肝臓 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、全一次構造の決定を試みた。
- 4) p25 部分 cDNA をプローブに、ヤツメウナギの各臓器から精製した mRNA を用いてノーザンブロットングを行った。

<結果>

- 1) 精製したレクチンの分子質量は還元下 SDS-PAGE で 25 kDa であると確認された。
- 2) MCA 活性の結果、p25 フラクシオンにプロテアーゼ活性が見られ、イムノブロットングにより、p25 は MASP-A と会合していることが判明した。
- 3) p25 の全一次構造を決定したところ、Gly-X-Y の繰り返し構造と糖鎖認識部位 (CRD) が存在し、p25 は MBL ホモログであることが明らかとなった。
- 4) ノーザンブロットングの結果、MBL は肝臓に特異的に発現していた。
- 5) MBL-MASP-A 複合体は C3 の 鎖を 鎖に分解した。

<結論>

ヤツメウナギにおいて MBL の全一次構造を決定した。MBL は MASP-A と会合し C3 を活性化し、マボヤに存在する原始補体系²⁾と類似していることが推定された。

<文献>

- i) Fujita T., Nature Rev. Immunol. 2: 346: (2002)
- ii) Sekine H, et al., J. Immunol. 167:4504-4510 (2001)

ヤツメウナギ factor H の単離と解析

松下亜紀子、遠藤雄一、松下 操¹⁾²⁾、藤田禎三福島県立医大・医・二生化,¹⁾ 東海大・工・生命化学,²⁾ 糖鎖工学研究施設

Isolation and characterization of lamprey factor H

Akiko Matsushita, Yuichi Endo, Misao Matsushita¹⁾²⁾ and Teizo Fujita

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

¹⁾ Department of Applied Biochemistry and ²⁾ Institute of Glycotechnology, Tokai University

〈はじめに〉

ヒト補体 factor H は、補体活性化時の C3b の過剰な生成を抑制する重要な制御因子である。近年、ヒトにおいて多くの関連分子が報告されており、様々な解析がなされている。

今回我々は、ヤツメウナギ肝臓からの PCR で CCP モジュールのみで構成される分子を得た。

また、これに相当する蛋白質分子を血清から分離し、ヤツメウナギ factor H (以下 la fH) と名づけた。この分子がヒト factor H のホモログであることを確認するために解析を行った。

〈方法〉

1) ヤツメウナギ肝臓 cDNA を鋳型とした PCR で部分配列を決定した。

この配列をプローブとして、cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、全構造を決定した。

得られた配列を基にリコンビナント蛋白質を作製し、ウサギに免疫して抗血清を得た。

2) スクリーニングで得た部分クローン (3.7Kb) をプローブに、ヤツメウナギ鰓・肝臓・腸管・血液細胞・心筋から抽出した total RNA を用いて Northern blotting を行った。

3) ヤツメウナギ血清より SuperQ カラムと Asahi-pak を用いて、分子量とリコンビナ

ント蛋白質に対する抗血清の反応を指標に蛋白質を精製し、N 末端のアミノ酸配列を解析した。

4) ヤツメウナギの MBL-MASP, C3 を用いて、la fH の C3 分解に及ぼす影響を解析した。

〈結果〉

1) la fH は CCP モジュールの繰り返し構造を呈しており、シグナル配列を有した。

BLAST によるホモロジーサーチでは、CCP を持つ各種蛋白質がヒットして、ヒト complement receptor1, 2、ヒト factor H などがこれに含まれた。

2) Northern blotting の結果、肝臓に特異的に発現が見られた。

3) ヤツメウナギ血清から精製された約 150kDa の蛋白質の N 末端アミノ酸配列は、cDNA から得られた配列と一致していた。

4) ヤツメウナギの MASP-A は、C3 α 鎖を α' 鎖に分解 (C3b を生成) するが、この C3b に対する la fH の作用を現在検討中である。

〈考察〉

la fH は、その構造的な類似性からヒト factor H のホモログであると推定された。

ヒト factor H は、補体第二経路の C3bBb を制御する他、他経路との共通因子である factor I の cofactor として機能する。しかし、ヤツメウナギに factor I に相当する分子は未だ見つかっておらず、la fH の補体システムにお

る位置付けも未知である。

一方、第二経路同様に原始的かつ下等動物の主要な活性化経路である補体レクチン経路と Ia fH の関わりにも興味を持たれる。

参考文献

- 1)Whaley K. et al., J. Exp. Med., 144: 1147-1163 (1976)
- 2)Weiler J. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73: 3268-3272 (1976)
- 3)Nonaka M. et al., J. Immunol., 133: 3242-3249 (1984)

ヤツメウナギ補体制御因子の機能解析

木村祐子、井上直和、松本美佐子、野中勝¹、藤田禎三²、瀬谷司

大阪府立成人病センター研究所免疫、¹東京大学大学院理学系研究科、²福島県立医科大学大学生化学

The functional analysis of a complement regulatory protein in the lamprey

Yuko Kimura, Naokazu Inoue, Misako Matsumoto, Masaru Nonaka¹, Teizou Fujita², Tsukasa Seya

Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo

²Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

【はじめに】ヤツメウナギは円口類に属する脊椎動物である。免疫グロブリンの機能報告はなく、レクチン経路や第二経路による補体活性化がヤツメウナギの生体防御に重要であると考えられてきた。一方、補体制御因子の研究は主にほ乳類で、他はニワトリ¹と硬骨魚類^{2,3}で報告があるのみである。そこで本研究においてヤツメウナギの制御因子を同定し補体制御能を解析することとした。

【方法】

1. MCP cDNAs より作成した縮重 primer を用いた nested PCR 法により lamprey C regulatory protein (Lacrep) の cDNA を cloning した。Northern blot analysis 及び Western blot analysis により mRNA とタンパクレベルにおける lacrep の組織発現を比較検討した。
2. 出芽酵母 2×10^6 をヤツメウナギ血清 0-50% を 25°C 30 min incubate し、酵母上の C3 及び lacrep の沈着量を flow cytometry により検出した。
3. 細胞障害活性を測定する為に、lacrep 全長及びヒト MCP 膜ドメインをつなぎ合わせた plasmid DNA を transfection 法により CHO に導入、細胞上の発現を確認した。又 non-transfected CHO 細胞及び

発現が同程度のヒト MCP transfected 株を用意した。これらの細胞は IgG 抗体及びマンナン (lectin pathway の活性化)により感作させ、ヒト補体及びヤツメウナギ補体と incubate した後、それぞれの細胞障害性を測定した。

4. cofactor 活性を解析する為に、蛍光ラベルしたヤツメウナギ C3b-like C3 を基質として用い、分画した factor I-like protease と lacrep を 25°C , 5h incubate した後、還元下にて電気泳動した gel を蛍光イメージアナライザーにより観察した。又、Incubate の際メタル含有及び非含有及び抗 lacrep 抗体加え行い分解産物を比較検討した。

【結果、考察】

1. Lacrep は 2055bp の ORF で、signal peptide 及び 8 つの SCR より構成される。ヒト RCA proteins との相同性は Lacrep 2-3 がヒト C4bp α 鎖 SCR 2-3 と 34.3%、Lacrep 6-7 が DAF SCR 3-4 と 34.4%などいずれも同様に高かった。Northern blot 及び Western blot analysis により Lacrep は liver で合成され、plasma 中に主に検出された。
2. 出芽酵母上でヤツメウナギ血清は活性化され C3 の沈着が確認された。Lacrep 沈着量は血清濃度に

依存し増加し、10mMEDTA 添加によりいずれの成分の沈着も阻害された。

3. ヒト補体と incubate すると、Lacrep-transfected CHO 株は non-transfected CHO 株と同程度の細胞障害性であった。ヤツメウナギ補体と incubate すると Lacrep-transfected CHO 細胞の傷害性は低下した。

4. lacrep は活性化 C3 の α chain を基質として factor I-like protease と共に分解させた。その分解はメタル存在化に置いてのみ起こり、硬骨魚類で証明された事実(sandbass², sea beam³ など)と同様ではほ乳類とは異なっていた。また lacrep 抗体によりその分解は阻害された。

【総括】

これらのことから Lacrep は活性化された C3 に対して factor -I like protease とともに分解することにより過剰な補体活性化を制御していたり、異種細胞の phagocytosis に協力的に働いている可能性があることが示唆された。今後ヤツメウナギの補体活性化機構を明らかにすると共に制御機構及び機能を明らかにしてゆく。

【文献】

- 1) Inoue, N. et al., J. Immunol. 166:424 (2001)
- 2) Kemper, C. et al., J. Biol. Chem. 273:19398. (1998)
- 3) J. Orol Sunyer. et al., Immunological Reviews. 166: 39 (1998)

トリの RCA locus と RCA 蛋白質の機能解析

信田京子、押海裕之、松本美佐子、木村裕子、瀬谷司

大阪府立成人病センター研究所免疫学部門

Structural and functional analysis of chicken RCA proteins

Kyoko Shida, Hiroyuki Oshiumi, Misako Matsumoto, Yuko Kimura, Tsukasa Seya

Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases,

(はじめに) Regulator of Complement activation (RCA) gene cluster はヒト、マウスで chromosome 1 に存在し、factor H 以外の SCR-containing complement regulatory proteins の遺伝子を含む。RCA の起源、プロトタイプは明らかでないが、最近の genome project からサカナには未発達で哺乳類では相同遺伝子群のクラスターとして完成していると推定される。本研究でトリの *Cremp* をプローブにして SCR の cluster を同定した。これらの基礎データから該当蛋白質が補体制御活性を持つ事を証明したので報告する。

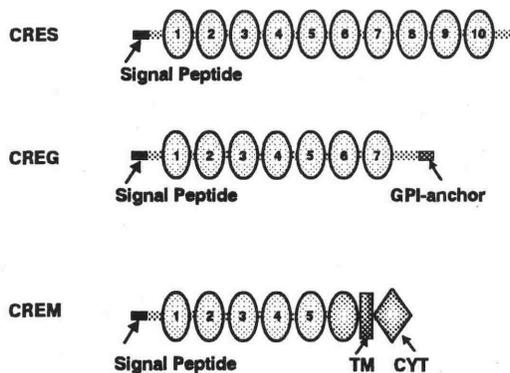
(方法、結果、考察) トリの RCA ライブラリーを *Cremp* cDNA でスクリーニングし、4 個の ~150~200Kb のクローンを得た。Exon trap 法で SCR をコードする exon をこれから回収し、トリの *Brusa* の cDNA ライブラリー (後飯塚博士、東京理科大) から完全長 cDNA をクローニングした。BAC クローンの約 100Kb の中に少なくとも 6 種の遺伝子が同定できた。このうち 4 種は mRNA として同定でき、3 種の完全長 cDNA が得られた。このうち 1 つは *Cremp* (以下 CREM と呼ぶ)、残り 2 つは新規のトリ SCR 蛋白質であった

(図 1)。1 つはシグナルシーケンスを持ち、7 個の SCR, GPI アンカー付加のコンセンサスシーケンスを C 末に持った。これを CREG と名付けた。もう 1 つは分泌可溶型の特徴を持ち、C4bp と類似のフレームで 8 個の SCR を持つ蛋白質であった。これを CRS と名付けた。CREG, CREM の膜結合部位を除去したりコンビナント sCREG, sCREM を CHO 細胞に発現させて上清から精製 sCREG, sCREM を得た。CRS も同様に精製した。3 者ともにトリ I 因子のコファクターとしてトリ C3b, ヒト C4b を分解した。故にこれらは補体制御因子群であり、BAC の SCR クラスターはヒトの RCA に相当することが機能的に検証できた。膜型 CREG, CREM はともに発現宿主細胞をトリ血清 (補体源) から守った。ウサギ抗 CHO 抗体で発現細胞を感作して細胞傷害を人為的に起こしても CREG 又は CREM の発現は宿主 CHO 細胞を補体から防御した。以上から膜型制御因子には intrinsic regulation の機能があると云える。一方、CRS を除去したトリ血清は著しく速く補体の細胞傷害活性を減じた。CRS の主機能は補体の消費を防ぐことにあるかも知れない

い。以上の機能はヒトの RCA の機能分担がすでにトリで確立したもとを示唆し、サカナで明らかな RCA クラスターが発見できない

ことから陸生が RCA の多様性を誘発した可能性を支持する。

(図 1)



GPI アンカー生合成の最初のステップに係わる 7番目のコンポーネント PIG-Y の解析

村上良子、前田裕輔、洪 榮振¹、木下タロウ

大阪大学微生物病研究所 免疫不全

Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-Y,
the seventh component of the enzyme complex.

Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

¹Genomic Research Center for Enteropathogenic Bacteria and Department of Microbiology,

Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

[はじめに]

真核生物の細胞表面には多数の膜蛋白質が存在している。それらと膜との結合様式の中には、GPI(glycosylphosphatidylinositol)と呼ばれる糖脂質によるものが知られおり、その基本構造は、酵母、原虫、哺乳類に至るまで保存されている。このような蛋白質は GPI アンカー型蛋白質と呼ばれ、蛋白質の C 末端がアミド結合を介して GPI と結合しており、細胞表面に発現することで多様な役割を果たしている。GPI 生合成の最初のステップは、ホスファチジルイノシトール(PI)に UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)の GlcNAc を転移する反応である。このステップには PIG-A, PIG-H, PIG-C, GPI1, PIG-P と DPM2 の6つの蛋白質が関与していることが明らかにされている¹。発作性夜間血色素尿症患者の異常細胞では PIG-A の変異によりこのステップの酵素活性が欠損している。今回われわれは、これらの6つの蛋白とコンプレックスを作る 7 番目の蛋白 PIG-Y を同定したので解析結果を報告する。

[方法]

GST と FLAG でタンデムにエピトープタグした PIG-A をヒトの PIG-A 欠損細胞株である JY-5 細胞に発現させた。1%ジギトニンで可溶化し、anti-FLAG ビーズで免沈後 FLAG ペプチドで溶出したものをさらにグルタチオンビーズで結合したものを集めてくるという2ステップで PIG-A complex を精製し、SDS-PAGE で展開したところ、銀染色により新規のバンドを検出した。切り出したバンドのアミノ酸配列をもとに tBlastn により EST クローンを検出した。

[結果]

新規の遺伝子 human PIG-Y は 71 アミノ酸をコードしており、銀染色によって得られたバンドのサイズに一致していた。hPIG-Y は2つの膜貫通領域を持つ膜蛋白で、ホモロジーサーチではひっかからないものの、酵母で報告されている Eri-1² に、極めて類似の構造を持ち 22.4%の identityがあった。一方パーキットリンパ腫の細胞株である Daudi 細胞においては、細胞表面の GPI アンカー型蛋白が欠損しており、cell lysate を用いた in vitro の解

析により GlcNAc 転移酵素活性が欠失していることが明らかになった。この Daudi 細胞に PIG-Y を発現させると細胞表面の GPI アンカー型蛋白の発現と GlcNAc 転移酵素活性が戻ることから、PIG-Y が責任遺伝子であることがわかった。また PIG-Y が存在しない Daudi 細胞において、PIG-A complex を解析すると他の 6 つのコンポーネントは PIG-Y あるなしに係わらず、PIG-A と共沈してることがわかった。

[考察]

PIG-Y は、GlcNAc 転移酵素の触媒サブユニットである PIG-A の complex に含まれ、その活性に必要な蛋白である。しかしながら PIG-Y の非存在下においても PIG-A は他のコンポーネントとコンプレックスを形成することができる。即ち PIG-Y はその結合により酵素活性を制御している可能性がある。今後、PIG-Y が GPI 生合成の要である蛋白 PIG-A の酵素活性をどう制御し、それらがどのように細胞の状態にリンクしているか解明していきたいと考えている。

[文献]

- 1) Watanabe, R. et al., EMBO J. 19: 4402 (2000)
- 2) Sobering, A. K. et al., Cell 117: 637 (2004)

The first case of brother patients with PNH.

Uamporn Siripanyaphinyo, Yoshiko Murakami, Wanchai Wanachiwanawin¹, Vichai Atichartikarn²
and Taroh Kinoshita

Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, ¹Faculty of Medicine Siriraj Hospital, ²Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Objective

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), is an acquired clonal disorder primarily caused by somatic mutation of X-linked *PIG-A* gene in hematopoietic stem cell. The *PIG-A* gene product is involved in early step of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis. Abnormal blood cells derived from *PIG-A* mutated clone(s) have reduced or absent surface expression of GPI anchored proteins (GPI-AP) such as decay accelerating factor (DAF or CD55) and CD59. Although PNH is a rare disease, we experienced 2 brother patients with classical PNH. Among 6 sons in the family, the third and the fifth sons developed PNH since 1992. To understanding the role of inheritance in pathophysiology of PNH, we analyzed *PIG-A* gene in these brothers.

Methods

1. Patients : 2 males patients (we termed P1 for elder brother and P2 for younger brother) with classical PNH were being treated at Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand were studied. The diagnosis of PNH was based on clinical finding, bone marrow examination and positive Ham's test.
2. Flow cytometric analysis: Granulocytes were isolated from peripheral blood. Granulocytes and erythrocytes were stained with monoclonal antibodies to CD55 and CD59 then analyzed by flow cytometry.

3. Total DNA and RNA were extracted from granulocytes. *PIG-A* mutation was analyzed as described¹.

Results

1. In spite of 99% affected granulocytes from P1 patient, we could not identify mutation in the coding region and splice sites. This patient had only few transcript of *PIG-A* as shown by RT-PCR analysis. We speculated that P1 has mutation somewhere in *PIG-A* that leads to no or very little *PIG-A* transcript.
2. P2 has G to T base change within 5' splice site of intron 4 resulting in abnormal splicing. This mutation causes exon 4 deletion in mRNA.

Conclusions

1. In this study, we concluded that P1 and P2 have different mutations in *PIG-A* gene and mutation of *PIG-A* gene found in P2 patients was not different from overall abnormality in *PIG-A* gene in classical PNH so far reported.
2. This is the first report of brother patients with PNH. Since accumulated data showed that *PIG-A* mutation itself is not sufficient for developing PNH, additional factors are required to allow expansion of mutated clone(s). These brothers may provide a good scenario for investigation of the additional factors under restricted genetic background.

References

1. Yamada N, Miyata T, Maeda K, Kitani T, Takeda J, Kinoshita T: Somatic mutations of *PIG-A* gene found in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 85:885, 1995
2. Inoue N, Murakami Y, Kinoshita T: Molecular genetics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 77:107, 2003

発作性夜間血色素尿症(PNH)における 異常クローン拡大に関わる候補遺伝子

泉井朋久¹、植田康敬^{1,2}、西村純一³、待井隆志⁴、金倉 譲²、木下タロウ¹、井上徳光⁵

¹大阪大学微生物病研究所免疫不全、²大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学

³デューク大学医学部血液学、⁴那智勝浦町立温泉病院内科、

⁵大阪府立成人病センター研究所分子遺伝学部門

A candidate gene involved in expansion of PNH cells

Tomohisa Izui¹, Yasutaka Ueda^{1,2}, Jun-ichi Nishimura³,

Takashi Machii⁴, Yuzuru Kanakura², Taroh Kinoshita¹, and Norimitsu Inoue⁵

¹Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

²Department of Hematology and Oncology, Osaka University Medical School

³Division of Hematology, Department of Medicine, Duke University Medical Center

⁴Division of Internal Medicine, Nachi-katsuura Onsen Hospital

⁵Department of Molecular Genetics, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Disease

[はじめに]

発作性夜間血色素尿症(PNH)は補体制御因子であるDAFやCD59の欠損のため、自己補体による溶血発作を起こす後天性疾患である。これらの補体制御因子はグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)と呼ばれる糖脂質を介して細胞膜に発現している。PNH患者の血球細胞においてはGPIアンカー型蛋白が全般に欠損しており、GPIの生合成に関わる遺伝子であるPIG-Aが原因遺伝子として同定されている。PNH患者ではPIG-Aの突然変異およびそれによるGPIの欠損を示す血球細胞が全系統とも骨髄・末梢血中でクローン性に優位となることが知られている。

PNHを合併する頻度が高い再生不良性貧血(AA)の患者においてはGPI欠損細胞が正常人に比して高頻度に認められることから、こうしたクローナルな拡大に自己免疫的機序が関与している¹と推定されて

いる。しかし、AA患者にみられるGPI欠損細胞は微量にとどまることが多く、またPNH患者においても数的に拡大しないGPI欠損クローンを認めることから、さらなる遺伝子異常がクローンの拡大に関与していることが考えられる²。

我々は、骨髄においてPIG-Aの変異を持つ細胞と染色体異常を持つ細胞が一致しており、2つの異常が同一の造血幹細胞に起こったものと考えられるPNH症例を報告してきた³。この患者にみられる染色体構造異常については昨年度までに本シンポジウムにて報告した。すなわち、一方の12番染色体のq13-q15領域の9.3Mbp程度が他方の12番染色体のq15領域に挿入されているものであり、また染色体のbreakpoint周囲に数kbp程度の欠失および一部重複がみられた。

[方法]

昨年までに報告したように、挿入が起こっている部位には脂肪腫や子宮筋腫などの良性腫瘍で異常発現していることが知られている遺伝子high-mobility group protein A2 (HMGA2)が存在しており、それが3'-UTR領域で分断されていた。HMGA2はAT-hookと呼ばれるDNA binding domainをもつ転写因子である。本来は胎児期においてのみ発現し、正常な成体組織では発現していないとされているが、ヒトの脂肪腫や子宮筋腫などの良性腫瘍細胞において染色体転座に伴うキメラ蛋白として発現していることが知られている^{4,5,6}。

本症例の骨髄細胞について、HMGA2遺伝子の発現について質的・量的検討を行った。

また、大阪大学医学部の倫理委員会の承認を得て、PNHと診断されている他の症例から末梢血を採取した。多型核白血球および単核球を分離し、それらにおけるHMGA2遺伝子の発現レベルを定量的RT-PCRにより解析した。

[結果]

1. 患者におけるHMGA2遺伝子の発現

本症例の骨髄細胞からは良性腫瘍の症例と同様に、HMGA2の異常なmRNAを検出した。HMGA2は5つのエクソンからなるが、本症例で検出された異常なmRNAはエクソン4の後にイントロン4内の配列(ゲノムでは約1kb下流にある)が続いているものであった。良性腫瘍でみられる異常なmRNAは共通してエクソン5を欠失していることから、本症例においてもこの異常なmRNAが異常細胞クローンの増殖に関与していることが考えられる。また、両アレル間のポリモルフィズムから、この異常なmRNAが染色体異常をきたした方のア

レル由来であることが明らかになった。

2. 他のPNH患者におけるHMGA2遺伝子の発現

患者6例と正常人6例について行った定量的RT-PCRでは、HMGA2遺伝子の発現レベルが非常に低い、もしくは検出限界以下であったため、比較検討するには至らなかった。

[考察]

染色体異常を伴うPNH患者から、PNHにおける異常なクローンの拡大に関わる候補遺伝子としてHMGA2を同定した。当該患者の骨髄細胞では異常なHMGA2のmRNAの発現を有意に高いレベルで検出し得たが、末梢血ではごく低レベルにとどまった。他症例についても末梢血では評価可能な程度の発現はみられなかった。PNHにおける異常クローンの拡大は骨髄の造血幹細胞で起こっているものと考えられるので、これは妥当な結果と言えるかもしれない。今後は患者骨髄を用いた解析を進めたい。

[文献]

1. Murakami Y. et al., Blood, 100: 4116 (2002)
2. Inoue N. et al., Int J Hematol. 77:107 (2003)
3. Nishimura J. et al., Am J Hematol., 62: 175 (1999)
4. Schoenmakers EF. et al., Nat Genet., 10: 436 (1995)
5. Ashar H. R. et al., Cell, 82: 57 (1995)
6. Goodwin G., Int J Biochem Cell Biol., 30: 761 (1998)

HIV 感染細胞を補体依存性に排除するヒトモノクローナル抗体の研究

岡田則子、金原紀章、飛沢笑山¹、三浦智行²、石田高司³、Yin Shuping、
土肥名月、岡田秀親

名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御学、³分子内科学、¹神戸環境保健研究所寄生体部、
²京都大学ウイルス研究所エイズ研究施設

Study of human monoclonal antibody that eliminates HIV infected cells.

Noriko Okada, Noriaki Kimbara, ¹Shousan Tobisawa, ²Tomoyuki Miura,

³Koji Ishida, Shuping Yin, Natsuki Dohi, Hidechika Okada

Dept Biodefense, ³Internal Medicine & Molecular Science, Nagoya City Univ Grad Sch Med Sci,

¹Dept Microbiol, Kobe Inst Helth, ²Exp Res Center, Inst Virus Res, Kyoto Univ Grad Sch Med Sci

はじめに

我々は約2%の健常人血清に HIV-1 感染細胞を補体反応依存的に破壊する活性があることを見いだした。また、10年以上長期生存 HIV 感染者血清を検討したところ、80%以上で HIV 感染細胞に対する強い細胞傷害活性が検出された。この傷害活性は HIV 感染細胞に反応する IgM 抗体量との間に高い相関を示した。これらの IgM 抗体の抗原としてガングリオシド GM2 や Gg4 を確認した。さらに、HIV 感染患者血清中の抗 GM2-IgM 抗体量は、CD4 カウントと正の相関を、また、HIV-RNA ロードと負の相関を示し、感染者体内における、感染細胞反応性 IgM 抗体の重要性が示唆された。そこで、HIV 感染細胞に特異的に反応するヒト IgM モノクローナル抗体を得るために、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むヒト染色体導入マウス(キリンビール社)を感染細胞で免疫して、抗体産生ハイブリドーマ 9F11 クローンを得た。ヒト IgM 抗体 9F11 は、感染細胞特異的に反応し、1 ug/ml 以下の少量で、強力に補体依存性細胞障害活性を示した。そこで、9F11 が反応する細胞についてさらに解析を進めるとともに、HIV 感染者末梢血リンパ球を用いての抗ウイルス活性について検討した。

方法

1 ヒトレトロウイルスである HTLV-1 が感染して発症したヒト T 細胞白血病細胞株である MT2, MT4, ATN-1, ATL102.HUT102 および T 細胞

白血病細胞株 CCRF-CEM, PEER, Jurkat, TALL-1, MOLT3, HPB-ALL などの細胞に対する反応性および細胞障害性を FACS および Cr 放出試験により解析した。

2 サルのエイズウイルスである SIV(Mac 239 株)をサルリンパ球株に感染させた後、その SIV 感染細胞への 9F11 反応性および細胞障害性を解析した。さらに SIV を赤毛サルに感染させて、その10週間後に生存している感染サルの末梢血よりリンパ球を分離して 9F11 の反応性を FACS 解析した。

3 HIV 陽性ヒト末梢血を Ficol 分離した後、StemSep カラムパスにより、CD4 陽性細胞画分を得た。この感染者 CD4 細胞を 10 ug/ml 9F11 存在下に10%新鮮 AB 型ヒト血清添加 RPMI1640 にて一晚反応させた後、反応上清を取り除き、1 ug/ml 抗 CD3 抗体添加 10%FCS-RPMI1640 にて培養した。3日間培養後上清を除去して、50U/ml IL2 添加 10%FCS-RPMI1640 にて培養後、10日目および20日目の培養上清を回収して、上清中の HIV コア蛋白 p24 量を ELISA にて解析した。

結果

1 9F11 は HIV-1 感染細胞に反応する抗体であるが、ATL 由来細胞株にも反応性を示した。また、検討した非 ATL 細胞である白血病細胞などには全く反応性を示さなかった。さらに、MT2 や MT4 では HIV 感染細胞と同様に細胞障害活性が検出さ

れた。

2 サル SIV サル感染細胞に 9F11 は反応して補体依存性細胞障害活性を示した。また、SIV 感染サルの末梢血リンパ球に 9F11 は反応性を示した。

3 HIV 感染者の末梢血 CD4 陽性細胞を 9F11 と補体で処理した後に、抗 CD3 抗体と IL2 培養にてウィルスの叩き出しを行った。末梢血検体 38 例中リンパ球培養できたのが 23 例であり、このうちの 6 検体で p24 量が検出された。9F11 添加により、これらのすべての検体で 98% 以上の p24 産生の抑制が検出された。そのうちの 4 例は完全抑制を示した。

考察

HIV 感染細胞に反応して補体依存性細胞障害を強力に誘導できる 9F11 は HIV-1 の実験室株を用いて、抗ウイルス効果を示すことが確認されている。今回、レトロウイルス HTLV-1 感染細胞株においても 9F11 は反応し、細胞傷害活性を発揮することが確認された。9F11 は HIV-1 感染のみならず ATL 治療にも応用可能な抗体であることが示唆された。また、サル感染実験における、9F11 の安全性および有効性の検討も可能となった。さらに、HIV 感染者の末梢血リンパ球培養による *ex vivo* 解析においても 9F11 は優れた抗 HIV 効果を発揮できた。今後、潜伏感染細胞の排除なども対照と

した解析を進める予定である。

(本研究は文科省大学発ベンチャー創出事業補助金および厚労省科学研究補助金により一部をサポートされた。)

文献

- 1 Okada, H., Wu, X. and Okada, N. Int. Immunol. 10: 91-96, 1998
- 2 Okada, N., Wu, X. and Okada, H. Microbiol. Immunol. 41: 331-336, 1997
- 3 Wu, X., Okada, N., Momota, H. et al. J. Immunol., 152: 533-539, 1999
- 4 Okada, N., Wu, X., Mizokami, M., Irie, R.F. and Okada, H. Microbiol. Immunol. 43: 723-727, 1999
- 5 Okada, N. and Okada, H. Microbiol. Immunol., 43: 729-736, 1999
- 6 Okada, N., Yin, S., Asai, S., Dohi, N., and Okada, H. International Immunopharmacology 2: 1390, 2002
- 7 Okada, N., Yin S., Asai, S., Kinbara, N., Dohi, N., Hosokawa, M., Wu, X. and Okada, H. Molecular Immunology 41: 288-289, 2004

C5a 阻害ペプチドのアセチル化効果についての検討

堀田彩、朝井鈴佳、三浦典子¹、大野尚仁¹、岡田秀親^{2,3}、岡田則子
 名古屋市立大学大学院生体防御学分野、¹東京薬科大学薬学部免疫学、²(株)蛋白科学研究所、
³福祉村病院長寿医学研究所

Studies on effects of acetylation of C5a inhibitory peptide

Aya Hotta, Suzuka Asai, Noriko Miura¹, Naohito Ohno¹, Hidechika Okada^{2,3} and

Noriko Okada

Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,

¹Tokyo Univ. Pharm. Life Sci. School of Pharmacy, ²Institute for Protein Science Co. Ltd.,

³Choju Medical Institute, Fukushima Hospital

【はじめに】

C5a の 37 番目から 53 番目のアミノ酸部分のペプチド (PL37) は C5a の機能に重要な働きをしており、PL37 に対する相補性ペプチドとして設計合成した Pep-A は C5a に結合して C5a を不活性化する作用が認められた (J. Immunol. 172: 6382, 2004)。LPS で感作しておいたラットに Crry に対する抗体である 5I2 を静脈内に投与すると 30 分以内に全例ショック死を起こすが、抗体投与 10 分前に Pep-A を投与しておくことで全例救命することができた。しかし、生体内での安定性を高める必要があると考え、N 末をアセチル化した A-Pep-A を作成し検討を行った。

【方法および結果】

マウスに *Candida albicans* 由来の CAWS (*Candida albicans* water soluble extract) を静脈内に投与するとマウスは補体活性化を伴う急性炎症を起こして死亡する。これに先立ち 10 分前に Pep-A を投与しても救命することができなかった。マウスの体内で Pep-A が速やかに分解を受けてしまうためと考えた。そこで、Pep-A の蛋白分解酵素などに対する安定性を増すために、アミノ末端のアラニンのアセチル化したアセチル化 Pep-A (A-

Pep-A) を作成した。

CAWS 致死に与える影響を調べるために、ICR マウス、5 週令、♂を用い、10 分前に Saline, A-Pep-A を投与した ICR マウスに、CAWS を静脈内投与した。その結果、CAWS 200 μg/mouse 投与の系では抑制は見られなかったが、CAWS を 100 μg/mouse 投与したマウスの A-Pep-A i.v. 前処置群で致死の抑制が観察された。したがって、アミノ末端のアラニンをアセチル化するなどの化学修飾を施すことにより、Pep-A の治療効果を高めることができる。

| date | pre | dose | route | CAWS | dead/total |
|-----------|--------|--------|-------|--------------|------------|
| 2004.2.14 | saline | 200 μL | i.p. | 200 μg/mouse | 3/3 |
| | A-PepA | 4mg/kg | i.p. | 200 μg/mouse | 3/3 |
| | A-PepA | 4mg/kg | i.v. | 200 μg/mouse | 3/3 |
| 2004.2.16 | saline | 200 μL | i.p. | 100 μg/mouse | 3/3 |
| | A-PepA | 4mg/kg | i.p. | 100 μg/mouse | 3/3 |
| | A-PepA | 4mg/kg | i.v. | 100 μg/mouse | 2/4 |

ラット (Wistar/ST オス、8 週齢、体重約 250 グラム) の背部皮内に補体制御膜因子である Crry に対するモノクローナル抗体 (5I2 抗体) を投与して惹起する炎症反応に対する Pep-A およびアミノ末端のアラニンをアセチル化した A-Pep-A の作用を解析した。炎症反応の指標としては、5I2

抗体投与の1時間前に Evans Blue 液（生理食塩水に 8 mg/ml の濃度に溶解）を 0.5 ml 尾静脈より注射しておき、炎症局所への色素の漏出で判定した。色素は血漿タンパク質に結合するので、局所炎症反応が起こることにより血漿タンパク質が毛細血管からもれ出た事の指標となる。

5 µg の 5I2 抗体（40 µL の生食に溶解）を皮内に接種するとき、4 µg の A-Pep-A を混合しておくとも 30 分後の色素漏出を抑えることができ、40 µg の A-Pep-A を加えておいたときには、2時間後でも明瞭な抑制が認められた。これに対し、Pep-A では 40 µg を用いても色素漏出の抑制は 30 分目でも認められなかった。Pep-A を A-Pep-A にすることにより、炎症抑制作用が極めて高まる

ことが示された。Pep-A は皮内の酵素により速やかに分解されてしまうのに対して、アセチル化された A-Pep-A は酵素による分解を受けにくいために皮内で C5a に対する抑制作用が継続し、炎症抑制作用が強く現れたと解釈できた。したがって、A-Pep-A は炎症抑制剤として強い効果を発揮すると考えられる。

Pep-A と A-Pep-A の C5a に対する抑制作用の際については、カルシュウムインフラックス法などやモルモット皮内反応などを用いて詳細に解析中である。

【考察】

A-Pep-A などを治療薬として活用できる可能性がある。

| 5I2 抗体量 | Pep-A | A-Pep-A | 30分後の青班* | 2時間後の青班** |
|---------|-------|---------|----------|-----------|
| 2.5 µg | 40 µg | | ++ | 7 ± 2 |
| 2.5 µg | | 40 µg | — | 3 ± 1 |
| 2.5 µg | 4 µg | | ++ | 6 ± 3 |
| 2.5 µg | | 4 µg | — | 4 ± 2 |
| 2.5 µg | | | ++ | 6 ± 3 |
| 5.0 µg | 40 µg | | +++ | 10 ± 3 |
| 5.0 µg | | 40 µg | — | 4 ± 1 |
| 5.0 µg | 4 µg | | +++ | 9 ± 4 |
| 5.0 µg | | 4 µg | + | 7 ± 4 |
| 5.0 µg | | | +++ | 10 ± 4 |

* 30 分の時点で目視により観察。 ** 2 時間後に安楽死させ、皮膚をはがして計測。

S19 リボソーム蛋白二量体の C5a リセプターを介した 線維芽細胞アポトーシス亢進作用

西浦 弘志¹、渋谷 陽子²、山本 哲郎¹

¹熊大・院・医薬研究部・分子病理、²医・付属病院・中検

Ribosomal protein S19 dimer-induced C5a receptor-mediated augmentation of apoptosis in fibroblastic cell lines

Hiroshi Nishiura¹, Yoko Shibuya², Tetsuro Yamamoto¹

¹Departments of Molecular Pathology and ²Laboratory Medicine,

Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University.

「はじめに」

我々は、これまでに、慢性関節リウマチ肉芽抽出液から S19 リボソーム蛋白(RP S19)架橋化二量体を単離し、この分子が、アポトーシス細胞から遊離されること、並びに、単球の C5a リセプター(C5aR)に対して走化性アゴニストとして、逆に、多核球の C5aR にはアンタゴニストとして作用することにより単球優位性白血球浸潤を起すことを明らかにしてきた^{1,2}。最近、同肉芽巢の繊維芽細胞に C5a リセプターが強く発現していることが報告されたことから³、RP S19 二量体の繊維芽細胞に対する新たな作用の可能性を探ろうと考えた。今回、架橋二量体化が不可能な RP S19 を強制発現させた繊維芽細胞株を用いた一連の実験を行い、RP S19 二量体の C5aR を介したアポトーシス増強作用を見出した。

「方法」

マウス線維芽細胞(NIH3T3)に、架橋二量体化に必須の 137 番目グルタミンをアスパラギンに置換した変異型ヒト RP S19 cDNA を組み込んだ発現ベクター(pCAGGS-IRES-Neo)を移入した細胞株(NIH3T3-mutant)を、樹立した。コントロールとして、野生型ヒト RP S19 cDNA を組み込んだ発現ベクターおよび発現ベクターのみを移入した細胞株(NIH3T3-wild type および NIH3T3-mock)を、同時に樹立した。これらの細胞に、マンガンイオンを負荷して、アポトーシスを誘導する系を確立し、RP S19 二量体や C5aR アンタゴニスト等の影響を検討した。

「結果」

- (1) NIH3T3-mutant は、マンガン誘導性アポトーシスに対して耐性を示した。
- (2) 抗 RP S19 抗体を培養液中に共存させると、全てのクローンにおいて、アポトーシス率が半分にまで減少した。
- (3) RP S19 二量体を、培養液中に共存させると NIH3T3-mutant のアポトーシスに対する耐性が喪失した。
- (4) マンガン負荷により、C5aR mRNA の増加と細胞表面への C5aR の発現が観察された。
- (5) C5aR アンタゴニストあるいは抗マウス C5aR 抗体を共存させると、アポトーシス率が半分にまで減少した。

「考察」

今回の実験で、繊維芽細胞におけるマンガン誘導性アポトーシスの機序の中に、細胞表面に発現した C5aR に、自細胞あるいは周囲細胞から遊離された RP S19 二量体が結合することでアポトーシスが亢進するという新たなオートクリン的なアポトーシス増幅機構が存在することが明らかとなった。リウマチ肉芽巢の C5aR を強発現した繊維芽細胞もこれに関係している可能性がある。

「文献」

- 1) Horino K, et al. Lab Invest. 78: 603 (1998)
- 2) Shrestha A, et al. Am J Pathol. 162: 1381 (2003)
- 3) Elena, N., et al. Arthritis Rheum. 46: 4934 (2002)

白血球の C5a リセプター依存性活性酸素種産生における S19 リボソーム蛋白二量体のアゴニスト・アンタゴニスト両面作用

イヴェット・レヴォヨ、西浦弘志、山本哲郎
熊本大学大学院医学薬学研究部分子病理学分野

Agonist and antagonist dual effect of S19 ribosomal protein dimer
in leukocyte respiratory burst reaction

Ivette S. Revollo, Hiroshi Nishiura, Tetsuro Yamamoto

Department of Molecular Pathology, Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

<はじめに>

われわれはこれまでに、慢性関節リウマチ肉芽抽出液から S19 リボソーム蛋白(RP S19)架橋化二量体を単離し、この分子が、アポトーシス細胞から遊離されること、並びに、単球の C5a リセプター(C5aR)に対して走化性アゴニストとして、逆に、多核球の C5aR にはアンタゴニストとして作用することにより単球優位性白血球浸潤を起すことを明らかにしてきた。今回、C5aR が関与するもう一つの重要な白血球機能である活性酸素種産生に対する RP S19 二量体の効果を検討した。

<方法>

ヒト RP S19 およびその変異体は、既報のごとく大腸菌発現系を用いて調製した。単核白血球および多核白血球は、正常ヒト末梢血から分離した。白血球の活性酸素種産生は、刺激白血球による水溶性テトラゾリウム塩(WST-1)の還元強度として、波長 438nm における吸光度上昇度を連続的に測定することにより定量した。

<結果>

1. RP S19 二量体は、単球に対して濃度依存性に活性酸素種産生を惹起した。RP S19 二量体のこの作用は、C5a リセプターアンタゴニストにより抑制された。
2. RP S19 二量体は、多核球には活性酸素種産

生を惹起しない上、C5a 刺激による活性酸素種産生を抑制した。

3. C 末端部 4 残基分を短縮した変異 RP S19 二量体は、多核球に対しても、C5a リセプター依存性に活性酸素種産生を惹起した。

<結論と考察>

C5a リセプターを介した白血球の活性酸素種産生においても、RP S19 二量体は、単球にはアゴニストとして、また、多核球にはアンタゴニストとして作用した。このアゴニストからアンタゴニストへの切り替えは、RP S19 の C 末端部に依存していた。RP S19 二量体を用いることにより、多核球の混在の有無に関わらず、単球だけの活性酸素種産生能を測定できた。この結果、細胞 1 個当たりの活性酸素種産生能は、単球に比べて多核球が優位に高いことが明らかになった。

血液透析患者における赤血球膜補体レセプター(CR1)の検討 —糖尿病性腎症と他腎疾患との比較—

玉野まり子, 若林道郎, 恩田紀更, 眞野 訓, 大井洋之, 富野康日己

順天堂大学医学部腎臓内科

Erythrocyte complement receptor type I(E-CR1) in hemodialysis patients

—Comparison between diabetic nephropathy and other renal disease—

Mariko Tamano, Michiro Wakabayahi, Kisara Onda, Satoshi Mano, Hiroyuki Ohi and Yasuhiko Tomino

Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine

【はじめに】

赤血球膜上の Complement receptor type 1(E-CR1)は transmembrane 型の膜蛋白質で、主に二つの役割を担っている。一つは血中の Immune complex (IC) の処理であり、二つめは補体制御因子として C3 convertase の形成を阻害することである。

我々は血液透析患者が易感染性の傾向にあり、生体防御機構の面で健常人と比較して risk を負っていることに注目し、その因子の一つとして E-CR1 が関わっている可能性を考えた。E-CR1 が低値の状態では慢性腎不全による正球形正色素性貧血が出現したときには、生体内の E-CR1 はきわめて少ない状態となり、生体防御の risk factor となると思われる。貧血の治療として用いられているエリスロポエチン治療に抵抗性の場合、特にこのようなことが考えられる。我々のこれまでの血液透析患者に関する検討では、次のような結果を得ている[1,2]。

1. 血液透析患者の E-CR1 は、健常人と比較し正規分布をみると、低値にシフトしていた。
2. E-CR1 が低値でエリスロポエチンによっても改善しない症例を認めた。
3. E-CR1 低値の患者は、高値の患者と比較し、明らかに感染症などの合併症が多かった。また、HCV の感染者が有意に多かった。

4. 5年後の E-CR1 低値群の生存率は、他群に比較し有意に低値であった。

また、透析患者で E-CR1 が低値を示す原因については以下のことが示されている[3]。

1. E-CR1 低値症例の遺伝学的検討で、遺伝的に E-CR1 の低値を示す LL 型のみではなく、本来高値を示す HH 型でも E-CR1 の低下が認められた。
2. E-CR1 低値を示す血液透析患者の透析膜を補体活性を起こす Cellulose 膜から補体活性を起こさない PAN 膜へ変更したところ、E-CR1 の増加が認められた。これは、後天的な CR1 の低下に透析膜の補体活性化亢進による様々なメディエーターが関与している可能性も示唆された。

【目的】これまでの検討過程で血液透析患者のなかでも原疾患が糖尿病性腎症 (DM) では、他の腎不全(nonDM)に比較して E-CR1 低値の症例が多くみられたことから、両者の比較を行い CR1 の低値と血液透析患者の病態の関係をより明らかにするため検討を行った。

【方法】対象：血液透析患者を対象とし、原疾患として DM は 176 名、nonDM は 101 名であった。

E-CR1 および E-Decay accelerating factor (DAF), E-CD59 の測定：既報[3]の通り、モノクローナル抗 CR1 抗体(DAKO)を使用

し、E-CR1 を flow cytometry で測定し、CR1 結合量 (antibody binding capacity, ABC) として算出した。本研究では ABC が平均+1 標準偏差以上を high expression 群 (High-CR1)、平均-1 標準偏差未満を low expression 群 (Low-CR1) と定義した。また比較のため、GPI-anchor 型膜制御因子である E-DAF, E-CD59 も同時に測定した(モノクローナル抗 DAF 抗体, 福島県立医大 藤田貞三 博士より供与; モノクローナル抗 CD59 抗体, 名古屋市立大学 岡田則子 博士より供与)。遺伝性多型の検討、およびその他の臨床所見: 既報の通り intron 27 について Hind III による PCR-RFLP を行い、HH, HL, LL の遺伝子型を決定した[3]。また、各種臨床所見と検査データについても比較検討を行った。

[結果]

DM 患者では nonDM 患者に比べて E-CR1, E-DAF, E-CD59 は明らかに低値を示した (図 1)。また、E-CR1 の Hind III-RFLP による Genotype の分類では、DM, nonDM ともに H allele をもっているにもかかわらず E-CR1 の低値を示す症例が認められたが、疾患間で genotype の頻度に差は認められなかった(表 1)。

DM 患者では Low-CR1 群の方が High-CR1 群と比較して、透析期間が長かった(p<0.01)。また、CR1 の ligand である C3, C4, C1q, MBL の血中濃度は、Low-CR1 群と High-CR1 群で有意な差を認めなかった。

[考察・結論]

DM の血液透析患者では nonDM の患者と比較して E-CR1 は低値を示し、genotype の解析から E-CR1 の低下は後天的と考えられる。我々はその一因として何らかの透析膜の影響を既に報告しているが、DM 患者ではさらに特有の病態が E-CR1 の後天的な低下をもたらしていることが示唆された。膜結合様式の異なる E-DAF, CD59 も同様に低下していることから、赤血球膜自体の glycation の影響などを検討する必要があると考えられた。

[文献]

1. Ohi H. et al., Am J Kidney Dis, 41:179 (2003)
2. 大井洋之, 第 30 回補体シンポジウム講演集:19 (1993)
3. Tamano M. et al., Nephrol Dial Transplant, 19:1467 (2004)

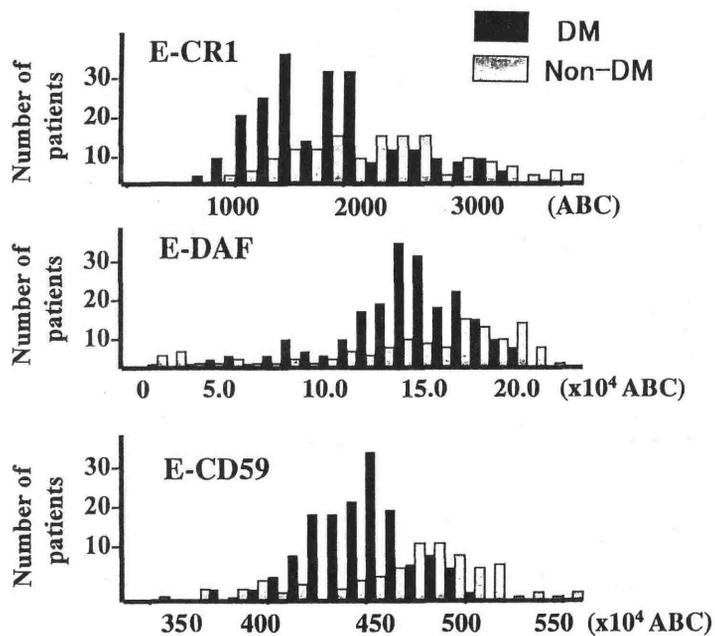


図1 DMおよびnonDM血液透析患者における赤血球膜補体制御因子の発現量

表1 CR1 genotype の頻度

| Genotype | DM (n=176) | nonDM (n=101) |
|----------|--------------|---------------|
| HH | 111 (63.1 %) | 67 (61.4 %) |
| HL | 58 (32.9%) | 37 (36.6%) |
| LL | 7 (3.9%) | 2 (1.9 %) |

尿中補体活性化産物は蛋白尿を有する糸球体疾患において腎予後推定に有用な指標である

森田良樹、丸山彰一、湯澤由紀夫、松尾清一

名古屋大学大学院病態内科学講座免疫応答内科学

Urinary complement activation product is a potent predictor of renal survival in proteinuric glomerular diseases.

Yoshiki Morita, Shoichi Maruyama, Yukio Yuzawa, Seiichi Matsuo

Div. of Clinical Immunology, Dept. of Internal Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

[はじめに]

蛋白尿は糸球体障害の指標だけでなく尿細管障害性を有し、腎機能予後の危険因子である。蛋白尿中の数多くの物質の中で、アルブミンや鉄・トランスフェリン、IgG、補体などが尿細管間質障害を引き起こす原因物質として考えられている。臨床のデータ上は特に High-molecular-weight (HMW) proteins が蛋白尿中に見られるときに予後が悪いと報告されている。我々は、以前、動物実験で蛋白尿中に含まれる補体成分は尿細管腔に到達すると管腔表面で活性化され、尿細管障害をおこすこと¹、ヒトの蛋白尿を有する糸球体疾患患者において尿中補体活性化産物 {CAPs (iC3b, Bb, MAC)} を測定し、巣状糸球体硬化症や糖尿病性腎症では有意に高値を示すこと、尿蛋白量と相関すること²を報告した。

[方法]

今回の研究では、尿中 MAC と腎不全進行との関連性について検討した。蛋白尿 1 g 以上の腎疾患患者 141 名について尿中 MAC を測定し、その後平均 40.6 ヶ月フォローアップし、エンドポイント（透

析開始あるいは血清クレアチニン前値の 2 倍）への到達率、リスクファクターの多変量解析、ステロイドに対する反応性について検討を行った。

[結果]

尿中 MAC と腎機能低下速度に有意な相関が得られた。次に、血清クレアチニン 3mg/dl 以下の患者において、尿中 MAC を高値群と低値群の 2 群間で腎生存率を検討した。その結果、尿中 MAC 低値群は高値群に比較して有意に腎生存率が高かった。多変量解析の結果、腎予後に影響する危険因子は、尿蛋白量、血清クレアチニン値、尿中 MAC 高値群であった。また、ステロイドの反応性については、尿中 MAC 低値群において反応が良好であった。

[考察]

上記の結果から蛋白尿を有する患者では尿中 MAC 量高値は、腎不全の予後の不良因子であることと、腎炎治療上、ステロイド治療に抵抗性を示す可能性が高いことが示唆された。

[文献]

- 1) Morita Y. et al., J Am Soc Nephrol 8: 1363(1997)
- 2) Morita Y. et al., J Am Soc Nephrol 11: 700(2000)

腎虚血再灌流障害における

補体制御蛋白 CD55 と CD59 による腎保護作用

山田耕永、南学正臣¹、三輪隆史、藤田敏郎¹、Wenchao SongCenter for Experimental Therapeutics and Department of Pharmacology,
University of Pennsylvania School of Medicine、¹東京大学医学部腎臓内分泌内科

Critical Protection from Renal Ischemia Reperfusion Injury by CD55 and CD59

Koei Yamada, Masaomi Nangaku¹, Takashi Miwa, Toshiro Fujita¹, WenChao SongCenter for Experimental Therapeutics and Department of Pharmacology,
University of Pennsylvania School of Medicine, ¹ Division of Nephrology and Endocrinology,
University of Tokyo School of Medicine

[はじめに]

補体とその制御蛋白は、様々な腎疾患の病因に深く関与している^{1,2}。腎虚血再灌流障害は、虚血性急性腎不全のモデルであり、また腎移植後の移植腎の生着に影響を及ぼすことが知られている。現在まで腎虚血再灌流障害において補体系が活性化されることが示唆されてきたが、その役割については不明な点が多く、また補体活性化がどのように制御されているかも十分に解明されていない。今回我々は膜結合型補体制御蛋白 CD55 と CD59 に注目し、これらの蛋白が欠損したマウスに腎虚血再灌流障害を惹起し、腎虚血再灌流障害における CD55 と CD59 の役割を検討した³。

[方法]

体重 25-30g、雄の CD55 欠損 (CD55^{-/-}) マウス⁴、CD59 欠損 (CD59^{-/-}) マウス⁵、CD55/CD59 欠損 (CD55^{-/-}CD59^{-/-}) マウス、コントロール (wild-type) マウスの両側 renal pedicle を 22 分間クランプし、再灌流後 24 時間目の腎機能 (blood urea nitrogen; BUN) と腎組織の比較検討を行った。

[結果]

CD55^{-/-} マウスにおける腎虚血再灌流障害はコントロールマウスに比べ有意に増悪していた。CD59^{-/-} マウスにおける腎障害はコントロールマウスと有意差を認めなかったが、CD55^{-/-}CD59^{-/-} マウスは CD55^{-/-} マウス、CD59^{-/-} マウス、コントロールマ

ウスに比べ有意に重篤な腎障害を呈していた。また CD55^{-/-}CD59^{-/-} マウスの peritubular capillary の内皮細胞には C3 と MAC の沈着および peritubular capillary 内には血栓がみられた。さらに cobra venom factor によって補体を欠損させた CD55^{-/-}CD59^{-/-} マウスの腎虚血再灌流障害はコントロールマウスに比べ有意差を認めなかった。

[考察]

膜結合型補体制御蛋白 CD55 と CD59 の欠損は MAC による微小血管障害を引き起こし、腎虚血状態を遷延させる可能性が示唆された。このことから CD55 と CD59 は補体の活性化を介する腎虚血再灌流障害を軽減させるべく相加的に働いていると考えられた。今後、腎虚血再灌流の際に生じる MAC による微小血管障害をターゲットとした治療が期待されるが、この観点から CD55^{-/-}CD59^{-/-} マウスは有用なモデルマウスになると考えられる。

[文献]

- 1) Yamada, K. *Kidney Int* 59: 137 (2001)
- 2) Nangaku, M. *J Am Soc Nephrol* 14: 2411 (2003)
- 3) Yamada, K. *J Immunol* 172: 3869 (2004)
- 4) Miwa, T. *Blood* 99: 3707 (2002)
- 5) Song, W.C. *J Immunol* 157: 4166 (1996)

コイのアナフィラトキシンの単離と機能解析

加藤陽子、中尾実樹、矢野友紀

九州大学大学院農学研究院

Isolation, identification and functional analysis of carp anaphylatoxins.

Yoko Kato, Miki Nakao, Tomoki Yano

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Japan

〈はじめに〉

アナフィラトキシン(C3a, C4a, C5a)は、それぞれ補体成分 C3, C4, C5 から放出される 8~10 kDa のペプチドで、哺乳類では白血球を感染局所に誘導するなど様々な炎症反応に関与している。一方、硬骨魚類ではこれらアナフィラトキシンの機能を分子レベルで調べた報告はほとんどない。本研究ではコイのアナフィラトキシンの単離と機能解析を試みた。

〈方法〉

ザイモサンで活性化したコイ血清を酸/加熱処理した後、Cellulofine GCL-300m によるゲル濾過クロマトグラフィーおよび TSKgel SP-5PW による陽イオン交換クロマトグラフィーによってアナフィラトキシンを精製した¹⁾。精製アナフィラトキシンは、N 末端アミノ酸配列の解析、TOF-MS による分子量測定、および Peptide Mass Finger-printing によって同定するとともに、C 末端 Arg の有無を決定した。また、単離されたアナフィラトキシン (0~10 nM) について、コイ頭腎・体腎由来の好中球に対する誘引活性を調べた²⁾。

〈結果〉

ザイモサン活性化コイ血清から、6 種のアナフィ

ラトキシン (C3a-H1, C3a-H1-desR, C4a-2, C4a-2-desR, C5a-I-1-desR, C5a-I-2-desR) を単離・同定した。これらのコイ好中球誘引活性を調べた結果、C5a-I-1-desR と C5a-I-2-desR のみが、0.5-1 nM の濃度で強い誘引活性を示し、これらによる好中球の移動は C5a の濃度勾配依存的な走化性であることが明らかとなった。

〈結論〉

- 1) コイアナフィラトキシンのうち、C5a のみがコイ好中球に対する走化性因子として働いた。
- 2) 本研究で得られた結果は、哺乳類のアナフィラトキシンの特性と一致しており³⁾、硬骨魚類のアナフィラトキシンの機能は哺乳類と同程度にまで分化していることが示唆された。

〈文献〉

- 1) Köhl *et al.*, *In Complement -A practical approach*, pp135. (1997)
- 2) Falk *et al.*, *J Immunol. Methods*, 33: 239 (1980)
- 3) Wetsel *et al.*, *In Therapeutic Interventions in the Complement System*, pp113. (2000)

軟骨魚類サメの C3/C4/C5 遺伝子

林 晋平、寺戸 勲雄¹、木村 博¹、野中 勝東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻、¹滋賀医科大学医学科基礎医学系放射線基礎医学講座

Shark Complement Component C3/C4/C5 Genes

Shinpei Hayashi, Tokio Terado¹, Hiroshi Kimura¹, Masaru Nonaka

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo,

¹Department of Experimental Radiology, Shiga University of Medical Science

〔はじめに〕

哺乳類の補体系では、C3 の遺伝子重複の産物であるとされる C4、C5 が他の補体分子の活性化や細胞への直接攻撃のユニットの一部として働いており、この遺伝子重複は補体系の機能の拡大に重要な役割を果たしたと考えられている。これまで様々な動物からクローニングされた関連遺伝子の系統解析から、C3/C4/C5 間の遺伝子重複は脊椎動物の系統で硬骨魚類出現以前に生じたことが明らかにされており^{1,2}、一方無脊椎動物のナメクジウオ³、ホヤ⁴、ウニ⁵ から得られた C3/C4/C5 遺伝子は、系統樹上で C3/C4/C5 の重複に先立って分岐していることが示され、この重複が脊椎動物の系統で生じたことが示唆されている。我々は昨年の本大会でドチザメから C3、C4、C5 の各々の少なくとも一部のクローニングを報告し、この遺伝子重複が軟骨魚類の出現以前だった事を示唆した。本年はドチザメでの解析の進展と、ドチザメでは擬遺伝子しか同定できなかった C5 について、多種のサメを用いて解析した結果を報告する。

〔方法〕

既知の C3/C4/C5 遺伝子の multiple alignment により見出された保存性の高いアミノ酸配列を元に degenerate primer を作成した。またドチザメ liver から total RNA を抽出し、そこから作成した cDNA を template に上述の primer を用いて該遺伝子の部分配列を得た。この配列から得られた primer を元に 3'-

RACE, 5'-RACE 及び primer walking を行い、C3/C4/C5 全領域の遺伝子配列を決定した。C5 に関してはドチザメから取られた遺伝子に ORF が見られなかった為、同様の実験をホシザメ (*Mustelus manazo*) 及びツノザメ (*Squalus mitsukurii*) でも行った。

〔結果〕

ドチザメからは C3 様遺伝子が 2 種、C4 様遺伝子が 3 種及び C5 様遺伝子が 1 種確認された。また他の 2 種のサメで行った C5 様遺伝子の探索でもそれぞれ 1 種が確認された。3 種のサメから取れた C5 様遺伝子のうちホシザメを除く 2 種では読み枠上で frame shift が生じており、擬遺伝子となっていることが示唆された。

〔考察〕

ドチザメから C3 と C4、ホシザメから C5 の機能していると考えられる遺伝子の存在が確認されたことから、C3/C4/C5 の遺伝子重複と機能分化は軟骨魚綱板鰓垂綱の出現よりも以前に起こったことが示された。しかしながら C5 は系統的に離れた 2 種のサメで擬遺伝子化しており、今後は系統的に古いサメを用いて擬遺伝子化の時期の特定を行いたい。

〔文献〕

- 1) Kuroda, N. et al. Immunogenetics 51:117
- 2) Franchini, S. et al. Dev. Comp. Immunol. 25:419
- 3) Suzuki, MM. et al. J Mol Evol. 54(5):671-9.
- 4) Marino, R. Immunogenetics 53(12):1055-64
- 5) Al-sharif WZ. J Immunol. 15;160(6):2983-97

補体 C3 遺伝子の起源と進化

杉本早苗、藤戸尚子、野中勝

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

Origin and Evolution of the Complement Component C3 Gene

Sanae Sugimoto, Naoko Fujito, Masaru Nonaka

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo,

[はじめに]

高等動物の補体系は約 30 種類の蛋白成分で構成されていて、自然免疫系において主要な役割を担っている。補体系は後口動物の系統で確立されたと考えられているが、その中心成分である C3 及び C3 の属する TEP (チオエステル含有蛋白質) family の起源は未だに明らかではない。TEP family は補体系蛋白質 C3、C4、C5 から成る C3 様 subfamily とプロテアーゼインヒビターである α 2-macroglobulin (α 2M)、GPI アンカーを持つ膜蛋白質 CD109 から成る α 2M 様 subfamily に二分される事が知られている。これまで C3 様遺伝子は後口動物以上で、 α 2M 様遺伝子は前口動物以上でその存在が確認されるにとどまっていたため C3 は α 2M の遺伝子重複により生じたと考えられていたが、近年刺胞動物の珊瑚から C3 様遺伝子の存在が報告され、C3 及び TEP family の起源を検討し直す必要が生じた。本研究では、TEP family で保存されている領域に設計した縮退プライマーを用いて海綿動物、刺胞動物における TEP 遺伝子の単離、解析を試みた。

[方法]

海綿動物は普通海綿綱ダイダイイソカイメン (*Halichondria japonica*) と石灰海綿綱オカダケツボカイメン (*Sycon okadai*) の 2 種を、刺胞動物は花虫綱タテジマイソギンチャク (*Haliplanella lineate*) とヒドロ虫綱ヒドラ (*Hydra vulgaris*) の 2 種を用いた。各動物から total RNA を精製し、既知の他動物の TEP 分子

で保存されているチオエステル結合領域とその下流領域に設計した縮退プライマーを用いて RT-PCR を行った。得られた部分配列をプローブとして BLAST search により相同性検索を行った。cDNA ライブラリーを作製し得られた部分配列をプローブとしてスクリーニングし塩基配列を決定し、また、5'、3'RACE 法によって全塩基配列を決定した。分子系統樹は Clustal X による近隣接合法によって作製した。

[結果]

ダイダイイソカイメン、オカダケツボカイメンからは TEP 遺伝子の部分配列は得られなかったが、タテジマイソギンチャクからは 4 種類、ヒドラからは 2 種類の TEP 遺伝子の部分配列が得られた。タテジマイソギンチャクで得られた 4 種の TEP 遺伝子の塩基配列を 5'、3'RACE 法により決定し、Clustal X による系統樹を作製したところ、4 種のうちの 2 つは C3 様遺伝子、1 つは α 2M 様遺伝子、もう 1 つは CD109 様遺伝子である事が示唆された。これにより、刺胞動物の段階で既に、TEP family の代表的なメンバーである C3、 α 2M、CD109 が揃っていた事が明らかになった。ヒドラで得られた 2 種の TEP 遺伝子の部分配列は α 2M と高い相同性を持つ事が BLAST search により示された。部分配列をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、そのうちの 1 種の全長配列が得られ全塩基配列を決定した。Clustal X による系統樹

を作製したところ、タテジマイソギンチャク $\alpha 2M$ 様遺伝子に最も近縁な $\alpha 2M$ 様の遺伝子である事が示唆された。得られた $\alpha 2M$ 様遺伝子は約 520bp の領域において低い相同性を持ち、計 4 種の塩基配列が得られたため、アリアルである可能性も含めてヒドラには 2 種以上の $\alpha 2M$ 様遺伝子が存在する事が明らかになった。

[考察]

海綿動物では TEP 遺伝子は存在せず、刺胞動物のイソギンチャクでは C3、 $\alpha 2M$ 、CD109 遺伝子が存在し、刺胞動物の中で独自の進化を遂げたとされるヒドラには $\alpha 2M$ 遺伝子だけが存在した。この結果は、C3 及び他の TEP 蛋白質は海綿動物が分岐した後、後生動物の共通祖先で出現し、C3 様、 $\alpha 2M$ 様両 subfamily への遺伝子重複も刺胞動物の出現以前に完了していた事が示唆された。その後 $\alpha 2M$ 様 subfamily は全ての動物の系統で保持されたが、C3 様 subfamily はヒドラ系統、多くの前口動物の系統で失われたと思われる。今後 In Situ Hybridization による局在解析によって、後口動物のものとは異なる可能性の高いイソギンチャクの C3 遺伝子の機能解析の手がかりを得たい。

[文献]

- 1) Adams M. D. et al., Science 287: 2185-95 (2000)
- 2) Aguinaldo A.M. et al., Nature 387: 489-93 (1997)
- 3) Al-Sharif W. Z. et al., J Immunol 160: 2983-97 (1998)
- 4) James W.V., PNAS 94: 8001-8005 (1997)
- 5) Kortschak, R. D. et al., Curr Biol 13: 2190-5 (2003)
- 6) Law, S. K. et al., Blood 99: 1683-91 (2002)
- 7) Lin, M. et al., Blood 99: 1683-91 (2002)
- 8) Muller-Eberhard, H. J., Annu Rev Biochem 57: 321-47 (1988)
- 9) Nonaka, M. et al., J Immunol 162: 387-91 (1999)
- 10) Saitou, N. and Nei, M., Mol Biol Evol 4: 406-25 (1987)
- 11) Sottrup-Jensen, L., Proc Natl Acad Sci U S A 82: 9-13 (1985)

尾索動物カタユレイボヤにおける MHC Class III 補体遺伝子の単離 および物理的連鎖解析

吉崎史子、井川俊太郎¹、佐竹正延¹、佐藤矩行²、野中勝
東大・院理・生物、¹東北大・加齢医学研究所、²京大・院理・動物

Cloning and Physical Linkage Analysis of the MHC class III complement genes in *Ciona intestinalis*

Fumiko Yoshizaki, ¹Shuntaro Ikawa, ¹Masanobu Satake, ²Nori Satoh, and Masaru Nonaka

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, the University of Tokyo,

¹Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

²Department of Zoology, Graduate School of Science, Kyoto University

<はじめに>

補体ファクターB(Bf)は第二経路の C3 転換酵素を構成するセリンプロテアーゼである。Bf 遺伝子はヒトでは、共通の祖先から分岐したと考えられる C2 とともに第 6 染色体の MHC 領域に存在する。さらに、C4 も Bf、C2 の近傍にあり、軟骨魚類サメでも MHC 領域にこの連鎖があることが明らかになっている。サメよりも早い段階で分岐した尾索動物ホヤでは、抗体分子や MHC 分子など獲得免疫で重要な分子は無いものの、複数成分で構成される補体系の存在が遺伝子レベルで示唆されている(1)。本研究では、獲得免疫系の出現以前に補体系遺伝子の連鎖が成立していたか否かを検討することを目的として、尾索動物カタユレイボヤで Bf 遺伝子のクローニングおよび C3/C4/C5 の共通祖先から分岐したと考えられるカタユレイボヤ C3 遺伝子との位置関係の解析を行った。

<方法>

1、カタユレイボヤ Bf の cDNA クローニング

カタユレイボヤ EST データベースに対する相同性検索、血球・内柱の cDNA ライブラリのスクリーニングにより 2 種の Bf cDNA を単離した。また、ゲノム配列からさらなる Bf 遺伝子が予測さ

れたので、相同性をもとに予測した開始コドン付近と終止コドン付近にプライマーを作成し、RT-PCR によりコーディング領域全長を増幅・クローニングした。

2、発現解析

各組織での発現をノザンプロットングおよび RT-PCR により検討した。

3、ゲノム構造の解析

カタユレイボヤドラフトゲノム配列を対象に相同性検索を行い、Bf 遺伝子領域および周辺の塩基配列を得て、エクソン、イントロン構造の解析および反復配列の同定を行った。

4、カタユレイボヤ C3 遺伝子との物理的連鎖解析

カタユレイボヤ初期発生胚から将口らの方法(2)にしたがい染色体標本作製した。カタユレイボヤ Bf 遺伝子、および既報の C3-1、C3-2 遺伝子(3)領域を含む BAC クローンをゲノムライブラリ(4)から単離し、DIG またはビオチンで標識してプローブとし、染色体 Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) を行い、連鎖解析を行った。

<結果>

1、カタユレイボヤから 3 種のファクターB 配列

を得て、*CiBf-1*、*CiBf-2*、*CiBf-3*とした。それぞれ、999、998、963 残基のアミノ酸をコードしていると予測された。予測アミノ酸配列はヒト Bf と比較すると 24%~26%の相同性を示した。*CiBf-1* と *CiBf-2* で 88%、*CiBf-1* と *CiBf-3*、*CiBf-2* と *CiBf-3* はそれぞれ 49%の相同性を示した。予測されたドメイン構造は 3 つに共通しており N 末から Low-density lipoprotein receptor (LDLR)-Short consensus repeat (SCR)-LDLR-SCR-SCR-SCR-von Willbrand factor A-Serine Protease と、脊椎動物 Bf、C2 と比較して LDLR ドメイン 2 つと SCR ドメイン 1 つを余分に持つ形であった。セリンプロテアーゼドメインに着目すると、いずれも活性中心セリンのコードが AGY で、触媒ヒスチジンの周囲のシステイン (His ループ)がないという特徴をもち、脊椎動物の Bf、C2 のセリンプロテアーゼとは異なり、むしろ脊椎動物の C1s、C1r、MASP2、MASP3 のセリンプロテアーゼと共通していた。しかし、*CiBf* のセリンプロテアーゼをコードする領域にはイントロンがある点で C1s、C1r、MASP2、MASP3 と異なっていた。

2、ノザンプロッティング、RT-PCR から、*CiBf-1* の発現量が最多で、鰓、内柱に強いシグナル、胃、腸、精巣で弱いシグナルが検出された。また、*CiBf-2* は卵巣で、*CiBf-3*は腸での発現が一番多かった。

3、3つの Bf 遺伝子はゲノムの約 50kb の領域に並んで存在していた。*CiBf-1* と *CiBf-2* の cDNA で非常に相同性が高い部分が見られたが、ゲノムではイントロンの一部も含めてきわめてよく保存されていた。また、*CiBf-1*、2、3 に共通して保存されていた箇所もエクソンだけではなくイントロンの一部まで保存されており、ごく最近に Bf 遺伝子間での遺伝子変換が起こったことが示唆された。この領域には、71 塩基をユニットとするリピート、19 塩基をユニットとするリピートがそれぞれ多数コピーあった。これらリピートが遺伝子変換に何らかの役割を果たした可能性が考えられる。

4、染色体 FISH 法により、*CiBf*、*CiC3-1*、*CiC3-2*

の 3 遺伝子座はどの 2 つも同一染色体上にはないことが明らかになった。

<考察>

カタユウレイボヤ Bf は脊椎動物と比較して追加のドメインを持っていたこと、脊椎動物 Bf、C2 とは異なるタイプのセリンプロテアーゼドメインを持っていたことから、進化の過程でドメインシャフリングが起こったと考えられる。また、カタユウレイボヤ Bf のセリンプロテアーゼは分断されたエクソンでコードされていたので、その祖先は脊椎動物 C1s、C1r、MASP2、MASP3 に見られるイントロンのセリンプロテアーゼの原型となるものだった可能性も考えられる。

脊椎動物 MHC 領域に存在する補体遺伝子 Bf、C2 のカタユウレイボヤホモログ *CiBf* と、*C3/C4/C5* のホモログ *CiC3-1*、*CiC3-2* は連鎖していなかった。連鎖の成立時期は脊椎動物の系統に分岐した後と推察され、C2、C4 の連鎖が古典経路 C3 転換酵素の形成に何らかの役割を果たした可能性が考えられる。

Bf の機能的な面については、硬骨魚類以前に分岐したグループでは解明されていない。現在、機能解析をめざして尾索動物マボヤで Bf 蛋白質の精製を試みている。

<文献>

- 1) Azumi, K. et al., Immunogenetics 55:570 (2003)
- 2) Shoguchi, E. et al., Zoolog Sci 21:153 (2004)
- 3) Marino, R. et al., Immunogenetics 53:1055 (2002)
- 4) Kobayashi, M. et al., Genes Genet Syst 77:283 (2002)

補体系後期成分の起源を探索する

木村 鮎子、遠藤 一如、吉崎 史子、宮沢 清太、瀬谷 司¹、野中 勝東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻、¹北海道大学大学院医学研究科・病態解析学講座

Evolutional Origin of the Terminal Complement Components.

Ayuko Kimura, Kazuyuki Endo, Fumiko Yoshizaki, Seita Miyazawa, Tsukasa Seya¹, and Masaru NonakaDepartment of Biological Sciences, Graduate School of Science, the University of Tokyo, ¹Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

<目的>

哺乳類補体系のエフェクター分子である補体系後期成分(Terminl Complement Components: TCCs)は、膜障害性複合体を形成して膜電位を破壊し細胞を溶解させる機能をもつと考えられている。これまでの研究から、補体系は後口動物の系統で獲得されたものと考えられており、その中でもより原始の姿に近い補体系をもつと期待される尾索動物ホヤでは、補体系のエフェクター機能のうち、食食促進³⁾や炎症細胞の誘導^{4) 5)}が既に確認されている。しかし、もうひとつのエフェクター機能である膜障害機能については、これまで有顎脊椎動物のみでしか確認されていない⁶⁾。また最近、TCCは直接的な膜障害機能だけではなく、sublyticな量ではイオンリークを引き起こし、シグナル伝達を介して免疫細胞のアポトーシスや増殖を促進する機能を持つことを示唆する論文が幾つか発表され^{1) 2)}、その生理的役割を見直す必要性が生じている。

そこで本研究では、補体系で働く膜障害因子の起源を明らかにするとともに、原始的な補体系膜障害因子の機能を解析することによって、その生理的な意義を明らかにしていくことを目的とし、尾索動物のマボヤとカタユウレイボヤを用いてTCC遺伝子を探索し、またマボヤTCC蛋白質の機能解析の前段階として組み替え蛋白質に対する抗体を作成した。

<方法>

1. ホヤ TCC 遺伝子の網羅的な単離

後口動物のTCCで保存されているアミノ酸配列をもとに作成した縮退プライマーと、2種のホヤの各組織から抽出したRNAとを用いて、RT-PCRによりホヤTCC遺伝子の部分配列を得た。さらに完全長cDNAを得るため、マボヤではPCR産物をプローブとして肝臓cDNAライブラリのスクリーニングを行い、カタユウレイボヤではPCR産物の塩基配列を、ドラフトゲノム配列⁷⁾から予測されたTCC遺伝子の配列と比較した。

2. マボヤ TCC 遺伝子の発現解析およびポリクローナル抗体の作成

ノザンプロットにより、マボヤTCC遺伝子の発現部位を確認した。さらに蛋白質レベルでの解析を行うため、マボヤTCC遺伝子のcDNA配列をもとに組み替え蛋白質を作成し、これに対するポリクローナル抗体を作成した。

<結果>

1. ホヤ TCC 遺伝子の網羅的な単離

マボヤから1種、カタユウレイボヤから15種のTCC様遺伝子を得た。これらがコードする蛋白質のドメイン構造を予測してヒトのTCC、Perforinと

比較すると、どちらのホヤの TCC 様因子も、1) 脊椎動物の Perforin にはなく TCC にのみ存在するドメインを幾つかもつこと、2) しかし C5 など他の補体成分と相互作用するのに必要と考えられる FIM、SCR ドメインを全く欠いていることが分かった。また、マボヤ TCC の TSP、EGF-like ドメインは保存されている Cys 残基の幾つかを欠いており、その N、C 末側にはそれぞれドメイン構造の予測できないアミノ酸配列が続いており、マボヤ TCC が独自の進化を遂げている事が示唆された。ホヤと脊椎動物の TCC に共通する4つのドメインのアミノ酸配列をもとに分子系統樹を作成すると、2種のホヤの TCC、脊椎動物の TCC、Perforin とがそれぞれひとつのグループを作り、この系統樹からはホヤの TCC 様遺伝子が脊椎動物の TCC と Perforin のどちらに近縁であるのかを判断することはできなかった。

2. マボヤ TCC 様遺伝子の発現解析およびポリクローナル抗体の作成

ノザンブロットにおいて、マボヤ TCC 様遺伝子の発現は肝臓で特異的に認められた。また、作成したポリクローナル抗体を用いて、マボヤの各組織から抽出した蛋白質に対するウエスタンブロットを行ったところ、体腔液（血清）に特異的なバンドが2つ検出され、さらに N-グリコペプチダーゼ処理によってこれらのバンドがそれぞれより低分子量へと移動したことから、N 型の糖鎖付加を受けていることが分かった。

<考察>

ホヤの TCC が脊椎動物 TCC にのみ見られる独特のドメインセットをもつことから、これらが祖先分子を共有することが示唆されるが、分子系統樹やアミノ酸配列の比較から、これらの分子の進化的な分岐はかなり古くそれぞれが独自の進化を遂げている

様子が伺える。マボヤ TCC は脊椎動物 TCC と同様に、肝臓で発現され糖蛋白質として体腔液中に分泌されることから、脊椎動物の TCC に近いものである可能性が高い。しかしながらドメイン構造からは、ホヤ TCC はホヤの補体中心成分と相互作用しない可能性も考えられる。

<結論>

以上の結果から、ホヤのような後口無脊椎動物の系統でも既に TCC 遺伝子が発現していたことが明らかになった。しかし一方、ホヤの TCC 遺伝子は体腔液中に存在しながら補体系中心成分の制御下から離れて働く可能性が示唆された。ホヤ TCC の膜障害機能やホヤ体液中における生理機能については、さらなる機能解析によって明らかにしていきたいと考えている。

<参考文献>

- 1) Duncan S et al, *Clinical Science*, 104: 455-6 (2003)
- 2) Horea G. Rus et al, *Immunological Reviews*, 180: 49-55 (2001)
- 3) Nonaka M and Azumi K, *Dev Comp Immunol*, 23: 421-7 (1999)
- 4) Raftos D. A et al, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 134: 377-86 (2003)
- 5) Pinto M R et al, *J Immunol*, 171: 5521-8 (2003)
- 6) Jensen JA et al, *Science*, 214: 566-9 (1981)
- 7) Dehal P et al, *Science*, 298: 2157-67 (2002)

補体研究会（補体シンポジウム）会則

I 総則

- (1) 本会は補体研究会（The Japanese Association for Complement Research）という。
 - (2) 本会は補体研究会ならびにこれに関連する分野の進歩発展を図ることを目的とする。
 - (3) 本会は前条の目的を達成するため、次に定める事業を行う。
- 1) 年1回以上にわたる総会ならびに学術集会（補体シンポジウム）の開催。
 - 2) 内外の関連学術団体との連絡及び協力。
 - 3) その他の必要な事業

II 会員

- (4) 本会は、補体研究ならびにこれに関連する分野の学問の研究を志す人々、及びそれに賛同する賛助会員を以て組織される。
- (5) 本会に会員として入会を希望する者は、所定の申込書に必要事項を記入し、会費を添えて本会事務局に提出するものとする。
- (6) 本会の会費については細則で定める。
- (7) 会員は学術集会において、その実績を発表できると共に、その抄録集の配布を受ける。
- (8) 会員で故なくして2年間会費を滞納したものは退会とみなす。
- (9) 本会の名誉を著しく毀損した会員は、運営委員会の議を経て除名することが出来る。
- (10) 本会に特に功労のあった方で、細則に定める規定により推薦された方を名誉会員とする。

III 役員

- (11) 本会に次の役員をおく。

| | |
|--------------------|-----|
| 会長 | 1名 |
| 運営委員 | 若干名 |
| 監事 | 2名 |
| 補体シンポジウム当期および次期集会長 | 2名 |

- (12) 会長は、本会を代表し、運営委員会を召集する。会長の選出は運営委員会が行い、総会での承認を得て決定する。任期は4年とし、2期を限度とする。ただし再任後の任期は2年とする。
- (13) 運営委員は会員から選挙により選出し、任期は4年とし連続の再任は認めない。細則で定めるところの選挙規定に従って2年毎に選挙を行い、半数ずつ交代するものとする。
- (14) 監事は、運営委員経験者の中から運営委員会が選出し、総会での承認を得て決定する。
- (15) 監事は会計および選挙等を監査する。監事の任期は4年とし、連続の再任は認めない。任期中監事を辞退するものが生じた際には、所定の手続きを経て速やかに後任を補充

するものとし、その際の任期は前任者の残留期間とする。

- (16) 運営委員会の構成員は運営委員、補体シンポジウム集会長（当期および次期）および会長とする。
- (17) 運営委員会は、構成員の過半数の出席を要する。
- (18) 運営委員会は、会務の審議、本会の運営に当たる。
- (19) 補体シンポジウムの集会長は、運営委員会が選出決定する。
- (20) 補体シンポジウム集会長は、補体シンポジウムを主宰する。
- (21) 補体シンポジウム集会長の任期は、前期補体シンポジウム開催時に始まり、主宰補体シンポジウム終了時に終る。

IV 学術集会・総会

- (22) 年次集会（補体シンポジウム）を行う。時宜に応じて必要な集会を開催することが出来る。
- (23) 運営委員会は、補体シンポジウム開催中または必要に応じて会長がこれを召集する。
- (24) 総会は年1回、補体シンポジウム開催中に当期集会長が召集し、運営委員会決定事項の報告と必要な討議を行い、承認を求める。

V 会計

- (25) 経理会計は事務局において行うほか、必要に応じてシンポジウム集会長もこれにたずさわる。
- (26) 本会の経費は、会費・寄付金・その他の収入および利子をもってこれにあてる。
- (27) 補体シンポジウムにおいては、出席会員から参加費を徴収することが出来る。
- (28) 本会の会計年度は1月1日に始まり、12月31日に終わり、総会において会計報告を行う。
- (29) 監事は会計の監査を行い、その結果を総会において報告する。

VI 会則変更

- (30) 本会の会則を変更する場合は、総会出席会員の3分の2以上の賛成を必要とする。

付則

この会則は昭和60年3月1日より施行する。

平成2年8月7日 一部改訂

平成4年7月23日 一部改訂

平成5年7月21日 一部改訂

細 則

I 会費

- (1) 本会の年会費は当分の間年額5,000円とする。但し学生会員（学部学生および大学院生）は3,000円とする。学生会員は、学生証の写し等を毎年事務局へ提出し、確認を受けるものとする。賛助会員の会費は年間1口30,000円とする。

II 選挙規定

運営委員の選出は当分の間次の規定に従って行う。

- (2) 運営委員の定数は6名を原則とする。
- (3) 選挙事務は事務局において行う。
- (4) 運営委員の選挙にあたり、運営委員候補者名簿を作成する。
- (5) 運営委員候補者として、任期満了の運営委員は3名、運営委員経験者は1名を推薦することが出来る。
- (6) 事務局は、運営委員候補者名簿および投票用紙を、会員に総会開催2ヶ月前までに郵送し、会員はそれにもとづき、所定の日時まで3名連記で投票を行う。ただし、候補者以外のものに投票しても差し支えない。
- (7) 開票には、少なくとも監事1名の立会いを必要とする。監事は、開票結果にもとづいて、得票数の上位3名の運営委員と次点1名を定め、運営委員会および総会に報告する。
- (8) 次点者は運営委員に欠損が生じた場合に、その任に当たる。

III 事務局

- (9) 本会の事務局は会長の指名する事務局長のもとに置く。

IV 名誉会員

- (10) 名誉会員の候補者の推薦は、運営委員2名以上の推薦によって成立する。名誉会員候補者は運営委員会において選考され、総会の承認を得て名誉会員に決定される。

付則

細則(1)は昭和62年度より、賛助会員については平成5年度より施行する。

平成2年8月7日 一部改訂

平成4年7月23日 一部改訂

平成5年7月21日 一部改訂

謝 辞

(株) 蛋白科学研究所 (<http://www.prsc.jp>) 様より、第41回補体シンポジウムへご支援を頂きました。心から御礼申し上げます。

第41回補体シンポジウム

集会長 野中 勝

補体研究会賛助会員

(50音順)

トーアエイヨー (株)

日本ハム (株)

明治製菓 (株)

和光純薬工業 (株)

補体研究会

会長 瀬谷 司

運営委員 岡田 秀親
酒井 好古
野中 勝
堀内 孝彦
松尾 清一
松下 操
松本美佐子
山本 哲郎

監事 岡田 則子
藤田 禎三

事務局長 野中 勝

集会長 野中 勝

次期集会長 松尾 清一

