The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	補体制御因子SCRタンパク質の受精と分子進化に関する研究
Author(s)	井上, 直和
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/43352
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【15】

氏　　名	井上直和（いのうえなおかず）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16968　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学　位　論　文　名	**補体制御因子 SCR タンパク質の受精と分子進化に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　西澤　恭子 （副査） 教　授　八木　清仁　　教　授　前田　正知　　教　授　岡部　　勝

論文内容の要旨

補体系は、生体内に進入した異物を排除するために重要な役割をもつタンパク質群である。ほ乳類を含む高等動物の免疫系には、基本免疫系と獲得免疫系の両者が存在し、補体系は、両者にまたがって機能する。補体の活性化は、異物のペプチドにより産生された抗体により活性化する古典的経路と抗体非依存的な機構により活性化する第二経路、さらに微生物表面の糖鎖を認識し、活性化するレクチン経路が存在する。

補体は、細胞障害エフェクターとして機能する液性因子であり、その活性化は強力で一度活性化すると連鎖的にその活性化が進行し、異物のみならず、自己細胞を攻撃しうる危険性もある。しかし、血液中と細胞膜上に補体を制御する分子が数種類存在し、自己細胞上の補体活性化を制御している。これらの分子の多くは、約60アミノ酸から成る、short consensus repeat（SCR）ドメインと呼ばれる機能ドメインを保持している。本研究では、これら SCR 型の補体制御分子に関する以下のような解析を行った。

まず初めに、進化的に古い動物種の補体制御分子の単離と機能解析を行った。

補体のメインファクター C3は、基本免疫と獲得免疫をもつ軟骨魚類以上の動物種からウニやホヤのような獲得免疫がない動物種まで、広く保存されている。このように抗体を産生できない動物種でも、抗体非依存的な補体活性化経路が存在し、異物排除系として機能している。

一方、補体制御分子は、ほ乳類よりも下等な動物種において、ほとんど解析が成されておらず、ヒト型のホモログや種特異的な機能分子を含めてほとんど単離されていない。そこで、本研究では、ほ乳類よりも下等な鳥類（ニワトリ）の膜結合型補体制御分子（Cremp; Complement regulatory membrane protein）を単離し、機能解析を行った。Cremp は、ヒトの膜結合型補体制御分子、membrane cofactor protein（MCP）、decay accelerating factor（DAF）に部分的に類似し、単純に MCP、DAF のホモログではなく、ニワトリの新規 SCR タンパク質であることが分かった。Cremp を発現させた培養細胞がニワトリの補体にのみ抵抗性を示すことから、Cremp は、ニワトリの補体を種特異的に制御する分子であることが明らかになった。また、Cremp は、広範囲な臓器で発現することから、ニワトリで主要に機能する補体制御分子であると考えられた。このことにより、Cremp は、機能面でもほ乳類より下等な動物で初めて同定された膜結合型補体制御分子であることが明らかになった。さらに、抗体を産生しない円口類のヤツメウナギにおいても、SCR タンパク質（laSCRp;lamprey SCR protein）を単離することに成功した。ヤツメウナギの laSCRp は、ヒトの補体制御分子、C4b-binding protein（C4bp）α鎖、Factor H、DAF に一次構造

上で類似する分子であり、血清に多量に存在することから可溶型の補体制御分子と推測された。また、ヤツメウナギの血清中には、少なくとも2種類のlaSCRpが存在すると考えられた。さらに、抗体非依存的な補体活性化による、血清中のC3とlaSCRpの酵母への結合が同じ挙動を示すことから、laSCRpは、補体系に関与する分子であると推測された。

次に、補体制御分子の受精における役割について検討した。

精巣、または精巣上体には、DAF、MCP、C4bp、sp56（補体を制御するのかは不明であるが、C4bpに高い相同性をもつSCRタンパク質)、CD59などの多くの補体制御タンパク質が特殊化した形で存在し、子宮、卵管の補体の攻撃から精子を守ると推測される。しかし、精子に発現するMCPの機能は、補体制御以外に卵細胞への精子の結合あるいは融合と考えられる。その理由は、1）ヒトのMCPは、精子に多量に発現し、精子の先体内膜に局在する。2）ヒトのMCPの抗体（MH61）がハムスター卵、ヒト卵への精子結合あるいは融合を部分阻害する。3）最近単離されたMCPのマウスホモログは、精巣に特異的発現し、ヒト精巣型のmRNAサイズの1.5kbが多量に発現することが挙げられる。そこで、本研究では、より生理的なMCPの発現意義を調べるために、ジーンターゲティング法を用いて、MCPの遺伝子を欠失させたマウスを作製し、その解析を行った。

マウスMCPは、ヒトMCPと同様に先体部、特に先体内膜に局在していることが分かった。さらにタンパク質レベルでも精巣特異的な発現が確認された。MCP欠損マウスは、雌雄ともに健康に育ち、外見的にも何ら異常は認められなかった。また予想に反し、MCP欠損雄マウスは、不妊にならず、むしろ野生型マウスと比較して平均産子数に若干の増加が見られた。精子が受精可能になるために必要な先体反応（精子細胞膜と先体外膜との融合）を起こす速度を測定したところ、MCP欠損マウスからの精子は、野生型よりも先体反応しやすくなっていることが分かった。これらの結果から、精子に発現するマウスのMCPは、補体の制御や、精子と卵細胞の結合に直接影響する分子ではなく、先体反応の制御に関わる分子であることが推測された。

論文審査の結果の要旨

補体系は、生体内に進入した異物を排除するための重要な役割をもつタンパク質群である。補体系活性化の中心にあるC3やC3コンベルターゼは、自発的に崩壊する短命な分子であるのに加え、補体を制御する分子が数種類存在し、自己細胞上の補体活性化を制御している。この補体制御分子は、ほ乳類よりも下等な動物種においてほとんど解析されておらず、ヒト型のホモログや種特異的な機能分子を含め単離もほとんどなされていない。本研究では進化的に古い動物種の補体制御分子の単離と機能解析を行った。また精巣・精巣上体には多くの補体制御タンパク質が特殊化した形で存在し補体の攻撃から精子を守っていると推測されることから、精子に多量発現する膜結合型補体制御因子（MCP）の解析も行った。その結果、以下の成果が得られた。

1 ほ乳類より下等な動物で細胞膜結合型補体制御分子Crempを単離することに成功した。
2 ニワトリのCrempはヒトMCP、DAFに機能的、構造的に類似する分子であり、ニワトリの補体を種特異的に制御することを明らかにした。また、Crempは、広範囲な臓器に発現することからニワトリで主に機能する補体制御分子であると考えられた。
3 抗体を産生しない動物において、SCRタンパク質（laSCRp）を単離することに成功した。
4 ヤツメウナギのlaSCRpは、ヒトの補体制御分子、C4bpα鎖、Factor H、DAFに一次構造上で類似する分子であり、血清で多量に存在することから、可溶型の補体制御分子と推測された。また、ヤツメウナギの血清中には、少なくとも2種類のlaSCRpが存在すると考えられた。
5 抗体非依存的な補体活性化による、血清中C3とlaSCRpの酵母への結合が同じ挙動を示すことから、laSCRpは、補体系に関与する分子であると推測された。
6 MCPの遺伝子を欠失させたマウスを作製した。
7 マウスMCPは、精巣特異的に発現し、精子上では、先体内膜に局在していた。
8 精子に発現するマウスMCPは、補体の制御や精子と卵細胞の結合に直接影響する分子ではなく、むしろ、先体

反応の制御に関わる分子であることが推測された。

以上の成果は、古い動物種の補体制御分子を単離・解析すると共に精子における膜結合型補体制御因子（MCP）の生殖における重要な作用を明らかにしたものである。

今後、補体制御因子の様々な作用を解明する上で大きな貢献を果たすものと思われ、博士（薬学）の学位授与に値するものと考える。