

機関番号：34315

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590074

研究課題名（和文） マンナン結合タンパク質とマトリックスメタロプロテアーゼの相互作用とその生理的意義

研究課題名（英文） Characterization and physiological significance of the interaction between mannan-binding protein and matrix metalloproteases.

研究代表者

川崎 伸子（KAWASAKI NOBUKO）

立命館大学・総合理工学研究機構・教授

研究者番号：70077676

研究成果の概要（和文）：

種々の哺乳動物の血清中に存在するカルシウム依存性のレクチンであるマンナン結合タンパク質（MBP）は糖鎖を認識し結合することにより、先天性免疫に重要な役割を果たしている。本研究では、この MBP の生理的条件下での内在性リガンドとして腎臓に見出された、マトリックスメタロプロテアーゼであるメプリンと MBP との相互作用の分子機構、次いで、その生理的役割を実験的虚血再灌流マウスの腎組織切片を用いて解明した。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanism of the interaction between a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent lectin, mannan-binding protein (MBP) and metalloproteases, meprens and its functional roles in the ischemia/reperfusion-operated mouse kidneys were studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	60,000	2,600,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：マンナン結合タンパク質、マンナン結合レクチン、メプリン、マトリックスメタロプロテアーゼ、レクチン、糖鎖、補体活性化、腎虚血再灌流

## 1. 研究開始当初の背景

マンナン結合タンパク質 (mannan-binding protein: MBP) はマンナン結合レクチン (MBL) ともよばれ、報告者らによって発見された動物レクチン (糖鎖認識タンパク質) である。MBP は、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。血清中の MBP は補体系の活性化作用 (補体活性化レクチン経路) をもつなど、先天性生体防御因子とし

て働いている。しかしながら、生理的条件下での MBP の内在性のリガンド (MBP によって認識され、MBP に結合する物質) に関する知見はほとんど得られていなかった。そこで、報告者らがマウスの種々の組織切片を用いて調べたところ、腎臓の皮質、近位尿細管の管腔側において MBP のリガンドが高発現していることを見出した。これらのリガンドは、その後の生化学的研究により、メプリンサブユニット、メプリンサブユニットと同

定された。マウスのメプリンは高度に糖鎖付加を受けた分泌型あるいは膜結合型の亜鉛依存性マトリックスメタロプロテアーゼである。次いで、報告者らはMBPとメプリンとの相互作用およびその相互作用がメプリンの酵素活性に与える影響について調べた。その結果、MBPが、メプリンによる、細胞外マトリックスの成分を含むさまざまなタンパク質分子の分解に対して阻害活性を持つことを明らかにした。これ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として注目され、この酵素阻害の分子機構に興味を持たれた。また、MBPは虚血性腎障害に関与しているとの報告があり、この原因として腎臓における、メプリン-MBPの相互作用による補体の活性化の関与が考えられた。そこで、報告者らは、虚血再灌流マウス腎臓を用いて、メプリン-MBPの相互作用の生物学的機能解明の研究に着手した。

## 2. 研究の目的

動物レクチンMBPと、その内在性リガンドであるマトリックスメタロプロテアーゼメプリンとの選択的相互作用の分子機構およびその生理的役割の解明を目的として、以下の2点について研究を行った。

(1) MBPによるメプリンの酵素活性阻害機構を酵素学的手法により解析する。

(2) マウスメプリンの場合、サブユニットに10カ所、サブユニットに9カ所のN-結合型糖鎖の潜在的付加部位が存在するが、生体内では実際にメプリン分子のどの部位にどのような構造をもつN-型糖鎖が付加されているか、またMBPがどの糖鎖に結合してメプリンの酵素活性を調節しているのかは、まだほとんど明らかにされていない。MBPがメプリンに高い選択性をもって結合する理由を検討するために、メプリン上のMBP結合に参与する糖鎖の性質を解析する。

(3) 虚血性腎障害の原因解明を目的としてMBPとメプリンの相互作用による補体活性化について、*in vitro*アッセイおよび実験的虚血再灌流マウスの腎組織切片を用いる免疫染色、*in situ*ハイブリダイゼーションにより解析する。

## 3. 研究の方法

(1) MBPによるメプリンの酵素活性阻害機構の解析。

当初、われわれがメプリンの活性測定に用いてきたSDS-PAGEパターン解析法は、タンパク質分子の分解を定性的に解析するのに有効な方法であったが、MBPによる酵素活性阻害を酵素学的に解析することは困難であった。そこで新たに、アゾカゼインおよび合成低分子量ペプチド基質などを用いて基本的な酵素学的解析を追加して行った。すなわ

ち合成基質succinyl-Ala-Ala-Ala-methylcoumarylamideはメプリンにより切断され、aminomethylcoumarin(AMC)を生成するのでAMCの蛍光測定により酵素活性を測定できる。この反応系に種々の濃度のMBPを加え、メプリンのプロテアーゼ活性の測定を行い、解析した。

(2) MBP-メプリンの相互作用にかかわる、メプリンの糖鎖の特徴の解析。

N-グリコナーゼ(PNGaseF)あるいはエンド-β-N-アセチルグルコサミナーゼH(Endo-H)で消化し、消化物についてMBPレクチンプロットを行った。

MBP以外の種々のレクチンによるメプリン酵素活性への効果の検索。

メプリンの活性阻害に直接関与している糖鎖の性質を明らかにするために、種々の特異性の異なる植物レクチンを用いて、メプリンとの結合性をレクチンプロットで解析したのち、結合性を示すレクチンについてメプリンのプロテアーゼ活性に対する阻害効果の有無を調べた。

(3) MBPとメプリンの相互作用による、*in vitro*補体活性化作用の解析。

プラスチックプレートにメプリンを固定化した後、MBP、MASPs(MBP-associated serine proteases)補体成分C4、HRP標識したC4bに対する抗体を順に加え、HRPの発色基質によりC4bの沈着の程度を測定し(図1)、これを補体活性化の指標とした

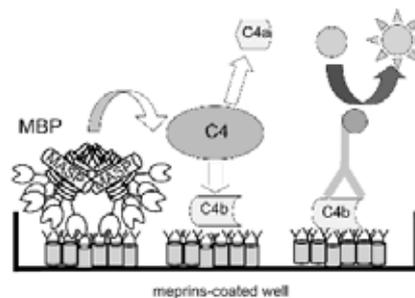


図1. MBP-メプリン相互作用による補体活性化作用の*in vitro*アッセイ

(4) 腎虚血再灌流における、MBPとメプリンの相互作用による補体活性化作用の解析。

実験的腎虚血再灌流(Ischemia/Reperfusion: I/R)障害マウスの作製。

ネブタールで麻酔したマウスを37のホットプレートで加温した状態で開腹し、両腎動脈を血管用鉗子で挟み血流を停止させた。40分後、鉗子を除去し、筋膜を縫合して皮膚を手術用ホッチキスで固定し、飼育した。Shamマウスでは血流を停止させない。手術前、手術後数時間ごとに尾から血液を採取し、血中尿素窒素(BUN)値を測定して障害の指標とした。(4)-以降の実験ではこれらの処置を施

したマウスの腎臓を用いた。コントロールとしてShamマウスの腎臓を用いた。

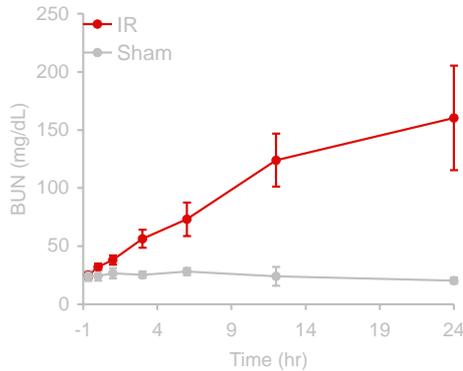


図 2. 腎虚血再灌流マウスと Sham マウスにおける腎障害指標となる BUN の測定

BUNがshamの約3倍に上昇している虚血後6時間経過したマウス(図2)を用いて、免疫染色、タンパク質定量、mRNA発現量の測定を行い、*in vivo*における補体活性化について解析し、虚血性腎障害にレクチン経路を介する補体活性化が関与しているかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MBP によるメプリンのプロテアーゼ活性阻害機構の解析

カゼイン、副甲状腺ホルモン、コラーゲン IV およびゼラチンを基質として、メプリンによる加水分解に対する MBP の影響を、SDS-PAGE により調べた。その結果、これらの基質はいずれもメプリンによる分解を受けたが、その分解は MBP により濃度依存的に阻害された。また、この MBP による阻害は、マンノースの添加により解除された。

低分子合成基質である succinyl-Ala-Ala-Ala-methyl coumarylamide を基質として、メプリンのアミダーゼ活性に対する MBP の影響を測定したところ、MBP はアミダーゼ活性を阻害しなかった。

以上の結果より、基質がタンパク質の場合、MBP はメプリンの活性中心付近の糖鎖に結合することにより基質の活性中心への接近を阻害し、基質の分解を妨げるが(図 3A)、基質が低分子の場合には、MBP がメプリンの糖鎖に結合していても、基質は活性中心に接近することができるため、MBP はメプリンの酵素活性を阻害できない(図 3B)ことが推定された。

##### (2) MBP-メプリンの相互作用にかかわる、メプリンの糖鎖構造の解析。

メプリンの PNGaseF (N-グリコシド型糖鎖をペプチドとの結合部位の根元より切断除

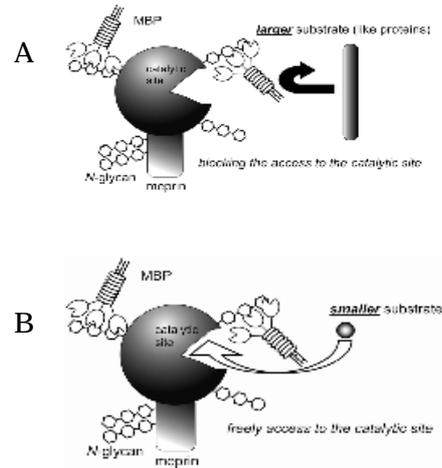


図 3 MBP によるメプリンのプロテアーゼ活性阻害機構

去) 処理により MBP との反応性が消失した。このことより、MBP とメプリンの相互作用には N-型糖鎖が必須であり、O-型糖鎖は関与していないと考えられた。また Endo H (高マンノース型、複合型糖鎖を除去する酵素) 処理するとメプリンの MBP との反応性が約 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、一部は、メプリン分子上の複合型糖鎖を介して結合すると考えられた。

植物レクチンである、ConA、PNA、LCA、AAL についてメプリンのコラーゲン IV 分解に対する影響を調べた。その結果、ConA により、コラーゲン分解が阻害され、次いで AAL、LCA により、ある程度阻害され、PNA は阻害効果を示さなかった。これらの結果は MBP によるメプリンのプロテアーゼ活性阻害に高マンノース糖鎖、フコース糖鎖が関与していることを裏付けていた。

##### (3) 腎虚血再灌流腎臓におけるMBPとメプリンの相互作用による補体活性化作用に関する研究。

最近、MBP ノックアウトマウスを用いた研究により、腎虚血によって尿細管壊死が引き起こされる過程に補体系が関与していることが示されている。しかし、腎虚血再灌流障害における補体活性化の詳細な機構は不明である。そこで、本研究において、虚血性腎障害の原因解明を目的として、MBP とメプリン相互作用による補体活性化について調べた。

*in vitro*における MBP とメプリンとの相互作用による補体活性化。

ELISA による C4b 沈着でアッセイしたところ、メプリンと MBP の相互作用により補体系が効率的に活性化されることを明らかにす

ることができた。

虚血性腎障害のモデルとして用いられる実験的腎虚血再灌流 (Ischemia/Reperfusion, I/R) モデルマウスを作製した。

I/R モデルマウスの腎臓の組織切片を用いて、メプリン、MBP、補体成分の局在を免疫組織染色により調べた。メプリンは、正常な状態で発現がみられる皮質のみならず、髄質においても観察された。また、近位尿細管の形態変化が観察された。これらは損傷を受けた近位尿細管細胞の刷子縁が脱落し、下流に流されたためであると考えられた。また、MBP および補体成分 C3b は、I/R マウスにおいて、主に皮質の近位尿細管に、一部が髄質に観察され、これらの一部がメプリンと共局在していた。この結果より、*in vivo* においてもメプリンと MBP が相互作用し、補体系を活性化することが示唆された。

化学架橋試薬により処理した、I/R マウスの腎臓皮質片より NP-40 で抽出した可溶化物を抗 MBP 抗体、抗メプリン抗体で反応させ、得られた免疫沈降物を SDS PAGE にかけて、ウェスタンブロットにより解析したところ、I/R マウスでは Sham マウスに比べて、有意に多量の MBP とメプリンが共沈してくることが観察された。

I/R モデルマウスの腎臓における MBP mRNA 発現量の変化についてリアルタイム PCR を用いて調べた。コントロールである sham マウスと I/R マウスの間で MBP mRNA の発現量に差異は認められなかった。したがって、I/R による腎臓における MBP タンパク質の量の増加は腎臓における MBP の発現量の増加によるのではなく、近位尿細管周辺に張り巡らされた血管から流出した MBP が尿細管に沈着したことによると推定された。

以上の結果より、虚血性再灌流腎臓において、MBP がメプリンに結合することが引き金となって起こるレクチン経路による補体の活性化によって、急性腎障害や出血が引き起こされることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

著者名: M.Nonaka, BY.Ma, H.Imaeda, K.Yamaguchi, N. Kawasaki, K. Hodohara, N.Kawasaki, A. Andoh, Y. Fujiyama, & T. Kawasaki、論文標題: Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) recognizes a novel ligand, Mac-2-binding protein, characteristically expressed on human colorectal carcinomas.、雑誌名: Journal of Biological Chemistry、査読: 有

、in press、発行年: 2011、First Published Online on April 22, 2011, doi:10.1074/jbc.M110.215301

著者名: N.Kawasaki & T.Kawasaki、論文標題: Recognition of Endogenous Ligands by C-Type Lectins: Interaction of Serum Mannan-binding Protein with Tumor-associated Oligosaccharide Epitopes.、雑誌名: Trends in Glycoscience and Glycotechnology、査読: 有、巻: 22、発行年: 2010、ページ: 141-151

著者名: N.Nakamura, M.Nonaka, BY.Ma, S.Matsumoto, N.Kawasaki, S.Asano, & T. Kawasaki、論文標題: Characterization of the Interaction of between Serum Mannan-binding Protein and Nucleic acid Ligands.、雑誌名: Journal of Leucocyte Biology、査読: 有、巻: 86、発行年: 2009、ページ: 737-748

著者名: N.Kawasaki, C-W.Lin, R.Inoue, K-H.Koo, N.Kawasaki, B-Y.Ma, S.Oka, M.Ishiguro, T.Sawada, H.Ishida, T.Hashimoto, & T. Kawasaki、論文標題: Highly Fucosylated N-Glycan Ligands for Mannan-binding Protein Expressed Specifically on CD26 (DPPVI) Isolated from a Human Colorectal Carcinoma Cell Line, SW1116.、雑誌名: Glycobiology、査読: 有、巻: 19、発行年: 2009、ページ: 437-450

著者名: BY.Ma, K.Yoshida, M.Baba, M.Nonaka, S.Matsumoto, N.Kawasaki, S.Asano, & T. Kawasaki、論文標題: The Lectin Jacalin Induces Human B Lymphocyte Apoptosis through Glycosylation-dependent Interaction with CD45.、雑誌名: Immunology、査読: 有、巻: 127、発行年: 2009、ページ: 477-488

[学会発表](計15件)

発表者名: 野中元裕, Ma BY., 山口圭子, 川崎伸子, 川崎敏祐、発表標題: C-Type lectin DC-SIGN interacts with Mac-2BP expressed on human colon tumors.、学会名等: BMB 2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学大会合同大会) 発表年月日: 2010年12月10日、発表場所: 神戸ポートアイランド、神戸市(兵庫県)

発表者名: M.Nonaka, BY.Ma, N.Kawasaki, T.Kawasaki、発表標題: Mac-2 BP Expressed on Human Colon Carcinomas is a Novel Ligand for DC-Sign.、学会名等: Annual Conference of the Society for Glycobiology、2010、発表年月日: 2010年11月10日、発表場所: St.Pete Beach (Florida, USA)

発表者名: T.Kawasaki, N.Kawasaki, M.Nonaka, BY.Ma、発表標題: Recognition of

Tumor-associated Oligosaccharides by Serum Mannan-binding Protein.、学会名等：Annual Conference of the Society for Glycobiology, 2010、発表年月日：2010年11月7日、発表場所：St. Pete Beach(Florida, USA)

発表者名：M. Nonaka, BY. Ma, S. Matsumoto, K. Yamaguchi, N. Kawasaki, N. Kawasaki, T. Kawasaki、発表標題：C-Type Lectin DC-SIGN Recognizes Glycans of Mac-2BP Expressed on Colorectal Cancer.、学会名等：25th International Carbohydrate Symposium、発表年月日：2010年8月2日、発表場所：幕張メッセ国際会議場、千葉市(千葉県)

発表者名：T. Kawasaki, N. Kawasaki, M. Nonaka, BY. Ma, H. Imaeda, Y. Fujiyama, & A. Andoh、発表標題：Interaction of Serum Mannan-binding Protein with Tumor-associated Oligosaccharide.、学会名等：7th International Symposium on Glycosyltransferases、発表年月日：2010年7月31日、発表場所：国際ファッションセンター、東京都

発表者名：山口圭子, 大坪和明, 荒川健司, Khoo, K-H, 川崎ナナ, 中尾広美, 野中元裕, Ma, BY., 川崎伸子, 川崎敏祐、発表標題：CD26/DPPIV の糖鎖構造と酵素活性に関する研究、学会名等：第 82 回日本生化学大会、発表年月日：2009年10月24日、発表場所：神戸ポートアイランド、神戸市(兵庫県)

発表者名：野中元裕, Ma BY., 松本尚吾, 川崎伸子, 川崎敏祐、発表標題：血清型マンナン結合タンパク質と核酸の相互作用とその生物学的意義、学会名等：第 82 回日本生化学大会、発表年月日：2009年10月24日、発表場所：神戸ポートアイランド、神戸市(兵庫県)

発表者名：山口圭子, 中尾広美, 長尾和弥, 石田秀治, 木曾真, 福井成行, 野中元裕, Ma BY., 川崎伸子, 川崎敏祐、発表標題：ルイスAモノマーおよびオリゴマー糖鎖を用いた抗ルイス糖鎖抗体の反応特異性解析、学会名等：第 29 回日本糖質学会年会、発表年月日：2009年9月11日、発表場所：飛騨・世界生活文化センター、高山市(岐阜県)

発表者名：野中元裕, Ma BY., 中村奈都子, 松本尚吾, 川崎伸子, 川崎敏祐、発表標題：血清型マンナン結合タンパク質による核酸の認識とその意義、学会名等：第 29 回日本糖質学会年会、発表年月日：2009年9月11日、発表場所：飛騨・世界生活文化センター、高山市(岐阜県)

発表者名：T. Kawasaki, N. Kawasaki, K-H. Khoo, K. Yamaguchi, M. Nonaka, & BY. Ma、発表標題：Interaction of mannan-binding protein and its high affinity ligands expressed on CD26 (DPPIV) isolated from a

human colorectal carcinoma, SW1116.、学会名等：15th European carbohydrate symposium、発表年月日：2009年7月21日、発表場所：Vienna(Austria)

山口圭子, 川崎伸子, Khoo, KH., 石黒正路, 澤田敏彦, 川崎ナナ, 中尾広美, Ma BY., 川崎敏祐、発表標題：マンナン結合タンパク質に対して高親和性結合を示すリガンド糖鎖の構造的特徴、学会名等：BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会合同大会) 発表年月日：2008年12月12日、発表場所：神戸ポートアイランド、神戸市(兵庫県)

発表者名：野中元裕, Ma BY., 川崎伸子, 川崎敏祐、発表標題：樹状細胞C型レクチン DC-SIGNによる結腸がん細胞表面糖鎖の認識と腫瘍免疫の調節機構、学会名等：BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会合同大会) 発表年月日：2008年12月12日、発表場所：神戸ポートアイランド、神戸市(兵庫県)

発表者名：平野真, Ma BY., 川崎ナナ, 川崎伸子, 川崎敏祐、発表標題：虚血性腎障害におけるマンナン結合タンパク質と meprinとの相互作用、学会名等：日本薬学会第129年会、発表年月日：2009年3月26日、発表場所：国立京都国際会館、京都市(京都府)

発表者名：M. Hirano, N. Kawasaki, BY. Ma, & T. Kawasaki、発表標題：MOLECULAR MECHANISM OF THE INHIBITION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF MEPRINS BY MBP.、学会名等：The 23rd International Lectin Conference、発表年月日：2008年7月13日-16日、発表場所：University of Stirling, Nr Bridge of Allan (Scotland)

発表者名：N. Kawasaki, K-H. KHOO, R. INOUE, BY. Ma, & T. Kawasaki、発表標題：SPECIFIC INTERACTION OF MANNAN-BINDING PROTEIN WITH HIGHLY FUCOSYLATED POLY LACTOSAMINE-TYPE N-GLYCANS ISOLATED FROM HUMAN COLORECTAL CARCINOMA.、学会名等：The 23rd International Lectin Conference、発表年月日：2008年7月12日、発表場所：University of Edinburgh, Edinburgh (Scotland)

〔図書〕(計1件)

著者名：N. Kawasaki, BY. Ma, & T. Kawasaki  
出版社名：Springer、書名：Experimental Glycoscience: Glycobiology、発行年：2008年、総ページ数：498頁、ed. By N. Taniguchi et al.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.glyco.is.ritsumei.ac.jp/RCG/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

川崎 伸子 (KAWASAKI NOBUKO)

立命館大学・総合理工学研究機構・教授

研究者番号：70077676

### (2)研究分担者

川崎 敏祐 (KAWASAKI TOSHISUKE)

立命館大学・総合理工学研究機構・教授

研究者番号：50025706

### (3)連携研究者

(なし)

研究者番号：