

The 44th Complement Symposium

August 2007, Hiratsuka

Proceeding of the Complement Symposium

Vol. 44 (2007)



平成19年8月

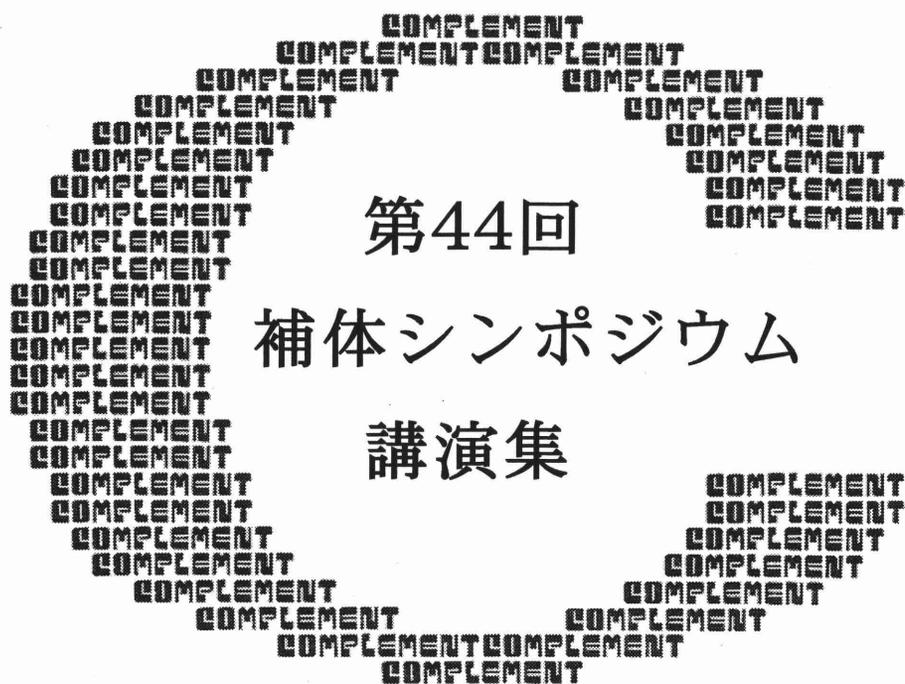
平塚

補体研究会

The Japanese Association for Complement Research

Proceeding of the Complement Symposium

Vol. 44 (2007)



会期：平成 19 年 8 月 24 日（金）、25 日（土）

会場：東海大学湘南キャンパス・松前記念館

〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 1117

集会長：東海大学工学部生命化学科

松下 操

〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 1117

Tel : 0463-58-1211 内線 4178, 4442

E-mail : mmatsu@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

第44回補体シンポジウム参加案内

講演会場 東海大学湘南キャンパス・松前記念館地下講堂

受付 第1日 8月24日(金) 12時より

松前記念館地下講堂ロビーにて

参加費 一般 5,000円

学生 2,000円

懇親会費 3,000円

発表方法 全て口頭発表、PCプレゼンテーションで行います。一般演題は討論を含めて15分を予定しています。

PCは事務局にて用意しますので、PowerPointで作成したファイル(ファイル名は「演題番号+氏名.ppt」)をCD-RまたはUSBメモリーにてお持ち下さい(CD-RWおよびDVDによるデータの持込みはできないのでご注意ください)。事務局にて用意するPCはWindows XPとMac OSXで、プレゼンソフトはそれぞれPowerPoint 2003とPowerPoint 2004です。

ファイルの受付は発表30分前までにお済ませ下さい。

運営委員会 第1日 8月24日(金) 12:00~12:45 (松前記念館地下講堂控室)

総会 第2日 8月25日(土) 13:15~13:45 (松前記念館地下講堂)

懇親会 第1日 8月24日(金) 18:30~20:00 (14号館地下カフェラウンジ)

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

進化多様性生物学研究室内 野中 勝

Tel/Fax: 03-5841-4990

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

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

東海大学湘南キャンパスへの行き方

小田急線「鶴巻温泉駅」の北口より〔下大槻団地行き〕または〔秦野駅行き〕バス（約10分）で〔東海大学北門〕下車。または「東海大学前駅」下車徒歩約15分（途中急な上り坂が続きます）。

最寄り駅（鶴巻温泉駅または東海大学前駅）へのアクセス

□ 新宿駅より

- 小田急線（小田急小田原線）の急行で約70分。
- 小田急線特急ロマンスカーで本厚木駅まで乗車（約45分）、本厚木駅で急行または各駅停車に乗り換え約10分。

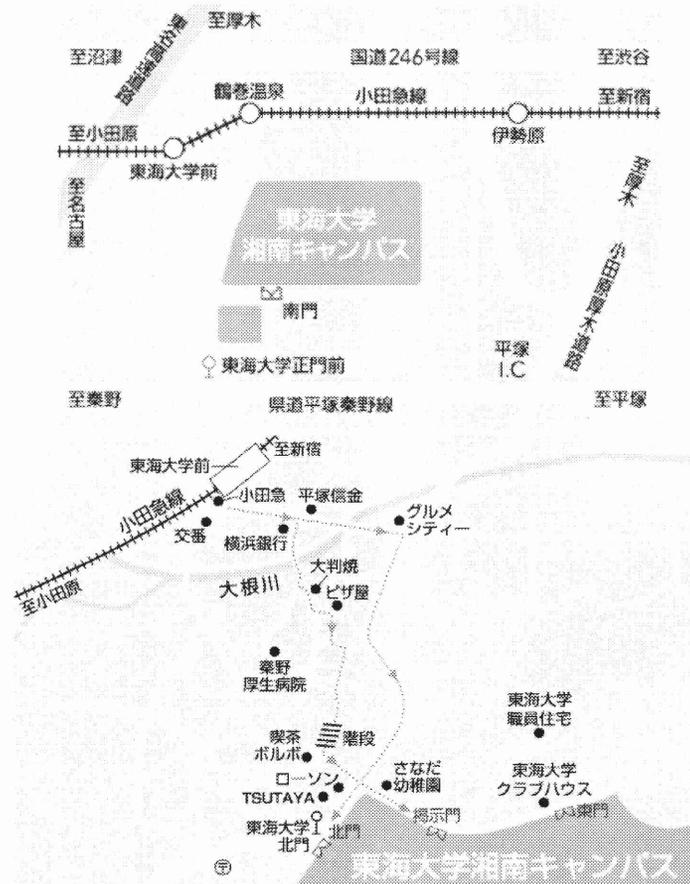
□ 小田原駅より

- 小田急線（小田急小田原線）の急行で約25分。

□ 羽田空港より

- 空港連絡バスで本厚木駅まで乗車（約65分）、本厚木駅より小田急線を利用。空港連絡バスについては、ウェブサイト（http://www.kanachu.co.jp/bus/airportbus_haneda01.html）を参照。
- 新宿駅または小田原駅へ行き、そこから小田急線を利用。

平塚駅北口より〔東海大学行き〕のバス（約30分）もあります。「東海大学正門前」でなく、終点（南門）でお降り下さい。



Campus Map

湘南キャンパス

東海大学

バス停 (東海大学北門)

松前記念館

掲示門

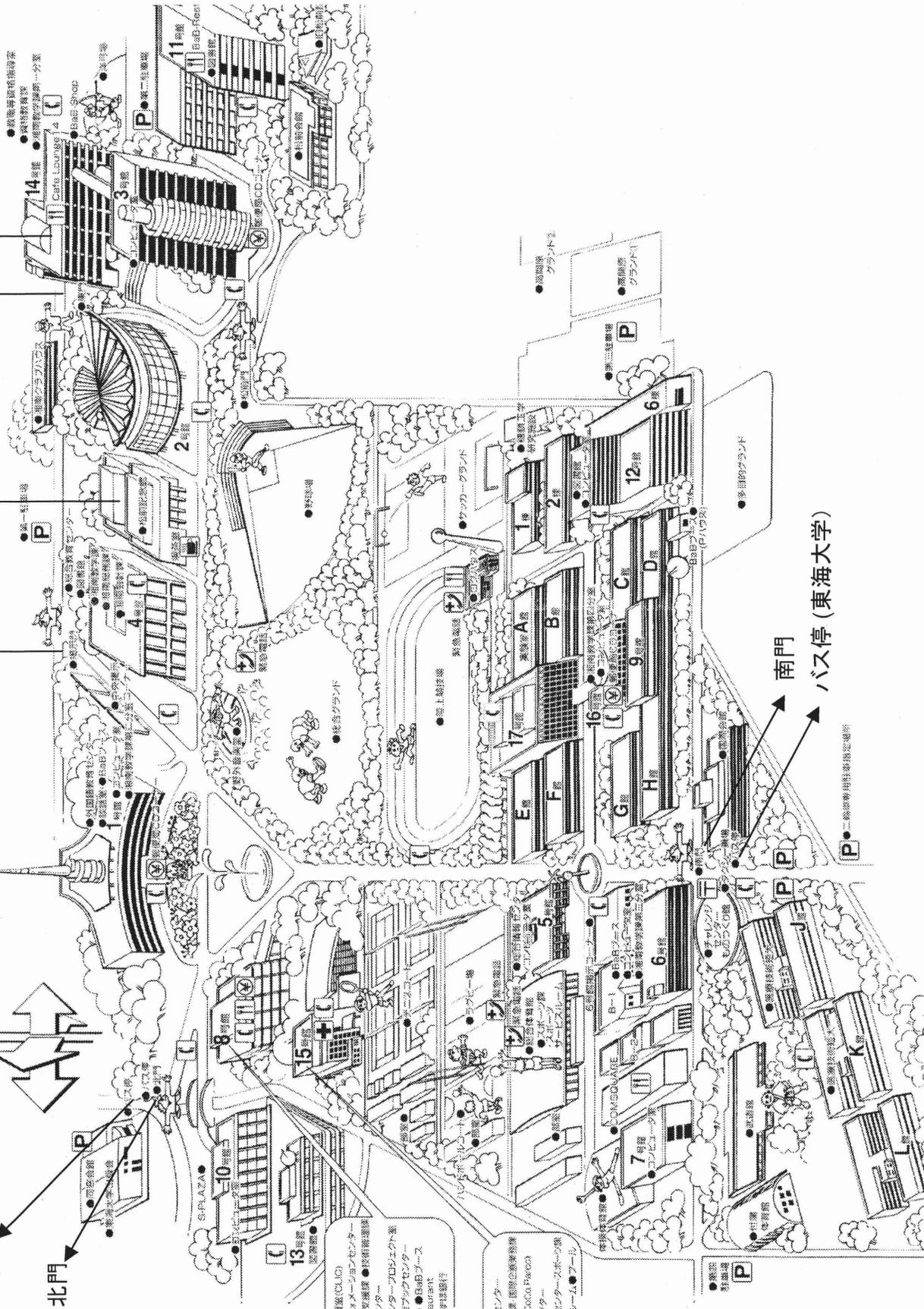
14号館

東門

北門

南門

バス停 (東海大学)



- 8号館
- 学生生活支援課 (CLC)
 - 国際インフार्メーションセンター
 - 国際キャリア支援課 ● 国際管理課
 - 国際キャリアセンター
 - 国際キャリアセンター・プロジェクト室
 - 国際キャリアセンター・プロジェクト室
 - Bab—Shop ● Bab—ブース
 - Bab—Restaurant
 - 横浜銀行 本町支店
 - 三井住友銀行

- 15号館
- 学生生活支援センター
 - 国際キャリア支援課 ● 国際管理課
 - 国際キャリアセンター ● 国際管理課
 - 学生生活支援課 (CACA F&C)
 - 国際キャリアセンター
 - 国際キャリアセンター ● Bab—ブース
 - Bab—ブース ● Bab—ブース
 - Bab—ブース ● Bab—ブース

● 東門
● 南門
● 北門

P ● 東門
P ● 南門
P ● 北門

日 程 表

8月24日(金)

12:00 開場

13:00~13:05	開会の辞	松下 操
13:05~14:20	セッションA : 第二経路、レクチン経路、GPIアンカー 座長 岡田則子、中尾実樹	
14:20~14:35	コーヒープレイク	
14:35~16:40	生体防御レクチンシンポジウム 座長 岡田秀親、堀内孝彦	
16:40~16:55	コーヒープレイク	
16:55~17:55	特別講演1 演者 David C. Kilpatrick 座長 瀬谷 司	
18:30~20:00	懇親会	

8月25日(土)

9:00 開場

9:30~11:00	セッション B : 受容体、炎症 座長 大井洋之、松尾清一	
11:00~11:15	コーヒープレイク	
11:15~12:15	特別講演 2 演者 Lee Bok Luel 座長 木下タロウ	
12:15~13:15	昼食	
13:15~13:45	総会	
13:45~14:45	セッション C : 進化 1 座長 遠藤雄一、井上徳光	
14:45~15:00	コーヒープレイク	
15:00~16:00	セッション D : 進化 2 座長 野中 勝、山本哲郎	
16:00~16:05	閉会の辞	松下 操

第 44 回補体シンポジウム・学術プログラム

第 1 日 8 月 2 4 日 (金)

セッション A: 第二経路、レクチン経路、GPI アンカー

13:05~14:20

座長 岡田則子、中尾実樹

A-1 カプトガニにおける補体系活性化機構の解析

有木 茂¹⁾、福岡貴彰¹⁾、高原修作¹⁾、尾崎 彩¹⁾、遠藤雄一²⁾、藤田禎三²⁾、
川畑俊一郎¹⁾

九大・理・生物、²⁾福島県立医大・医・免疫

A-2 MASP 欠損マウスにおける *Staphylococcus aureus* に対する食作用の解析

岩城大輔¹⁾、菅野和子¹⁾、高橋 実¹⁾、遠藤雄一¹⁾、松下 操²⁾、藤田禎三¹⁾

¹⁾福島県立医科大学・医・免疫、CREST、²⁾東海大学・工・生命化学

A-3 L-ficolin/MASP 複合体は莢膜多糖体の N-アセチルノイラミン酸を介して B 群レンサ
球菌に結合し補体経路を活性化する

青柳祐子¹⁾、Elisabeth E. Adderson²⁾、Craig E. Rubens³⁾、John F. Bohnsack⁴⁾、関進基⁵⁾、
松下 操⁵⁾、藤田禎三⁶⁾、奥脇義行¹⁾、高橋信二¹⁾

¹⁾女子栄養大学・栄・微生物学、²⁾St. Jude Children's Research Hospital、³⁾University
of Washington、⁴⁾University of Utah、⁵⁾東海大・工・生命化学、⁶⁾福島県立医大・医・
免疫学

A-4 モルモット MBL の精製と機能解析

小野千明、立石恒一朗、松下 操

東海大学・大学院工学研究科・工業化学専攻

A-5 遺伝性 GPI アンカー欠損症と治療について

村上良子¹⁾、前田裕輔¹⁾、Antonio Almeida²⁾、Anastasios Karadimitris²⁾、木下タロウ¹⁾

¹⁾大阪大学微生物病研究所 免疫不全疾患研究分野

²⁾ Department of Haematology, Imperial College London, Hammersmith Hospital, UK

生体防御レクチンシンポジウム

14:35~16:40

座長 岡田秀親、堀内孝彦

S-1 認識分子 Ficolin の構造と働き

遠藤雄一、岩城大輔、高橋実、松下 操¹⁾、藤田禎三
福島県立医大・医・免疫、¹⁾東海大・工・生命化学

S-2 肺コレクチンによる自然免疫機構

黒木由夫¹⁾²⁾、西谷千明¹⁾²⁾、光澤博昭¹⁾²⁾、佐野仁美¹⁾²⁾
¹⁾札幌医科大学医学部生化学第一講座、²⁾CREST, JST

S-3 新規コレクチンファミリーの発見とその役割

若宮伸隆¹⁾、大谷克城¹⁾、坂本隆志²⁾、芥子宏行²⁾、福應温¹⁾、張成宰¹⁾、吉崎隆之¹⁾、
福田光子¹⁾、小山 聡¹⁾、福澤 純¹⁾、本村 亘¹⁾、吉田逸朗¹⁾、鈴木定彦³⁾
¹⁾旭川医科大学・医学部・微生物、²⁾扶桑薬品工業・研究開発センター、
³⁾北海道大学・人獣共通感染症センター

S-4 Pentraxin 3 の炎症反応における意義とその役割

奥谷大介
岡山大学医学部腫瘍胸部外科、国立病院機構南岡山医療センター

S-5 ガレクチンファミリーが見せる機能の特異性と非特異性

中村隆範、西 望、東海林博樹、山本ひとみ、Lu Liang-Hao
香川大学・医学部・生体分子医学講座・分子細胞機能学

特別講演 1

座長 瀬谷 司

16:55~17:55

Animal lectins in innate immunity

David C. Kilpatrick

Scottish National Blood Transfusion Service, National Science Laboratory, UK

第2日 8月25日(土)

セッションB: 受容体、炎症

9:30~11:00

座長 大井洋之、松尾清一

B-1 活動性ループス腎炎の糸球体における、C3a receptor (C3aR)の発現

水野正司¹⁻³⁾、Stephanie Blanchin³⁾、Philippe Gasque³⁾、西川和裕⁴⁾、松尾清一¹⁾

¹⁾名古屋大学大学院大学腎臓内科、²⁾同 腎不全治療システム学講座、

³⁾カーディフ大学医学部医学生化学&免疫学講座、⁴⁾愛知医大腎臓内科

B-2 アナフィラトキシンC5aを阻害する相補性ペプチドAcPepAの解析

岡田則子¹⁾、Lewis Hau¹⁾、小野文子²⁾、寺尾恵治²⁾、水江由佳³⁾、朝井鈴佳¹⁾、

岡田有武⁴⁾、宮本端夕¹⁾、岡田秀親⁴⁾⁵⁾

¹⁾名古屋市立大学医学研究科免疫学分野、²⁾医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、³⁾札幌イムノダイアグノスティック、⁴⁾(株)蛋白科学研究所

⁵⁾福祉村病院長寿医学研究所

B-3 補体C5aリセプターを介した肥満細胞内カルシウム導入機構

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分野

B-4 CD46依存性の麻疹ウイルス株のinterferon応答能の解析

新開大史¹⁾、谷口光恵²⁾、田辺真佐子²⁾、松本美佐子¹⁾、瀬谷 司¹⁾

¹⁾北海道大学大学院医学研究科、²⁾大阪府立成人病センター研究所

B-5 Toll様受容体5 (TLR5) と全身性エリテマトーデスの関連

堀内孝彦、木本泰孝、三苦弘喜、民本泰浩、内野愛弓、高橋美聡、押領司健介、藤健太郎、塚本浩

九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科

B-6 癌から分泌される乳酸によるIL-23-IL-17炎症経路の誘導

志馬寛明¹⁾、藪 政彦¹⁾、赤澤 隆¹⁾、松本美佐子²⁾、瀬谷 司²⁾、井上徳光¹⁾

¹⁾大阪府立成人病センター研究所・分子遺伝学部門、

²⁾北海道大学大学院医学研究科・感染症制御学分野

特別講演 2

座長 木下タロウ

11:15~12:15

The molecular recognition mechanism of fungal β -1,3-glucan and bacterial peptidoglycan in the prophenoloxidase activation cascade

Lee Bok Luel

National Research Laboratory of Defense Proteins, College of Pharmacy,
Pusan National University, Korea

セッション C: 進化 1

13:45~14:45

座長 遠藤雄一、井上徳光

C-1 Lysine-type peptidoglycan recognition signal mediated by PGRP-SA/GNBP1 is triggered by auto-activating modular serine protease

Su-Jin Kim ¹⁾, Chan Hee Kim¹⁾, Ji-Won Park¹⁾, Kyung-Bak Roh¹⁾, Hyun Mi Kwon¹⁾, Nam-Chul Ha¹⁾, Masaru Nonaka²⁾ and Bok Luel Lee¹⁾

¹⁾National Research Laboratory of Defense Proteins, College of Pharmacy, Pusan National University, Korea and ²⁾Department of Biological Sciences Graduate School of Science, The University of Tokyo, Japan

C-2 刺胞動物イソギンチャク (*Nematostella vectensis*) の補体系遺伝子解析:

I. C3, Bf, MASP cDNA の構造解析

坂口絵理・木村鮎子・野中真弓・野中 勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

C-3 刺胞動物イソギンチャク (*Nematostella vectensis*) の補体系遺伝子の解析:

II. C3, Bf, MASP 遺伝子の発現解析

木村鮎子・野中 勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

C-4 サメ補体 C5 遺伝子の構造解析

南雲浩之、林 晋平、野中 勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

座長 野中 勝、山本哲郎

- D-1 コイ補体成分 C1 タンパク質の同定
市居 敬、柚本智軌、鵜木陽子、中尾実樹
九州大学大学院農学研究院
- D-2 モノクローナル抗体を用いたコイ C3 アイソタイプの機能解析
一木智子、鵜木陽子、柚本智軌、中尾実樹
九州大学大学院農学研究院
- D-3 魚類における新規補体制御因子の同定
辻倉正和、柚本智軌、鵜木陽子、中尾実樹
九州大学大学院農学研究院
- D-4 *Xenopus tropicalis* の補体制御遺伝子座の解析
押海裕之¹⁾ 鈴木 譲²⁾ 松本美佐子¹⁾ 瀬谷 司¹⁾²⁾
¹⁾北大・医 ²⁾北大・生命科学院

Animal lectins in innate immunity

David C. Kilpatrick

Scottish National Blood Transfusion Service, National Science Laboratory, Edinburgh, UK

The innate immune response provides an immediate first line of defence involving a variety of cells and humoral factors. Animal lectins are found in and on cells of the immune system and also occur as soluble agents. Lectins function in immunity by promoting cellular communication between, and trafficking of, immune function cells; regulating inflammation; preventing autoimmunity; and as constitutive or inducible antibody equivalents. Complex mixtures of lectins, from several structural families, are found in invertebrates like horseshoe crabs and insects. Soluble pattern recognition proteins specific for bacterial peptidoglycans and fungal β -1,3-glucans have been conserved during evolution; the human counterparts are mannan-binding lectin (MBL) and L-ficolin. MBL has been the subject of an extensive literature, some of which is consistent with the view that MBL deficiency or insufficiency (variously defined) confers an increased susceptibility to infection and has an adverse influence on the course of numerous diseases that can be complicated by infections. Paradoxically, MBL deficiency seems to have little clinical significance in the general population, and there is some evidence to support the view that high circulating MBL concentrations could be harmful. MBL is largely genetically determined, but the well-established genotype-serum concentration relationship can be misleading and contribute to some of the anomalies in the literature. While MBL can distinguish self from non-self and self from altered-self (in the form of apoptotic and possibly cancer cells), there is also evidence that MBL can bind to autologous ligands in and on healthy cells. This could have interesting consequences for MBL replacement therapy (which is

currently under development); both plasma-derived and recombinant MBL have short biological half-lives, but their effects on cells might persist for much longer. L-ficolin concentrations vary only about 5-fold in most healthy adults and we and others have found that polymorphism in the *FCN2* gene influences serum concentration. In contrast to MBL, there have been few disease association studies involving ficolins. A preliminary study implicated L-ficolin in the susceptibility of children to respiratory illnesses, especially those children suffering from allergies. Other clinical studies are now in progress. We are conducting a prospective study of innate immune factors in neonates using cord blood samples as a starting point. Babies with low L-ficolin concentrations have shorter gestational ages, lower birthweights and an increased incidence of perinatal infections. No such relationships were found with serum MBL, but reduced ability to activate the MBL-dependent lectin pathway of complement activation showed the same trends as L-ficolin insufficiency. Homozygosity for variant *MBL2* alleles was also associated with susceptibility to bacterial infections. These findings suggest that L-ficolin participates in host defence during the perinatal period and constitute the first evidence that L-ficolin insufficiency may contribute to the adverse consequences of prematurity.

特別講演 2

The molecular recognition mechanisms of fungal β -1,3-glucan and bacterial peptidoglycan in the prophenoloxidase cascade

Lee Bok Luel

National Research Laboratory of Defense Proteins, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan, Korea

The prophenoloxidase (pro-PO) proteolytic activation cascade like the vertebrate complement system, which leads to melanization of invading microbes, is major innate immune defense mechanism in invertebrates that is triggered by bacterial peptidoglycan (PG) and fungal β -1,3-glucan in the hemolymph. Last several years, we have determined molecular structures and biochemical properties of PG- or β -1,3-glucan-recognition protein and down-stream pro-PO activating factors that are directly involved in pro-PO activation cascade. Subsequently, we recently reported biochemical evidences that the clustering of PG recognition protein (PGRP)-SA molecules on the polymeric lysine-type-PG is required for the activation of the pro-PO cascade. We also highlighted that the lysozyme-mediated partial digestion of highly cross-linked lysine-type-PG dramatically increases the binding of PGRP-SA, presumably by inducing clustering of PGRP-SA, which then recruits the *Tenebrio molitor* GGBP1 homologue (Tm-GGBP1) and a modular serine protease (Tm-MSP) containing low density lipoprotein receptor class A repeats domain, complement control protein domain and catalytic serine protease domain, which might lead to the activation of both the Toll and pro-PO pathways. However, the molecular mechanism of how upstream factors transfer lysine-type PG or β -1,3-glucan recognition signal to downstream factors is not determined yet. Recently, we have succeeded to purify upstream essential factors for the activation of β -1,3-glucan or lysine-type PG dependent pro-PO system. Here, I will present the molecular recognition

mechanism of pro-PO cascade induced by lysine-type PG or β -1,3-glucan.

認識分子 Ficolin の構造と働き

遠藤雄一、岩城大輔、高橋実、松下操¹⁾、藤田禎三
 福島県立医大・医・免疫、¹⁾東海大・工・生命化学

Structure and function of ficolin

Yuichi Endo, Daisuke Iwaki, Minoru Takahashi, Misao Matsushita¹⁾, Teizo Fujita

Dept. of Immunology, Fukushima Medical University School of Medicine

¹⁾Dept. of Applied Biochemistry and Institute of Glycotechnology, Tokai University

Ficolin は、主に N 末端側のコラーゲン様ドメインと C 末端側のフィブリノーゲン様ドメインからなるハイブリッドタンパク質である。このドメイン構造は、茎状のコラーゲン様構造をもつという点で、マンノース結合タンパク (MBL) や補体 C1q と類似している。Ficolin は、MBL や C1q のように、3 量体がさらに重合しオリゴマーとして存在する。Ficolin の重要な機能の一つは、フィブリノーゲン様ドメインにより発揮される糖結合活性である。Ficolin の特異的糖結合活性¹⁾や Ficolin の結晶解析の結果^{2,3)} は、この分子が病原微生物のような非自己を識別できることを示している。現在、Ficolin はヒトでは 3 種類、マウスでは 2 種類が知られており、マウス Ficolin A はヒト L-Ficolin (血清型) に、マウス Ficolin B はヒト M-Ficolin (非血清型) に相同である⁴⁾。興味深いことに、Ficolin のいくつかは、MBL と同様、血中でセリンプロテアーゼ MASP と複合体を形成し、「レクチン経路」を介して補体系を活性化する⁵⁻⁷⁾。これまでの解析により、レクチン経路が特異的な分子基盤の上に成り立っていることが明らかになってきたが、Ficolin の真の生理的役割については依然明らかでない。

我々は、Ficolin A 欠損マウスの表現型解析と再構成実験から、その機能を検討してきた。その結果、Ficolin A は確かに補体レクチン経路を介して細菌の認識と排除に働き、

一方、Ficolin B はレクチン経路を介さずに細菌の排除に働くと推定された⁸⁾。

Ficolin は、アポトーシスを起こした細胞の認識にも関与していることが示唆されている⁹⁾。最近、我々は Ficolin とフィブリノーゲンとの相互作用に注目し解析を進めるなかで、いくつかの興味深い点を明らかにした。この結果は、Ficolin の機能ドメインがフィブリノーゲンと進化的起源を同じくしていることに加えて、その働きの上でも相互に深く関連していることを示唆している。今後、Ficolin の生理作用の真の標的と多岐能性がさらに明らかになるものと期待される。

参考文献

- 1) Endo Y. et al. *Immunogenet* 57:837 (2005)
- 2) Gariatti V. et al. *EMBO J* 26:623 (2007)
- 3) Tanio M. et al. *J Biol Chem* 282:3889 (2007)
- 4) Endo Y. et al. *Genomics* 84:737 (2004)
- 5) Matsushita M. et al. *J Immunol*, 164:2281 (2000)
- 6) Matsushita M. et al., *J Immunol*, 168:3502 (2002)
- 7) Liu Y. et al. *J Immunol* 175:3150 (2005)
- 8) Endo Y. et al. *Immunobiol* 212:371 (2007)
- 9) Kuraya M. et al. *Immunobiol* 209:689 (2005)

肺コレクチンによる自然免疫機構

黒木由夫^{1) 2)}、西谷千明^{1) 2)}、光澤博昭^{1) 2)}、佐野仁美^{1) 2)}¹⁾ 札幌医科大学医学部生化学第一講座、²⁾ CREST、JST

Innate immune functions by pulmonary collectins

Yoshio Kuroki¹⁾²⁾, Chiaki Nishitani¹⁾²⁾, Hiroaki Mitsuzawa¹⁾²⁾, Hitomi Sano¹⁾²⁾,¹⁾ Department of Biochemistry, Sapporo Medical University School of Medicine²⁾ CREST, JST

肺コレクチンのサーファクタント蛋白質 A と D (SP-A と SP-D) は、マンノース結合レクチンとともに、C型レクチンのコレクチン・グループに属する。SP-A と SP-D は、疎水性の SP-B と SP-C、および、特異リン脂質とともに、肺サーファクタントを構成する成分で、肺の生体防御を担っている。呼吸器は外界に開放しており、常に病原微生物侵入の危険に曝されているので、肺コレクチンによる自然免疫機構は重要である¹⁾。

SP-A ノックアウトマウスでは、smooth LPS の気管投与によって肺内炎症反応が有意に亢進する。SP-A は、ペプチドグリカン、ザイモサンおよび smooth LPS に結合しないが、これらのリガンドにより惹起される炎症性サイトカイン分泌と NF- κ B 活性化を有意に抑制した。さらに、SP-A は、Toll 様受容体 (TLR) 2 と 4 の細胞外ドメインに結合し、SP-A 存在下では、TLR 細胞外ドメインと上記リガンドとの結合が有意に抑制された。このことは、SP-A が TLR 細胞外ドメインに結合することによって、TLR-リガンド相互作用が阻害され、TLR 介在炎症反応が抑制されること^{3, 4)} を示唆している。

コレクチンは、細菌に直接結合し、オプソニンとしてマクロファージによる細菌貪食を促進することが知られている。一方では、肺コレクチンは細菌に結合できない条件下でも細菌貪食を促進することが

示され、オプソニン効果の他にもマクロファージによる細菌貪食促進の機構が存在することが明らかにされた。肺コレクチン存在下では、マクロファージにおけるスカベンジャー受容体 A やマンノース受容体の貪食受容体の細胞膜局在が有意に増加することが示され、そのことによって、マクロファージによる肺炎球菌や非定型抗酸菌の貪食が促進されると考えられる^{5, 6)}。

このように、肺コレクチンは、マクロファージを活性化することによって病原菌クリアランスに寄与する一方で、TLR との相互作用を介して過剰な炎症から肺組織を防御している。

〈参考文献〉

- 1) Kuroki, Y., et al.
Cell. Microbiol. in press (2007)
- 2) Murakami, S., et al.
J. Biol. Chem. 277:6830 (2002)
- 3) Yamada, C., et al.
J. Biol. Chem. 281:21771 (2006)
- 4) Kudo, K., et al.
J. Immunol. 172:7592 (2006)
- 5) Kuronuma, K., et al.
J. Biol. Chem. 279:21421 (2004)

生体防御レクチンである新規コレクチンファミリーの発見と その役割

若宮伸隆¹⁾、大谷克城¹⁾、坂本隆志²⁾、芥子宏行²⁾、福應温¹⁾、張成幸¹⁾、吉崎隆之¹⁾、
福田光子¹⁾、小山聡¹⁾、福澤純¹⁾、本村亘¹⁾、吉田逸朗¹⁾、鈴木定彦³⁾

¹⁾旭川医科大学・医学部・微生物、²⁾扶桑薬品工業・研究開発センター、³⁾北海道大学・人獣共通
感染症センター

Novel collectins of CL-L1, CL-P1, CL-K1 as host defense lectin

Nobutaka Wakamiya, Katsuki Ohtani, Takashi Sakamoto, Hiroyuki Keshi, Atsushi Fukuoh,
SeongJae Jang, Takayuki Yoshizaki, Mitsuko Fukuda, Satoshi Koyama, Jun Fukuzawa,
Wataru Motomura, Itsuro Yoshida, Yasuhiko Suzuki

¹⁾Department of Microbiology and Immunochemistry, Asahikawa Medical College,

²⁾Research and Development Center, Fuso Pharmaceutical Industries, ³⁾Department of
Global Epidemiology, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University

<はじめに>

コレクチンはC型レクチンと呼ばれる糖結合性蛋白質の一種で、その内部にコラーゲン様構造を有する特徴をもつ。本コレクチンは、1980年京都大学の川寄らによりMBLが報告された¹⁾。その後MBLの血中濃度が著しく低いヒトの一部がくり返し感染症に罹るとい現象が発見され、コレクチンが感染に対する生体防御に関わる可能性が指摘された²⁾。次いで、肺胞上皮から分泌されるサーファクタント蛋白として、SP-A、SP-Dの2つのコレクチン分子が明らかになった。今回、我々は、さらに新たな3つのコレクチン分子を発見し、その性状についての解析を行った。

1. 新規コレクチン遺伝子の発見

新規コレクチンは、蛋白質精製からのアプローチでは同定できず、ESTデータベースのスクリーニングから、コレクチンのCRD配列をもったヒト遺伝子クローンを数個発見する事ができた。その後クローン断片の発現場所から、CL-L1 (collectin liver 1)、CL-K1

(collectin kidney 1)、CL-P1 (collectin placenta 1) と名付けた3つの遺伝子をクローニングした^{3, 4, 5)}。

以下では、新規コレクチンのなかでもっとも良く解析進んでいるCL-P1を中心に概説する。

ヒトCL-P1cDNAは、742個のアミノ酸をコードする約2.2kbの塩基を有する遺伝子であり、予想されるアミノ酸配列からコラーゲン様領域とCRDを含むことより、コレクチンのファミリー分子であると考えられた。続いてマウスCL-P1遺伝子をクローニングし、両者の推定されるアミノ酸配列を用いたアライメントから全長は完全一致し、アミノ酸レベルで91%という非常に高い同一性を示すことを明らかになった。CL-L1、CL-K1両遺伝子でも、ヒトとマウス間の相同性を比較すると、89%、92%であることがわかり、これらの新規コレクチン分子は、種間の保存性が非常に高い遺伝子であることが推測された。

2. CL-P1の構造とその生物学的意義

CL-P1は、N末端から短い細胞内領域・膜貫通領域・コイルドコイル領域・コラーゲン様領域とC

末端に続く球状蛋白質という構造をもち、マクロファージスカベンジャー受容体A(SR-A)にその全体構造が、酷似していた。免疫組織染色では、CL-P1 は主に血管内皮に存在することが明らかになった。CL-P1 遺伝子発現細胞株における実験から、CL-P1 はアセチル LDL にあまり結合せず、酸化 LDL に特異的に結合する性質をもつことが明らかになった。次に微生物に対する結合では、蛍光標識された大腸菌・黄色ブドウ球菌・酵母を用いた実験で、使用したすべての微生物は発現細胞表面に結合し、酵母ではファゴサイトーシスに関与することが認められた。さらに、生理的に CL-P1 遺伝子を発現しているヒト血管内皮細胞における遺伝子ノックダウン実験により、これらの細胞では、酵母のファゴサイトーシスに CL-P1 が主に関与することが見出された。従来マクロファージが、異物の排除や清掃を担当すると提唱されているが、血管壁を構成する血管内皮細胞自体が清掃作用を有することが推測された。また、ラット総頸動脈における虚血再灌流実験では遷延性に CL-P1 が誘導され、その部位に酸化 LDL が取り込まれ、さらなる血管損傷への一因になる可能性が考えられた。一方、ゼブラフィッシュにおける遺伝子ノックダウン実験では体幹部の形態形成不全がみられ、その原因が血管形成不全に由来することが明らかになり、CL-P1 が胎生早期においては血管形成に関与することが推測された。

3. コレクチンの分子進化

新規コレクチン群の発見で、現時点では、6つのコレクチンファミリーがあると考えられる。それらはすべて、C型レクチンに属するものの、その分子進化については不明な点が多い。以前 R. Hillらは、コレクチン遺伝子の分子進化として、C型レクチンの源基遺伝子から、コラーゲンエクソン挿入とイントロン喪失によって、CRD領域が一つのエクソンでコードされるコレクチン分子が誕生したとする進化パターンを提唱した。しかし CL-P1 遺

伝子の発見から、膜型レクチンにコラーゲンエクソンの挿入によりまず CL-P1 型コレクチンが形成され、その後コラーゲンエクソン増幅とイントロン欠損が生じることによって、2段階でコレクチン遺伝子の原型(CL-L1, CL-K1)ができる可能性が考えられた。さらに近年、ゲノムプロジェクトが急速に進展し、多くのC型レクチンやコレクチン関連の遺伝子構造が明らかになり、新たなコレクチンの分子進化モデルが考えられる情報ができているので、それらについても概説する。

<参考文献>

1. Kozutsumi Y. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 658 (1980)
2. Super M. et al. *Lancet* 2: 1236 (1989)
3. Ohtani, K. et al. *J. Biol. Chem.* 274: 13681 (1999)
4. Ohtani, K. et al. *J. Biol. Chem.* 276: 44222 (2001)
5. Keshi, H. et al. *Microbiol. Immunol.* 50: 1001 (2006)

Pentraxin3 の炎症反応における意義とその役割

奥谷大介¹⁾²⁾

¹⁾岡山大学医学部腫瘍胸部外科, ²⁾国立病院機構南岡山医療センター

The Role of Long Pentraxin 3 in Inflammatory Responses

Daisuke Okutani¹⁾²⁾

Department of Cancer and Thoracic Surgery, Okayama University¹⁾

Department of Surgery, Minami-Okayama Medical Center²⁾

〈概説〉

生体に加わる感染性または非感染性の侵襲は、呼吸・代謝・免疫などの機能を変化させて、侵襲に対する生体の恒常性を維持する反応を引き起こす。この反応において免疫系液性因子の役割は特に重要であり、細胞間の情報伝達物質として、細胞の分化・増殖による免疫応答、炎症や代謝反応の調節をする。Pentraxin は体液性免疫の一部をなす重要な急性反応性蛋白であり、補体の活性化や好中球による食作用の刺激などの生理作用を持つ。Pentraxin は Long Pentraxin (LP) と Short Pentraxin (SP) の 2 種類に大別され、共に C-末端 Pentraxin ドメインを構成成分として有している。LP は、構造上 C-末端 Pentraxin ドメインに結合する unrelated Long N-末端ドメインを有している点において、SP と区別される。1994 年 Emsley により発見された PTX3 は tumor necrosis factor-stimulated gene-14 (TSG14) と呼ばれ、元々、血管内皮細胞の IL-1 inducible gene または線維芽細胞の TNF- α inducible gene として認識されていた¹⁾。IL-1・TNF- α ・リポ多糖類(LPS)などの炎症シグナルに反応して血管内皮細胞・線維芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞・滑膜細胞・上皮細胞などの全身の細胞より、PTX3 の産生が誘発される¹⁾。また正常な状態では、血液中の PTX3 レベルは極めて低いが、一旦激しい炎症（例えば、急性心筋梗塞・感染・自己免疫性疾患・退行性疾患など）が起こるとそのレベルは急激に上昇する。更に敗血症などでは、

PTX3 が疾患の活動性や重症度と相関を示すと報告されている。

PTX3 と CRP の相関関係は報告されておらず、PTX3 は CRP と無関係に、炎症の程度を鋭敏に反映する指標として臨床において重要な役割を果たすと考えられている²⁾。一層の研究により、PTX3 の免疫学的意義や PTX3 の臨床に関連するそのより具体的なメカニズムの解明が必要である。

〈参考文献〉

- 1) 奥谷大介.
日本臨床免疫学会会誌. 29:107-13(2006)
- 2) Okutani D et al.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 292:
144-53(2007)

ガレクチンファミリーが見せる機能の特異性と非特異性

中村隆範、西 望、東海林博樹、山本ひとみ、Lu Liang-Hao

香川大学・医学部・生体分子医学講座・分子細胞機能学

Functional specificity and commonness of galectin family

Takanori Nakamura, Nozomu Nishi, Hiroki Shoji, Hitomi Yamamoto, Liang-Hao Lu

Department of Endocrinology, Faculty of Medicine, Kagawa University

ガレクチンは β -ガラクトシド構造（ラクトース、ラクトサミンなど）を特異的に認識する動物レクチンの一群のファミリーである。平林らによって3つのサブタイプ（プロト型、キメラ型、タンデムリピート型）に分類され、各々が細胞増殖・アポトーシスや細胞接着・遊走など基本的な生物活性に関わっている。ガレクチンは生合成の過程で細胞外に分泌するためのシグナル配列を欠くことから、基本的には細胞質あるいは核内に大部分は留まっているが、実際には細胞表面や細胞外マトリックスなど細胞外に分布していることも観察されている。従って、ガレクチンの作用を考える時、細胞外と細胞内の両方向からの働きに注意する必要がある。我々はこれまで、細胞外からのガレクチンファミリーの作用を明らかにするため、末梢白血球や各種培養細胞を使って、主にタンデムリピート型ガレクチン（ガレクチン-8、-9 など）の免疫系細胞の活性化と糖鎖認識を介した情報伝達機構の解析を行った。その結果、ガレクチン-9 が T 細胞 (Jurkat, Molt-4) のアポトーシス¹⁾ と細胞接着の両応答を惹起し、ガレクチン-8 は好中球や T 細胞の細胞接着を誘導することを見出した²⁾。さらに接着誘導に関わるガレクチン-8 の標的分子として、好中球からインテグリン- α M、Jurkat 細胞からインテグリン- α 4 を同定した。

また、情報伝達系の解析から Jurkat 細胞の接着誘導にはガレクチン-8 とインテグリンとの結合に始まる細胞内リン酸化カスケードの活性化とアクチンフィラメントの形成にあると考えられた。一方、アポトーシスに関与するガレクチン-9 の標的分子の同定には未だ成功していないが、アポトーシス経路にはカスパーゼ（細胞内のプロテアーゼの活性化が関与する経路）に依存する経路としない経路の2種が複雑にからみ合っているものと考えられた³⁾。最近、細胞内でのガレクチンの機能を探る目的で、ガレクチン-9 の細胞内での役割についても解析を進めている。

培養細胞系は、ガレクチンファミリーの機能や活性の違いを比較したり、ガレクチンの基本的な細胞応答機構を解析する上で便利なシステムである。本シンポジウムでは、ガレクチンファミリーの分子種毎の機能の違いと共通性を簡単な実験系を使って紹介しながら、ガレクチン研究の現状と課題について報告したい。

<参考文献>

- 1) Y. Kashio et al. J. Immunol. 170: 3631 (2003)
- 2) N. Nishi et al. Glycobiology 13: 755 (2003)
- 3) L.-H. Lu et al. J. Biochem. 141: 157 (2007)

カプトガニにおける補体系活性化機構の解析

有木 茂¹⁾、福岡貴彰¹⁾、高原修作¹⁾、尾崎 彩¹⁾、

遠藤雄一²⁾、藤田禎三²⁾、川畑俊一郎¹⁾

¹⁾九大・理・生物、²⁾福島県立医大・医・免疫

Studies on the activation mechanisms of complement system in horseshoe crabs

Shigeru Arik¹⁾, Takaaki Fukuoka¹⁾, Shuusaku Takahara¹⁾, Aya Ozaki¹⁾,

Yuichi Endo²⁾, Teizo Fujita²⁾, Shun-ichiro Kawabata¹⁾

¹⁾Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University

²⁾Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

<目的>

補体系は、哺乳類の生体防御において重要な役割を果たしている。これまで、補体系のタンパク質は後口動物からのみ同定されていたが、最近になり、前口動物であるカプトガニからも補体因子 C2/Bf および C3 のホモログが同定された¹⁾。本研究ではカプトガニ補体系の活性化の分子機構を解明することを目的に研究を行なった。

<方法>

- 1) グラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌を日本産カプトガニの血漿とインキュベートし、細菌表面に結合した C3 の抗原量をフローサイトメトリーで測定した。
- 2) 各種細菌表層成分と日本産カプトガニの血漿を混合し、抗カプトガニ C3 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、カプトガニ補体系を活性化する細菌表層成分を同定した。

<結果>

- 1) グラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌、いずれの菌体表面にもカプトガニ C3 は結合した。カプトガニ血漿中には、補体系活性化に必要な成分がそろって

いると考えられる。

- 2) カプトガニ補体系は、リポ多糖によって最も強く活性化された。また、リポ多糖による補体系活性化はマグネシウムイオン依存的であった。

<考察>

カプトガニ補体系は、グラム陰性菌の表層成分であるリポ多糖によって強く活性化される。また、リポ多糖による補体系活性化には体液凝固系のプロテアーゼが関与している可能性がある。カプトガニが生息する海水中に存在する細菌は、そのほとんどがグラム陰性菌である。したがって、カプトガニはグラム陰性菌に対する生体防御機構を進化させたと考えられる。

<参考文献>

- 1) Zhu, Y. et al. EMBO J. 24: 382 (2005)

MASP 欠損マウスにおける *Staphylococcus aureus* に対する食作用の解析

岩城大輔¹、菅野和子¹、高橋 実¹、遠藤雄一¹、松下 操²、藤田禎三¹

¹福島県立医科大学・医・免疫、CREST、²東海大学・工・生命化学

The ability of mannose binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs)-deficient mice to phagocytose *Staphylococcus aureus*

Daisuke Iwaki¹, Kazuko Kanno¹, Minoru Takahashi¹, Yuichi Endo¹, Misao Matsushita², Teizo Fujita¹

¹Department of Immunology, Fukushima Medical University and CREST, Japan Science and Technology Agency

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

[はじめに]

補体レクチン経路は、mannose-binding lectin (MBL) および ficolin が、体内に侵入してきた病原体表面糖鎖を直接認識し活性化を起こす。MBL および ficolin には、3 種の MBL-associated serine protease (MASP-1、MASP-2、MASP-3) と small MBL-associated protein (sMAP) が結合し、複合体を形成している。レクチン経路活性化の際に、MASP-1 は補体成分 C3 を限定加水分解により直接活性化し、MASP-2 は C4 と C2 を活性化することが *in vitro* 解析により明らかとなっている¹⁾。MASP-2 により活性化された C4 と C2 は、C3 転換酵素 (C4b2a) を形成する。活性化した C3 (C3b) は、病原体表面に結合し、オプソニンとして作用する。MASP-3 は、MASP-1 とのオルタナティブスプライシングにより産生され、MASP-1 と共通の N 端領域 (H 鎖) と独自のセリンプロテアーゼドメイン (L 鎖) からなるが、その生理的機能は不明である。また、sMAP は、オルタナティブスプライシングにより産生される MASP-2 の短縮型タンパク質であり、セリンプロテアーゼドメインを欠失しており、その機能について全く明らかではなかった。これまでに私たちは、3 タイプの MASP 欠損マウス (MASP-1/3 KO、sMAP/MASP-2

KO、all MASPs KO マウス) を作成している。sMAP/MASP-2 KO マウスの解析をおこなったところ、sMAP は MASP-2 の MBL への結合を阻害し、MBL-MASP 複合体による C4 活性化を抑制することを明らかにした²⁾。本研究では、*Staphylococcus aureus* に対するファゴサイトーシスにおける MASP の役割を明らかにする目的で、MASP 欠損マウスの解析をおこなった。

[方法]

- 1) FITC 標識 *S. aureus* をマウス腹腔内に投与し、1 時間後、腹腔内細胞を採取し、細胞内に取り込まれた細菌数を FACS 解析により測定した。
- 2) *S. aureus* を腹腔内感染させ、感染後 3 日目のマウスの臓器 (脾臓、腎臓、肝臓、肺) ホモジェネートを寒天培地で培養し、形成された細菌コロニー数より各臓器における残存細菌数を計測した。

[結果]

- 1) MASP-1/3 KO マウスと all MASPs KO マウスの腹腔内細胞のファゴサイトーシスレベルは、ともに野生型マウスの約 60% で、有意な低下が認められた。
- 2) *S. aureus* 感染後の各臓器における細菌生存数は、MASP-1/3 KO マウスおよび all MASPs KO マウスにおいて野生型マウスを上回り、有意な差が見られた。

[考察]

MASP-1/3 KO マウスおよび all MASP KO マウスにおいて、ファゴサイトーシスの有意な低下が認められたことから、MASP-2 よりも MASP-1 (あるいは MASP-3) がオプソニン化においてより重要な役割を果たしていると考えられる。今後、リコンビナント MASP を用いた再構成実験をおこない、C3 オプソニン化における各 MASP の役割についてさらに解析をおこなう予定である。

[文献]

- 1) Matsushita M. et al. J. Immunol. 165: 2637 (2000)
- 2) Iwaki D. et al. J. Immunol. 177: 8626 (2006)

L-ficolin/MASP 複合体は莢膜多糖体の *N*-アセチルノイラミン酸を介して B 群レンサ球菌に結合し補体経路を活性化する

青柳 祐子¹⁾, Elisabeth E. Adderson²⁾, Craig E. Rubens³⁾, John F. Bohnsack⁴⁾, 関 進基⁵⁾, 松下 操⁵⁾, 藤田 禎三⁶⁾, 奥脇 義行¹⁾, 高橋 信二¹⁾

¹⁾女子栄養大・栄・微生物学, ²⁾St. Jude Children's Research Hospital, ³⁾University of Washington, ⁴⁾University of Utah, ⁵⁾東海大・工・生命化学, ⁶⁾福島県立医大・医・免疫学

L-ficolin/MASP complexes bind to group B streptococci predominantly through *N*-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide, and activate the complement pathway

Youko Aoyagi,¹⁾ Elisabeth E. Adderson,²⁾ Craig E. Rubens,³⁾ John F. Bohnsack,⁴⁾ Jin G. Min,⁵⁾ Misao Matsushita,⁵⁾ Teizo Fujita,⁶⁾ Yoshiyuki Okuwaki,¹⁾ Shinji Takahashi¹⁾

¹⁾Division of Microbiology, Joshi-Eiyoh University, ²⁾Department of Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, ³⁾Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, ⁴⁾Department of Pediatrics, University of Utah, Salt Lake City, ⁵⁾Department of Applied Biochemistry, Tokai University, ⁶⁾Department of Immunology, Fukushima Medical University

〈はじめに〉

B 群レンサ球菌 (GBS) は、新生児の敗血症や髄膜炎の最も一般的な原因である。出産において GBS に汚染された大部分の新生児は発症せず、しかしこれらの非感染児の多くは、保護的なレベルの莢膜多糖体 (CPS) 特異抗体を欠いている。補体レクチン経路は、CPS 特異抗体欠失血清による GBS のオプソニン化の潜在的なメカニズムである。実際、L-ficolin は血清型 III 型 GBS の CPS¹⁾ とリポタイコ酸 (LTA)²⁾ に結合することが明らかにされている。

本研究で私達は、MBL/MASP 複合体と L-ficolin/MASP 複合体が、GBS の種々血清型株に結合してレクチン経路を活性化するかどうか、またレクチンによって認識される GBS 細胞上の分子を明らかにした。

〈方法〉

GBS への L-ficolin と MBL の結合は、GBS と血清を反応させた後、上清中の残存量を ELISA により測定し、求めた。L-ficolin/MASP による C4 消費は、500 mM NaCl 存在下で GBS と血清を反応させて L-ficolin を結合させ、次いで C4 と反応させた後、上清中の残存 C4 量を ELISA により測定し、求めた。精製 CPS, B 群特異多糖体 (GBPS), LTA および CPS と GBPS を構成する単糖への L-ficolin 結合は、50%阻害濃度 (IC50) として求めた。固相化 *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) プレートに精製 L-ficolin と阻害物質を加え反応させた後、

GlcNAc に結合した L-ficolin 量を ELISA により測定し、阻害曲線から IC50 を求めた。

〈結果と考察〉

MBL は供試 56 株のいずれにも結合せず、一方、L-ficolin は血清型 Ib, V, VI, VIII および RDP 型 III-2 と III-3 の全ての株 (37 株) に結合した。L-ficolin/MASP 複合体が結合した株はいずれも C4 を消費した。L-ficolin は、精製した血清型特異 CPS と GBPS の全てに結合したが、しかし精製した LTA には結合しなかった。全ての血清型特異 CPS に存在する *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) の IC50 は GlcNAc の IC50 と同モル濃度であった。ノイラミニダーゼ処理 GBS と未処理 GBS への L-ficolin の結合曲線は、L-ficolin 結合を GBS の NeuNAc 含有量に対してプロットした際に、ほぼ同様であった。さらに L-ficolin は、野生株に結合するが、莢膜欠失相同変異株と CPS の NeuNAc 欠失相同変異株には結合しなかった。

私達は、L-ficolin/MASP 複合体が CPS の NeuNAc との相互関係を介して GBS に結合すると結論づけた。

〈参考文献〉

- 1) Aoyagi, Y. *et al.* J. Immunol. 174:418 (2005)
- 2) Lynch, N. *et al.* J. Immunol. 172:1198 (2004)

モルモット MBL の精製と機能解析

小野千明、立石恒一郎、松下 操

東海大学・大学院工学研究科・工業化学専攻

Purification and functional characterization of guinea pig MBL

Chiaki Ono, Koichiro Tateishi, Misao Matsushita

Master Course of Industrial Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokai University

〔目的〕

マンノース結合レクチン (MBL) は血清中に存在する生体防御レクチンであり、セリンプロテアーゼの MASP と複合体を形成している。MBL が病原体表面のマンノースや N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 等の糖鎖をカルシウム依存的に認識して結合することにより補体系を活性化する。現在、MBL は哺乳類ではヒト、マウス、ラット等で見いだされているが、モルモットについては未だ報告されていない。本研究では、モルモット血清より MBL を精製し、レクチン経路及び第二経路の活性化について検討した。

〔方法〕

- 1) モルモット血清より GlcNAc-agarose によるアフィニティークロマトを行い、マンノース溶出画分を得た。次に、MonoQ を用いて更に精製を行い、MBL と推定されるレクチンを得た。
- 2) 合成基質を用いてプロテアーゼ活性を測定した。
- 3) モルモット MBL 画分の SDS-PAGE を行い、PVDF 膜へ転写後、目的のバンドを切り出し、シーケンシングを行った。
- 4) モルモット MBL 画分をマンナン処理ヒツジ赤血球 (EM) と反応させた。その後ヒト C4、C4 欠損モルモット血清 (C4DS) の順に反応させ、溶血の程度を測定した。
- 4) EM をモルモット MBL 画分と反応後にセリンプロテアーゼ阻害剤である DFP で処理または未処理

の後に C4DS と反応させ、溶血の程度を測定した。

〔結果〕

- 1) モルモット血清の GlcNAc-agarose/マンノース溶出画分を MonoQ で分画し、還元下 32kDa の分子サイズを持つ、MBL と推定されるレクチンが得られた。この成分に一致して高いプロテアーゼ活性が見られた。
- 2) シーケンシングにより本成分の N 末端側のアミノ酸配列と内部配列を決定した。
- 3) モルモット MBL 画分と反応させた EM は、C4 及び C4DS と反応させることによって溶血した。
- 4) モルモット MBL 画分と反応させた EM は C4 がなくても C4DS で溶血したが、DFP 処理により溶血の程度は低下した。

〔考察〕

今回精製したレクチンは糖結合性や分子量から見てモルモット MBL であると考えられる。溶血活性の結果から、モルモット MBL 画分には C4 と C2 活性化能を持つセリンプロテアーゼがあり、レクチン経路を活性化する。また、ヒト MBL-MASP と同様に、モルモット MBL-セリンプロテアーゼ複合体は第二経路も活性化する可能性がある。

〔文献〕

- 1) Selander, B. et al. J. Clin. Invest. 116:1425 (2006)

遺伝性 GPI アンカー欠損症と治療について

村上良子¹、前田裕輔¹、Antonio Almeida²、Anastasios Karadimitris²、木下タロウ¹、

¹大阪大学微生物病研究所 免疫不全疾患研究分野

² Department of Haematology, Imperial College London, Hammersmith Hospital, UK

Inherited GPI deficiency and its treatment

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

² Department of Haematology, Imperial College London, Hammersmith Hospital, UK

[はじめに]

GPI 欠損症として知られている発作性夜間血色素尿症(PNH)は、造血幹細胞の *PIG-A* 遺伝子に体細胞突然変異がおこり血球細胞においてのみ GPI アンカー型蛋白の発現が欠損する後天的な疾患である¹。*PIG-A* は GPI 生合成の最初のステップに必須の蛋白で、*Piga* ノックアウトマウスは全身で GPI アンカー型蛋白が発現しないために胎生致死となる。

昨年の本学会で我々は主症状として深部静脈血栓症と欠神発作を呈し、劣性遺伝形式を持つ GPI アンカー欠損症の 2 家系を報告した²。その後の治療経過を追加報告する³。

[方法および結果]

1. 全く関係のない 2 家系から、いとこ結婚により計 3 人の患児が出生した。門脈の血栓症と欠神発作を共通症状としてもつが、他に発達の異常はみとめられなかった。
2. 末梢血、および線維芽細胞の FACS 解析により GPI アンカー型蛋白の発現の低下がみとめられ、その程度は細胞種により異なっていた。赤血球系では CD59, DAF の発現低下は軽微で、また非血球細胞である線維芽細胞においても CD59 の発現低下がみられ、このことは PNH と全く異なる

疾患であることを示す。

3. 患者由来の B 細胞株の脂質解析により、原因遺伝子は *PIG-M* で、プロモーター部位の GC box の点変異により、この部分を認識する Spl の結合が阻害された結果遺伝子の発現が激減していることがわかった。
4. ChIP 解析によりこの部分のヒストンアセチル化が減少していることがわかったので、患者由来の B 細胞株を HDAC(histone deacetylase)阻害薬である Na butyrate で処理すると *PIG-M* の発現が戻った。
5. 患児の一人は難治性のでんかんで日常生活が困難な状態であったが、Na phenylbutyrate の投与により、好中球における GPI の発現も戻り、けいれん発作もなくなった。

[考察]

本来 GPI の完全欠損は胎生致死であり、*PIG-M* は GPI 生合成に必須の遺伝子である。患者はプロモーター部位の異常によって basal な発現は激減しているが、胎生期の発達はほぼ正常である。このことは *PIG-M* がさまざまな転写因子によって発現の調節を受けていることを示す。また患者は赤血球における GPI アンカー型蛋白の発現がほぼ正常であるた

めに PNH のような溶血発作をおこさない。末梢血の FACS 解析をしないと GPI の欠損があることがわからないので、原因不明のけいれんや血栓症として病気を見過ごされている可能性がある。小児科領域の臨床医にこの病気を広く知ってもらい、さらなる症例の集積とモデルマウスの作製により、主症状である血栓症とけいれん発作にどのような GPI アンカ一型蛋白が関係しているのか明らかにしたい。

[文献]

- 1) Takeda J., et al., Cell 73: 703 (1993)
- 2) Almeida A.*, Murakami Y, * et al., Nature Med. 12: 7846(2006)
- 3) Almeida A. *, Murakami Y. * et al., N Engl J Med 356: 161641(2007)

*:equally contributed

活動性ループス腎炎の糸球体における、C3a receptor (C3aR) の発現

水野正司¹⁻³⁾、Stephanie Blanchin³⁾、Philippe Gasque³⁾、西川和裕⁴⁾、松尾清一¹⁾

¹⁾名古屋大学大学院大学腎臓内科、²⁾同 腎不全治療システム学講座、

³⁾カーディフ大学医学部医学生化学&免疫学講座、⁴⁾愛知医大腎臓内科

Complement C3a receptor was highly found in the glomeruli of inflamed human lupus nephritis.

Masashi Mizuno¹⁻³⁾, Stephanie Blanchin³⁾, Philippe Gasque³⁾, Kazuhiro Nishikawa⁴⁾, Seiichi Matsuo¹⁾

Dept. of Nephrology¹⁾ & Renal Replacement Therapy²⁾, Internal Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan, Medical Biochemistry & Immunology, School of Medicine Cardiff University, Cardiff, UK³⁾, Department of Internal Medicine, Aichi Medical University⁴⁾.

[はじめに]

C3 はアナフィラトキシンとして、C5a と共に良く知られている。一方で、膜性腎症、IgA 腎症、膜性増殖性糸球体腎炎等の腎炎において、その糸球体に補体が免疫グロブリンと共に補体が沈着が観察される。ループス腎炎の組織学的に活動性の高い症例では、大量に補体の沈着が認められる。活動性のあるループス腎炎では、補体の著しい活性化が起っているが、その際に産生される C3a のレセプターが、腎臓でどのようになっているのか? という点について興味深い。はじめに C3aR の発現の変化を *in vitro* で検討し、実際にヒト腎生検で C3aR の発現を検討した。

[方法]

1. Human C3aR を transfection した K562 細胞で C3aR に対する抗体の確認を行った。
2. Human C3aR の発現している HMC1 細胞を用いて、C3a による刺激、IFN- γ による刺激後の C3aR の発現の変化を見た。THP1 細胞を用いて、IFN- γ 刺激による発現の変化をみた。
3. 腎腫瘍で摘出した腎臓の正常部分を用いて、C3aR の発現を観察した。
4. ループス腎炎、膜性腎症、膜性増殖性腎症、IgA 腎症、微笑変化型ネフローゼ症候群、相乗糸球体硬

化症、ANCA 関連腎炎、抗基底膜抗体腎炎、糖尿病性腎症の各疾患について、ヒト腎生検組織を用いて、C3aR の発現を調べた。

また、補体、免疫グロブリンの沈着も観察した。

5. ループス腎炎について、C3aR の発現を半定量化して組織学的活動性との関係を調べた。
6. ループス腎炎の組織型と SLE の疾患活動性との比較を行った。

[結果]

1. 我々の用いた抗 C3aR 抗体、BiG1 と 2 は、human C3aR に対して特異的に結合した。
2. MHC1 細胞を用いて、C3a の刺激を行うと、C3aR は down-regulation した。C3aR の up-regulation、down-regulation は、同一の刺激によっても、細胞の種類で異なることが示された。
3. 正常腎臓では、IF 上、C3aR は、抗体による蛋白レベルでの発現は認められなかった。
4. 慢性腎炎の組織について、症例数は限られてはいたが、ループス腎炎の糸球体で 42.9% が陽性であったが、他の腎炎では陰性であった。尿細管については、どの切片でも陰性であった。
5. ループス腎炎について、組織学的活動性と C3aR の発現の強さには、相関が認められた。
6. ループス腎炎での C3aR の分布は、IgG の沈着

とほぼ一致して観察された。一部は血管内皮にも分布していた。

[考案]

C3aR の up-regulation、down-regulation は、状況によって、変化する可能性が示唆された。ループス腎炎は、最近の報告で、C3aR が重要な役割を担っている可能性が示されており¹⁾、今回我々の報告で、特に活動性の高いループス腎炎の糸球体に C3aR の発現が見られることが多いことは興味深いことと思われる²⁾。

[文献]

- 1) Bao L. et al., J Immunol 173:4190(2005)
- 2) Mizuno M. et al., Am J Kidney Dis 49:598(2007)

アナフィラトキシン C5a を阻害する相補性ペプチド AcPepA の解析

岡田則子¹、Lewis Hau¹、小野文子²、寺尾恵治²、水江由佳³、朝井鈴佳¹、岡田有武⁴、
宮本瑞夕¹、岡田秀親^{4,5}

¹名古屋市立大学医学研究科免疫学分野、²医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、
³札幌イムノダイアグノスティック、⁴(株) 蛋白科学研究所、⁵福祉村病院長寿医学研究所

Analysis of Ac-PepA complementary peptide which inhibits the activity of
anaphylatoxin C5a.

Noriko Okada, Lewis Hau, Fumiko Ono, Keiji Terao, Yuka Nizue, Suzuka Asai, Alan
Okada, Mizuyu Miyamoto, Hidechika Okada

Dept of Immunology, Nagoya City UNiv Grad Sch Med Sci, Tsukuba Promate Res Cent,
Sapporo Immuno-diagnostics. Ltd, Inst Protein Sci. Ltd, Fukushima Hospital Choju
Med Inst.

(はじめに)

C5a アナフィラトキシンは、敗血症や多臓器不全等の重篤な病態の要因のひとつと考えられている。その C5a の作用を阻害する方法として、C5a レセプター阻害剤が数種類開発されている。しかし、炎症時には C5aR の発現増強が起こるため治療効果を発揮できなかった。これに対し、リガンドである C5a に対する抗体が盲腸結札穿孔腹膜炎モデルなどで有効性を発揮することが報告されている。我々は、C5a アナフィラトキシンに対して特異的に強い阻害作用を持つ 17 アミノ酸から成る相補性ペプチドを創生した¹⁾。

(方法と結果)

相補性ペプチド PepA は分子比 1 : 10 で C5a の活性を抑制する。ラット LPS ショック死動物実験モデルにおいて、PepA の静脈注射で全例を救命できた。ラットでの血中半減期は 1 分と短期であった。アミノ末端 (N 末) のアラニンのアセチル化した

AcPepA は生体内での安定性が増し、さらに強い抑制効果を発揮することをモルモットおよびラット皮内反応にて確かめた²⁾。カニクイザル 7 頭に致死量の LPS (4mg/kg) を投与しエンドトキシンショック病態が起こり始めた 30 分後から AcPepA を 2 mg/kg/hr で 4 時間静脈内持続投与において、7 頭のサル全てを救命することができた。救命されたサルの組織および血漿の解析により、肺組織等への白血球の浸潤は同様に誘起されるが、ショックの後期反応因子である HMGB1 や MIF の血漿中への放出が抑制された。

(考察)

重篤な敗血症患者の救命に C5a 阻害ペプチド AcPepA が有用であると推察される。

(参考文献)

- 1) Fujita E. et al. J Immunol, 172:6382-6387, 2004
- 2) Okada, N. et al. Microbiol. Immunol. 51: 439-443, 2007

補体 C5a リセプターを介した肥満細胞内カルシウム導入機構

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分野

Mechanisms of C5a receptor dependent Ca^{2+} entry in mast cells

Hiroshi Nishiura, Tetsuro Yamamoto

Dept. of Mol. Pathol., Faculty of Med. and Pharm. Sci., Kumamoto Univ., Kumamoto, Japan

【はじめに】

リボソーム蛋白 S19(RP S19)二量体が、補体 C5a 刺激によるモルモット肥満細胞からのヒスタミン放出を阻害することを発見し¹⁾、肥満細胞上の補体 C5a リセプター(C5aR)は、好中球上のものと同様であると考えていた。しかし、今回、新たに RP S19 二量体擬似蛋白質として作成した C5a/RPS19 キメラ(C27R-G73D-C5a- Δ AGQVAAANKKH)を用いた検討より、partial agonist である事を示唆する結果を得たので、その細胞内分子機構と共に報告する。

【方法】

I) C5a および C5a/RPS19 キメラを用いて、ヒトおよびモルモット単球・好中球に対するアゴニスト・アンタゴニスト作用が、RP S19 二量体と同様に再現されることを検討した II) C5a/RPS19 キメラによる C5a 刺激ヒスタミン放出への阻害効果を、モルモットでは血漿成分の漏出、ヒト肥満細胞 HMC-1 株では放出ヒスタミン量の測定により評価した。III) C5a/RPS19 キメラによる C5a 刺激 HMC-1 細胞内カルシウム放出への阻害効果を、Fra-2AM を用いた蛍光測定により評価した。IV) C5a/RPS19 キメラによる C5a 刺激 HMC-1 細胞内 G 蛋白依存シグナルへの阻害効果を、PI3-K/Akt および ERK-K 経路についてウエスタン法を用いて検討した。

【結果】

I) C5a/RPS19 キメラは、C5a モルモット皮内注により出現する単球・好中球浸潤像を、単球優位浸潤像に変化させた。II-1) 低濃度 C5a/RPS19 キメラは、C5a モルモット皮内注により出現する血漿成分漏出を阻害した。HMC-1 細胞を用いた検討でも、同様の結果を得た。II-2) 高濃度 C5a/RPS19 キメラは、モルモット皮内の血漿成分漏出を惹起した。HMC-1 細胞を用いた検討でも、同様の結果を得た。

III-1) 低濃度 C5a/RPS19 キメラは、C5a により出現する HMC-1 細胞内カルシウム放出を阻害した。III-2) 高濃度 C5a/RPS19 キメラは、HMC-1 細胞内カルシウム放出を惹起した。III-3) 高濃度 C5a/RPS19 キメラ刺激 HMC-1 細胞内カルシウム濃度上昇は、低濃度のカルシウムキレート剤である EGTA により阻害された。IV-1) 高濃度 C5a/RPS19 キメラは、C5a により出現する PI3-K/Akt 経路を阻害した。IV-2) 高濃度 C5a/RPS19 キメラは、ERK-K 経路を惹起した。

【考察】

C5a 刺激による肥満細胞内のカルシウム濃度上昇が、ヒスタミン放出機構である。このカルシウム導入の担い手は、セカンドメッセンジャーである PLC を介した PI3 依存性の Endoplasmic Reticulum 膜のカルシウムチャンネルおよび Plasma Membrane のカルシウムチャンネルである²⁾。しかし、ヒスタミン放出に至るまでの詳細な解明には至っていない。我々は、RP S19 二量体刺激 C5aR 介在性 ERK-K 経路依存性の肥満細胞内カルシウム濃度上昇が、細胞外カルシウムに依存する事を発見した。今回、C5aR 介在性 G 蛋白質依存性/PI3 非依存性 Plasma Membrane のカルシウムチャンネルの働き³⁾を基に、ヒスタミン放出に至るまでの機構について議論したい。

【文献】

- 1) Tokita, K., Yamamoto, T. Lab. Invest. 84: 1174 (2004)
- 2) Luca M. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery 1: 105 (2006)
- 3) Hiroyuki W., et al. Nature 434: 1271 (2003)

CD46 依存性の麻疹ウイルス株の interferon 応答能の解析

新開大史¹⁾、谷口光恵²⁾、田辺真佐子²⁾、松本美佐子¹⁾、瀬谷 司¹⁾

¹⁾ 北海道大学大学院医学研究科、²⁾ 大阪府立成人病センター研究所

High type I IFN induction by CD46-adapted measles virus strains

Masashi Singai¹⁾, Mitue Kurita-Taniguchi²⁾, Masako Tanabe²⁾, Misako Matsumoto¹⁾, Tsukasa Seya¹⁾

¹⁾ Department of Microbiology and Immunology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku Sapporo 060-8638 Japan,

²⁾ Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Higashinari-ku, Osaka 537-8511,

<はじめに>

Type I Interferon (IFN)は alpha と beta があり、IFN-beta がウイルスなどの細胞応答として早期に誘導されることが知られていた。IFN-beta は谷口によって 1979 年にクローニングされ、interferon-regulatory factors (IRFs) という複数の転写因子がその誘導に関与することが継続研究で報告されてきた。IFN-beta は ISRE (interferon-stimulated regulatory element) というエレメントを promoter に含み、IRF-3 が ISRE の positive regulatory domain 3 (PRD3) に結合することが判明した。IRF-3 が TBK1, IKKepsilon という 2 種の kinase によってリン酸化を受け、ダイマーを形成して転写因子として核内に移行することが間もなく判明した。しかし、ウイルス感染において何が IRF-3 を活性化するのか長らく不明であった。ごく最近、ウイルスの産生する 2 重鎖 RNA が細胞膜で Toll-like receptor 3 (TLR3)、細胞質内で RIG-I/MDA5 によって検知されることが判明し、これらの下流経路をたどれば IRF-3 の活

性化に分子カスケードとして行き着くことが推定されている。

我々は CD46 が麻疹ウイルス馴化株のレセプターとして同定されて以来長畑株 (NV) という馴化株を用いて CD46 依存性の麻疹ウイルス応答をヒト樹状細胞などで検討してきた。その後 CD150 (SLAM) が麻疹ウイルスの primary receptor と同定され、CD46, CD150 の応答の相違がテーマの 1 つになっている。樹状細胞は両方を発現するが、上皮細胞 (麻疹ウイルスの初期標的と考えられている) は CD46 しか発現しない。樹状細胞も上皮細胞もウイルスに応答して IFN-beta を誘導する経路が活性化することが知られている。さらに上皮特異的なレセプターが存在するという仮説も提示されている。

本研究は CD46, CD150 が樹状細胞、上皮細胞 (CD150 を強制発現した) において如何なる経路で IFN-beta を誘導するかを検討し、CD46 適応の馴化株が野外株と異なるメカニズムで強力な IFN-inducer となることを報告する。

<方法>

CD46 は STc/Cyt2 isotype を用いた。CD150 は当研究室で cDNA cloning した。これらを発現ベクター (pME18s) に組み込んで A549 上皮細胞に発現させた。IFN promoter assay は 125-luc を用いたレポーターで行なった。IRF-3 のリン酸化、ダイマー形成は既報に準拠して行なった。麻疹ウイルス株は阪大微研、公衆衛生研究所、国立感染研などから頒布された。TLR3, RIG-I/MDA5 の下流分子の同定と機能査定は既報に譲る。Genechip は Affimetrics の U60A を用いて解析した。IFN は mRNA と蛋白レベルも測定した。

<結果>

樹状細胞において NV は野外株より 100 倍以上複製効率が高かった。しかし、上皮細胞ではこの違いは見られなかった。樹状細胞では NV は大量の IFN-beta を誘導したが上皮細胞では誘導活性が極めて低かった。野外株は上皮、樹状細胞ともに IFN を誘導しなかった。野外株、馴化株ともに CD150 発現 A549 上皮細胞で IFN 産生が頗る上昇した。機能阻害抗体で CD46, CD150 をそれぞれ阻害して CD46 依存性、CD150 依存性の IFN 産生を査定した。NV を IFN 産生性馴化株として用いた。樹状細胞では CD46 阻害によって IFN 産生は完全に抑制された。一方上皮細胞では CD150 があれば CD46 の依存度は殆ど IFN 産生に反映されなかった。以上の結果は樹状細胞が特異な CD46 依存性の馴化株を育むこと、上皮系ではそれが無いことを示唆する。CD46 依存性の IFN 誘導の分子機構についていくつかの可能性を提示して、ウイルスによる樹状細胞の機能変調が免疫応答・抑制に関わることを例示する。

<考察>

CD46 が樹状細胞の副刺激分子、シグナル伝達分子、IL-12 産生抑制因子、Treg 誘導因子、として機能することが報告されてきたが、どれも麻疹感染の樹状細胞の機能として認定されるに至っていない。ウイルスが CD46 をレセプターに使う際、特殊な応答を誘起するかどうか不明である。何より麻疹ウイルスの初期感染が CD150 ではなく如何なるレセプターによって支持されるのかも分かっていない。本研究はこれらの CD46 ミステリーに解決の糸口を与えるかも知れない。

<参考文献>

1. Shingai M., et al., J. Immunol. In press. (2007).

Toll 様受容体 5 (TLR5) と全身性エリテマトーデスの関連

堀内孝彦、木本泰孝、三苦弘喜、民本泰浩、
内野愛弓、高橋美聡、押領司健介、藤健太郎、塚本浩
九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科

Association of Toll-like receptor 5 (TLR5) and systemic lupus erythematosus

Takahiko Horiuchi, Yasutaka Kimoto, Hiroki Mitoma, Yasuhiro Tamimoto,
Ayumi Uchino, Misato Takahashi, Kensuke Oryoji, Kentaro Toh, Hiroshi Tsukamoto
Department of Clinical Immunology, Rheumatology and Infectious Diseases,
Kyushu University Hospital

[はじめに]

TLR5は細菌の flagellin に対する受容体であり自然免疫に重要な役割を果たしている。TLR5 には 392 番目のアルギニン(Arg)を終止コドンに変える多型(C1174T)があり、TLR5 の機能が消失することが知られている。

近年欧米人種において、1174T が全身性エリテマトーデス (SLE) 患者では頻度が少ないことが報告され¹⁾、SLE 抵抗性に関連する可能性が指摘されている。

[方法]

1) 対象：九州大学病院免疫・膠原病・感染症内科に通院中あるいは通院歴のある SLE 患者 237 名、対照として健常人 253 名についてこの多型との関連を検討した。

2) 遺伝子解析：PCR-SSCP 解析ならびに直接シーケンス法を用いて 1174T の頻度を解析した。

3) 統計解析： χ 二乗検定を行った。

[結果ならびに考察]

1174T は SLE では 5 名 (2.1%)、健常人では 17 名 (6.7%) に認められた。1174T と SLE 抵抗性との関連が日本人でも示された (OR 0.299, $p=0.014$)。

SLE の遺伝的因子として人種を超えて関連が見出されている分子としては、補体 C1q、IRF5 など数少ない。今回、TLR5 が新たに人種を超えて関連が見出された。自然免疫と SLE との関連が示唆された。

[文献]

Hawn TR, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (30): 10593-7 (2005)

癌から分泌される乳酸によるIL-23-IL-17炎症経路の誘導

志馬寛明¹⁾、藪政彦¹⁾、赤澤 隆¹⁾、松本美佐子²⁾、瀬谷司²⁾、井上徳光¹⁾

¹⁾大阪府立成人病センター研究所・分子遺伝学部門、²⁾北海道大学大学院医学研究科・感染症制御学分野

Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23-IL-17 proinflammatory pathway

Hiroaki Shime¹⁾, Masahiko Yabu¹⁾, Takashi Akzawa¹⁾, Misako Matsumoto²⁾, Tsukasa Seya²⁾,
Norimitsu Inoue¹⁾

¹⁾Department of Molecular Genetics, Osaka Medical Center for Cancer, ²⁾Department of
Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

〔はじめに〕

癌の周囲には、様々な免疫細胞が浸潤することが知られている。しかし、どのようなメカニズムにより誘導されているのかは明らかではない。最近、炎症性サイトカインIL-23が癌の進展に重要であることが示された。IL-23は、IL-17産生T細胞に働き、IL-17産生を促進し、周囲にマクロファージや好中球の浸潤や血管新生を誘導する。我々は、今年のシンポジウムで、Toll-like receptorのリガンドと共に働き、IL-23の分泌を誘導する因子の同定について報告した。今回、その報告をさらに発展させたので、報告する。

〔方法〕

マクロファージ由来細胞株を用いてIL-23p19遺伝子の5'上流領域を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ系を利用し、肺癌細胞株培養上清から責任物質を同定し、その性質を解析した。

MHCクラスIIに提示されたOvalbumin (OVA) ペプチドを認識するTCRを発現するトランスジェニックマウスOT-IIを使い、IL-17やIFN γ の誘導を調べた。

担癌モデルを用いて、乳酸のアジュバント効果の促進効果について検討した。

〔結果〕

肺癌培養上清に含まれるIL-23p19サブユニットの転写を増強する因子は、乳酸であった。乳酸は、モノカルボン酸で、pH依存的に、プロトンと共にモ

ノカルボン酸トランスポーターを介して、細胞内に輸送される。そこで、乳酸によるIL-23p19転写増強活性におけるpHの影響を調べた。その効果は、乳酸を水酸化ナトリウムで中和することにより抑制された。また、乳酸ナトリウムには、増強活性を認めなかった。同じモノカルボン酸である酢酸やチオグリコール酸にも活性を認めたが、塩酸やジカルボン酸であるコハク酸には、活性を認めなかった。生体における細胞でもこの効果を認めるかどうかを調べるために、OT-IIマウス脾細胞を用いて、乳酸の効果を解析した。その結果、OVAペプチドと乳酸のみで、IL-17の分泌を著しく誘導した。一方、Th1サイトカインであるIFN γ の分泌は誘導しなかった。

癌周囲では、乳酸は、癌進展に対し促進的に働くが、免疫誘導に対しても促進的に働くのではないかと考え、担癌モデルを用いて、免疫アジュバンドの促進効果があるかどうかを検討した。その結果、腫瘍の成長は、乳酸を加えることにより有意に抑制された。

〔考察〕

本研究では、癌細胞から分泌される乳酸が、IL-23-IL-17経路を増強することを明らかにした。おそらく、癌周囲では、乳酸は、IL-23-IL-17経路を活性化し、血管新生を促進し、組織の再構築を促し、癌の進展に寄与すると考えられる。また、乳酸は、モノカルボン酸トランスポーターを介して細胞内に取り込まれて働いていると考えられた。今後、IL-23誘導に働く作用メカニズムを解明したい。

Lysine-type peptidoglycan recognition signal mediated by PGRP-SA/GNBP1 is triggered by auto-activating modular serine protease

Su-Jin Kim¹, Chan Hee Kim¹, Ji-Won Park¹, Kyung-Bak Roh¹, Hyun Mi Kwon¹, Nam-Chul Ha¹, Masaru Nonaka² and Bok Luel Lee¹

¹National Research Laboratory of Defense Proteins, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan, 609-735, Korea and ²Department of Biological Sciences Graduate School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

In case of lysine-type peptidoglycan (Lys-PG) recognition signal of Toll and prophenoloxidase cascade pathways, two pattern recognition proteins complex, PG recognition protein-SA (PGRP-SA) and Gram-negative binding protein 1 (GNBP1), binds to Lys-PG and this provides the activation signal that is triggering activation of Toll and prophenoloxidase proteolytic cascade pathways. However, the activation mechanisms of upstream components of these cascades are not determined yet. Recently, we demonstrated that an activated modular serine protease (MSP) from large beetle, *Tenebrio molitor* larvae, was specifically recruited on polymeric Lys-PG/PGRP-SA/GNBP1 complex. Here, we have purified zymogen MSP to homogeneity from the hemolymph and cloned its cDNA. *Tenebrio* MSP is composed of modular domains including four low density lipoprotein receptor class A repeats (LDLa) found in human LDL receptor family, one complement control protein domain and a serine protease catalytic domain. Based on *in vitro* reconstitution experiments using *Tenebrio* MSP, PGRP-SA, GNBP1 and GNBP3, zymogen MSP is specifically auto-activated after recognition of Lys-PG/PGRP-SA/GNBP1/Ca²⁺ complex, but not in Lys-PG/PGRP-SA/GNBP3/Ca²⁺. The crucial role of LDLa domain in the prophenoloxidase activation cascade is further confirmed *in vivo* by examining melanin syntheses capacity. Taken together, these results suggest that LDLa domains of MSP play an

essential role for the activation of Lys-PG recognition signal, which may lead to the activation of both the Toll and prophenoloxidase pathways.

刺胞動物イソギンチャク (*Nematostella vectensis*) の補体系遺伝子の解析:

I. C3、Bf、MASP cDNA の構造解析

坂口絵理・木村鮎子・野中真弓・野中勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

The complement genes of a cnidaria, sea anemone, *Nematostella vectensis*

I. Structural analysis of the C3, Bf and MASP genes

Eri Sakaguchi, Ayuko Kimura, Mayumi Nonaka and Masaru Nonaka

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

<はじめに>

近年の研究により、刺胞動物である *リサンゴ* や *イソギンチャク* からは補体系中心成分 C3 遺伝子が、旧口動物である *カブトガニ* からは C3 と Bf (B 因子) 遺伝子が発見され、補体系の起源は極めて古い事が明らかにされた。また、昨年の本大会で発表したように ^{4) 5)}、イソギンチャクの一つであるネマトステラからは C3、Bf、MASP 遺伝子の部分塩基配列が見つかったことから、主要な補体成分のドメイン構造は、刺胞動物と左右相称動物の分岐以前に完成していたことが示唆された。

本研究では、ネマトステラで見つかった二種の C3 (C3-1, C3-2)、Bf、MASP cDNA の部分配列をもとに RT-PCR および 5'-3'-RACE を行い、完全長配列を決定した。また、得られた配列をもとに、より詳細な一次構造の解析と、分子系統解析を行った。

<方法>

1) ネマトステラ C3、Bf、MASP cDNA 完全長配列の決定

ネマトステラドラフトゲノム ⁶⁾ から得られた各補体系遺伝子の部分アミノ酸配列を他動物種の補体系遺伝子のアミノ酸配列とアイメントし、高度に保存された部位に複数組のプライマーを作成した。刺胞動物ネマトステラ 1 個体から抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行い、直接あるいはクローニング後

に塩基配列を決定した。得られた断片配列をもとに 5'-および 3'-RACE を行って cDNA の全長配列を決定した。さらに、ゲノム配列からの遺伝子予測の誤りや、得られた各々の PCR 断片を連結することによるキメラ配列形成の可能性を排除し、さらに全タンパクコード領域をカバーする mRNA が発現していることを確認するために、5'-3'-UTR の部位に作成したプライマーを用いて RT-PCR を行い、一つながりの遺伝子配列を得た。

2) ネマトステラ C3、Bf、MASP 遺伝子の分子系統解析

C3-1、C3-2 と Bf、MASP それぞれについて、他動物種のアミノ酸配列とともにアラインし、GAP を取り除いた条件で近隣結合法により系統樹を作成した。

<結果・考察>

今回単離した完全長 C3-1、C3-2 cDNA からは、C3 に特徴的なドメイン構造と、シグナルペプチド配列が予測された。また、異物と結合するチオエステル部位、 α/β 切断サイト、C3a 領域において保存された 6 つの Cys 残基、触媒性 His 残基、C 末側の C345c ドメインなど、C3 活性に必要な殆どのアミノ酸配列を保持していた。一方、典型的な C3 コンバーターゼによる切断サイトは、C3-1 にのみ存在し C3-2 には欠けていた。C3-1、C3-2 間での、アミノ酸配列ア

イデンティティーは40%程度と非常に低かった。また、サンゴ、タテジマイソギンチャクにも見られ、刺胞動物 C3 に固有の特徴であると考えられる、3'末端側の R-K rich 領域も確認された。

Bf についても、CCP/CCP/CCP/vWA/SP という特有のドメイン構造と、シグナルペプトド配列が確認された。また、マグネシウムイオン結合部位、Df による切断部位、セリンプロテアーゼドメインの活性中心の3アミノ酸残基など、Bfの機能に重要と考えられる部位はよく保存されていた。

同様に MASP においても、分泌シグナルと、MASP/C1r/C1s ファミリーに特徴的な CUB/EGF/CUB/CCP/CCP/SP のドメイン構造、プロテアーゼ活性中心の三つのアミノ酸残基が保存されていた。また、これまで単離されてきた全ての *MASP-1* 遺伝子に共通する3つの特徴、活性中心 His を挟むシステイン架橋ループ、活性中心 Ser をコードする TCN コドン、複数エクソンから構成されたセリンプロテアーゼドメインの全てが確認された。また、今回単離した3つの補体系遺伝子の完全長を翻訳したアミノ酸配列を用いて作成した分子系統樹では、いずれも今回得られたネマトステラ遺伝子を最外群と仮定すると、ネマトステラと他の動物群の系統関係を正しく反映した樹形が得られたため、これらの遺伝子がこれまで単離された物の中でそれぞれ最も系統的な分岐の古いものであることが示唆された。

<結論>

今回得られた *C3-1*, *C3-2*, *Bf*, *MASP* cDNA 完全長の一次構造および分子系統解析の結果から、少なくとも3成分からなる補体系の起源は二胚葉動物と三胚葉動物の分岐以前に遡ることが示された。

<参考文献>

- 1) Dishaw, L.J., et al. *Immunogenetics* 57 (7), :535-548 (2005)
- 2) 杉本早苗、藤戸尚子、野中勝、第 41 回補体シン

ポジウム講演集(2004)p.62-63

- 3) Yong Zhu, et al. *EMBO J* 24(2):382-394 (2005)

- 4) 木村鮎子、坂口絵理、野中勝、第 43 回補体シンポジウム講演集 (2006) p.29-30

- 5) Nonaka, M and Kimura, A. *Immunogenetics* 58 (9): 701-13 (2006)

- 6) Sullivan, J.C., et al. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue): D495-9 (2006)

刺胞動物イソギンチャク (*Nematostella vectensis*) の補体系遺伝子の解析: II. C3、Bf、MASP 遺伝子の発現解析

木村 鮎子・野中 勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

The complement genes of a cnidaria, sea anemone, *Nematostella vectensis*

II. Expression analysis of the C3, Bf and MASP genes

Ayuko Kimura and Masaru Nonaka

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

<はじめに>

前大会で著者らは、二胚葉動物イソギンチャクの一種であるネマトステラ(*Nematostella vectensis*)から見出した、C3、Bf、MASP 遺伝子の部分塩基配列について報告し¹⁾、複数の因子から構成される補体系が、少なくとも二胚葉・三胚葉動物の系統が分岐した約 10 億年前より以前から存在していた可能性が高いことを示した。

一方で、サンゴやある種のイソギンチャクなど、一部の二胚葉動物では貪食機能をもつ細胞の存在が報告されているが^{2), 3)}、その分子機構や、生体防御との関わりについては全く分かっていない。前大会で発表したように、判明した部分構造に含まれる範囲で、イソギンチャクの C3 は異物のオプソニン化に、Bf と MASP は C3 や他の補体系因子の活性化に関わるアミノ酸残基を保存していることから、これらの因子が異物のオプソニン化を行うシンプルな生体防御系を構成している可能性は十分に考えられる。しかしながら、二胚葉動物は新口動物の補体系遺伝子の主な発現部位である肝臓(肝臓)に類する器官や、多くの補体系因子群が局在する血管や体腔に相当する腔所を欠くなど、三胚葉動物とは著しく異なる体制を持ち、これらの因子の機能を解明するためには、まず遺伝子発現の時期・部位を明らかにす

る必要がある。そこで著者らは、ネマトステラの 3 つの補体系遺伝子について、RT-PCR および Whole mount *in situ* hybridization (WISH)により、遺伝子発現時期と部位の特定を行った。

<方法>

1. RT-PCR によるネマトステラ C3、Bf、MASP 遺伝子の発現時期・部位の特定

3 つの cDNA を特異的に増幅するプライマーを各々設計した。発現時期の特定には、①未受精卵、②受精卵、③プラヌラ幼生、④生後 1 ヶ月(前期)、1.5 ヶ月(後期)の幼若ポリプ、⑤成熟ポリプの RNA を精製して、それぞれを鋳型とした RT-PCR を行い、バンドの有無により発現を判定した。発現部位の確認には、成熟ポリプを触手・mesentery filament(内胚葉)・外皮(外胚葉)・胃体腔内液(刺胞球を含む)に分けて RNA を精製し、同様の PCR を行った。

2. WISH による遺伝子発現部位の特定

各 cDNA につき、約 1 kb の配列を RT-PCR により増幅し、加水分解して約 0.5 kb のプローブを作成した。サンプルには、3 つの補体系遺伝子の発現が確認された体長 2~3mm 程度の後期幼若ポリプを用い、ハイブリダイゼーションはプローブ濃度 0.25ng/ul、40 時間・44℃という条件で行った。

<結果・考察>

1. RT-PCRによるネマトステラ C3、Bf、MASP 遺伝子の発現時期・部位の特定

3つの補体系遺伝子は、いずれも生後約1.5ヶ月の幼若ポリプ以降から発現が現れた。発現部位については、各組織の明確な分離が困難であったものの、触手と、mesentery filament を含む内胚葉に共通して発現が確認された。

3. WISHによる遺伝子発現部位の確認

C3、Bfでは、触手先端の内胚葉に強いシグナルが得られたほか mesentery filament にもシグナルが見られたのに対し、MASPでは、mesentery filament へのみ特異的なシグナルが検出された。いずれの遺伝子も、外胚葉でのシグナルは全く見られず、内胚葉に限局した発現パターンと判定できた。

<結論>

二胚葉動物ネマトステラの補体系遺伝子は、後期幼若ポリプと成熟ポリプでのみ発現し、これらの因子がある程度成熟したネマトステラにおいてのみ作られることが示された。また、内胚葉に限局した発現パターンは、これらの因子がネマトステラの胃体腔中に分泌されることを示唆している。今回、3つの遺伝子の発現が共通して見られた内胚葉由来の mesentery filament は、胃体腔に直接に面して消化吸収を行うとともに、別種のイソギンチャクでは phagocyte 様の細胞が単離された組織でもある。二胚葉動物の胃体腔が、中胚葉に裏打ちされた三胚葉動物の体腔と異なり外界に直結していることから、ネマトステラの補体系因子は胃体腔内を循環するのではなく、phagocyte 様の細胞が常駐する mesentery filament の付近に限定した、より局所的な働きをしている可能性が考えられた。

著者らは今後、蛋白質レベルでの解析を行うことを考えており、これらの因子の組み換え蛋白質に対する抗体の作成を進めている。

<参考文献>

- 1) 木村鮎子、坂口絵理、野中勝、第43回補体シンポジウム講演集(2006) p.29-30
- 1) Cecile T. Olano and Charles H. Bigger. Journal of invertebrate pathology, 76, 176-184 (2000)
- 2) Danielle M, C, Hutton et al. Biol. Bull, 191: 441-451 (1996)

サメ補体 C5 遺伝子の構造解析

南雲浩之、林晋平、野中勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

Structural analysis of the sharks C5 gene

Hiroyuki Nagumo, Shinpei Hayashi, Masaru Nonaka

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

<はじめに>

サメにおける C5 の存在については、古く溶血アッセイの結果からその存在が予想されていた⁽¹⁾。しかしその遺伝子については、以前の本大会で我々がドチザメ (*Triakis scyllium*) から ORF のとれない cDNA を、ホシザメ (*Mustelus manazo*)、ツノザメ (*Squalus sp.*) からは cDNA 配列の一部を報告したものの、全一次構造は未知のままであった。本研究ではホシザメ、ツノザメ C5 cDNA のタンパクコード領域全長の塩基配列を決定し、またドチザメ C5 遺伝子が全域にわたるスプライシング異常を生じさせる興味深い偽遺伝子であることを明らかにしたので報告する。

<方法>

1) サメ C5 遺伝子の単離

既知の各種脊椎動物の C3/C4/C5 アミノ酸配列の multiple alignment により保存性の高い領域を探して degenerate primer を作成した。この primer を用いてホシザメ、ツノザメの肝臓から total RNA を抽出し作成した cDNA を template に部分配列を得た。その情報に基づく 5' -RACE, 3' -RACE によってサメ C5 cDNA の全長配列を決定した。分子系統樹は Clustal X による近隣接合法によって作成した。

2) ドチザメ C5 遺伝子の解析

ホシザメ・ツノザメ C5 の全長配列を増幅するように

設計したプライマーを用いてドチザメ cDNA を template に PCR を行ったところ、スメアが検出されたのでこれをクローニングした。13 クローンインサート配列を読みホシザメ、ツノザメ配列と比較した。

3) Southern hybridization・Northern hybridization
ドチザメ C3、ドチザメ C4、ドチザメ・ツノザメ C5 の 3' 側 500 bp を probe として肝臓から抽出した genome DNA、total RNA に対して Southern hybridization、Northern hybridization を行った。

4) 溶血活性測定

AH₅₀ assay によってドチザメ、ツノザメ血清の溶血活性を測定した。

<結果>

1) 塩基配列より推定されたホシザメ、ツノザメ C5 の全アミノ酸配列はヒト C5 とそれぞれ 44% の、互いには 95% の identity を示した。β-α プロセッシング部位、C5 転換酵素切断部位など機能上重要な配列はすべて保存されており、大規模な欠損、挿入などは認められなかった。分子系統樹を作成したところ、他の脊椎動物の C5 と共にクレードを形成した。

2) ドチザメ C5 の全長を 13 クローン読んだところ、どの 2 つも完全には一致しておらず、ホシザメ、ツノザメ C5 と比較して insertion, deletion が点在し

ており、その場所が各クローン毎に異なっていることがわかった。ヒト、マウス *C5* 遺伝子の exon-intron 構造を参考にしてドチザメ cDNA の構造を調べると、欠損は exon のスキップ、挿入は intron の残留によりほとんど説明できることが判明した。また RT-PCR により複数個の exon を含むと予想される領域を増幅するとホシザメ・ツノザメでは単一のバンドが検出されたのに対して、ドチザメでは数本のバンドが検出された。

3) Northern hybridization の結果、*C3*, *C4* に関してはドチザメ、ホシザメ、ツノザメのいずれも同じサイズのバンドが検出された。*C5* に関してはホシザメ、ツノザメでは約 6 kbp にバンドがみられたのに対してドチザメでは約 10 kbp にバンドがみられた。*C5* の Northern hybridization に関してのみ、更に 6 種のサメの肝臓 RNA に対して試みたが、いずれもホシザメ、ツノザメと同じサイズのバンドが検出された。

また、予備的な Southern hybridization の結果は、ドチザメ、ホシザメ、ツノザメの 3 種のサメ共に *C5* 遺伝子のコピー数は 1-3 程度であることを示した。

4) サメ血清中の第二経路の溶血活性をウサギ赤血球、 Mg^{2+} -EGTA-GVB を用いて測定したところ、ツノザメでは十分な溶血活性が検出されたのに対して、ドチザメでは溶血活性が全く検出されなかった。この血清による溶血活性に関しても更に 6 種のサメの血清を用いて行ったところ、いずれも十分な活性が検出された。

<考察>

ホシザメ・ツノザメから *C5* 遺伝子を単離し系統樹解析及び血清中の溶血活性を測定した結果から軟骨魚類出現以前に *C3/C4/C5* の遺伝子重複及び機能分化が完成している事がわかった。また、ドチザメ *C5* 遺伝子は スプライシングの際に exon, intron の選択がうまくされないという興味深い異常があるため、機能を持つ *C5*

を発現できないものと考えられた。ドチザメに於いても *C3*, *C4* 遺伝子では正常なスプライシングが行われておりこの異常はドチザメ *C5* 遺伝子に固有と思われた。現在このスプライシング異常の機構を明らかにする為、*C5* 遺伝子の全長のクローニングを行っている。

<参考文献>

(1) Jensen et al., Science. 214:566-569, (1981)

コイ補体成分 C1 タンパク質の同定

市居 敬、柚本 智軌、鶴木 陽子、中尾 実樹

九州大学大学院農学研究院

Identification of Carp Complement Component C1

Takashi Ichii, Tomonori Somamoto, Yoko Kato-Unoki, Miki Nakao

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

<はじめに>

補体成分 C1 は免疫複合体を形成している抗体の定常部に結合し補体古典経路を活性化する成分であり、先天性免疫と獲得免疫をつなぐ架け橋として重要である。ヒト C1 は亜成分 C1q, C1r, C1s が Ca^{2+} 依存的に会合した分子量約 790 kDa の複合体である¹。硬骨魚類の補体では古典経路の活性が知られており、C1q-A, B, C 鎖や C1r 様プロテアーゼがクローニングされている^{2,3}ものの、C1 複合体はタンパク質レベルでは同定されておらず、その亜成分組成も不明である。本研究では、コイ C1 をタンパク質レベルで同定することを目的とした。

<方法>

1. 当研究室でクローニングされたコイ C1q-A, B, C 鎖の配列をもとに、それらの globular head 領域をコードする cDNA 断片を発現ベクター pCold-I にサブクローニングし、大腸菌 Origami B を用いて 6xHisTag を含む組換えタンパク質として発現させた。
2. 精製した組換え体でウサギを免疫し、この組換え体に対する抗体を得た。
3. コイ血清の古典経路および第二経路を介した溶血活性に対する抗コイ C1q-A 抗体の影響を検討した。
4. この抗体を固相化し、血清から抗体に結合する物

質を分離することを試みた。

<結果>

コイ C1q-A 鎖を可溶性の組換え体として発現させることに成功した。金属キレートアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過により、rC1q-A は還元条件下の SDS-PAGE で 18 kDa のバンドを与える組換え体として精製された。抗コイ C1q-A ウサギ IgG を用いたウェスタンブロットティングによって、コイ血清から 30 kDa のバンドが検出された。また、この抗体は古典経路を介したコイ血清の溶血反応を強く阻害した。固相化抗体カラムからの溶出物を SDS-PAGE に供試したところ、C1q の各ポリペプチド鎖と考えられるバンド(32, 30, 29 kDa)に加えて、81 kDa と 79 kDa のバンドが認められた。

<結論>

コイ血清中に少なくとも C1q-A 鎖を含む複合体としてコイ C1 が存在し、これが古典経路を介した溶血反応に関与することが判明した。コイ C1 複合体の分子組成は現在解析中である。

<文献>

- 1) Gaboriaud, C. et al., Trends Immunol. 25, 368-373 (2004)
- 2) Nakao, M. et al., Immunogenetics 52, 255-263 (2001)
- 3) Wang, T. et al., Immunogenetics 55, 615-628 (2003)

モノクローナル抗体を用いた コイ C3 アイソタイプの機能解析

一木智子、鵜木陽子、柚本智軌、中尾実樹

九州大学大学院農学研究院

Functional analysis of carp C3 isoforms using monoclonal antibodies

Satoko Ichiki, Yoko Kato-Unoki, Tomonori Somamoto, Miki Nakao

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

[はじめに]

硬骨魚類の補体系の特徴は、いくつかの補体成分に複数のアイソタイプが存在することである。特に、これまで解析された全ての魚種で補体系の中心成分である C3 が多重化しており、さらにそれら C3 アイソタイプ間では、チオエステルの開裂・結合反応を触媒する位置のアミノ酸が異なる。この部位のアミノ酸置換は C3 の異物への結合特異性に影響すると考えられるが、C3 アイソタイプの補体系における機能分化には不明な点が多い^{1,2)}。

コイには少なくとも5種の C3 アイソタイプがあり、多くの生物種と同様に触媒性 His 残基を保持している C3-H1 と、それが Ser に置換した C3-S が血清中の主要な C3 アイソタイプである³⁾。本研究では、C3-S と C3-H1 アイソタイプの機能分化を分子レベルで解析するためのツールとして、各アイソタイプを識別するモノクローナル抗体 (MAb) を作製し、両アイソタイプの結合特異性に着目した機能解析を行った。

[方法]

1) 7 週齢のマウス (BALB/c) を、コイ血清から精製した C3-S と C3-H1 で免疫し、その脾臓細胞

を PEG 法でミエローマ (P3U1) と融合させた。HAT 培地でハイブリドーマを選択培養した。目的の抗体を産生しているハイブリドーマを限界希釈法でクローン化し、無血清培地に馴化させた後、培養上清から Protein G HP column を用いて抗体を精製した。

2) ウサギ赤血球 (Er) とヒツジ赤血球 (Es) をグルタルアルデヒドで固定し (Er^f、Es^f)、さらに Es^f から感作ヒツジ赤血球 (Es^fA) を作製した。これら標的細胞をコイ血清と反応させた後、表面に沈着した C3-H1 と C3-S をフローサイトメトリーによって検出した。

3) Er、Es、EsA とコイ血清を反応させた後、赤血球膜を回収し、結合した C3 アイソタイプを Western blot で検出した。

4) Mannan あるいは卵白リゾチウム+抗卵白リゾチウムコイ IgM をコートした ELISA プレートにコイ血清を反応させ、沈着した C3 アイソタイプを検出した。

[結果]

1) 抗コイ C3-S β 鎖 [5C7 (IgG₁)] と抗 C3-H1 α 鎖 [3H11 (IgG_{2a})] を樹立した。

- 2) 異種赤血球への C3 アイソタイプの結合特異性をフローサイトメトリーで解析したところ、Er^f 上には C3-S、C3-H1 の両アイソタイプが検出されたのに対し、Es^f と Es^fA 上には C3-S のみが検出された。
- 3) 固定していない赤血球を使った Western blot 解析においても同じ結合特異性が確認された。
- 4) ELISA による C3 沈着試験において、Mannan に対しては、C3-S が有意な結合性を示したのに対し、C3-H1 の結合はほとんど認められなかった。一方卵白リゾチウムには、C3-S、C3-H1 共に結合が認められた。

[考察]

C3-S はウサギ赤血球・ヒツジ赤血球に結合するのに対し、C3-H1 はウサギ赤血球にしか結合しないことから、両アイソタイプは異物への結合特異性において機能分化を遂げていることが強く示唆された。この結合特異性の違いが何に起因するのかは不明であるが、Es や Mannan 上では C3-H1 が活性化されにくいのかもしれない。一方 C3-S は魚類に特徴的なアイソタイプであるが、今回調べたすべての標的に有意な結合性を示したことから、このような触媒性 His を欠く C3 が魚類の補体系では中心的な役割を果たしている可能性がある。

[文献]

- 1) Sunyer J. O. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8546-8551 (1996)
- 2) Law S. K. et al. Protein Sci. 6: 263-274 (1997)
- 3) Nakao M. et al. Eur. J. Immunol. 30(3): 858-866 (2000)

魚類における新規補体制御因子の同定

辻倉 正和、柚本 智軌、鶴木 陽子、中尾 実樹

九州大学大学院農学研究院

Identification of novel regulators of complement activation in fish.

Masakazu Tsujikura, Tomonori Somamoto, Yoko Kato-Unoki, Miki Nakao

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,

Kyushu University, Fukuoka Japan

<はじめに>

Regulator of complement activation (RCA) ファミリーは、補体制御タンパク質および補体レセプターを含んでいる。RCA タンパク質には分泌型と膜結合型があり、膜結合型制御因子は自己細胞を補体による攻撃から守るために重要である。系統発生的には、RCA タンパク質は円口類や硬骨魚類からも同定されており、その起原が非常に古いと示唆される。これまでに硬骨魚類では factor H 様の分子が barred sand bass¹ とヒラメで同定されている。また、円口類のヤツメウナギで factor H 様の分子が見つかっている²。しかし、魚類では自己細胞を保護する上で重要な膜結合型の RCA タンパク質は未だ同定されていない。本研究ではゼブラフィッシュとコイを供試魚として、膜結合型の RCA タンパク質を同定することを試みた。

<方法>

ゼブラフィッシュのゲノムデータベースから、BLAST 検索などによって膜結合型の新規 RCA タンパク質の配列を予測した。これを基にプライマーを設計し、ゼブラフィッシュの臓器（脳、腸管、脾臓、肝臓、腎

臓、皮膚、筋肉、鰓、心臓）の total RNA から、5'-, 3'-RACE を行うことにより、全塩基配列を決定した。この配列をクエリー配列としてコイの EST データベースを BLAST 検索し、膜結合型 RCA タンパク質の部分配列を得た。さらに 5'-, 3'-RACE によりこの全塩基配列を決定した。

<結果>

ゼブラフィッシュからは、404 残基のアミノ酸をコードする、2248 bp の cDNA がクローニングされた。この分子は 5 個の SCR ドメイン、膜貫通領域および細胞質領域を含んでいたため、Teleost Complement Regulatory Membrane protein (Tecrem) と名付けた。また、この分子の splicing variant も同定された。コイからも Tecrem をコードする 2353 bp の cDNA がクローニングされた。コイ Tecrem (362 アミノ酸) はゼブラフィッシュの Tecrem と約 60% のホモロジーを示し、4 つの SCR ドメイン、膜貫通領域および細胞質領域を有していた。

Tecrem の配列を用いて分子系統樹を Neighbor-Joining 法を用いて作成したところ、ゼブラフィッシュとコイの Tecrem はほかのいずれの分子ともクラスターを形成

せず、このことは Tecrem が新規 RCA タンパク質であることを強く示唆する。

<結論>

下等脊椎動物からは初めて膜結合型の RCA ファミリーに属する補体制御因子 Tecrem をクローニングした。Tecrem は分子系統樹において哺乳類で既知の RCA メンバーのいずれとも明らかな類縁関係を示さず、硬骨魚類に特有な RCA 分子であると考えられる。

<参考文献>

1. Dahmen A., et al. *Biochem. J.* 301, 391-397(1994)
2. Kimura Y. et al. *J. Immunol.*, 173: 1118-1128 (2004)

Xenopus tropicalis の補体制御遺伝子座の解析押海裕之¹⁾ 鈴木譲²⁾ 松本美佐子¹⁾ 瀬谷司¹⁾²⁾¹⁾北大・医 ²⁾北大・生命科学院Putative complement regulators in the RCA locus of *Xenopus tropicalis*

Hiroyuki Oshiumi, Yuzuru Suzuki, Misako Matsumoto, Tsukasa Seiya

1) Graduate School of Medicine, and 2) Graduate School of Life Sciences, Hokkaido University

〈はじめに〉 補体制御因子をコードする遺伝子はヒトの第一番染色体上の1q32の約1Mbpの領域にクラスターを形成している。補体制御因子は何れも Short Consensus Repeat (SCR) ドメインを繰り返し、一つの祖先型の遺伝子が遺伝子重複を繰り返すことで現在の複数の補体制御因子が形成された。我々はその起源と形成過程、また種間の多様性と共通性の解明を目的として、これまで、鳥類で、既にヒトと同様の可溶性、膜型、GPI アンカー型の補体制御因子が存在することを明らかにした¹⁾。サカナに RCA クラスターは未同定である。つまり、陸生のヒトと鳥類の共通祖先の段階ですでに現在のヒトの補体制御系の原型となるシステムが存在したと考えられる。今回、我々はさらに両生類の *Xenopus tropicalis* の RCA 遺伝子座を同定し、その機能の解明を試みた。

〈方法〉 JGI の *Xenopus tropicalis* のゲノムサーバー (<http://genome.jgi-psf.org/notice4.html>) を用い RCA 遺伝子座の同定を行った。また、*Xenopus tropicalis* の成体から各臓器を取り RNA 抽出を行い遺伝子の単離と発現解析を行った。

〈結果と考察〉

ヒトからニワトリまでの RCA 遺伝子座が連鎖している PFKFB2 遺伝子を指標に *Xenopus tropicalis* の RCA 遺伝子座の探索を *in silico* で行ったところ、PFKFB2

遺伝子下流に SCR ドメインを繰り返し持つ遺伝子を3種類発見した。公開されている EST 配列をもとに成体の肝臓と腎臓由来の RNA を用い、RACE を行い全長の cDNA の単離を試みたところ、PFKFB2 近傍の2種類の遺伝子の ORF の全長と最も遠方にある遺伝子の部分長の cDNA を単離した。これらはヒトと同様に何れも SCR ドメインを繰り返しもつ構造をしておりカエルに於ける RCA 遺伝子であると推測された。ここで Amphibian Regulator of Complement Activation: ARC とし、5' 側から順に Arc1, Arc2, Arc3 と名付けた。興味深いことに Arc1 が腎臓と消化管でのみ発現していたのに対し、Arc2 と Arc3 は調べた全ての臓器で発現が観察された。また、系統樹解析からは、Arc 遺伝子は他の種の補体制御因子よりも Arc 遺伝子同士が最も高い相同性を示し、ヒト補体制御因子の中では DAF に最も類似していた。これらのことから、脊椎動物が陸に上がった時、祖先型として GPI アンカー型の一つの RCA 遺伝子しか持たなかったのに対し、陸に上がった後にそれぞれ遺伝子重複を繰り返し現在の RCA 遺伝子座が形成されたと推測される。

〈参考文献〉

- 1) Oshiumi, H. et al.
J. Immunol. 175:1724 (2005)

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) 会長は必要に応じ、運営委員会の承認を得たうえで、自身の任期の範囲内の任意の任期を有する会長補佐を任命することができる。
- (14) 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。
- (15) 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。
- (16) 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。

- (17) 運営委員会の構成員は、運営委員、監事、補体シンポジウム集会長（当期および次期）、会長、および会長補佐とする。
- (18) 運営委員会は、構成員の過半数の出席を要する。
- (19) 運営委員会は、会務の審議、本会の運営に当たる。
- (20) 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。
- (21) 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。
- (22) 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

- (23) 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。
- (24) 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。
- (25) 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

- (26) 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。
- (27) 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。
- (28) 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。
- (29) 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。
- (30) 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

- (31) 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

平成16年8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)池田理化、エーザイ(株)、キリンビール(株)、東海大学総合研究機構(50音順)より第44回補体シンポジウムへご支援を賜りました。御礼申し上げます。

第44回補体シンポジウム
集会長 松下 操

補体研究会賛助会員

(50音順)

医学生物学研究所 (株)
トーアエイヨー (株)
明治製菓 (株)
和光純薬工業 (株)

補体研究会

会長	瀬谷 司
会長補佐	木下夕口ウ
運営委員	阿部正義 井上徳光 大井洋之 中尾実樹 南学正臣 岡田秀親 酒井好古 野中 勝
監事	岡田則子 藤田禎三
事務局長	野中 勝
集会長	松下 操
次期集会長	瀬谷 司

