

氏名	ひらの まこと 平野 真
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第643号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	血清レクチンとメタロプロテアーゼの相互作用とその生理的意義に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 竹島 浩 教授 伊藤 信行 教授 中山 和久

### 論文内容の要旨

本研究室で発見されたマンナン結合タンパク質 (MBP) はマンノース, フコース, *N*-アセチルグルコサミン残基を認識する  $\text{Ca}^{2+}$  依存性レクチンである。MBPは補体活性化などを引き起こす先天性生体防御因子として知られ, その外来性リガンドとして細菌, 真菌, ウイルスなど広範な病原微生物の細胞表面糖鎖が報告されている。一方, MBPが*in vivo*において腫瘍を退縮させるというMBP依存的細胞性細胞障害作用が本研究室で見出されており, この作用には腫瘍細胞表面の糖鎖リガンドや免疫細胞レセプターの関与が考えられている。しかしながら, これまでMBPの内在性リガンドとその生理的意義に関する知見はほとんど得られていなかった。

本研究ではmeprinが腎尿細管に存在するMBPの内在性リガンドであることを明らかにし, 次いでMBPとmeprinの相互作用が持つ生理的意義の解明を進め, MBPの新しい役割を明らかにすることが出来た。

#### 第1章 MBPによるmeprinのプロテアーゼ活性調節に関する研究

種々のマウス組織切片を用いてMBPによる組織染色を行い, 内在性リガンドの存在の有無を調べた。その結果, 腎臓の皮質, 近位尿細管の管腔側に内在性リガンドが高発現していることを見いだした。そこで次に, この内在性リガンドを同定するため, マウス腎臓の膜タンパク質からMBPアフィニティーカラムによりリガンドを精製した。これを還元条件下のSDS-PAGEで分離したところ, 83kDaと91kDaの2本の主要なバンドが得られた。これらのバンドについて質量分析によるプロテオミクス解析を行ったところ, それぞれmeprinの $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットと同定された。meprin  $\alpha$ ,  $\beta$ は共に高度に糖鎖付加を受けた亜鉛依存性マトリックスメタロプロテアーゼである。

次に, MBPとmeprinの結合の性質を検討するためにpeptide-*N*-glycosidase F (PNGase F) あるいはendo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase H (endo H) でmeprinを消化し, 消化物についてMBPレクチンプロットを行った。PNGase Fは全ての*N*-型糖鎖を根元から切断する酵素であるが, これにより結合性が消失したことからMBPとmeprinの相互作用には*N*-型糖鎖が必須であり, *O*-型糖鎖は関与していないことが明らかとなった。一方, *N*-型糖鎖の内の高マンノース型糖鎖を選択的に切断するendo Hで処理するとmeprinの結合性が約3分の1にまで低下した。このことからMBPは主として高マンノース型糖鎖を認識して結合するが一部, 複合型糖鎖も結合に関与することが明らかとなった。

次に, MBPが及ぼすmeprinのプロテアーゼ活性への影響について検討した。meprinの酵素活性測定には, 一般的によく用いられる基質であるカゼインをはじめとして細胞外マトリックスの構成成分など種々の高分子基質を用いた。MBP非存在下, 基質はmeprinによる分解を受けたが, MBP存在下では基質の分解は効果的に阻害された。この結果はレクチンが酵素活性を調節することを示す初めての報告である。

この活性阻害の機構としては, MBPがmeprinの酵素活性中心近くに存在する糖鎖に結合することにより基質がmeprinにアクセスするのを阻害する, あるいはMBPが結合することでmeprinの活性中心に構造変化が生じ, 活性を失うなどが考えられた。そこで次に, 低分子量合成基質を用いて活性阻害について検討したところ, MBPによるmeprinの酵素活性阻

害は起こらなかった。この結果からMBPによるmeprinの酵素活性阻害は、meprinの活性中心への高分子基質の接近が阻害されることによって引き起こされることが示唆された。

ある種のがん細胞ではmeprinのプロテアーゼ活性が上昇しており、これにより基底膜を構成する細胞外マトリックスが破壊され、がん細胞の浸潤や転移が促進されると報告されている。本研究により明らかとなった知見はmeprinが促進するがん細胞の浸潤をMBPが抑制し得ることを示唆している。

## 第2章 腎虚血再灌流におけるMBPとmeprinの相互作用による補体活性化に関する研究

虚血性腎障害のモデルとして用いられる腎虚血再灌流（IR）マウスにおいてその障害にレクチン経路による補体活性化が関与していることが、近年MBPノックアウトマウスを用いた研究で示されているが、その機構についての詳細は不明であった。申請者はこの補体活性化に腎臓におけるMBPの内在性リガンドであるmeprinが関与している可能性を考えた。本研究ではまずmeprinがレクチン経路により補体系を活性化するか否かを*in vitro*で検討した。その結果、MBPとmeprinの相互作用により補体系が効率的に活性化されることが明らかとなった。次に、*in vivo*におけるMBPとmeprinの相互作用および補体活性化について検討するためにIRマウスを作製し、免疫組織染色により腎臓におけるmeprin、MBPおよび補体成分C3の局在を調べた。虚血再灌流を行っていないマウスではMBP、C3ともにほとんど検出出来なかったが、IRマウスではMBPおよびC3の腎皮質への局在がみられ、これらが一部meprinと共局在していることが観察された。この結果は実際に生体内でMBPとmeprinが相互作用し、補体活性化を引き起こしていることを示唆している。次に、IRマウス腎臓におけるMBP量の増大が元来腎臓に発現しているMBPの増大によるものであるか否かをリアルタイムPCRにより解析したところ、MBPのmRNA発現量に変化は認められなかった。従って、IRマウス腎臓においては血液由来のMBPが腎皮質に移行していることが示唆された。

本研究によりMBPとmeprinの相互作用により補体系が活性化され、虚血性腎障害における尿細管壊死の引き金となっていることが示された。

以上、本研究はMBPとその内在性リガンドの相互作用がもたらす機能を解明し、MBPの生理的役割に新たな知見を加えたものである。

## 論文審査の結果の要旨

マンナン結合タンパク質（MBP）は本学薬学研究科の生体分子認識学分野、川寄敏祐前教授らによって発見された動物レクチンであり、病原微生物表面糖鎖を認識し補体系を活性化してこれら微生物を排除する機能がよく知られている。しかしながら、生体内にあるMBPのリガンド分子とその相互作用に関しては、まったく不明であった。本論文は、MBPとその内在性リガンドとの相互作用がもつ生物学的意義の解明を目的とした研究にて、MBPの生理的、病理的な役割の一端を解明している。

第1章では、質量分析によるプロテオミクス解析により、腎臓におけるMBPの内臓リガンドとしてmeprinという亜鉛依存性マトリックスメタロプロテアーゼを同定し、これらの糖鎖依存的な結合により、カゼインなどの高分子基質を用いた場合、meprinのプロテアーゼ活性が効果的に阻害されることを示した。これは糖認識分子であるレクチンが酵素活性を調節することを示す、これまでに例を見ない注目すべき結果である。また、ある種のがん細胞ではmeprinのプロテアーゼ活性が上昇しており、これによりがん細胞の浸潤や転移が促進されるという報告がある。コラーゲンIVなど細胞外マトリックスの構成成分を基質とした場合、MBPによりmeprinのプロテアーゼ活性が阻害されるという結果から、MBPがmeprinのプロテアーゼ活性が上昇したがん細胞の浸潤や転移を抑制することが強く示唆された。

第2章ではMBPとmeprinの相互作用がもたらす病理学的側面に着目している。以前から虚血性腎障害においてMBPによるレクチン経路を介した補体活性化が尿細管に決定的な損傷を与えることが示されていたが、MBPが如何なる分子と相互作用し、補体系を活性化するのかなど詳細な機構は不明であった。申請者は虚血性腎障害における補体活性化の際、meprinがMBPの標的分子となると予測した。そこでまず、*in vitro*において、MBPとmeprinとの相互作用により補体系が強く活性化されることを明らかにした。次いで、実験的虚血再灌流モデルマウスを作製し、*in vivo*におけるmeprin、MBPおよび補体成分の挙動を免疫組織染色により検討し、meprinとMBPが生体内で相互作用して補体系が活性化される

ことが示唆された。また、虚血再灌流モデルマウス腎臓におけるMBPのタンパク質量およびmRNA発現量の定量解析から、モデルマウス腎臓ではMBPのタンパク質量の大きな増加がみられたにもかかわらず、mRNA発現量には変化が認められないという結果が得られた。このことから、モデルマウス腎臓におけるMBPのタンパク質量の増加は、腎臓において発現するMBPの増加によるものではなく、尿細管周辺の血管から流入したMBPが近位尿細管に沈着することによって引き起こされることが示唆された。以上の結果から、腎臓移植や出血性ショックなどによる虚血性腎障害において、これらの予後に多大な影響を及ぼす補体活性化の発生機構に新たな知見が加えられた

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。