

氏名	なか がわ とも あき 中 川 知 明
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 564 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 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	生体防御因子としてのマンナン結合タンパク質 (MBP) の作用機序に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教授 川 寄 敏 祐 教授 伊 藤 信 行 教授 中 山 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

生体内に存在するタンパク質の半数以上は糖鎖付加を受けていると言われている。糖鎖は様々な生命現象において重要な役割を担い、また様々な疾病に関与していることが近年次々と明らかにされつつある。レクチンとは糖鎖を認識する酵素・抗体以外の一群のタンパク質であり、生体内における糖鎖情報の解読者として重要な役割を果たしている。マンナン結合タンパク質 (MBP) は当研究室において発見された動物レクチンの一種であり、カルシウム依存的にマンノース, *N*-アセチルグルコサミン, フコースに特異的に結合する。MBP は異物排除に関わる重要な先天性免疫因子として知られ、外来異物表面のリガンド糖鎖との結合が引き金となり、補体系活性化, 直接オプソニン作用等を示す。本研究は MBP の作用機序の解明を目的とするものであり、第一章では MBP の主要な機能である補体活性化の分子機構について、第二章では近年当研究室において発見された補体活性化非依存的な機構による MBP の抗腫瘍作用について、さらに第三章では新たな機能を示唆する小腸における MBP の発現について解析を行った。

第一章 血清マンナン結合タンパク質 (MBP) とリガンドとの結合を介した補体活性化の分子機構

MBP は糖鎖リガンドと結合すると補体を活性化するが、この補体活性化はリガンド糖鎖の担体の性質に依存する。すなわち、MBP が酵母や微生物のような細胞性リガンドに結合すると補体を活性化するが、酵母由来のマンナンなどの可溶性リガンドに結合しても補体を活性化しない。申請者らはこのような担体の働き、その持つ意味に注目し研究を進めて来たが、最近、可溶性の合成リガンド PV-Man が MBP と結合して非常に強力な補体活性化作用をもつことを見いだした。動的光散乱法による解析の結果、酵母マンナンは単一の分子として溶解しているのに対して、PV-Man は高分子ミセルを形成している事が判明した。ミセルサイズが MBP の補体活性化能に影響を持つことが予想されたので、PV-Man のミセルサイズを変化させ、補体活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、ミセルの直径が 52nm より減少するに伴い補体活性化能が低下し、直径 10nm になると活性はほぼ完全に消失した。一方、当研究室の Ma らによる電子顕微鏡観察の結果、MBP サブユニットの糖認識領域 (CRD) 3 個より成る構造単位の直径は約 10nm、構造単位の 3-6 量体の直径は約 45nm と測定された。これらの結果は、MBP の構造単位がそれぞれ別個の多価リガンドに結合するだけでは補体系は活性化されず、1 つの多価糖鎖リガンドにより複数の構造単位が架橋され、分子全体にひずみが生じ、この構造変化が、MBP に結合したセリンプロテアーゼの活性化を誘導し補体活性化が進行することを示しているものと考えられる。

本研究により、MBP によるリガンドの認識と補体活性化との関連の分子機構が明らかとなった。このことは MBP による補体活性化の制御機構を明らかにすると共に、過度の補体系の活性化の引き起こす種々の疾患の原因の解明にも役立つものと期待される。

第二章 血清マンナン結合タンパク質 (MBP) 依存的細胞性細胞障害作用 (MDCC) の機構解明

近年当研究室において、担癌動物に MBP 遺伝子を投与することで、補体活性化非依存的な作用により腫瘍の顕著な退縮が観察されることが発見された。この作用には何らかの免疫細胞の関与が推測されたことから、MBP 依存的細胞性細胞障

害作用 (MDCC) と名付けられた。本研究では、MDCC の機構解明のため、*in vitro* 実験系を構築し、MDCC の機構を解析した。MBP リガンド糖鎖を高発現するヒト結腸がん由来細胞株 SW1116 をターゲット細胞とし、MBP 存在下、ヒト単球系細胞株 THP-1 またはヒト末梢血由来白血球 PBL と共に共培養すると MBP 依存的な SW1116 の増殖抑制が認められた。この実験系を用い、この作用はアポトーシスを介するものであり、その作用には何らかの液性因子が関与することを明らかにした。さらに SW1116 由来の糖ペプチドの添加によりこの作用が増強されたことからこの作用が SW1116 上の糖鎖パターン認識を介して惹起されるものであることが示された。

第三章 小腸におけるマンナン結合タンパク質 (MBP) の発現

MBP は肝臓で産生され血中に放出されることが知られているが、その他の臓器における MBP の発現についてはほとんど調べられていない。本研究ではマウス各組織における MBP の発現を解析した。マウスにおいて MBP は 2 つの独立した遺伝子産物、血清型 MBP (S-MBP) と肝臓型 MBP (L-MBP) が存在していることが知られている。解析の結果、肝臓に加え、L-MBP mRNA は腎臓、胸腺、小腸で、S-MBP mRNA は腎臓、肺、精巣で発現していることが明らかとなった。特に L-MBP mRNA は小腸においては肝臓の約 9% という顕著に高い値で発現することが明らかになった。そこで、小腸における MBP の発現について免疫染色、*in situ* hybridization により詳細に検討を行ったところ、MBP は小腸全域に渡って発現が認められるが、特に空腸において強い発現が認められ、さらには絨毛先端部の上皮細胞において強く発現していることが明らかとなった。また、正常ヒト小腸組織の免疫染色により、ヒト小腸上皮において MBP の発現が確認された。絨毛先端部は常に外来異物に曝される場所であり、同所における MBP の発現は MBP が腸管免疫の一翼を担い、異物排除などの生体防御において第一線で働く因子であることを示唆するものである。

以上、本研究は MBP の主要な機能である補体活性化の機構を解明し、MBP の新たな機能である MDCC の機構、および腸管における MBP の発現について解析し、MBP の生体内での働きに関する重要な新知見を得たものである。

論文審査の結果の要旨

マンナン結合タンパク質 (mannan-binding protein; MBP) は C-型動物レクチンの一種であり、カルシウム依存的にマンノース、N-アセチルグルコサミン、フコースに特異的に結合する。MBP は異物排除に関わる重要な先天性免疫因子として広く知られ、外来異物表面のリガンド糖鎖との結合が引き金となる補体系活性化、直接オプソニン作用等を介して、外来異物排除に関わることが知られている。

MBP は糖鎖リガンドと結合すると補体系を活性化する。ただし、この補体活性化は、MBP が酵母や微生物のような細胞性リガンド糖鎖に結合する場合に限られ、MBP が酵母由来のマンナンや高マンノース型糖鎖を含むリソソーム酵素などに結合した場合には、補体系は活性化されない。申請者はこの一見奇妙な現象を分子レベルで解明することに成功した。申請者は、まず、可溶性の合成リガンドである PV-Man が MBP と良く結合するばかりでなく、強力な補体活性化作用を持つことを見いだした。PV-Man の分子性状を解析したところ、PV-Man は質量分析計では分子量 3,000-6,000 の一定の幅をもつ混合物であるが、動的光散乱法による解析では、直径約 52nm の分子サイズをもち、電子顕微鏡による観察でも、長さ約 50nm の不規則な棒状構造をもつことを明らかにした。この PV-Man のサイズは、すでに明らかにされている MBP 多量体と同程度の大きさである。これに対して、MBP に結合するにもかかわらず補体系を活性化しない酵母マンナンは直径が約 10nm で、MBP 構造単位の糖認識部位と同程度の大きさであることが明らかになった。リガンドのサイズが MBP の補体活性化能に影響を持つことが予想されたが、その後の研究により、PV-Man の直径が 52nm より減少するに伴い補体活性化能が低下し、直径 10nm になると活性はほぼ完全に消失した。これらのデータをアロステリック相互作用を解析するヒルプロットによる解析を行った結果、MBP による補体活性化には、1 分子の多価糖鎖リガンドに 3 個以上の構造単位が結合することが重要であり、その結果、分子全体にひずみが生じ、この構造変化が、MBP に結合したセリンプロテアーゼの活性化を誘導し補体活性化が進行すると結論を得た。この結果は、これまで全く不明であった MBP による補体系プロテアーゼの活性化の機構を初めて明らかにしたものであり、高く評価出来る。

MBP は、また、補体非依存的な経路で細胞障害作用を示すことが示されている。すなわち、MBP リガンドを高発現するヒト結腸癌由来細胞株 SW1116 を移植したヌードマウスに MBP 遺伝子を投与すると、腫瘍の顕著な退縮が観察され、

この作用には何らかの免疫細胞の関与が推測されたことから、MBP 依存的細胞性細胞障害作用 (MDCC) と名付けられている。申請者は、MDCC の機構解明のため、*in vitro* 実験系を構築し、MDCC の機構の解析を進めた。

また、ヒト MBP は単一の遺伝子にコードされていることが知られているのに対し、ラットやマウスには肝臓型 (L-MBP) と血清型 (S-MBP) の 2 種類の遺伝子が存在することが分かっている。申請者は定量的 PCR 法により、マウス各組織での MBP の発現量を測定した結果、肝臓を 100% として小腸において約 9% の L-MBP mRNA が発現していることを初めて明らかにした。

以上、本研究は先天性免疫において重要な役割をもつ MBP の構造と機能、組織分布に関する新しい知見を明らかにしたものである。よって本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 17 年 2 月 28 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。