

平成 22 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19770113
 研究課題名 (和文) 病原感染による補体レクチン経路活性化におけるセリンプロテアーゼ MASP の機能解析
 研究課題名 (英文) Analysis of complement activation in MASP-deficient mice

研究代表者
 岩城 大輔 (IWAKI DAISUKE)
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：10315492

研究成果の概要 (和文)：3 タイプの MASP 欠損マウスおよびリコンビナント MASP を用いた再構成実験、感染実験をおこない、生体内における MASP の機能について検討をおこなった。MASP-1 および MASP-2 は補体活性化に関与することが知られていたが、MASP-3 の機能についてはこれまで不明であった。本研究において、MASP-3 の活性化機構を明らかにし、MASP-3 が補体第二経路の活性化に関与することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：MASP-1 and MASP-2 are known to cleave some complement components and contribute to activation of the complement system. On the other hand, the function of MASP-3 remains unclear. To further clarify the roles of MASPs we generated and analyzed 3 types of MASP-deficient mice. In this study, we found a way to activate MASP-3 and the protease might be involved in activation of the alternative complement pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：自然免疫、補体、レクチン、セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

補体レクチン経路は、mannose-binding lectin (MBL) および ficolin が病原体表層糖鎖を認識し活性化される。MBL および ficolin は、3 種の MBL-associated serine protease (MASP) と複合体を形成し、MASP-1 および MASP-2 は補体活性化に関与することが知られていたが、MASP-3 の生理的機能につ

いては不明であった。

2. 研究の目的

3 タイプの MASP 欠損マウス (MASP-1/3 KO、MASP-2 KO、MASP-1/2/3 KO) およびリコンビナント MASP (rMASP) を用いた再構成実験、感染実験をおこない、以下の項目に重点をおき MASP の生体内における役割を明らかにする。

(1) 生体内における MASP の C3 活性化能の検討

(2) MASP KO マウスの病原微生物に対する感受性の解析

(3) MASP-3 の機能解析

3. 研究の方法

(1) 病原微生物へのC3沈着活性の測定：補体レクチン経路を活性化する病原体微生物の一つである *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) へのC3沈着活性について、各KOマウス血清の解析をおこなう。*S. aureus*をマウス血清とインキュベーション後、anti-C3抗体を用いたFACS解析により細菌表層へのC3沈着量を測定する。また、C3沈着活性の低下がいずれのMASPの欠損によるものかをMASP-1/2/3 KO血清とrMASPを用いた再構成実験により確認する。

(2) MASP KOマウスのオプソニンおよびファゴサイトーシス能の解析：各MASP KOマウスのC3活性化能を比較検討するうえで、C3オプソニン化およびファゴサイトーシスについて解析をおこなう。FITC標識した *S. aureus*をマウス血清とインキュベーションしてオプソニン化した後、マウス腹腔マクロファージとインキュベーション後、マクロファージ内に取り込まれた細菌をFACS解析により測定し、各血清のオプソニン活性を検討する。また、FITC標識 *S. aureus* をマウス腹腔内に注入した後、腹腔よりマクロファージを回収し、細胞内に取り込まれた細菌数を測定し、*in vivo*における各ノックアウトマウスのファゴサイトーシス能について解析をおこなう。

(3) 感染マウスの病原微生物体内残存数の測定：病原微生物感染後、麻酔済マウスより各臓器を摘出する。採取した各臓器ホモジェネートを希釈後、寒天培地にまき、形成されたコロニー数より残存病原体数を計測し、各KOマウスの生体内における異物排除機能について解析する。

(4) MASP-3の機能解析

①MASP-3活性化機構の解析：精製したMASP-1やMASP-2が、autoactivationにより容易に活性化されるのに対して、精製されたMASP-3を活性化させるには、4°Cで1週間以上放置しなければならないという報告がある(*J. Immunol.*, 2004, 172: 4342-4350)。最初に、生理的条件においてMASP-3を活性化させる条件を検討する。MASP-3単独では活性化が起こらない可能性が考えられるため、MBL-MASP複合体でのMASP-3活性化を解析する。マウス血清を細菌や酵母などレクチン経路活性化を誘導する病原微生物とインキュベーションして、病原微生物に結合した MBL-MASP複合体のMASP-3が活性化しているか調べる。活性化MASP-3は、加水分

解により、H鎖とL鎖の二本鎖構造を形成する。MASP-3の活性化は、二本鎖構造を指標にウェスタンブロッティングにより検出をおこなう。

②MASP-3活性化因子の同定：MBL-MASP複合体の病原微生物への結合によりMASP-3の活性化が惹起される条件を見つけられた場合、MASP KO血清とrMASPを用いた再構成実験をおこない、他のMASPのMASP-3活性化への関与を解析する。

③MASP-3の生理的基質の同定：ノックアウト血清において再構成したMBL-MASP複合体の活性化MASP-3による C2、C3、C4など補体成分の加水分解反応について解析をおこない、MASP-3のプロテアーゼ活性が、レクチン経路の活性化に関与するかを検討する。

4. 研究成果

(1) 病原微生物への C3 沈着活性の測定：*S. aureus* への C3 沈着は、1 分間のインキュベーションで野生型血清がプラトーに達するのに対して、MASP KO 血清はいずれも低位であった。MASP-2 KO と MASP-1/3 KO 血清は、それぞれ、5 分間、30 分間のインキュベーションにより野生型マウスと同程度の沈着が見られたが、MASP-1/2/3 KO 血清による C3 沈着は 30 分間インキュベーション後も正常血清より低かった。

(2) MASP KO マウスのオプソニンおよびファゴサイトーシス能の解析：MASP-1/3 KO マウスと MASP-1/2/3 KO マウスの腹腔内細胞のファゴサイトーシスレベルは、ともに野生型マウスの約 60%まで低下していた。

(3) 感染マウスの病原微生物体内残存数の測定：*S. aureus* 感染後の各臓器における細菌残存数は、MASP-1/3 KO マウスおよび MASP-1/2/3 KO マウスにおいて野生型マウスを上回り、有意な差が見られた。MASP-1/3 KO マウスおよび MASP-1/2/3 KO マウスにおいて、ファゴサイトーシス能の低下が認められたことから、MASP-2 よりもむしろ MASP-1 あるいは MASP-3 がオプソニン作用においてより重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

(4) MASP-3の機能解析

rMASP-3 は *S. aureus* により活性化が誘導され、活性化には MBL を必要としたことから、MBL-MASP-3 複合体が細菌を認識することで活性化が誘導されると考えられた。rMASP-3 の MASP-1/2/3 KO 血清への添加により *S. aureus* への C3 沈着は回復し、オプソニン活性も野生型血清の 90%まで回復したが、rMASP-3 による C3 および C4 の直接活性化は見られなかった。また、MASP-1/3 KO および MASP-1/2/3 KO 血清において、補体 B 因子活性化が著しく低下しており、rMASP-3 の添加で B 因子の活性化は回復した。以上の結果よ

り、MASP-3 の補体第二経路活性化への関与が示唆された。

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)

①M. Takahashi, Y. Ishida, D. Iwaki, K. Kanno, T. Suzuki, Y. Endo, Y. Homma, T. Fujita (2010): Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J. Exp. Med.* 207, 29-37. 査読有

②Y. Endo, N. Nakazawa, D. Iwaki, M. Takahashi, M. Matsushita, T. Fujita, (2009): Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *J. Innate. Immun.* 2, 33-42. 査読有

③M. Takahashi, D. Iwaki, K. Kanno, Y. Ishida, J. Xiong, M. Matsushita, Y. Endo, S. Miura, N. Ishii, K. Sugamura, T. Fujita (2008): Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J. Immunol.* 180, 6132-6138. 査読有

④K. Inoue, X. Wang, J. Saito, Y. Tanino, T. Ishida, D. Iwaki, T. Fujita, S. Kimura, M. Munakata (2008): Plasma UGRP1 levels associate with promoter G-112A polymorphism and the severity of asthma. *Allergol. Int.* 57, 57-64. 査読有

⑤岩城大輔、藤田禎三 (2007): 補体活性化のレクチン経路とプロテアーゼ、臨床免疫・アレルギー科、48巻、711-718項、科学評論社。査読無

[学会発表] (計 4 件)

①岩城大輔、菅野和子、高橋実、遠藤雄一、松下操、藤田禎三: Mannose-binding lectin-associated serine protease 3 (MASP-3) の機能解析、BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、兵庫県神戸市、2008年12月10日

②D. Iwaki, K. Kanno, M. Takahashi, Y. Endo, M. Matsushita, T. Fujita: Activation of mannose-binding lectin-associated serine protease 3. XXII International Complement

Workshop, Basel, Switzerland, 30 September, 2008.

③岩城大輔、菅野和子、高橋実、遠藤雄一、松下操、藤田禎三: MASP-3 の活性化と機能解析、第73回インターフェロン・サイトカイン学会 第19回生体防御学会 第45回補体シンポジウム 3学会合同大会、北海道札幌市、2008年7月11日

④岩城大輔、菅野和子、高橋実、遠藤雄一、松下操、藤田禎三: MASP 欠損マウスにおける *Staphylococcus aureus* に対する食作用の解析、第44回補体シンポジウム、神奈川県平塚市、2007年8月24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城 大輔 (IWAKI DAISUKE)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10315492

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし