

機関番号：16401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570136
 研究課題名(和文) コレクチンとの相互作用による免疫グロブリンの機能制御
 研究課題名(英文) Analysis of the interactions of collectins with immunoglobulins and the regulation immunoglobulin functions

研究代表者
 清水 健之 (SHIMIZU TAKEYUKI)
 高知大学・教育研究部医療学系・准教授
 研究者番号：10339137

研究成果の概要(和文)：本研究により、コレクチンの MBL と SP-D が糖認識領域を介して IgM に結合することが明らかとなった。さらに MBL の結合性は IgM の多量体構造、抗原結合親和性、抗原密度などに依存することが示された。これらの結果は、IgM の形状は抗原結合によって親和性や抗原密度に依存して変化すること、そしてそれらの変化を MBL が見分けることが出来ることを示唆している。また、MBL が補体系古典経路の活性化制御に関与する可能性を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We found that MBL and SP-D bound to IgM through CRD. The interactions between MBL and IgM in immune complexes depended on the affinity and antigen-density. These results suggest that antigen-bound IgM can take different conformations, which are distinguished by MBL. We also found that MBL can modulate classical pathway of complement cascade.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：免疫学、蛋白質、生体分子、コレクチン、免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

免疫グロブリン(抗体)は、獲得免疫による感染防御反応における最も重要な因子の一つである。一方で炎症やアレルギー、自己免疫疾患などの発症に関与しており、免疫グロブリン機能の活性化と抑制のバランスを保つことが必要である。その制御機構の解明は、免疫学における最も重要なテーマの一つである。

コレクチンファミリーに属する肺サーファクタント蛋白質 A (SP-A) と同 D (SP-D)、マンノース結合レクチン (MBL) は、自然免

疫生体防御レクチンとして、感染防御の最前線で活躍している。さらに我々は、コレクチンがマクロファージの Toll 様受容体シグナル制御や食食受容体発現増強など、様々な生体防御反応の制御に関与していることを示してきた。

これまでに、コレクチンが免疫グロブリンと結合することが報告されている。しかし、この相互作用が免疫グロブリンの生体防御機能にどのような意味を持つのかは不明であった。

2. 研究の目的

コレクチンと免疫グロブリン、免疫複合体の相互作用を詳細に解析することは、コレクチンによる免疫グロブリンの機能調節のメカニズムを考える上での基盤となる。そこで、コレクチンと免疫グロブリン、さらに抗原を結合した免疫複合体との相互作用を複数の実験系を用いて測定する。このとき、性質の異なる抗原や免疫グロブリンを用いて、その違いについて検討する。また、コレクチンの相互作用に重要なドメインを決定し、結合様式を明らかにする。

コレクチンとの相互作用の解析結果をもとに、免疫グロブリンの機能がどのように変化するかを解析する。一つは、免疫グロブリンによる補体経路の活性化を解析する。もう一つは、免疫細胞に発現している Fc 受容体を介した機能である、マクロファージによる貪食や、抗原による架橋で起こる細胞の活性化を調べる。コレクチンが免疫グロブリンの機能にどのような影響を与えるのかを明らかにし、生体防御反応における生物学的重要性を解明する。

3. 研究の方法

(1) コレクチンと免疫グロブリンの相互作用の解析

①今回使用した免疫グロブリンは、同一の可変領域（ハプテンの1種である NP を特異的に認識する）を持ち定常領域の異なる組換え免疫グロブリン、もしくはモノクローナル IgM (NP-CGG 免疫マウスから得られた NP 特異的 IgM 産生ハイブリドーマから得られた。同一の V_H 遺伝子と κ 軽鎖を使用しているが、CDR3 と軽鎖に多様性があり、抗原親和性が異なる。) である。コレクチンはヒト SP-A、SP-D、MBL 遺伝子を導入することにより、CHO 細胞を用いて産生させ、精製した。

②コレクチンと免疫グロブリンの相互作用は、以下の3通りの方法で検討した。免疫グロブリンをマイクロタイターウェルに固相化し、ビオチン化組換えコレクチンの結合を ELISA 法で検出した。免疫グロブリンとビオチン化コレクチンを溶液中で反応させ、ストレプトアビジン磁気ビーズでプルダウン後、Western blotting により免疫グロブリンの共沈を検出した。MBL をセンサーチップに固定し、アナライトとして組換え免疫グロブリンを流して、表面プラズモン解析を行った。

③MBL や SP-D と IgM の結合様式を解析するため、固相化 IgM との相互作用について、以下の2点を検討した。結合反応液中に、EDTA や過剰のマンノース、コレクチンの糖結合領域 (CRD) に対するモノクローナル抗体を加えて、その影響調べた。また、IgM を DTT で還元、ヨードアセトアミドでアルキル化することにより、多量体構造を破壊した後、マイク

ロタイタープレートに固相化して、MBL の結合性を比較した。

④免疫複合体中の免疫グロブリンへの結合性を解析するため、NP-BSA をマイクロタイターウェルに固相化し、抗 NP 免疫グロブリンを反応させることにより、免疫複合体を形成させた。この抗原に結合した免疫グロブリンに対するビオチン化コレクチンの結合を、ELISA 法で検出した。

(2) 赤血球溶血反応による補体系活性化の測定

ヒツジ赤血球を NP 化し、抗 NP IgM とウサギ補体を添加することにより溶血反応を起こした。別法として、ヒツジ赤血球に抗ヒツジ赤血球マウス血清を加え、ウサギ補体を添加することにより溶血反応を起こした。反応液上清の吸光度を測定し、水による完全溶血と比較して溶血度を求めた。コレクチン添加による影響を検証した。

(3) マクロファージによる貪食作用

①蛍光ビーズに NP-BSA を結合させ、さらに抗 NP IgG2b を反応させることで IgG 結合ビーズを調整する。カバーガラスに付着させたラット肺胞マクロファージに貪食させ、ビーズを取り込んだ細胞をフローサイトメトリーで解析した。

②抗ヒツジ赤血球血清を反応させることにより、もしくは NP 化赤血球に抗 NP IgM や IgG2b を反応させることにより、感作赤血球を調整した。コレクチンを反応させ洗浄後、カバーガラスに付着させたマクロファージ細胞株 Raw264.7 細胞に貪食させた。細胞外に付着している赤血球を溶血後、貪食している細胞数を顕微鏡下で計測した。

(4) IgE による脱顆粒反応

ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞を抗 NP IgE によって感作し、NP-BSA で刺激した。脱顆粒を培養上清中に放出された β -hexosaminidase 活性の測定により定量した。マウス骨髄由来マスト細胞は、骨髄細胞を IL-3 と SCF 存在下で培養することにより誘導し、RBL-2H3 と同様に用いた。IgE 依存脱顆粒反応におけるコレクチンの効果を検討した。

4. 研究成果

(1) コレクチンは、CRD を介して IgM に結合する。

①SP-D と MBL は、固相化した免疫グロブリンに結合するが、特に IgM と IgE、IgA に対して強い結合を示した。一方、IgG への結合は比較的弱かった。SP-A は他の2つのコレクチンと比較すると免疫グロブリンへの結合は弱い、IgM に対しては結合がみられた。溶液中での反応では、全てのコレクチンは IgM に対して結合性を示した。他に、IgA への結合も若干みられた。表面

プラズモン解析でも、固相化した MBL に対して IgM が結合することが示された。以上の結果より、コレクチンのうち、SP-D と MBL は IgM に対して結合性を示すことがわかった。IgE や IgA に対しては条件次第で結合性がみられるが、IgG への結合性は弱い。SP-A は免疫グロブリンに対する結合性が弱く、IgM に対してのみ結合性を示した。

②MBL や SP-D の IgM に対する結合性は、Ca²⁺ を必要とし、EDTA や過剰のマンノースで阻害された。また、CRD に対するモノクローナル抗体によって阻害されることから、コレクチンの CRD が結合に関与していることが明らかとなった。IgM の多量体構造を還元・アルキル化により破壊すると、IgM の多量体構造の分解と関連して MBL の結合性が顕著に減少した。IgG はその定常領域に N 型糖鎖が 1 カ所付加しているのに対し、IgM では 5 カ所の糖鎖結合部位がある。この修飾糖鎖の数と付加している糖鎖構造の違い、及び IgM の多量体構造がコレクチンの結合性に重要であることが示唆された。

③固相化した NP-BSA に結合した免疫グロブリンのうち、IgM に対して SP-D と MBL は強い結合を示した。IgE に対しても弱い結合がみられたが、IgG は結合しなかった。SP-A はいずれの場合も結合はみられなかった。以上の結果から、IgM は抗原非存在下のみならず、抗原に結合した状態でも SP-D や MBL のリガンドとなり得ることが示された。

(2)免疫複合体の IgM に対する MBL の結合性は、IgM のクローンによって異なり、抗原密度と親和性に依存する。

①IgM と MBL が最も明確な結合を示したので、これについてさらに詳しい検討を行った。固相化した IgM に対するビオチン化 MBL の結合は、IgM クローン間で異なることがわかった。このことは、修飾糖鎖の構造にクローン間で違いがあることを示唆する。また、初回免疫で得られたクローン間での差異に比べ、追加免疫で得られたクローン間の差異の方が大きかった。追加免疫で得られる IgM は、糖鎖修飾に関して多様性が高いことが示唆された。

②それぞれの IgM の抗原親和性は異なるが、固相化する抗原の密度が十分高い場合、いずれのクローンでも同程度抗原に結合する。この抗原に結合した IgM に対する MBL の結合性もクローン間で違いがあった。特に抗原親和性の高い IgM では、MBL の結合性が低下していることが示唆された。このことから、抗原親和性の高い IgM は抗原結合時に MBL が結合し難い形状を取っていると考えられる。

(3)高濃度の MBL は補体活性化を抑制する。

①IgM による補体系古典経路の活性化に対するコレクチンの影響を調べるため、赤血球溶血反応を測定した。SP-A や SP-D 添加では、

溶血に有意な違いは見られなかった。よって、肺コレクチンは補体経路活性化には関与しないと考えられる。

②MBL の場合は、50 μ g/ml 添加すると溶血反応が有意に低下し、MBL が補体経路活性化を抑制する効果があることがわかった。今回用いた組換え MBL が、C1q や MBL-MASP 複合体の IgM への結合を阻害している可能性がある。MBL の補体活性化阻害のメカニズムは、今後さらに解析する必要がある

(4)SP-A は Fc γ R を介した貪食を促進する。

①ラット肺胞マクロファージによる IgG2b 結合ビーズの貪食は、SP-A によって促進された。SP-A は、IgG が結合していないビーズを用いた場合でも貪食を促進する効果があるが、IgG 結合ビーズではその効果がより協調された。よって、SP-A は Fc γ R 受容体を介した病原菌の排除にも関与していることが示唆された。SP-A の IgG 結合は弱いので、SP-A は IgG に作用するよりも、マクロファージに作用して貪食を増強している可能性が高い。

②IgM 感作赤血球の貪食を測定してみたが、コレクチンによる貪食促進効果は確認できなかった。コレクチンは抗原に結合した IgM に結合できるが、それによるオプソニン効果は認められなかった。

(5)IgE による脱顆粒は、コレクチンでは抑制できない。

SP-D や MBL は IgE と固相系で結合したので、IgE による脱顆粒をコレクチンが制御できるのかを検討した。Fc ϵ RI を発現しているラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 もしくはマウス骨髄由来マスト細胞に、抗 NP IgE 抗体を反応させて感作し、NP-BSA で刺激した。感作時、及び刺激時にコレクチンを添加しても、脱顆粒に有意な差は見られなかった。

本研究課題の遂行により、MBL や SP-D が免疫グロブリンの IgM に結合すること、結合にはコレクチンの CRD が重要であることが示された。さらに、コレクチンの結合には IgM の形状（糖鎖の種類と数、多量体構造、抗原結合時の形態）が深く影響していることが示された。そして、MBL は IgM による補体活性化を変化させることが示された。

これらの成果は、MBL が補体系レクチン経路だけでなく、古典経路の活性化にも関与することにより、感染制御に働いている可能性を示唆するものである。抗原結合による IgM の形態変化は IgM の機能発揮と深く関連していると考えられている。これまでに我々は、IgM による補体活性化を比較した場合、親和性の高い IgM が高密度抗原

に結合したときは、補体活性化が低いことを示しており、これは IgM の形態の違いを反映していると考えている。このような IgM の形態の違いは MBL も見分けられるということが明らかとなった。今後 IgM の機能解析の進展に重要な知見と考えている。

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 6 件)

- ① Akikazu Murakami, Yuka Takahashi, Miyuki Nishimura, Takeyuki Shimizu, and Takachika Azuma. 'The amino acid residue at position 95 and the third CDR region in the H chain determine the ceiling affinity and the maturation pathway of an anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl antibody' *Mol. Immunol.*, 査読有, vol. 48, 2010, p. 48-58.
- ② Kaku Sawada, Shigeru Arika, Takashi Kojima, Atsushi Saito, Masami Yamazoe, Chiaki Nishitani, Takeyuki Shimizu, Motoko Takahashi, Hiroaki Mitsuzawa, Shin-ichi Yokota, Norimasa Sawada, Nobuhiro Fujii, Hiroki Takahashi, and Yoshio Kuroki. 'Pulmonary collectins protect macrophages against pore-forming activity of *Legionella pneumophila* and suppress its intracellular growth' *J. Biol. Chem.*, 査読有, vol. 285, 2010, p. 8434-8443.
- ③ Takeyuki Shimizu, Chiaki Nishitani, Hiroaki Mitsuzawa, Shigeru Arika, Motoko Takahashi, Katsuki Ohtani, Nobutaka Wakamiya, and Yoshio Kuroki. 'Mannose binding lectin and lung collectins interact with Toll-like receptor 4 and MD-2 by different mechanisms' *Biochim. Biophys. Acta.*, 査読有, vol. 1790, 2009, p. 1705-1710.
- ④ Chiaki Nishitani, Motoko Takahashi, Hiroaki Mitsuzawa, Takeyuki Shimizu, Shigeru Arika, Norio Matsushima, and Yoshio Kuroki. 'Mutational analysis of Cys⁸⁸ of Toll-like receptor 4 highlights the critical role of MD-2 in cell surface receptor expression' *Int. Immunol.*, 査読有, vol. 21, 2009, p. 925-934.
- ⑤ Masami Yamazoe, Chiaki Nishitani, Motoko Takahashi, Tsuyoshi Katoh, Shigeru Arika, Takeyuki Shimizu, Hiroaki Mitsuzawa, Kaku Sawada, Dennis R. Voelker, Hiroki Takahashi, and

Yoshio Kuroki. 'Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors' *J. Biol. Chem.*, 査読有, vol. 283, 2008, p. 35878-35888.

- ⑥ Xiaomeng Nie, Chiaki Nishitani, Masami Yamazoe, Shigeru Arika, Motoko Takahashi, Takeyuki Shimizu, Hiroaki Mitsuzawa, Kaku Sawada, Kelly Smith, Erika Crouch, Hisato Nagae, Hiroki Takahashi, and Yoshio Kuroki. 'Pulmonary surfactant protein D binds MD-2 through the carbohydrate recognition domain' *Biochemistry*, 査読有, vol. 47, 2008, p. 12878-12885.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 清水健之、コレクチンの免疫グロブリンに対する結合性の解析、第 83 回日本生化学会大会、2010 年 12 月 9 日、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ② 有木茂、Pulmonary collectins bind and agglutinate *M. avium* and attenuate its growth、第 83 回日本生化学会大会、2010 年 12 月 9 日、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ③ 西谷千明、酸化肺サーファクタントリン脂質による LPS 惹起炎症性細胞応答制御機構の解明、第 83 回日本生化学会大会、2010 年 12 月 9 日、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ④ 有木茂、非定型抗酸菌に対する肺コレクチンの生体防御機構、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 25 日、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑤ 西谷千明、肺サーファクタントリン脂質の酸化による LPS 惹起炎症性細胞応答の抑制、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 25 日、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑥ 有木茂、Pulmonary collectins interact with and aggregate *Mycobacterium avium*、第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 11 日、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑦ 澤田格、Pulmonary collectins exhibit anti-microbial activity against *Legionella pneumophila*、第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 11 日、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑧ 山添雅己、肺サーファクタント蛋白質 D によるリポ多糖惹起炎症反応の抑制、第 19 回日本生体防御学会学術総会、2008 年 7 月 10 日、北海道大学学術交流会館 (北海道)
- ⑨ 有木茂、肺コレクチンは非定型抗酸菌

に結合し、菌体凝集を惹起する、第 19 回
日本生体防御学会学術総会、2008 年 7 月
10 日、北海道大学学術交流会館（北海道）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 健之 (SHIMIZU TAKEYUKI)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：10339137

(2) 研究分担者

黒木 由夫 (KUROKI YOSHIO)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：70161784
(2009 年度～2010 年度：連携研究者)

西谷 千明 (NISHITANI CHIAKI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：30381255
(2009 年度～2010 年度：連携研究者)

有木 茂 (ARIKI SHIGERU)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：80464478
(2009 年度～2010 年度：連携研究者)