

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460596

研究課題名(和文) 認識分子フィコリンの恒常性維持に果たす新たな役割と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of a new role of ficolin on endogenous homeostasis

研究代表者

遠藤 雄一 (Endo, Yuichi)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20117427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫の認識分子であるフィコリン1は、フィコリン2とは異なり、発生時期の組織細胞や成体の白血球を認識ことが明らかになった。マウスフィコリン1(フィコリンB)の標的分子は、細胞膜表面シアル酸含有膜タンパク質であり、フィコリンBは単独で、またはプロテアーゼMASP-3と複合体を形成し、レクチン経路を介して作用すると考えられた。また、フィコリンBはN末端アミノ酸のN-アセチル基を認識して細胞骨格タンパク質にも結合することから、傷害された細胞の認識にも関与すると考えられた。このように、フィコリン1は、生体防御の役割に加えて、自己内部環境の恒常性維持に働くことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Ficolins are recognition molecules in innate immunity. This study demonstrated that unlike ficolin 2, ficolin 1 was involved in recognition of self-cells in fetal tissues and leukocytes in adult circulation. Ficolin B (mouse ficolin 1) bound to several sialic acid-containing proteins in mouse fetal tissue and adult peripheral leukocytes. Ficolin B also recognized the N-acetyl group of N-terminal amino acid in ubiquitous cytoskeleton proteins in these cells, which are exposed during cell damage. In fetus, ficolin B formed the complex simply with MASP-3, a key enzyme of the lectin pathway, and in adult, ficolin B-MASP complex contained MASP-1, -2, -3, and regulatory proteins sMAP and MAp44. These results suggest that ficolin 1 has a role on endogenous homeostasis through the lectin pathway in both developmental and adult stages.

研究分野：医歯薬学

キーワード：フィコリン (ficolin) 自然免疫 恒常性維持 レクチン レクチン経路 フィコリン欠損マウス

## 1. 研究開始当初の背景

補体レクチン経路は、認識分子であるレクチンが感染微生物等の表面に保存された分子パターンを認識する。これに伴いレクチンと複合体を形成しているセリンプロテアーゼ MASP (MBL-associated serine protease) が活性化型に転換し補体系を活性する (1)。レクチン経路は新たな補体活性化経路であり、古典的経路と第二経路に続く第三の経路となった。レクチン経路は、自然免疫に働く生体防御機構と考えられている。レクチン経路で働くレクチンとしては、MBL (mannose-binding lectin)、フィコリン (ficolin) およびコレクチン CL-K1 が知られており、これらはそれぞれ三種類の MASP (MASP-1, -2, -3) および二種類の非プロテアーゼ型タンパク質 (sMAP, MAP44) と複合体を形成する。この複合体の分子構成は多様で詳細はほとんど分かっていない。フィコリンは、N 末端側のカ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り、12-18 量体のホモポリマーを形成し、共通に N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を認識する (2)。ヒトでは三種類のフィコリン (L-, M-および H-FCN)、マウスでは二種類のフィコリン (FcnA および FcnB) が知られており、それぞれが MASP と結合子、レクチン経路を介して機能する (2)。フィコリンは、H-FCN はヒトなどの霊長類のみにみられ、その他は糖結合特異性、血中動態および系統発生に基づいてフィコリン 1 (ヒト M-FCN とマウス FcnB) とフィコリン 2 (ヒト L-FCN とマウス FcnA) に分類される (3)。しかし、個々のフィコリンの生理的役割と作用機序については依然不明な点が多い。

近年、他の研究グループによって、レクチン経路の認識分子の一つである CL-K1 が個体発生において骨形成に関与し、その欠損は 3MC 症候群を発症させることが明らかにされた (4)。また、補体古典的経路の認識分子 C1q は、加齢に伴い血中濃度が上昇し、筋の組織再生を抑制して老化因子として働くことがわかった (5)。このように、補体系の一部の認識分子が、自己組織・細胞の認識に関与することが明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでのフィコリン研究の視点とは異なり、フィコリンが生体内の自己分

子を認識して内的環境の維持に働くことを明らかにする。とくに、獲得免疫が成立していない発生期に注目し、フィコリン欠損マウス胎児のマイクロアレイ解析、データベースを用いたパスウェイ解析などの網羅的解析と、フィコリン欠損マウス胎児の形態的解析および胎児組織を用いた生化学的解析によって、フィコリンの役割とその分子基盤・生物学的意義の解明をめざす。その中で、胎児と成体でのレクチン経路の構成の違いやフィコリン 1 とフィコリン 2 の役割の違いを明らかにする。その結果から、これまでの生体防御におけるフィコリンの役割に加え、とくにフィコリン 1 が自己細胞上の標的分子を認識し、内的環境の監視・維持に働くことを明らかにする。

## 3. 研究の方法

マウス発生期におけるフィコリンの役割を以下の方法で調べた。

フィコリンの生体における役割を網羅的に抽出するために遺伝子・タンパク質データベースを用いたパスウェイ解析を行った。

14.5 日齢の FcnA 欠損マウス胎児および FcnB 欠損マウス胎児の遺伝子発現をマイクロアレイ解析で解析し、野生型マウス胎児の結果と比較した。

12.5 日齢から 17.5 日齢のマウス胎児における組織異常を調べるために、フィコリン欠損マウス (FcnA 欠損、FcnB 欠損および FcnA/B 二重欠損) の各組織 (肝臓、脾臓、骨髄など) を野生型マウス胎児と比較した。各週齢の胚について、組織切片の各種染色と TUNEL 染色により、野生型マウスとの違いを調べた。

胎児組織における FcnA および FcnB の局在をみるために、野生型マウス胎児の組織切片を用いて免疫組織染色を行った。また、FcnA/B 二重欠損マウスの胎児組織切片に組替え FcnA (rFcnA) または rFcnB を添加して集積部位検出した。

マウス胎児におけるレクチン経路の各構成分子 (FcnA, FcnB, MASP-1, MASP-2, MASP-3, sMAP, MAP44, MBL-A, MBL-C, CL-K1) の発現を RT-PCR で調べた。

マウス胎児組織ホモゲネートから可溶性分画、ミクロソーム分画を調整し、ELISA により各分画への FcnA および FcnB の結合を測定した。結合の特異性は、糖による結合阻害と、各分画のノイラミニダーゼ処理により調べた。

フィコリン・MASP 複合体の分子構成は、野生型マウスの胚ホモジェネートの可溶性分画を抗体カラムにかけウェスタンブロットにより解析した。

FcnB 標的分子の同定は、マウス胎児組織のミクロソーム分画の二次元電気泳動と質量分析により行った。

成体の末梢白血球に働くフィコリンの役割を以下のように解析した。

網羅的解析から抽出されたフィコリンの造血系細胞の成熟や移動における役割について、実際に、rFcnA および FcnB が末梢白血球に結合するかどうか、またどの集団に結合するかを FACS で調べた。結合後に生じる細胞の変化を蛍光顕微鏡で観察した。結合の特異性は、糖による結合阻害実験と細胞のノイラミニダーゼ処理により調べた。

白血球由来の培養細胞を用いて、1 と同様の検討を行った。

末梢白血球表面の FcnB 標的分子の同定は、培養細胞から調整した膜分画を二次元電気泳動と質量分析により行った。

#### 4 . 研究成果

パスウェイ解析とマイクロアレイ解析の網羅的解析から、フィコリン 1 (マウス FcnB とヒト M-FCN を含むグループ) が細胞の移動・ホーミングさらに造血細胞の分化や成熟に関与する可能性が示唆された。そこで、三経統のフィコリン欠損マウス胎児の各組織(肝臓、脾臓、骨髄など)の形態を調べたが、いずれの系統の胎児にも大きな異常は認めなかった。詳細な検討の結果、12.5-14.5 日齢のフィコリン B 欠損マウスに微細な形態異常(とくに骨格系)を見いだした。胎児の組織では、FcnA は肝臓と脾臓で発現し、FcnB は成体とは異なり肝臓で発現していた。また、FcnA/B 二重欠損マウス胎児の組織切片に rFcnA または rFcnB を添加し結合をみたところ、rFcnB が骨格や軟骨周辺に集積することがわかった。rFcnA の集積はみられなかった。フィコリンはアポトーシス細胞を認識するという報告があり、胎児期に生じるアポトーシス細胞を認識して骨格系の形態形成に関与する可能性が考えられた。そこで、FcnB 欠損マウス胎児の組織切片を TUNEL 染色や活性型カスパーゼ 3 染色したが、野生型との間に有為な差は認めなかった。

12.5-14.5 日齢の野生型マウス胎児の RT-PCR の結果、レクチン経路の構成分子のうち、FcnA、FcnB、CL-K1、MASP-1、MASP-2 および MASP-3 が 12.5 日齢から産生されていることがわかった。一方、MBL-A、MBL-C、sMAP および Map44 の産生はこの時期には確認できなかった。胎児における sMAP と Map44 の欠如はアフィニティクロマトグラフィでも確認された。sMAP と Map44 はレクチン経路の活性を阻害する制御因子と考えられており、発生初期のレクチン経路は制御因子を含まない比較的単純な系であることが判明した。さらに、アフィニティクロマトグラフィの結果、FcnA は MASP-2 と複合体を形成し、FcnB は MASP-3 と複合体を形成していることが判明した。成体ではこのような単純な構成ではないことがわかっており、胎児では各フィコリンが特定の機能に特化している可能性が示唆された。

フィコリンの早期発生期の発現は、この時期にフィコリンの標的分子が内在していることを示唆している。これを確かめるために、マウス胎児組織ホモゲネートの各分画成分とフィコリンとの結合を調べた結果、FcnA と FcnB とともに可溶性分画とミクロソーム分画の両方に結合することがわかった。FcnA/B とともに一定濃度のミクロソーム分画への結合は日齢(13-17d)とともに増加した。その FcnA と FcnB の結合は、GlcNAc で阻害されたが Mannose、Galactose では阻害されなかった。シアル酸は FcnA の結合は阻害しなかったが、FcnB の結合を阻害した。ミクロソーム分画をノイラミニダーゼで処理すると、FcnB の結合が著しく低下した。一方、胎児組織可溶性分画への結合は FcnA と FcnB とともに増加し、FcnA の結合は GlcNAc と mannose で阻害され、フィコリン B の結合は、GlcNAc で阻害され、mannose や galactose では阻害されなかった。この結果は、FcnA と FcnB はともに可溶性分画とミクロソーム分画両者に標的分子が存在するものの、標的分子はフィコリン間でまた 2 分画間で異なることが示唆された。

次に、ミクロソーム分画中の FcnB の標的分子の同定に的を絞って解析した結果、いくつかの膜結合型タンパク質や受容体が候補として抽出された。FcnB はコアタンパク質のシアル酸残基を認識していると考えられた。標的分子は複数で、FcnB の群特異的な認識を反映していた。現在それらの作用機序の解析を進めている。

候補分子の中には、細胞骨格タンパク質も含まれ、とくにアクチンは FcnB に強い結合性を示した。アクチンは、成体マウスの肝、脾、肺、末梢血のミクロソーム分画からも標的分子として抽出された。FcnB は、アクチンの N 末端アミノ酸の N-アセチル基を認識すると考えられた。FcnB とアクチンとの結合は組換えアクチンを用いた実験でも確認された。

次に、網羅的解析で示唆されたフィコリン（とくにフィコリン 1）の白血球の移動や成熟への関与を実際の細胞を用いて検討した。その結果、FcnB は末梢 NK 細胞の一集団、T リンパ球の一集団、B リンパ球の一集団およびミエロイド系骨髄細胞に結合することが判明した。また、ヒト M-FCN が末梢樹状細胞の一集団、形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DC) に特異的に結合することを明らかになった。これらのフィコリンの細胞への結合は、GlcNAc やシアル酸添加によって阻害された。また、細胞のノイラミニダーゼ処理によって阻害され、フィコリンは細胞膜表面のシアル酸を認識していることが判明した。FcnB にみられた細胞結合活性は FcnA にはなく、フィコリン 1 に特有の機能と考えられた。FcnB が認識する細胞表面のシアル酸含有コアタンパク質の同定を試みた。また、rFcnB は細胞表面に結合した後で大きなクラスターを形成していた。このクラスター形成による細胞の形態や極性の変化や、細胞同士の凝集は明瞭ではなかった。これらの結果は、Jurkat, Raji, THP-1 細胞などの白血球培養細胞を用いた検討によっても確認された。

FcnB の標的分子の同定を行った結果、いくつかの膜タンパク質が候補分子として抽出された。これらのタンパク質のなかで多くのシアル酸を含む CD43 は有力な候補分子と考えられた。現在、確認と FcnB 結合以後のイベントについて解析を進めている。

これらの結果から、フィコリン 1 (FcnB, M-FCN) は、フィコリン 2 (FcnA, L-FCN) とは異なり、発生期と成体の両方において自己細胞を認識することが明らかになった。FcnA は MASP-2 と複合体を形成していることからレクチン経路を介して補体 C2, C4 の活性化を主導していると考えられる。FcnA の標的分子は自己の中にもあるという結果ではあるが、その糖特異性から推定して主な標的は外来性のものと考えられる。内在分子を標的とした FcnB の機能は、発生期においては MASP-3 と

複合体を形成して、成体においては 3 種類の MASP, sMAP および Map44 と複合体を形成して発揮されていると考えられた。しかし、rFcnB の個々の標的分子への結合後の rMASP-3 の活性化の証明には成功していない。フィコリンは多価のレクチンであり、標的分子の架橋などにより単独で作用する可能性は否定できない。その標的分子は、1 つは細胞表面のシアル酸含有タンパク質であり、もう一つは細胞傷害・アポトーシスなどで細胞の外に露出した細胞骨格タンパク質であると考えられる。フィコリン 1 機能の分子基盤の解明にはまだ多くの検討が必要である。

#### <引用文献>

- (1) Matsushita M. and Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med*, 1992, 176:1497-1502.
- (2) Matsushita, M., et al. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem*, 1996, 271:2448-2454.
- (3) Endo Y., et al. New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. In: Jeon, K.W., (ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2015, vol.316:49-110.
- (4) Rooryck C., et al. Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet*, 2011, 43: 197-203.
- (5) Naito A.T., et al. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell*, 2012, 149: 1298-1313.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Structural and functional overview of

the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 査読有, 2013, 61:273-283.

Kodama T, Sekine H, Takahashi M, Iwaki D, Machida T, Kanno K, Ishida Y, Endo Y, Fujita T. Role of complement in a murine model of peanut-induced anaphylaxis. Immunobiology, 査読有 2013, 218:844-850, doi: 10.1016/j.imbio,.

Brinkmann CR, Jensen L, Dagnæs-Hansen F, Holm IE, Endo Y, Fujita T, Thiel S, Jensenius JC, Degn SE. Mitochondria and the lectin pathway of complement. J Biol Chem, 査読有, 2013, 288:8016-8027, doi:10.1074/jbc.M112.430249.

Takahashi M, Sekine H, Endo Y, Fujita T. Comment on “Manna-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. J Immunol, 査読有, 2013, 190:2477, doi: 10.4049/jimmunol.1390002,.

Matsushita M, Kilpatrick D, Shiraki H, Liu Y, Tateishi K, Tsujimura M, Endo Y, Fujita T. Purification, measurement of concentration, and functional complement assay of human ficolins. Methods Mol Biol, 査読有, 2014, 1100:141-59, doi:10.1007/978-1-62703-724-2\_12.

Genster N, Takahashi M, Sekine H, Endo Y, Garred P, Fujita T. Lessons learned from mice deficient in lectin complement pathway molecules. Mol Immunol, 査読有, 2014, 61(2):59-68. doi: 10.1016/j.molimm.2014.07.007.

Holt C B, Østergaard J A, Axelgaard E, Nielsen G K, Endo Y, Thiel S, Hansen T K. Ficolin B in diabetic kidney

disease in a mouse model of type 1 diabetes. Mediators Inflamm, 査読有, 2015, 2015:65326, doi: 10.1155/2015/653260.

Nikaido T, Tanino Y, Wang X, Sato S, Misa K, Fukuhara N, Sato Y, Fukuhara A, Uematsu M, Suzuki Y, Kojima T, Tanino M, Endo Y, Tsuchiya K, Kawamura I, Frever C W, Munakata M. Serum syndecan-4 as a possible biomarker in patients with acute pneumonia. J Infect Dis, 査読有, 2015, 212:1500-1508, doi:10.1093/infdis/jiv234.

#### [学会発表](計1件)

高橋実, 遠藤雄一, A. Antonioli, V.M. Holers, W. Schwaeble, 藤田禎三, 関根英治. MASP-1 および MASP-3 の機能-ヒトとマウスの違いについて- 第50回補体シンポジウム. 2013年7月5日, 旭川.

#### [図書](計1件)

Endo Y, Matsushita, M., Fujita, T. New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. In: Jeon, K.W., (ed.), International Review of Cell and Molecular Biology, 査読有, 2015, vol. 316:49-110, doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.003. Elsevier.

#### [産業財産権](計0件)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

遠藤雄一 (ENDO, Yuichi)  
福島県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号: 20117427

#### (2) 研究協力者

鈴木俊幸 (SUZUKI, Toshiyuki)  
石田由美 (ISHIDA, Yumi)