

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590259

研究課題名(和文) 生体防御因子であるスカベンジャー受容体CL-P1の生体における役割解明

研究課題名(英文) Biological analyses of scavenger receptor CL-P1 which is a host defense factor

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：CL-P1の発生過程および生体における役割の解明について検討を行った。CL-P1遺伝子ノックアウトマウスが胎生致死であることから、致死時期検討を行い、着床前であることを明らかにした。さらに受精後のCL-P1の動態をCL-P1遺伝子のプロモーターによりGFPを発現するトランスジェニックマウスを用いて検討を行ったが、受精直後からの発現は確認できたがどのような機能を担うか明らかにすることはできなかった。生体での役割を解析する為コンディショナルノックアウトマウスの作成を行い、検討を行ったが、現段階での新たな知見は得られなかった。今後も検討を続けCL-P1の生体における役割の解明に努めたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：I have been working for the elucidation of the role in the biological and developmental processes of CL-P1. Since the CL-P1 gene knockout mice are embryonic lethal, I examined the lethal time, it was clarified that it is pre-implantation. I have studied a function of CL-P1 after the fertilization using the transgenic mouse which developed GFP by the promoter of the CL-P1 gene, but I was able to confirm the expression from immediately after fertilization, but it was not possible to clarify whether play what function. And creating conditional knockout mice in order to analyze the role in vivo, it was examined, but did not provide a new finding at the present stage. I continue examining it and would like to try for the elucidation of the biological CL-P1 in future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：発生・分化 コレクチン スカベンジャー受容体 血管内皮細胞 ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

コレクチンは、その構造の内部にコラーゲン様構造とカルシウム要求性の糖認識領域(carbohydrate recognition domain; CRD)を持ち、CRDによって微生物などの異物の糖鎖を認識して排除する自然免疫を担う分子であると考えられている。申請者は研究の過程において *CL-L1*、*CL-P1*、*CL-K1* の3種類の新規コレクチン遺伝子を発見した(*CL-L1*: Ohtani, *JBC* 1999, *CL-P1*: Ohtani, *JBC* 2001, *CL-K1*: Keshi, Ohtani, *Microbiol Immunol* 2006)。*CL-P1* (collectin placenta 1)は、細胞内領域、膜貫通領域、コイルドコイル領域、コラーゲン様領域、ネック領域、CRDの6つのドメイン構造を持ち、3量体を形成し血管内皮細胞に膜タンパク質として発現すると考えられる。また、この予測される *CL-P1* の構造は、スカベンジャー受容体 SR-AI に類似しており、*CL-P1* を過剰発現させた CHO 細胞において、酸化変性させた LDL(酸化 LDL)に結合してエンドサイトーシスすること、さらに酵母、大腸菌、黄色ブドウ球菌等と結合してファゴサイトーシスすることから、*CL-P1* が生体防御にも直接的に関わっていることを明らかにした(Ohtani, *JBC* 2001, Jang, Ohtani, *JBC* 2009)。

さらに、*CL-P1* は、アミノ酸配列の相同性がヒト-マウス間で92%と非常に高く、生体に必須な遺伝子であることが示唆されたことから、ゼブラフィッシュをモデルとして、受精卵を用い *CL-P1* の発現を抑制することで発生初期段階での *CL-P1* の機能解析を進めてきた。その結果、*CL-P1* 遺伝子発現を抑制することにより、背部大動脈、体節血管の欠損、心嚢(心臓に相当)浮腫、体幹形成の著しい遅延が認められた。そこで、*CL-P1* の発現抑制をすると共に、血管増殖因子(*VEGF*)遺伝子の過剰発現を行ったところ、発生遅延の回復が見られたことから、*CL-P1* が血管形成に関与することを明らかにした(Fukuda, Ohtani, *BBA*, 2011)。本結果は、スカベンジャー受容体が血管発生に関与する可能性を示した初めての報告であり、さらに自然免疫に関与する生体防御因子として捉えられていたコレクチンが形態形成に関与するという新しい研究局面を開くことができた。

次に、*CL-P1* 遺伝子欠損マウスを作成し、哺乳動物での *CL-P1* 機能解析を行うことを計画した。得られたヘテロマウスは雌雄ともに、成長や形態はまったく通常マウスとの間に差異は見られなかった。さらにヘテロマウス同士の交配を行い *CL-P1* 遺伝子ノックアウトマウスの作成を試みたが、成体マウス、中期発生段階(7.5日胚、10.5日胚)において、*CL-P1* 遺伝子欠損マウスを確認することが出来ないことから胎生致死であることを明らかにした。しかも、通常、血管や心臓などの形成不全による胎生致死は、10.5日胚前後でおこることが報告されているが、7.5日胚

でも生存胚が得られなかったことから、より以前にすでに胎生致死がおこっていることを示唆した。本結果から、血管形成とは異なる機序で、*CL-P1* が胚初期発生に関与している可能性を示唆した。

## 2. 研究の目的

これまでの検討結果から、*CL-P1* 遺伝子の生体防御因子としての役割以外に、初期発生、血管形成において重要な役割を担うことを示唆した。本研究において、さらに詳細な検討により生体における機能を明らかにし、そのメカニズムを解明することにより、*CL-P1* がこれまでのコレクチンやスカベンジャー受容体の概念である生体防御とは異なる観点をもつ新たな機能を備えた分子であることを証明することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

発生における *CL-P1* の役割を明らかにするため、まず、受精後の *CL-P1* 発現の変化を調べた。正常マウスを用いた体外受精の後、定量PCRによる mRNA 定量、組織切片を用いた免疫組織染色を行った。その後、ヘテロマウスでの体外受精を行い、受精後の発生を *in vitro* で顕微鏡下観察しながら、分化がどこまで進むのか、さらに着床が完全にできるのかなどを確認することにより *CL-P1* の胚発生における役割解明を進めた。ゼブラフィッシュにおいて血管形成に *CL-P1* 遺伝子が関わることを明らかにしているため、上記と並行してコンディショナルノックアウトマウスを作成し、形態形成後の個体で、血管増殖や微生物に対する感染防御能等の自然免疫における *CL-P1* の役割解明の研究を進めた。

## 4. 研究成果

### (1) 受精後の *CL-P1* 発現の把握

正常マウスを用いた体外受精の後、*CL-P1* の mRNA レベル(定量PCRによる mRNA 定量)、タンパク質レベル(組織切片を用いた免疫組織染色)での検討により *CL-P1* の発現動態の把握を試み、受精の直後より発現誘導がおこることを明らかにした。

### (2) *CL-P1* ヘテロ接合体配偶子の体外受精による胎生致死時期決定

胚の成長分化過程の形態学的観察、成長休止胚の遺伝子型解析を行い、ノックアウト胚の胎生致死時期の決定を行った。*CL-P1* 遺伝子ヘテロマウスを用いて、体外受精を行い、*in vitro* で、その成長分化を顕微鏡下で観察し、致死胚については、遺伝子の情報を調べ、*CL-P1* 遺伝子ホモ欠損胚かどうかを調べた。これら観察、検討によりどこまで成熟分化が可能であるか判断したところ、着床以前に致死に至ることを明らかにした。ヘテロマウスの体外受精により、経時的に胚を個別にサン

プリングし、CL-P1 の発現を定量 PCR により確認を行い、さらに受精卵に siRNA をマイクロインジェクションし、発生過程を観察したが、致死時期決定には至らなかった。

CL-P1 ノックアウトマウスが胎生致死である証明のため CL-P1 遺伝子トランスジェニックマウスとの交配による表現型回復を確認する必要があるため CL-P1 遺伝子トランスジェニックマウスの作成を試みた。CL-P1 遺伝子のプロモーター領域とマウス CL-P1 cDNA と連結したコンストラクトを構築し、CL-P1 遺伝子トランスジェニックマウスを作成した。同時に発現様式解析のため、マウス CL-P1 遺伝子のプロモーター領域に GFP 遺伝子を連結したコンストラクトの構築も行い、個体を獲得した。出生後の CL-P1 の役割を解明するためコンディショナルノックアウトマウスの作成も進めたが個体獲得には至らなかった。

獲得した CL-P1 トランスジェニックマウスと CL-P1 ヘテロマウスとの交配により CL-P1 遺伝子欠損による胎生致死の証明を試み、CL-P1 遺伝子欠損マウスの個体の出生確認はできなかった。原因を究明するため複数の CL-P1 トランスジェニックマウスのクローンについて検討したが、いずれのクローンも本来のプロモーターによる発現とは異なる遺伝子発現を示したことから表現型回復には至らなかったと結論付け、他のクローンによる検討を試みたが証明には至らなかった。

CL-P1 の発現様式解析のため、マウス CL-P1 遺伝子のプロモーターによって GFP を発現するトランスジェニックマウスを作成し、発生段階を含め発現解析を行った。その結果、血管内皮以外の発現が明らかとなり、新たな機能を示唆することができた。

以上の取り組みの結果、新たな機能の解明には至らなかったが、今後もこれまでの知見をもとにさらに研究を進め CL-P1 の生理的な役割の解明につなげていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

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*, 査読有、2014、

DOI:10.1007/s11239-013-1042-5

Ohtani K, Wakamiya N, Novel collectins play double roles in embryonic and fetal development as well as innate immunity, *Seikagaku*, 査読有、Vol85, No. 1, 2013、38-42、

<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-conte>

<nt/uploads/2013/06/85-01-08.pdf>

Hosoda R, Kuno A, Hori YS, Ohtani K, Wakamiya N, Oohiro A, Hamada H, Horio Y, Differential cell-protective function of two resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) glucosides against oxidative stress, *J Pharmacol Exp Ther*, 査読有、Vo344, No. 1, 2013, 124-132  
DOI: 10.1124/jpet.112.198937

Ohtani K, Suzuki Y, Wakamiya N, Biological functions of the novel collectins CL-L1, CL-K1, and CL-P1, *J Biomed Biotechnol*, 査読有、2012  
DOI:10.1155/2012/493945

Yoshizaki T, Ohtani K, Motomura W, Jang SJ, Mori K, Kitamoto N, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N, Comparison of human blood concentrations of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin, *J Biochem*, 査読有、Vol. 151, No. 1, 2011、275-283  
DOI: 10.1007/s13258-011-0001-9

Kim YU, Ohtani K, Mori K, Jang SJ, Suzuki Y, Wakamiya N, Gene Regulation Function of the Three Specificity Protein-1 (Sp1) within the Human Collectin Placenta-1 Proximal Promoter, *Gene and Genomics*, 査読有、Vol. 33, 2011、275-283  
DOI: 10.1093/jb/mvr114

Koyama S, Ohtani K, Fukuzawa J, Yao N, Fukuda M, Jang SJ, Hasebe N, Kikuchi K, Itabe H, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N, The induction of human CL-P1 expression in hypoxia/ reoxygenation culture condition and rat CL-P1 after ischemic/reperfusion treatment, *Biochim Biophys Acta*, 査読有、Vol. 1810, 2011, 836-842  
DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.013

Fukuda M, Ohtani K, Jang SJ, Yoshizaki T, Mori K, Motomura W, Yoshida I, Suzuki Y, Kohgo Y, Wakamiya N, Molecular cloning and functional analysis of scavenger receptor zebrafish CL-P1, *Biochim Biophys Acta*, 査読有、Vol. 1810, 2011, 1150-1159  
DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.09.016

[学会発表](計 13 件)

Wakamiya N, Collectin CL-P1 is an endocytosis and phagocytosis receptor using scavenger receptor CL-P1 is an endocytosis receptor using clathrin-dependent endocytosis pathway and clathrin-independent phagocytosis pathway, European Meeting on Complement in Human Disease, 2013 年 8 月 17 日、Jena (Germany)

松田泰幸、コレクチン CL-L1 の組織局在と

分子構造に関する解析、日本生化学会、  
2013年9月11日、横浜  
松田泰幸、コレクチン CL-L1 の組織局在と  
分子構造に関する解析、日本糖質学会、  
2013年8月5日、大阪  
Wakamiya N, The biological functions and  
blood concentration of CL-K1,  
International carbohydrate Symposium,  
2013年7月9日、Madrid (Spain)  
Wakamiya N, The biological functions of  
the novel collectins CL-L1, CL-K1, and  
CL-P1, International Society of  
development and comparative immunology,  
2013年7月9日、Fukuoka  
Wakamiya N, Collectin and scavenger  
receptor CL-P1 is an endocytosis  
receptor using clathrin-dependent  
endocytosis pathway and clathrin-  
independent phagocytosis pathway、  
European Carbohydrate symposium、2013  
年7月7日、Tel-Aviv (Israel)  
松田泰幸、コレクチン CL-L1 の組織局在  
と分子構造に関する解析、補体シンポジウ  
ム、2013年7月5日、旭川  
大谷克城、組織におけるコレクチン CL-K1  
の生化学的検討、日本生化学会、2012年  
12月14日、福岡  
Wakamiya N, The biological functions  
and tissue expressions in Collectin  
Kidney 1 (CL-K1), International  
Complement Workshop、2012年10月10日、  
Chania, Crete (Greece)  
大谷克城、コレクチン CL-K1 のマウスお  
よびヒト組織における発現検討、日本糖  
質学会、2012年9月17日、鹿児島  
大谷克城、コレクチン CL-K1 の組織におけ  
る発現検討、補体シンポジウム、2012年8  
月24日、大阪  
森 健一郎、コレクチン CL-P1 のリガンド  
認識ドメインについての解析、日本糖質学  
会、2011年7月11日、長岡  
SeongJae Jang, Scavenger receptor,  
CL-P1 mediates oxLDL endocytosis by  
associating with AP-2  $\mu$ 2, 日本生化学会、  
2010年12月8日、神戸

〔図書〕(計 0件)

〔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 1件)

名称：虚血性疾患亢進作用を有するポリペプ  
チド

発明者：若宮伸隆、大谷克城、坂本隆志、岸  
雄一郎

権利者：扶桑薬品工業株式会社

種類：特許、

番号：出願第 13/582495

取得年月日：25年8月29日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：