

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460353

研究課題名(和文) 生体防御分子コレクチンCL-K1の新規な機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel function of biological defense molecule collectin CL-K1

研究代表者

大谷 克城(Ohtani, Katsuki)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90396367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コレクチンCL-K1は、異物排除に関わる自然免疫分子として知られていたが、発生や成長発育にCL-K1の関与が窺われたので、その役割とメカニズムの解明を試みた。発生過程においては、CL-K1 KOマウスを用いて、着床後胚発生から出生までの経時的な組織標本の解析から表現型の異常を明らかにした。また、成体における表現型解析では、様々な組織における異常や骨形成の異常を見出した。さらに、血液学的解析や尿検査により腎機能の異常も明らかにし、組織学的な異常が原因であることがわかった。生体防御以外の発生や形態形成に係る機能を明らかにすることにより「生体防御蛋白の二重機能性」を動物モデルで証明することができた。

研究成果の概要(英文)：Collectin CL-K1 was a secreted protein and was known as an innate immune molecule involved in elimination of microbes, but CL-K1 was involved in development and growth, so we attempted to elucidate its role and mechanism. Regarding the developmental process, phenotypic abnormalities could be found in CL-K1 KO mice from the morphology from embryogenesis to birth after implantation and from blood biochemical data. Phenotypic analysis in adults revealed abnormal tissue in H-E staining of each tissue specimen, further found abnormality in bone formation by using X-ray and CT apparatus, and clarified renal function abnormality by hematological analysis and urinalysis.

By clarifying completely new functions other than biological defense of collectins, "dual function of biological defense proteins" could be proved in animal models.

研究分野：免疫学

キーワード：コレクチン 発生・分化 糖鎖 自然免疫 補体

1. 研究開始当初の背景

(1) コレクチン CL-K1 遺伝子は CL-L1 発見時にその存在を明らかにし、2006 年本遺伝子クローニングを行い、その後、マウスにおいて血管平滑筋細胞に存在することを明らかにした。さらに、予備実験で CL-K1 ノックアウト (KO) マウスの作成に成功している。その結果、CL-K1 遺伝子 null マウスは、一見して小さく、低体重であることを見出した。

(2) 2011 年 Rooryck らによって、3MC 症候群と呼ばれる常染色体劣性遺伝病の 10 数例の家系において、次世代ゲノムシーケンサーを用いた遺伝子解析の結果、本疾患原因が CL-K1、MASP-3 遺伝子の変異によるどちらかのタンパク質欠損であることが報告された。3MC 症候群は両眼隔離、眼裂狭小、眼瞼下垂、球状眉、眼異形、頭蓋骨癒着、口蓋裂、前房欠損等を特徴とする遺伝病であり、遺伝子解析の結果は、CL-K1 と MASP が連動してヒトの個体発生に重要な役割を果たす可能性を示唆している。

(3) CL-K1 の糖鎖結合特異性は、Man9 に対して極めて高いことがわかっている。この Man9 糖鎖を有する既知のタンパク質としてサイログロブリンが唯一報告されている。この分子は甲状腺ホルモンの産生に関わり、甲状腺ホルモン分泌の亢進が体重減少と関連することから、作業仮説として、CL-K1 欠損により、甲状腺機能亢進が起こり、低体重・生育不全がおこる可能性を考えている。

2. 研究の目的

(1) 従来知られているコレクチンと同様に、CL-K1 の生体防御における役割が明らかになりつつある。しかしながら、この機能とは全く異なる発生や出生後の発育に関与することが予備実験や遺伝子病の発見から示唆されることから、この新たな機能を解明することにより、名取博士の昆虫モデルで提唱された「生体防御蛋白の二重機能性」を動物モデルにおいて証明する。

(2) 既に CL-K1 KO マウスは作成済みであることから野生型のマウスとの比較により、表現型における差異を明らかにする。次に、発生から発育のどの時期にどのような部位で機能しているかを評価し、特有の表現型に至る CL-K1 の役割や機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) CL-K1 の生体における役割を明らかにするため、CL-K1 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、発生および生体における表現型解析を行った。

① 発生における表現型解析

着床前の初期胚については、ヘテロマウスの雌雄およびワイルドマウスの雌雄の体外受精を行い、その差異を比較した。着床後に関

しては交配後 3 段階に分けて胎仔を摘出して組織標本作製し、顕微鏡観察により形態的な差異を観察するとともに、抗マウス CL-K1 抗体を用いて CL-K1 の局在との関連について検討を行った。

② 成体における表現型解析

ノックアウトマウスとワイルドマウスの各組織標本作製し、HE 染色を行い、顕微鏡観察により検討を行った。また、血液学的解析も行った。血清、血漿を用いた血液生化学的検査を行い野生型マウスと比較するとともに表現型解析で見出された知見と併せて CL-K1 の機能する臓器や関与の機序の予測を行った。

(2) CL-K1 とサイログロブリンの相互作用と甲状腺機能へ及ぼす影響についての検討するため、マウスの甲状腺の組織標本作製して、CL-K1 とサイログロブリンの免疫染色を行い、共局在の確認を行った。

4. 研究成果

(1) 表現型解析

① 発生における表現型解析

着床前については、差異は見いだされなかったが、着床後においては、いくつか異なる表現型が観察された。正常マウスと比較して CL-K1 KO マウスにおいて、口蓋裂などが観察されたが成長遅延による器官形成の遅れであり、出生時には正常な状態である場合がほとんどであり、有意な差異は見られなかった。出生時における CL-K1 KO マウスの低体重や低い出生率の原因究明には至らなかった。

② 成体における表現型解析

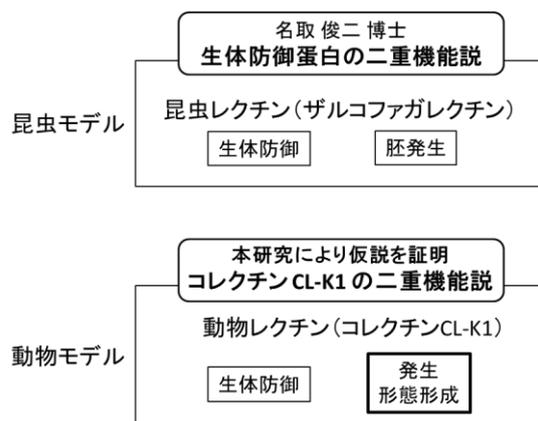
出生後の個体に関しては、免疫組織染色および HE 染色により、CL-K1 KO マウスの各組織において異常を明らかにした。さらに小動物実験用 X 線 CT 装置により断層撮影を行い 3D 画像の構築により骨格の差異について検討したところ、頭部や背骨において骨形成の異常を見出した。また、血清、血漿を用いた血液学的解析や尿検査を行い、腎機能に異常があることも明らかにした。

(2) CL-K1 と共に 3MC 症候群を引き起こす因子として報告のある MASP-1 の関与についても検討し、抗 CL-K1 抗体を用いた免疫沈降により MASP-1 の共沈について検討を進め、CL-K1 と MASP-1 が血液中で複合体を形成していることを明らかにした。さらに他の蛋白質も共沈することも確認し、同定を試みたが、関与する因子を明らかにすることはできなかった。CL-K1、MASP-1 と共に他の因子が関与することにより形態形成することが示唆された。

(3) 抗 CL-K1 抗体及び抗サイログロブリン抗体によりマウスの甲状腺における共局在

を明らかにすることができた。さらに CL-K1 を哺乳類細胞にて遺伝子発現を行うことにより、組換え CL-K1 を精製し、市販のサイログロブリンを用いた結合実験により両者が直接結合することをあきらかにすることができた。

(4) 以上の取り組みから、生体防御タンパク質である CL-K1 には、生体防御とは全く無関係な発生における形態形成という役割を担う二重機能性を有した因子であることを証明することができた。



今回の取り組みでは、当初計画していた発生や形態形成における CL-K1 の役割のメカニズムの解明には至らなかったが、ヒトの 3MC 症候群でみられた補体活性化経路において機能する MASP-1 と結合することから、両分子が協調して、発生における形態形成に関与することを示唆することができた。

(論文投稿準備中の為、詳細な結果を示す図表を示すことができなかつた。)

<引用文献>

- ① Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang SJ, Motomura W, Yoshizaki T, Fukuda M, Koyama S, Fukuzawa J, Fukuoh A, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N. Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol.* 2006, 50(12) 1001-13.
- ② Rooryck C, Diaz-Font A, Osborn DP, Chabchoub E, Hernandez-Hernandez V, Shamseldin H, Kenny J, Waters A, Jenkins D, Kaissi AA, Leal GF, Dallapiccola B, Carnevale F, Bitner-Grindzic M, Lees M, Hennekam R, Stanier P, Burns AJ, Peeters H, Alkuraya FS, Beales PL. Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet.* 2011, 43(3)197-203.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Hwang I, Mori K, Ohtani K, Matsuda Y, Roy N, Kim Y, Suzuki Y, Wakamiya N.

Collectin Kidney 1 Plays an Important Role in Innate Immunity against *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J Innate Immun.* 2017 9(2) 217-228. doi: 10.1159/000453316. 査読有

- ② Roy N, Ohtani K, Hidaka Y, Amano Y, Matsuda Y, Mori K, Hwang I, Inoue N, Wakamiya N. Three pentraxins C-reactive protein, serum amyloid p component and pentraxin 3 mediate complement activation using Collectin CL-P1. *Biochim Biophys Acta.* 2017 1861(2) 1-14. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.11.023. 査読有
- ③ Hansen SW, Ohtani K, Roy N, Wakamiya N. The collectins CL-L1, CL-K1 and CL-P1, and their roles in complement and innate immunity. *Immunobiology.* 2016 221(10)1058-67. doi: 10.1016/j.imbio.2016.05.012. 査読有
- ④ Roy N, Ohtani K, Matsuda Y, Mori K, Hwang I, Suzuki Y, Inoue N, Wakamiya N. Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation. *Biochim Biophys Acta.* 2016 1860(6)1118-28. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.02.012. 査読有
- ⑤ Ohtani K, Wakamiya N. Is host defense due to complement-related lectins? *Glycomicrobiology* 2016 15 1-11. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycomicrobiology/GM15/GM15E.html> 査読有
- ⑥ Troegeler A, Lugo-Villarino G, Hansen S, Rasolofy V, Henriksen ML, Mori K, Ohtani K, Duval C, Mercier I, Bénard A, Nigou J, Hudrisier D, Wakamiya N, Neyrolles O. Collectin CL-LK Is a Novel Soluble Pattern Recognition Receptor for *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2015 10(7)e0132692. doi: 10.1371/journal.pone.0132692. 査読有
- ⑦ Venkatraman Girija U, Furze CM, Gingras AR, Yoshizaki T, Ohtani K, Marshall JE, Wallis AK, Schwaeble WJ, El-Mezgueldi M, Mitchell DA, Moody PC, Wakamiya N, Wallis R. Molecular basis of sugar recognition by collectin-K1 and the effects of mutations associated with 3MC syndrome. *BMC Biol.* 2015 13 27. doi: 10.1186/s12915-015-0136-2. 査読有
- ⑧ Takahashi K, Ohtani K, Larvie M, Moyo P, Chigweshe L, Van Cott EM, Wakamiya N. Elevated plasma CL-K1 level is associated with a risk of developing disseminated intravascular coagulation (DIC). *J Thromb Thrombolysis.* 2014 38(3) 331-8. doi: 10.1007/s11239-013-1042-5. 査読有
- ⑨ Mori K, Ohtani K, Jang S, Kim Y, Hwang

I, Roy N, Matsuda Y, Suzuki Y, Wakamiya N. Scavenger receptor CL-P1 mainly utilizes a collagen-like domain to uptake microbes and modified LDL. *Biochim Biophys Acta*. 2014 1840(12)3345-56. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.08.015. 査読有

- ⑩ Jang S, Ohtani K, Fukuoh A, Mori K, Yoshizaki T, Kitamoto N, Kim Y, Suzuki Y, Wakamiya N. Scavenger receptor CL-P1 mediates endocytosis by associating with AP-2 μ 2. *Biochim Biophys Acta*. 2014 1840(11)3226-37. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.07.019. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Matsuda Y, Structural characterization of novel collectins, CL-K1, CL-L1, and CL-LK in blood. 26th International Complement Workshop. 2016.9.4-8. Kanazawa (Japan)
- ② Hwang I, In vitro and in vivo roles in Collectin Kidney 1 (CL-K1) with innate immunity against *Streptococcus pneumoniae*. 26th International Complement Workshop. 2016.9.4-8. Kanazawa (Japan)
- ③ Roy N, Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation. 26th International Complement Workshop. 2016.9.4-8. Kanazawa (Japan)
- ④ 大谷 克城、コレクチン CL-P1 は、急性期タンパク CRP を介して補体経路を活性化する、第 35 回 日本糖質学会、2016 年 9 月 1 日 - 3 日、高知市文化プラザ かるぼーと (高知)
- ⑤ 大谷 克城、コレクチン CL-K1 の糖鎖認識と 3MC 症候群における変異の分子機構への影響、BMB2015 (日本分子生物学会、日本生化学会合同大会)、2015 年 12 月 1 日 - 4 日、神戸ポートアイランド (神戸)
- ⑥ Wakamiya N, Molecular basis of sugar recognition by CL-K1 and the effects of mutations associated with 3MC syndrome. GLYC023 - 23rd International Symposium on Glycoconjugate. 2015.9.15-20, Split (Croatia)
- ⑦ Nitai Roy、急性期応答蛋白質である CRP と補体活性化についての検討、難治疾患共同研究拠点集会「糖鎖免疫 Glyco-Immunology 2015」、2015 年 8 月 19-20 日、東京医科歯科大学 (東京)
- ⑧ 大谷 克城、新規コレクチン CL-K1 の糖鎖認識と生物学的活性についての解析、第 34 回日本糖質学会、2015 年 7 月 31 日 - 8 月 2 日、東京大学 (東京)

[図書] (計 1 件)

- ① Ohtani K, Suzuki Y, Wakamiya N、

Springer、Glycoscience: Biology and Medicine、2014、1029-1036

[その他]

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/microbio/microbiology.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 克城 (OHTANI, Katsuki)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 90396367