

氏名	内藤 はるな
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第426号
学位授与の日付	平成11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	薬学研究科製薬化学専攻
学位論文題目	先天性免疫因子としての血清レクチンに関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 川寄敏祐 教授 市川 厚 教授 伊藤信行

論文内容の要旨

生体の細胞表面には、糖タンパク質、糖脂質などの多様な形で糖鎖が存在している。近年、これらの糖鎖は、発生と分化、エンドサイトーシス、細胞接着、生体防御などの様々な生命現象に広く関与することが明らかになり、注目を集めている。動物体内には、特定の糖鎖と結合するタンパク質が存在し、この一群のタンパク質は動物レクチンと呼ばれている。血清マンナン結合タンパク質(Mannan-Binding Protein, 略してMBP)は、哺乳類血清中に広く存在し、マンノース、N-アセチルグルコサミンといった糖鎖に特異的に結合する動物レクチンである。MBPはN末端側のコラーゲン様領域で多量体を形成し、C末端側の糖認識ドメインで糖鎖に特異的に結合する。MBPは補体成分のC1qと構造的に類似しており、補体系の活性化やオプソニン作用を行うことが知られている。このことから、MBPは表面に糖鎖を持つ病原微生物の排除に重要な役割を果たすと考えられている。小児科領域では、オプソニン不全症とMBPの関係が注目されている。すなわち、オプソニン不全症の小児では、多形核白血球による補体を介した糖鎖依存的な食食機能が欠損しており、重篤な感染症、下痢、発育不全などの症状を示す。これらの小児では、MBP遺伝子に点突然変異が生じており、MBPの正常な立体構造が形成されていない。また、これらの小児ではMBPの血中濃度が非常に低くなっており、補体系の活性化が起こらないことが明らかとなった。このようにMBPは、抗体やT細胞が関与する後天的な獲得性免疫が機能するまでの間の第一線で働く先天性免疫因子であり、直接的生体防御を担うと考えられている。

血中でMBPが低濃度であることは様々な感染症を引き起こす要因になると考えられた。そこで、MBPの血中濃度に関連して、MBPの発現制御および血中における代謝的安定性という2つの面から以下の研究を行った。

また、MBPと同様の性質を示すものの糖特異性の異なるブタ新規レクチンのクローニングを行った。

第一章 ヒト血清MBPの転写調節機構

(1) ヒトMBP遺伝子の5'上流領域の遺伝子構造

ヒトgenomic DNA libraryをスクリーニングすることにより、MBP遺伝子の5'上流領域の遺伝子構造およびその塩基配列を決定した。また、MBPは2カ所の転写開始点を持っており、エキソン0由来の転写物およびエキソン1由来の転写物が存在することが分かった。また、それぞれに対して独自の転写プロモーターが存在しており、両者とも一般的な転写活性化エレメントであるTATA boxやCAAT boxを含んでいた。さらに、急性期タンパク質の5'上流域に多く存在するIL-6応答配列(IL-6 responsive element)や肝臓に特異的なタンパク質の発現を制御することで知られている転写因子HNF-3(Hepatocyte nuclear factor-3)の認識配列なども存在していることが明らかとなった。

(2) ヒトMBPの転写制御

MBPの転写発現に必要な領域を探索するため、転写活性化能をもつと考えられるエキソン0上流域およびエキソン1上流域の2カ所の領域について欠失変異体を作成し、それぞれのプロモーター活性を調べた。その結果、エキソン0上流域よ

りもエクソン1上流域のほうが転写活性化能が強いことが分かった。また、エクソン1上流域に存在するHNF-3認識配列を欠失させると、プロモーター活性が約50%減少することが分かった。すなわち、MBPの発現に転写因子HNF-3が関与する可能性が示された。さらに、ゲルシフトアッセイにより、実際にこの領域のDNA配列にHNF-3が結合することを確認した。この結果は、MBPが肝臓で産生されるという事実をよく説明していた。

(3) エクソン1上流領域の遺伝的多形とその転写に与える影響

近年、ヒトMBP遺伝子のエクソン1上流に遺伝的多形が2ヵ所あり、その塩基配列の組み合わせにより、HY、LY、LXの3種類に分類できることが報告された。さらに、HYの配列をもつヒトでは血清中のMBP濃度が高く、LYでは中くらい、LXでは低いことが明らかとなった。そこで、HY、LY、LXの3種類の塩基配列を持つ変異体を作成し、そのプロモーター活性を測定すると、HY、LY、LXでそれぞれ高い、中くらい、低い活性を示した。つまり、MBP遺伝子の転写レベルが血清中のMBP濃度を左右することが示唆された。

第二章 MBPの血中での代謝的安定性

健常人では、MBPは31kDaのサブユニットが18量体の多量体を形成し、特徴的な高次構造をとっている。しかし、オプソニン不全症の小児においては、MBPは3量体のままとまっている。オプソニン不全症の小児では血中のMBP濃度が非常に低く、それによって様々な疾患が引き起こされると考えられている。そこで、この野生型および変異型MBPのアミノ酸配列の相異およびサイズの相異が血中濃度に影響を及ぼすかどうかを調べるため、それぞれの血中の代謝的安定性について解析した。まず、ヒト野生型および変異型MBPをワクシニアウイルス発現系により合成し、マンノースを用いたアフィニティカラムで精製した。これを¹²⁵Iで放射標識したのち、マウスに静脈内投与し、一定時間ごとにマウス血中に存在する放射活性を測定した。その結果、MBPは血液中で分解されることはなく安定であるが、血中の代謝的半減期を算出すると、正常型MBPでは6.3時間、変異型では3.5時間となった。つまり、変異型MBPは、より早く血中から消失し、代謝されることが分かった。この知見は、オプソニン不全症の小児では、血中濃度が低いという調査結果をよく説明するとともに、MBPを臨床的に用いる場合の有力な情報となると考えられた。

第三章 ブタ新規血清レクチンのcDNAクローニング

新生ブタでは、その母体の特殊な胎盤構造により、極端に血清中の免疫グロブリン量および補体レベルが少なく、抗体を介した免疫機能が特に弱い。しかし、新生ブタ血清はグラム陰性細菌に対してClq非依存的な殺菌作用を持つ。この殺菌作用は、表面にホスホマンナンをもつ細菌に対して選択性を示し、マンナンをもつ細菌に対しては効果を持たない。そこで、ブタ血清中に新規動物レクチンの存在を想定し研究を進めた結果、新規レクチンの単離およびその遺伝子クローニングに成功した。単離されたcDNA配列および推定されるアミノ酸配列より、このレクチンは、アミノ酸配列中にコラーゲン様領域や糖認識ドメインに共通のアミノ酸配列を持つことからMBPと非常に類似したタンパク質であると考えられた。また、マウスやラットの血清型MBPと構造的に高いホモロジーを持つことも分かった。しかし、本レクチンはホスホマンナンに結合特異性があり、殺菌作用を示す細菌の種類がMBPとは異なることが示されている。ブタ血清中にはマンナンに特異性を示すレクチンも存在しており、互いに機能的な役割分担を行っている可能性も考えられた。

以上、本研究は先天性免疫因子であるMBPの血中濃度の制御に関して重要な知見を得るとともに、MBPと類縁の新規ブタレクチンの単離をすることにより、動物レクチンの生体防御における意義をさらに明らかにしたものである。

論文審査の結果の要旨

血清マンナン結合タンパク質 (MBP : mannan-binding protein) は、哺乳動物血清中に広く存在するマンノースおよびN-アセチルグルコサミンに特異的なレクチンである。細菌、微生物の多くは、細胞表面にマンノースやN-アセチルグルコサミンに富む多糖を含むのに対し、動物細胞は多くの場合、シアル酸に覆われた複合型糖鎖を持つ。このため、MBPは、自己の細胞と識別し、選択的に細菌に結合できる。MBPはN末端から順にシステイン領域、コラーゲン様ドメイン (CLD)、ネック領域、糖鎖認識ドメイン (CRD) の四つの領域からなり、このサブユニットの3量体が基本構造単位を形成する。

さらにこの基本単位が最大6個集まって一つの分子を形成している。MBPは補体系成分のClqと高次構造的によく似ており、補体系を活性化し、また、直接オプソニン活性を示す。この補体活性化は従来の古典経路及び第二経路とは異なる新しい経路であり、レクチン（MBP）経路と呼ばれている。このように、MBPは先天性免疫の重要な因子であり、その血中濃度の維持は重要である。事実、CLD部分遺伝子の点変異で生じる変異体MBPは、オプソニン不全症とも呼ばれ、血中濃度が低下し、重篤な感染症、下痢などの症状を示す。

申請者は、このMBPの血中濃度の調節機構の解明を目的として、MBP遺伝子の転写調節機構および血中MBPの代謝的安定性に関する研究を行い、次のような新しい知見を得た。

申請者はまず、ヒトゲノムDNAのスクリーニングを行い、MBP遺伝子の5'-上流の遺伝子構造およびその塩基配列を決定した。ここには2箇所の転写開始点とそれぞれのプロモーター領域が含まれることが分かった。このプロモーター領域について一連の欠失変異体を作成し、それぞれのプロモーター活性をルシフェラーゼをレポーター遺伝子として測定したところ、肝臓に特異的なタンパク質の発現を制御することで知られている、Hepatocyte-specific nuclear factor-3（HNF-3）が、重要な役割を果たすことが示唆された。このことはHNF-3認識配列を用いたゲルシフト法により確認された。また、最近、ヒトMBPのプロモーター領域には遺伝的多形が2箇所に存在し、これら多形間でMBPの血中濃度が異なると報告されている。そこで、これら3種類の変異体を作成し、そのプロモーター活性を測定したところ、その活性は血液中濃度とよい相関性を示した。

申請者は次に、MBPの血液中での代謝的性質を検討した。すなわち、ヒト正常型および変異型MBPを組み換え体として作成し、ヨード125で標識した後、マウス静脈内投与する事によりその代謝を調べた。その結果、変異型MBPでは正常型の約2倍速く代謝されていることが判明し、オプソニン不全症の小児においてMBP血中濃度が著しく低下している調査結果をよく一致した。

さらに、申請者は、MBPとよく似てはいるが、異なった糖結合特異性を示す、新規血清レクチンをブタ血清より精製し、その性質を解明したのち、そのcDNAクローニングに成功した。

以上の研究は、新たな先天性生体防御因子としての血清レクチンの諸性質を明らかにしたものであり、よって本論分は博士（薬学）の論文として価値あるものと認めた。更に、平成11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。