



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

博士論文

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

2002 年

大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学専攻

井上 直和

博士論文

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

2002 年

大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学専攻

井上 直和

目次

	頁
略語	I
序論	1
第一章 ニワトリの新規細胞膜結合型補体制御タンパク質の単離と機能解析	6
1-1 実験材料および試薬	7
1-2 実験方法	9
1-3 実験結果	14
1-3-1 ニワトリ Cremp の cDNA クローニング	
1-3-2 Cremp の mRNA とタンパク質の組織分布	
1-3-3 Cremp の局在	
1-3-4 Cremp の糖鎖付加	
1-3-5 Cremp の補体制御能	
1-4 考察	25
第二章 ヤツメウナギの血漿型補体制御タンパク質の単離と機能解析	27
2-1 実験材料および試薬	28
2-2 実験方法	28
2-3 実験結果	31
2-3-1 ヤツメウナギ SCR protein (laSCRp) の cDNA クローニング	
2-3-2 laSCRp の mRNA とタンパク質の組織分布	
2-3-3 laSCRp の糖鎖付加	
2-3-4 ヤツメウナギ血清中の C3 の沈着と laSCRp の相関性	
2-4 考察	39
第三章 マウス MCP の解析	41
3-1 実験材料および試薬	42
3-2 実験方法	43
3-3 実験結果	47
3-3-1 マウス MCP の組織分布と糖鎖修飾	
3-3-2 MCP 欠損マウスの作製とその確認	
3-3-3 精子上の MCP の発現局在	
3-3-4 F2 マウスの遺伝子型	

3-3-5	MCP 欠損雄マウスの平均産仔数と受精率	
3-3-6	MCP 欠損マウス精子への補体成分 C3 の沈着	
3-3-7	MCP 欠損マウス精子による先体反応の経時的変化	
3-4	考察	59
結論		61
総括		62
謝辞		65
参考文献		66

略語

AP	: Alternative pathway
BSA	: bovine serum albumin
BPB	: bromophenol blue
C	: complement
C4bp	: C4b-binding protein
CD	: cluster of differentiation
cDNA	: complementary DNA
CHO	: Chinese hamster ovary
CP	: Classical pathway
cpm	: counts per minute
CR	: complement receptor
Cremp	: complement regulatory membrane protein
Crry	: complement receptor 1-related protein y
DAF	: decay-accelerating factor
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	: enhanced green fluorescent protein
EGTA	: ethyleneglycol-bis(2-aminoethyl ester)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ES	: embryonic stem
F(ab') ₂	: F(ab') ₂ fragment of IgG
FACS	: fluorescence-activated cell sorter
FCA	: Freund's complete adjuvant
FCS	: fetal calf serum
FITC	: fluorescein isothiocyanate
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPI	: glycosylphosphatidylinositol
GVB ²⁺	: gelatin veronal buffer
hCG	: human chorionic gonadotropin
hMCP	: human MCP
IAA	: iodoacetamide
Ig	: immunoglobulin
IaSCRp	: lamprey SCR protein
MAC	: membrane attack complex
MASP	: mannose binding lectin (MBL)-associated serine protease
MCP	: membrane cofactor protein
mDAF	: mouse DAF
MHC	: major histocompatibility complex
mMCP	: mouse MCP
MOPS	: 4-morpholinepropanesulfonic acid
mRNA	: messenger RNA

ORF	: open reading frame
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: phosphate-buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PMS	: pregnant mare serum gonadotropin
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	: polyvinylidene difluoride
RCA	: regulators of complement activation
rpm	: rounds per minute
RT-PCR	: reverse transcriptase PCR
SBP1	: sand bass cofactor protein 1
SCR	: short consensus repeat
SD	: standard deviation
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SSC	: standard saline citrate
Tris	: tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween 20	: polyoxyethylene sorbitan monolaurate
UT	: untranslated region
VB	: veronal buffer

<序論>

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免疫グロブリン (Ig、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 (図 1)。

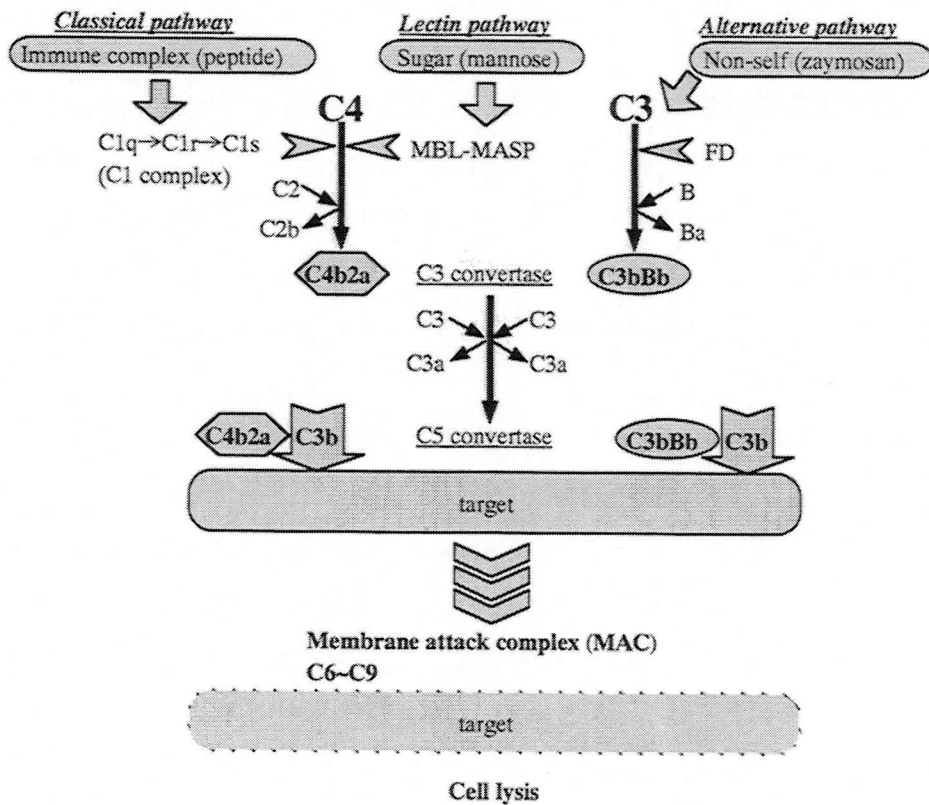


図1 補体系の活性化機構

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、補体成分が C1～C9 に加えて、いくつかのプロテアーゼから成るタンパク質群である。補体の活性化経路はどれも強力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、補体系の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することで、自己細胞上の補体活性化を制御している。このとき、補体の制御は、過剰な活性化を液相で制御する可溶型補体制御分子、膜結合性エフェクター成分 (C3、C9) の活性化を制御する、膜結合型補体制御分子の 2 種類の補体制御タンパク質群で行っている。

ヒトの場合、これら制御分子群には、血液中で機能する C4b-binding protein (C4bp)、Factor H と細胞膜上で機能する Complement receptor type 1 または C3b receptor type 1 (CR1; CD35)、decay accelerating factor (DAF; CD55)、membrane cofactor protein (MCP; CD46) が存在する。以上の分子は、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持っている (図 2)。

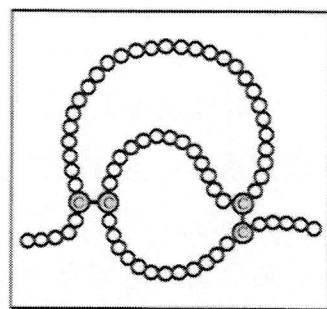


図2 short consensus repeat (SCR)

さらにそれ以外の補体制御タンパク質は、C1 の活性化を防ぐ C1 inhibitor (C1 INH) と補体の最終エフェクター、MAC (membrane attack complex) を制御する CD59 が存在する。これらの cDNA は、すべてクローニングされ、一次構造が明らかになっている。さらに、先に述べた SCR 型の補体制御分子は、ヒトでは、第一染色体の長腕、バンド 1q32 に位置し、Regulators of complement activation (RCA) と呼ばれる遺伝子集落を形成する (ref 1-2)。

これら、SCR タンパク質は、一般に 2 通りの制御方式で補体を制御する。つまり、1) cofactor 活性 (C3 コンベルターゼの構成成分である C3b や C4b に作用し、プロテアーゼ Factor I のコファクターとしてそれぞれを切断し不活性化する) 2) decay-acceleration 活性 (C3 コンベルターゼ (C4b2a, C3bBb) に直接反応し、その解離を促進する) の両方あるいはどちらかの活性を有し、補体の活性化を制御する (図 3)。ヒトの SCR タンパク質の補体制御能の種類と機能部位を表に示す (表 1)。

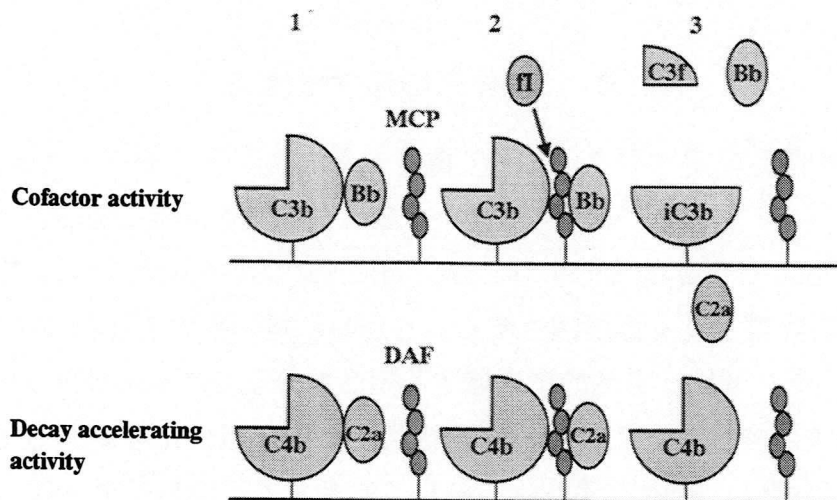


図3 Cofactor activityとdecay accelerating activity
反応は、1→2→3の順に進行する。

表1 SCRタンパク質の性質

Protein	SCR	Ligand	Cofactor	Decay acceleration	Binding domain	Virus, bacteria binding
Fluid-phase						
C4bp	8 ($\alpha \times 7-8$) 3 ($\beta \times 0-1$)	C3b, C4b	+	+	SCR1-3 (C4b)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Factor H	20	C3b	+	+	SCR1-4 (C3b)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Membrane-anchored						
CR1	30	C3b, C4b	+	+	SCR8-9, 15-16 (C3b) 1-2, 8-9, 15-16 (C4b)	
MCP	4	C3b, C4b	+	—	SCR2-4 (C3b, C4b)	MV, HHV6
DAF	4	C3bBb, C4b2a	—	+	SCR2-4 (C3bBb, C4b2a)	EV
Crry (rodent)	5	C3b, C4b	+	+	?	

EBV, Epstein-Barr virus; MV, measles virus; HHV, human herpes virus 6; EV, echo virus

(進化的に古い動物の補体系)

現在までに存在が知られている下等生物の補体系とその制御分子を示す (図 4) (ref 3)。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 (ref 4-5)。さらに最近、カやハエなどの昆虫類においても、C3 のホモログと思われるタンパク質が単離された (ref 6-7)。このように抗体を産生できない動物種でも、先に示した第二経路やレクチン経路依存的な補体系が存在し、異物排除系として機能していることが考えられる。特に、ホヤにおいては、レクチン経路のタンパク質、MASP (mannose binding lectin (MBL)-associated serine protease) が存在することから (ref 8)、補体系のプロトタイプは異物の糖鎖を認識し、活性化するレクチン経路であることが考えられる。

一方、補体制御タンパク質においては、ほ乳類以外の動物種で、十分な解析が成されていないのが現状である。補体の活性化から自己細胞を保護する、細胞膜結合型の補体制御分子は、マウスなどの齧歯類では、Crry (Complement receptor 1-related protein y) と呼ばれる DAF や MCP 様の機能分子が存在する (ref 9)。このように、同じほ乳類のヒトとマウスであっても異なる分子で補体の制御を行っている。しかし、ほ乳類よりも下等な動物種においては、ヒト型のホモログや種特異的な機能分子を含めて未だ単離されていない。そこで、本研究では、ニワトリの膜結合型補体制御タンパク質 (Cremp; Complement regulatory membrane protein) を単離し、解析したので以下に述べる (第一章)。また、ほ乳類より下等生物の液相の補体制御分子は、硬

骨魚類のサンドバスにおいて、SBP1 という分子が単離されている (ref 10-12)。この分子は、ヒトの C4bp と Factor H に類似した一次構造と機能をもつ分子である。本研究でさらに進化的に古い動物であるヤツメウナギにおいて補体制御分子 (IaSCRp; lamprey SCR protein) を単離し、その機能を解析したので以下に述べる (第二章)。本研究では、これらの分子の構造と機能を既知の SCR タンパク質と比較することで、SCR タンパク質の補体制御における重要なドメイン構造を見い出すこと、および下等生物の免疫系の説明を目的とした。

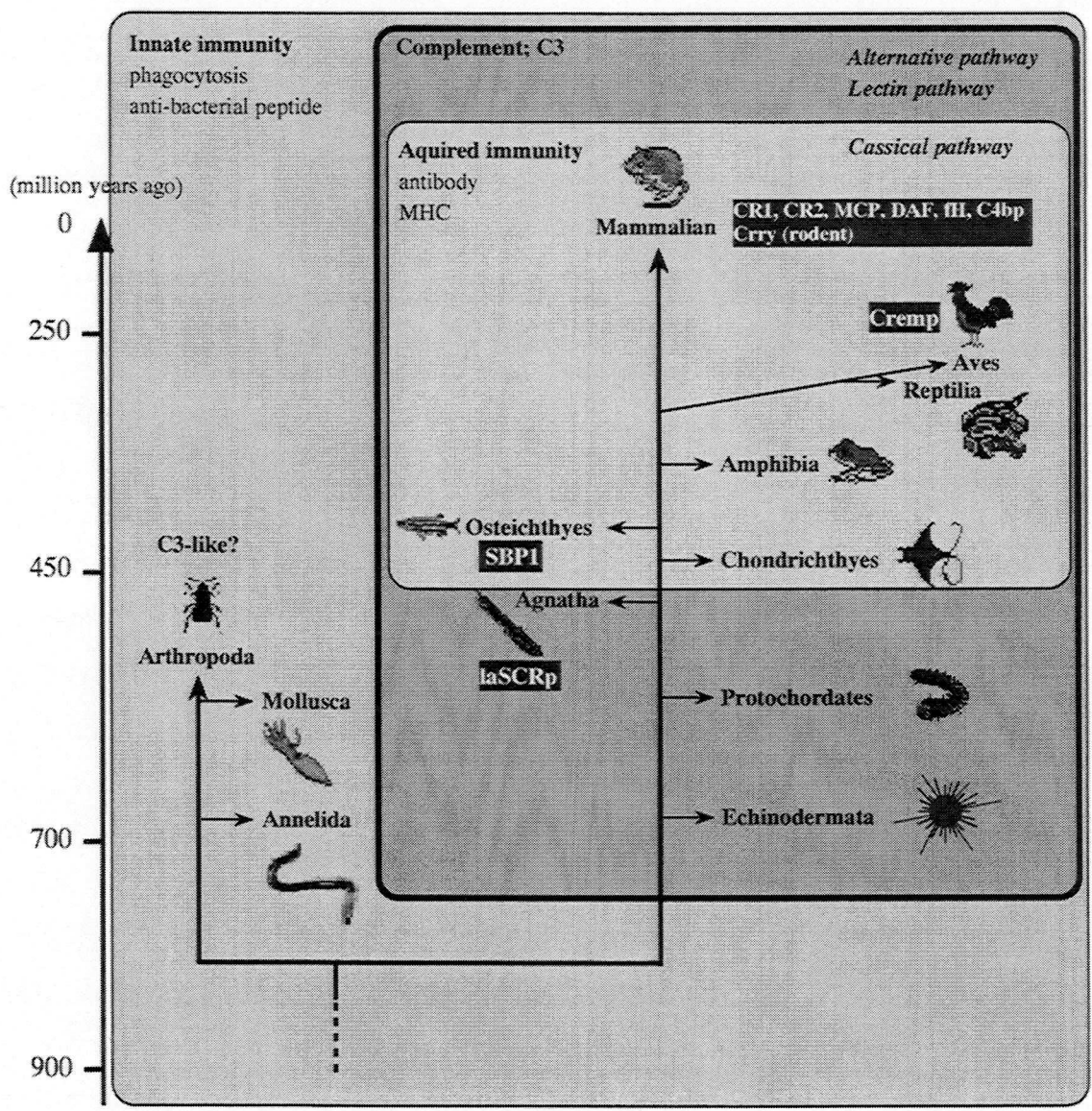


図4 補体系の補体因子C3と補体制御分子の系統樹

(受精と補体制御分子)

精巣、または精巣上体には、DAF、MCP、C4bp、sp56 (補体を制御するのは不明であるが、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 (ref 13-18)、子宮、卵管の補体の攻撃から精子を守るために機能すると推測される。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 (ref 19)。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 1.5 kb が多量に発現する (ref 16)。また、齧歯類は、Crry がほぼ全身に発現し、補体制御のメイン分子と考えられるため (ref 9, 20)、マウスの MCP の機能は、補体の制御以外に存在する可能性があることが挙げられる。しかし、精子において MCP が卵細胞との結合、融合に関与する分子である直接的な証拠はなく、その機能は不明である。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その解析を行ったので以下に報告する (第三章)。

＜第一章＞ニワトリの新規細胞膜結合型補体制御タンパク質の単離と機能解析

現在までにはほ乳類における補体制御タンパク質群の解析は、詳細に解析されている。しかし、ほ乳類以外の脊椎動物では、補体系を含め免疫系の仕組み全般において、それらを構成する分子の単離や解析など、ほとんど解明に至らないのが現状である。

ニワトリは、ほ乳類と同様に自然免疫、獲得免疫を備えている動物である。しかし、ニワトリは、抗体産生のための特殊化した臓器、ファブリキウス嚢をもつことをはじめ、ほ乳類とは多少異なった機構で異物の排除を行うと考えられる。

そこで、ニワトリの補体制御分子の単離と機能解析を行い、鳥類の補体制御系について検討した。

1-1 実験材料および試薬

1-1-1 抗体

マウス抗ヒト CD46 モノクローナル抗体 (M177) は、大阪府立成人病センターの松本美佐子博士により供与された。ウサギ抗ニワトリ Cremp ポリクローナル抗体 (1-2-3 参照)、ウサギ抗 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞株ポリクローナル抗体は、筆者が免疫、精製したものをを用いた。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体は、Biosource International 社より、FITC 標識ヤギ F(ab')₂ 抗ウサギ IgG、FITC 標識ヤギ F(ab')₂ 抗マウス IgG は、American Qualex International 社よりそれぞれ購入した。

1-1-2 細胞

ニワトリ B 細胞株 DT40 細胞は、京都大学の武田俊一博士により供与され、10% fetal calf serum (FCS)、1% chicken serum、50 μ M 2-mercaptoethanol、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin を含む RPMI-1640 培地 (Life Technologies 社) を用いて継代培養した。CHO 細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC) から購入し、10% FCS、60 μ g/ml kanamycin を含む Ham F12 培地 (日水製薬社) を用いて継代培養した。ウサギ腎細胞株 RK13 細胞は、RIKEN Cell Bank から購入し、10% FCS、2 mM L-glutamine、60 μ g/ml kanamycin を含む MEM 培地 (日水製薬社) を用いて継代培養した。すべての細胞は、37°C、5% CO₂ 存在下で維持した。

1-1-3 組織、血清

RNA blot、protein blot 解析に用いたニワトリの各組織は、ニワトリの解剖図に従い速やかにそれぞれの組織を分離した。分離した各組織は、使用するまで-80°C で保存した。ニワトリ、ヒト、ウサギの血清は、それぞれの動物から採血後、4°C で一晩放置し、3,000 rpm、5 分間の遠心分離により血餅と血清に分けた。血清は分注し、使用するまで-80°C で保存した。

1-1-4 遠心分離器

15 ml、50 ml のチューブ容量の試料は、3,000 rpm 以下の低速遠心分離では、日立社の 05PR-22 遠心分離器と付属のローターを用いた。3,000 rpm より高速遠心分離では、日立社の CR22G 遠心分離器と R10A2 ローターを用いた。0.5 ml、1.5 ml のチューブ容量の試料は、トミー精工社の MX-160 遠心分離器と付属のローターを用いた。

1-1-5 一般的な試薬

一般的に用いられる試薬は、すべて特級試薬を用いた。

1-1-6 溶液および緩衝液の組成

本章で使用した主な緩衝液等の組成を項目ごとにまとめて示した。

1) RNA blot 解析関連

20×MOPS 泳動バッファー : 0.4 M MOPS (pH 7.0), 100 mM 酢酸ナトリウム,
20 mM EDTA

5×RNA サンプルバッファー : 2 mM EDTA, 1.3% ホルムアルデヒド,
16% ホルムアミド, 10% グリセロール,
2×MOPS バッファー, BPB (適量)

ゲル変性液 : 50 mM NaOH

ゲル中和液 : 200 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.0)

ブロッキングバッファー (20×SSC) : 3M NaCl, 0.3 M sodium citrate

メンブラン洗浄液 (1) : 2×SSC, 0.05% SDS

メンブラン洗浄液 (2) : 0.1×SSC, 0.1% SDS

2) SDS-PAGE、protein blot 解析関連

CBB 染色液 : 0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (CBB),
45% メタノール, 9% 酢酸

脱色液 : 5% メタノール, 7.5% 酢酸

2×SDS サンプルバッファー : 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% グリセロール,
BPB (適量), 12% β-メルカプトエタノール (還元下)

泳動バッファー : 25 mM Tris, 190 mM グリシン, 0.1% SDS

転写バッファー (A) : 0.3 M Tris, 20% メタノール (pH 10.4)

転写バッファー (B) : 25 mM Tris, 20% メタノール (pH 10.4)

転写バッファー (C) : 25 mM Tris, 40 mM グリシン,
20% メタノール (pH 9.4)

メンブラン洗浄液 : 0.1% (v/v) Tween 20, 0.5 M NaCl,
20 mM Tris-HCl (pH 7.4)

ブロッキングバッファー : 10% スキムミルク, メンブラン洗浄液

3) Flow cytometry (FACS) 関連

PBS : 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl,
1.47 mM KH₂PO₄

FACS バッファー : 0.1% BSA, 0.1% NaN₃, PBS

4) 免疫染色関連

細胞固定液 : 3% パラホルムアルデヒド,
0.1% グルタルアルデヒド, PBS
ブロッキングバッファー (1) : 1% BSA, PBS
ブロッキングバッファー (2) : 10% (w/v) Block Ace, PBS
封入液 : 2.3% 1,4-diazabicyclo-2-octane (DASCO),
50% グリセロール, PBS

5) 細胞障害活性関連

ペロナール緩衝液ストック溶液 (5VB) : 0.71 M NaCl,
24.7 mM バンビタールナトリウム, 17.5 mM HCl
メタルストック溶液 : 150 mM CaCl_2 , 1 M MgCl_2
ゲラチンペロナール緩衝液 (GVB^{2+}) : 0.1% ゲラチン, 1×VB,
0.1% メタルストック溶液
0.1M EGTA· Mg^{2+} 保存液 : 0.1 M EGTA, 0.1 M MgCl_2 (pH 7.5)
0.03 M EGTA· Mg^{2+} -GVB (0.03 M EGTA-GVB) : 30% 0.1M EGTA· Mg^{2+} 保存液,
0.5 mM MgCl_2 , 0.9×VB, 0.1% ゲラチン

1-2 実験方法

1-2-1 ニワトリ Cremp の cDNA クローニング

Cremp cDNA の単離は、東京理科大学の後飯塚僚博士により供与されたニワトリ胸腺 cDNA ライブラリーを鋳型として行った。ニワトリ胸腺の cDNA 断片は、ほ乳類発現ベクター pME18s の *Bst* XI サイトに組み込まれており、Cremp の cDNA 断片を得るために pME18s のマルチクローニングサイトの DNA 配列上のプライマーと、様々な動物種の MCP で保存されているアミノ酸配列をもとに作製した縮重プライマーを用いて、nested PCR を行った (図 1-2)。また、PCR のスケジュールは下記のとおりである。

1st PCR

94°C 2 min
94°C 30 sec
50°C 1 min
72°C 90 sec

20 cycles

2nd PCR

1st PCR reaction 1 μl を鋳型として
94°C 2 min
94°C 30 sec
50°C 1 min
72°C 90 sec

35 cycles

4°C

さらに全長の cDNA 配列を得るために、確認された塩基配列に適合するプライマーを作製し、順次新たな cDNA 断片を得て全長の cDNA 配列を決定した (図 1-3)。また、このようにして得られた cDNA 断片は、すべて TA クローニングベクター、pCR-2.1 (Invitrogen 社) にサブクローニングし、ABI 310 シークエンサーによって DNA 配列を解析した。

1-2-2 ニワトリの組織の RNA blot 解析

様々なニワトリの組織の total RNA は、Life Technologies 社の TRIZOL Reagent を用いて抽出した。各組織の total RNA は 20 μ g ずつ、1 \times MOPS、18% ホルムアルデヒドを含む 1% (w/v) アガロースゲルで分離し、Hybond-N⁺ナイロン膜 (Amersham Pharmacia 社) に転写した。RNA を転写したナイロン膜は、Clontech 社の Express hybridization buffer を用いて、68°C、30 分間のプレハイブリダイゼーション後、³²P でラベルした Open reading frame (ORF) 全長の Cremp の cDNA フラグメントとともに、68°C、1 時間のハイブリダイゼーションを行った。数回の洗浄後、X-線フィルム (Hyper film MP, Amersham Pharmacia 社) に感光し、シグナルを検出した。

1-2-3 ウサギ抗ニワトリ Cremp ポリクローナル抗体の作製

Cremp に対するポリクローナル抗体を作製するために、Cremp 抗原の作製を行った。Cremp タンパク質を発現させるためのプラスミド DNA は、Cremp の N 末端に Kozak 配列、C 末端にヒスチジンが 6 つ付加するように構築した DNA 配列をほ乳類発現ベクター pME18s の Eco RI サイトに挿入し、作製した。Cremp の抗原として、このプラスミド DNA を RK13 細胞に Life Technologies 社の lipofectAMINE Reagent を用いて導入し、細胞そのものを用いた。48 時間後、一過的な Cremp の発現がピークに達した時、10 mM EDTA を用いて 1×10^7 個の細胞を回収し、PBS で数回洗浄し、0.5 ml の PBS に懸濁した。この PBS 懸濁溶液に 0.6 ml の Freund's complete adjuvant (FCA) (DIFCO 社) を加え、数回のシリンジストロークでエマルジョンを作り、1 週間ごとに計 4 回、ウサギの両足のリンパ節付近に免疫を行った。4 回目の免疫後、ブーストを行い、ウサギから採血した。血清中の IgG は、終濃度 33%の硫化アンモニウムを用いて沈澱させ、血清量の 1/10 量の PBS に懸濁後、PBS に対して透析した。また、IgG のタンパク質濃度は、その溶液の 280 nm の吸光度を測定し、IgG の比吸光係数 ($E^{1\%}$) を 13.6 として求めた。

1-2-4 ニワトリの組織の protein blot 解析

様々なニワトリ組織のタンパク質は、各組織を 100 mg/ml で lysis buffer (1% (v/v)

Nonidet P-40、0.14 M NaCl、0.01 M EDTA、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mg/ml iodoacetamide (IAA)、1 mM PMSF) に懸濁し、Potter 型ホモジナイザーを用いて組織を破碎し、可溶化した。可溶化したサンプルは、4°C、15,000 rpm、30 分で遠心分離し、可溶性画分を回収した。可溶性画分は、Bio-Rad 社の protein assay kit を用いてそのタンパク質量を BSA 当量で定量し、50 µg を SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel) で分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore 社) に転写した。転写後の膜は、10% スキムミルク (雪印乳業社) を含むブロッキングバッファーでブロッキングを行った後、2 µg/ml ウサギ抗ニワトリ Cremp 抗体を含むブロッキングバッファーと室温で 2 時間反応させた。数回の膜の洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (1/10,000 希釈) を含むブロッキングバッファーと室温で 1 時間反応させ、再び洗浄後、ECL (Amersham Pharmacia 社) で発色、検出を行った。

1-2-5 Cremp の stable transfectant の樹立

クローニングされた Cremp cDNA をほ乳類発現ベクター、pCXN-2 (ref 21) の *Eco* RI サイトに挿入し、そのプラスミド DNA を CHO 細胞に lipofectAMINE Reagent を用いて導入した。その後、0.6 mg/ml G418 (Life Technologies 社) でプラスミド DNA が導入された細胞を選択した。数日後、選択された細胞をペニシリンキャップを用いて単離した。Cremp の発現の確認は、ウサギ抗 Cremp 抗体を用いて Flow cytometry (1-2-6 参照) により行った。

1-2-6 Flow cytometry (FACS)

5×10^5 個の細胞を 20 µg/ml のウサギ抗 Cremp 抗体もしくは、5 µg/ml の M177 抗体を含む FACS バッファーで 4°C、1 時間反応させた。FACS バッファーで数回の洗浄後、25 µg/ml FITC 標識二次抗体を含む FACS バッファーで 4°C、30 分間の反応させ、再度洗浄後、FACSCalibur (Becton-Dickinson 社) を用いて細胞の蛍光強度を測定した。また、データの解析には、付属のソフト Cell Quest を用いた。

1-2-7 免疫染色

Cremp の発現した CHO 細胞 (CHO/Cremp) を細胞培養用のチャンバースライド (Nalge Nunc International 社) で 1 晩培養し、細胞をスライドガラスに付着させた。そのスライドガラスは、細胞固定液と 30 分間反応させ、細胞を固定化した。PBS で数回の洗浄後、ブロッキングバッファー (1) でブロッキングを行い、2 µg/ml ウサギ抗 Cremp 抗体を含むブロッキングバッファー (1) と 37°C、1 時間反応させた。ブロッキングバッファー (1) で数回の洗浄後、FITC 標識ヤギ F(ab')₂ 抗ウサギ IgG (1/100

希釈)と 10% Block Ace (雪印乳業社) を含むブロッキングバッファー (2) と 37°C、30 分間反応させ、再び洗浄後、封入液でカバーガラスを用いて細胞を封入した。蛍光を発する細胞は、共焦点顕微鏡 (FLUOVIEW, OLYMPUS 社) を用いて観察し、付属のソフト FLUOVIEW で画像を解析した。

1-2-8 糖鎖消化処理

Cremp の糖鎖付加を調べるために、*N*-glycosidase, *O*-glycosidase (Genzyme 社) を用いて糖鎖消化処理を行った。CHO/Cremp (5×10^6 個) を *N*-glycosidase 処理を行う細胞は 1% Nonidet P-40、10 mM EDTA、1 mg/ml IAA、1 mM PMSF を含む 50 mM Tris-maleate (pH 8.6) で、*O*-glycosidase 処理を行う細胞は 1% Nonidet P-40、10 mM EDTA、1 mg/ml IAA、1 mM PMSF を含む 20 mM Tris-maleate (pH 6.0) でそれぞれ可溶化し、4°C、15,000 rpm、30 分間の遠心分離で不溶画分を取り除いた。可溶画分 (20 μ l) には、100 μ U の neuraminidase (Sigma 社) を加え、37°C、1 時間反応させ、次いで 250 mU の *N*-glycosidase もしくは 1 mU の *O*-glycosidase と 37°C、16 時間反応させた。反応させたサンプルは SDS-PAGE で分離し、ウサギ抗 Cremp 抗体による protein blot 解析でシグナルを検出した。

1-2-9 細胞障害活性

コントロール CHO 細胞と CHO 細胞にヒト MCP を発現する細胞 (CHO/hMCP)、Cremp を発現する細胞 (CHO/Cremp) を、それぞれ 10 mM EDTA を含む PBS で集め、 1×10^7 個用意した。その細胞を 3.7 MBq の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を含む無血清 Ham's F12 培地 (total 1 ml) で 37°C、60 分間培養し、細胞に ^{51}Cr を取り込ませた。PBS で数回の洗浄後、 2×10^4 個/well になるように、10% FCS を含む Ham's F12 培地を加え、U 型 96 穴プレートに 50 μ l ずつ細胞をまいた。次いで、様々な濃度のウサギ抗 CHO 抗体を含む 50 μ l の GVB²⁺ もしくは 0.03 M EGTA-GVB を加え、4°C、30 分間反応を行った。さらに GVB²⁺ もしくは 0.03 M EGTA-GVB で、様々な濃度に希釈したニワトリ、ヒト、ウサギの血清を 100 μ l ずつ加え、緩やかに振盪し、補体の活性化を助長した。4°C、1,500 rpm、5 分間の遠心で細胞と培地を分離し、上清の培地 150 μ l をオートガンマカウンターで測定した (図 1-3)。

また、細胞の ^{51}Cr 遊離の割合は、次のような算出法で計算した。

$$(\text{sample cpm} - \text{control cpm}) / (\text{MAX cpm} - \text{control cpm}) \times 100$$

未処理の CHO 細胞における ^{51}Cr の自然遊離を control cpm とし、5% Triton X-100 を含む PBS で処理した CHO 細胞における ^{51}Cr の遊離を MAX cpm とした。以上の実験は triplicate で計 3 回行い、再現性を確認した。

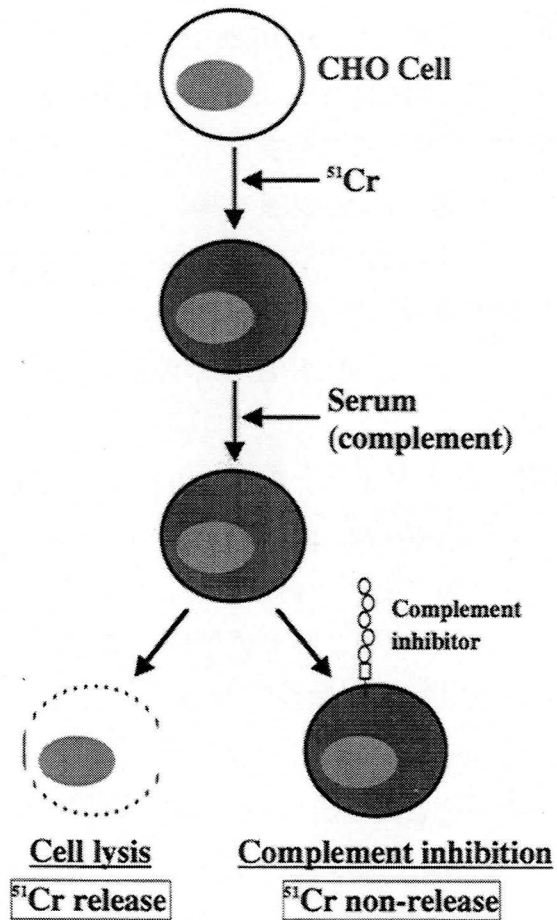


図1-1 細胞障害活性

Crempの補体制御活性は、 ^{51}Cr をCHO細胞に取り込ませ、補体の活性化によりCHO細胞から遊離される ^{51}Cr 量を指標とした細胞障害活性で調べた。

1-3 実験結果

1-3-1 ニワトリ Cremp の cDNA クローニング

ニワトリの補体制御分子を単離するために、様々な動物種で単離された MCP のアミノ酸配列、塩基配列を比較して、高く保存されている場所に縮重プライマーを作製した (図 1-2)。ニワトリ SCR タンパク質の cDNA 断片は、ニワトリ胸腺ライブラリーを鋳型とし、縮重プライマーと pME18s のプライマーを用いて PCR を行い、ヒトの MCP の SCR4 と高い相同性を示す 280 bp の塩基配列を得た。このことから、この分子は、ニワトリの MCP ホモログであることが予測された。さらに数回の PCR から (図 1-3)、ニワトリの SCR タンパク質を構成する cDNA の Open reading frame (ORF) と polyadenylation signal、poly (A) 配列を含む 3'UT を単離することができた (図 1-4)。さらに、正確な配列を得るために、肺から得た total RNA を用いて RT-PCR を行い、反応によって得られた、RT-PCR 産物の独立した 12 クローンの cDNA 配列を確認した。

筆者は、この新しく単離されたタンパク質を Complement regulatory membrane protein, Cremp と名付けた。Cremp の cDNA は、polyadenylation signal、poly (A) を含む 1910 bp で 451 アミノ酸から構成されることが予測された。Cremp タンパク質は、5 つの SCR ドメイン、1 つの SCR-like ドメイン、膜貫通領域、細胞内領域をもつ I 型の膜タンパク質であると推測され、SCR3 に N-結合型糖鎖付加配列が存在していた (図 1-4)。ホモロジー検索の結果、Cremp は単純に MCP ホモログではなく、いくつかの SCR タンパク質に高い相同性を持つことが分かった (表 1-1)。特に、SCR1 と SCR2 の連続した SCR ドメインのアミノ酸配列は、ヒトの DAF の SCR2-SCR3 に、SCR3 と SCR4 は、ヒトの MCP の SCR3-SCR4 にそれぞれ 43.6%、45.3%と 40%を越える高い相同性を示した (表 1-1)。一方、Cremp とマウスの Crry は、単独の SCR ドメインでは高い相同性 (Crry の SCR4 は Cremp SCR3 と 44.3%と高い相同性がある) を示すが、連続した SCR ドメインでは、40%以上の相同性が認められなかった。Cremp の SCR ドメインの構成、既知の SCR タンパク質との相同性から考えて、Cremp は Crry のような既知の SCR タンパク質の単純なホモログではなく、DAF と MCP 由来のキメラタンパク質であり、ニワトリの新規 SCR タンパク質であると考えられた。

1-3-2 Cremp の mRNA とタンパク質の組織分布

Cremp の mRNA の発現分布を RNA blot 解析で調べた。RNA blot 解析は、Cremp の ORF 完全長のプローブ (1356 bp) を用いて行った。その結果、2.2 kb の minor バンドと 3.0 kb の major バンドが検出された。3.0 kb のバンドは、すべての臓器に発現

しているのに対して、2.2 kb のバンドは、肺、腎臓、ファブリキウス囊、精巣、卵巣といった特定の臓器で検出された (図 1-5A)。これは、3'UT の長さの異なる polyadenylation signal に依存することを明らかにしたが (データは示さない)、その意義は、不明である。

さらに、タンパク質レベルでの組織分布をウサギ抗 Cremp 抗体を作製し、protein blot 解析で調べた。その結果、すべての組織において Cremp タンパク質は、アミノ酸から予測される分子量、46.8 k 付近に発現が確認された (図 1-5B)。さらに、非還元下で 2 量体と思われる 92 kDa のバンドが、脾臓、肺、腎臓、卵巣で検出された。しかし、2 量体の存在意義については、不明である。このように、Cremp の 3.0 kb の mRNA、46.8 kDa のタンパク質は、広範囲な組織で発現していることが明らかになった。

1-3-3 Cremp の局在

Cremp のアミノ酸配列の疎水プロットから、Cremp タンパク質は、シグナルペプチドを持つ、I 型の細胞膜結合型タンパク質と予測された (図 1-4)。Cremp の細胞における局在を調べるために、Flow cytometry (FACS) と免疫染色を行った。FACS では、ウサギ抗 Cremp 抗体を用いて、ニワトリの B 細胞株 DT40 と CHO に Cremp を恒常的に発現させた細胞株 (CHO/Cremp) を解析した。その結果、DT40、CHO/Cremp は、ともに高いレベルの Cremp を細胞表面で発現していることが分かった (図 1-6-1)。さらに、免疫染色の結果からも、細胞膜に局在していることが確認された (図 1-6-2)。以上により、Cremp は細胞膜結合型タンパク質であることが明らかになった。

1-3-4 Cremp の糖鎖付加

Cremp の SCR3 には、1 個所の N-結合型糖鎖付加配列が存在する (図 1-4)。しかし、protein blot 解析の結果からは、Cremp のアミノ酸配列から予測される分子量 46.8 k のみのシグナルが検出された (1-3-2)。Cremp の糖鎖付加が存在するのかを調べるために、*N*-glycosidase、*O*-glycosidase を用いた糖鎖消化解析を行った。その結果、DT40、CHO/Cremp 両方由来の Cremp も消化後の分子量に変化がなく、46.8 kDa の分子量を示した (図 1-7)。そのため、Cremp は、糖鎖修飾されないタンパク質と考えられた。

1-3-5 Cremp の補体制御能

Cremp の補体制御能を調べるために、⁵¹Cr を取り込ませた細胞 (CHO 細胞) とニワトリ血清 (補体源) を用いた細胞障害活性を行った。またその時、種特異的な補体制御能を調べるために、CHO/Cremp とヒト MCP を CHO 細胞に恒常的に発現させたクローン (CHO/hMCP) を用いた。ウサギ抗 CHO 抗体で CHO 細胞を感作する抗体

濃度は、ニワトリ、ヒト、ウサギの血清でそれぞれ最適な濃度を検討し、その濃度で細胞障害活性を測定した。その結果、ニワトリの血清を用いて補体を活性化すると、CHO 細胞、CHO/hMCP では、血清量依存的に細胞が障害されるのに対して、CHO/Cremp では、全く補体活性化が起こらず、Cremp が、ニワトリの補体の攻撃から CHO 細胞を守っていることが分かった (図 1-8A)。また、Cremp は、古典的経路、第二経路の両経路に対して、補体の活性化を阻害することも分かった。これに対して、ヒトの血清では、CHO/hMCP のみが補体の活性化を阻害し、Cremp は、全く阻害しなかった (何も導入していない CHO 細胞と同レベル) (図 1-8B)。さらに、ウサギの血清では、Cremp も MCP も全く補体の活性化を阻害することができなかった (図 1-8C)。このことから、Cremp は、種特異的に補体の活性化から自己細胞を保護する分子であることが明らかになった。

SCR 3 ← → SCR 4

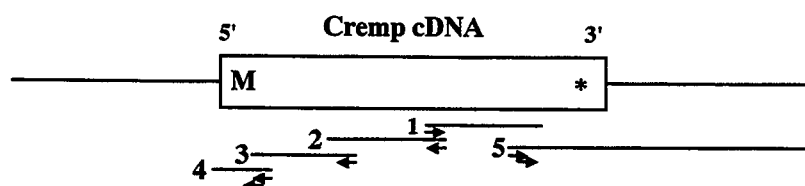
Human	C	---	GD	NS	VS	SR	AA	PE	CK	VV	KCR	FP	VV	EN	GK	QI	SG	FG	KK	FF	YK	AT	VM	FE	CC													
Vero	C	---	GN	ST	WS	HA	AA	PE	CK	VV	KCR	FP	VV	EN	GK	QI	SG	FG	KK	FF	YK	AT	VM	FE	CC													
B95a	C	---	RD	NS	VS	GD	AA	PE	CK	VV	KCR	FP	VI	EN	GK	QI	AG	FG	KK	FF	YK	AT	VI	FE	CC													
Pig	C	---	IG	KD	EW	SS	DP	PE	CK	VV	KCP	YP	PV	VP	NG	EIV	SG	FG	SK	FF	YK	AE	VV	FK	CC													
GP	C	---	AG	HQ	KW	SS	AA	PE	CK	VV	KCP	LP	VV	KNG	KQ	IS	GL	GQ	TF	FF	YQ	AT	VT	FQ	CC													
Mouse	C	---	AG	HT	WS	NS	SP	PE	CK	VV	KCP	NP	VL	NG	RL	IS	GA	GE	IF	SY	QS	TV	VM	FE	CC													
			*			**					*****		**		**				*	*	*	*	*	*	*													
Cremp	C	T	V	D	E	N	S	NG	V	W	S	G	P	P	PO	CK	V	V	I	C	DN	PO	V	EN	GR	KAS	GF	AS	QY	I	V	G	SS	V	R	F	E	C
		*				**					*	*****	*		**		*		*		*		*	*	*	*	*											

Degenerate primer; 5'-GA (A/G) TGTAAGTGGTCAAATGT-3'

図1-2 縮重プライマーの作製

様々な動物種のMCP間で高く保存されている配列を基に、縮重プライマーを作製した。

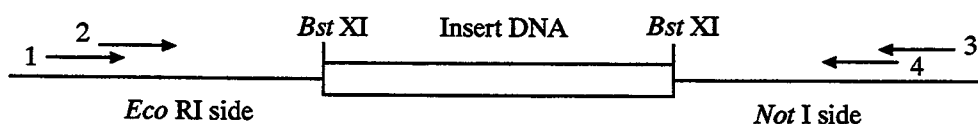
A)



1st PCR	2nd PCR
1. 5'-GARTGTAAAGTGGTCAAATGT-3'	5'-GARTGTAAAGTGGTCAAATGT-3'
2. 5'-TCCATCCCAAGCAAGACATA-3'	5'-TCCATCCCAAGCAAGACATA-3'
3. 5'-TAACCTGTACCCTTTTTCAC-3'	5'-TAACCTGTACCCTTTTTCAC-3'
4. 5'-TGCTGGCATCCTCCGTGAGCTCTGC-3'	5'-GCTCTGCATTCTGGACCTTGT-3'
5. 5'-TGGGATGGATGTAATTAGTTGTAC-3'	5'-TTGTACTGAAAATGGCACCT-3'

R: A or G

B)



1. pME18s 1 5'-TAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCT-3'
2. pME18s 2 5'-TACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAAT-3'
3. pME18s 3 5'-TAGACTAGTCTAGCGGCCGCACCTG-3'
4. pME18s 4 5'-GCACCTGCAGGCGCAGAACTGGTAG-3'

図1-3 CrempのcDNA配列をクローニングするための戦略

CrempのcDNA配列を得るために、表中のCrempに特異的なプライマー (A、矢印) とライブラリーのベクターpME18sに対するプライマー (B、矢印1~4) を用いて、nested PCRを行った。図中のcDNA断片 (1~5) は、得られた順番を示し、表中のプライマーの番号に相当する。また、2つある矢印は、後方のものが1st PCR、前方のものが2nd PCRで用いたプライマーを示した (矢印が1つのものは、同じプライマーを用いた)。Bでは、pME18sに対するプライマーとその作製場所を示した。なお、開始メチオニン、ストップコドン はMとasteriskでそれぞれ示した。

GCGGGCATGGCGGTGGGGGTGTTTGCCTTGGCGGTGCTGCTGGCGGGGCTCGGCGCGGCACGGGGCTAGGGCTCCTGCACGCTTCCAGACAAGGTCCAGA 100
 M A V G V F A L A V L L A G L G A A R A Q G S C T L P D K V Q N 32

ATGCAGAGCTCACGGAGGATGCCAGCACAATGAGCAGCTTTCCTGTTGGAACCACTGTGAGCTACACCTGTCGCCCTGGCTATATGAGGATCCCTGGGAT 200
 A E L T E D A S T M S S F P V G T T V S Y T C R P G Y M R I P G M 65

GCCTGTTAGTCGAACGTGTGGCGAAAACCTAATGTGGTCGCAATAGAGACGTTCTGTACAGCAAGAAGCTGTACTCATCCGGGAGAACTACAAAATGGC 300
 P V S R T C G E N L M W S Q I E T F C T A R S C T H P G E L Q N G 98

GTTGTTCATGTGACAGATCTTACATTGGTTCGGCAGTTACTTTTTCTTGTGAAAAAGGGTACAGGTTACATGGAAATCGTCAGATTTCCTGTGTAATTC 400
 V V H V T D L T F G S A V T F S C E K G Y R L H G N R Q I S C V I Q 132

AAGGTAAAGTTGTTGACTGGAATGGACCTCTTCCTTTATGTGATAGAGTTCTCTGTAGCCACCTCCAAGTATAGCCAATGGGCGCTACACTGAAGCAGC 500
 G K V V D W N G P L P L C D R V P C K P P S I A N G R Y T E A A 165

CAACTATGTTTATCAAAACACAGTAACCTATAGTTGTGACGATGTGCGCACAGGAGAAAATCCCTTCTCGCTGGTGGTTACCTTCTATTTCTGCACA 600
 N Y V Y Q T T V T Y S C D D V R T G E N P F S L V G S P S I F C T 198

GTTGATGAAAACCTCAATGGTGTGTTGGAGTGGACCGCTCCACAGTGTAAGTGGTCACTCTGTGACAAACCCACAAGTAGAAAACGGAAGAAAGGCATCTG 700
 V D E N S N G V W S G P P P Q C K V V I C D N P Q V E N G R K A S G 232
 GARTGTAAGTGGTCAAAATGT **degenerate primer**

GGTTTGCATCTCAGTATATCTATGGGAGCTCAGTTAGGTTTGAATGTGATCCAGACTATGTCTTGGCTTGGGATGGATGTAATTAGTTGTACTGAAAATGG 800
 F A S Q Y I Y G S S V R F E C D P D Y V L L G M D V I S C T E N G 265

CACCTGGTATCCATCATTACCAACTTGTAAAGAATTAGTGAAGATGCATGTGGTGCCTCCCAAGATCTCCCATGGAGAAGTCGTTCCACAGAAATCTGTG 900
 T W Y P S L P T C K R I S E D A C G A P K I S H G E V V P Q K S V 298

TACTTAAGAGGAGAGTCTGTTTCAGATAAGGTGCAGTCTCGCTGTGCTTTTCTGATGGTGGTACAGAGGTCACAGTAATGTGCCAAGGACGAAATACAT 1000
 Y L R G E S V Q I R C S P R C A F P D G G T E V T V M C Q G R N T W 332

GGAGTTCTGAACCAATTTGTGATGTGATTCTGAACCTTCTGATTCTCTCCAGTCATTAGCCATGGTAGAATAATTGAAGGAAAAAATCTGTATATTC 1100
 S S E P N C A C D S E P S D F S P V I S H G R I I E G K K S V Y S 365

CGAAGGGGATTTCGATTACAATTGAATGTTATGCAGGCTACACATTACATGGTGCAGCTCGTATTGAGTATATTGGAGGAGGCAGATGGACTCCAGAAAGTG 1200
 E G D S I T I E C Y A G Y T L H G A A R I E Y I G G G R W T P E V 398

CCAGTTTGCAAGTTAAGTGCTTATATTATGCCATCATCTGTATGATCGTGGCAGTTCTGGTGTTCCTGGCAGCCTTCGGATCTTTAAGAAATTCATT 1300
 P V C K L S A Y I I A I I C M I V A V L V F L A A F W I P K K F I S 431

CACAGGAAGGGAAGATGACAGCACTCCGCATACCTGCCAAATATACAGAGCTGTAAGCATGAATGACTCTGTCTGAGGGTGGGAGGGAATTCACAGTTGG 1400
 Q E G K S D S T P H T A K Y T S C K A * 451

ATGTGCCTATCAGAAATGAAATGAGTACGCTTATTCGCCTACGGAATCTAACGTACCTCACAGTGTGTTTTATGCTATTGGTTAACTATAGTAGGGAA 1500
 TAGTAGGTAAGAAAGATCAGTGTCTGCTGTTTGTCTGCACTATTGCTCTCTCTGTATGTAAATGGACATAGAGGCTCTTCCTGCAGCACA 1600
 CATCACTGTCTGCGCGGGGAGCACTCCTTCCTTACAGAAAGACTGTCCAATGTTAGCCCTGCTCACTACACTGTGAATGCACCTTCTCAATCACTTCTGC 1700
 AGTTCAGGTGGTGAATGTCGTTCTTTATGTTCTGAAATGTTTAAAGTGTGCTTTTCTTAAAGAGATTGGTGCCATTTAAGGCTGCATCTGTTTGAAA 1800
 TTGTTGCAATTTAGATCTTGTATCTGCTGCTTTCTTGTGTTGCCAAAGTTGATTCTGTATATCTGATGAATTAAGTGTGCTTTGATCAGAAAAA 1900
AAAAA 1910

図1-4 Crempの塩基配列とアミノ酸配列

Crempの予測されるアミノ酸は、塩基配列の下方に示した。Crempの配列を得るために用いた縮重プライマーは、SCR3とSCR4の間の矢印で示した。また、今回得られた、CrempのcDNAには、SCR3にN-結合型糖鎖付加配列(下線)、非典型的な polyadenylation signal (破線)、poly (A) 配列 (二重下線) が存在していた。なお、シグナルペプチド、膜貫通領域、細胞内領域はそれぞれ、SP、TM、CYTで示した。また、ストップコドンは、asteriskで示した。

表1-1 CrempとヒトDAF、ヒトMCP、マウスCrryのアミノ酸の相同性

Cremp	hDAF	hMCP	mCrry
SCR 1	SCR 2 <u>45.2%</u>	SCR 3 29.7%	SCR 1 31.8%
SCR 2	SCR 3 <u>43.3%</u>	<10%	SCR 5 34.0%
SCR 3	SCR 3 <u>41.8%</u>	SCR 3 <u>43.7%</u>	SCR 4 <u>44.3%</u>
SCR 4	SCR 2 22.7%	SCR 4 <u>47.5%</u>	SCR 5 39.0%
SCR 5	SCR 4 19.3%	<10%	<10%
SCR-like	<10%	SCR 2 23.1%	<10%

40%以上の相同性は下線で示した。

hDAF, human DAF; hMCP, human MCP; mCrry, mouse Crry

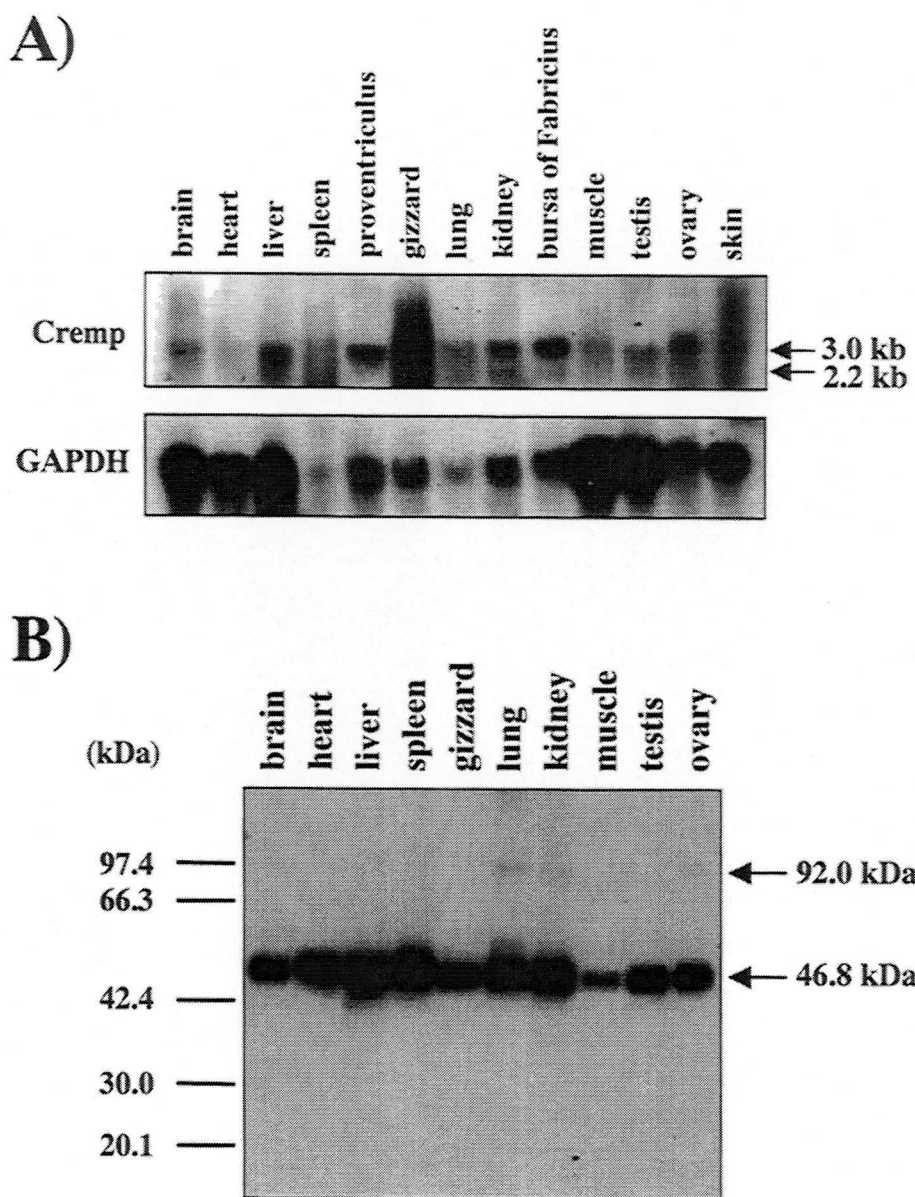


図1-5 CrempのmRNAとタンパク質の発現分布

A CrempのmRNAの発現分布 ニワトリの様々な組織のtotal RNAをそれぞれ20 μ gずつ1.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動した。CrempのmRNAの検出には、CrempのORFに対する塩基配列をプローブに用いた。

B Crempのタンパク質の発現分布 ニワトリの様々な組織のタンパク質をそれぞれ50 μ gずつ10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いた、SDS-PAGEで分離し、Crempポリクローナル抗体でCrempタンパク質を検出した。

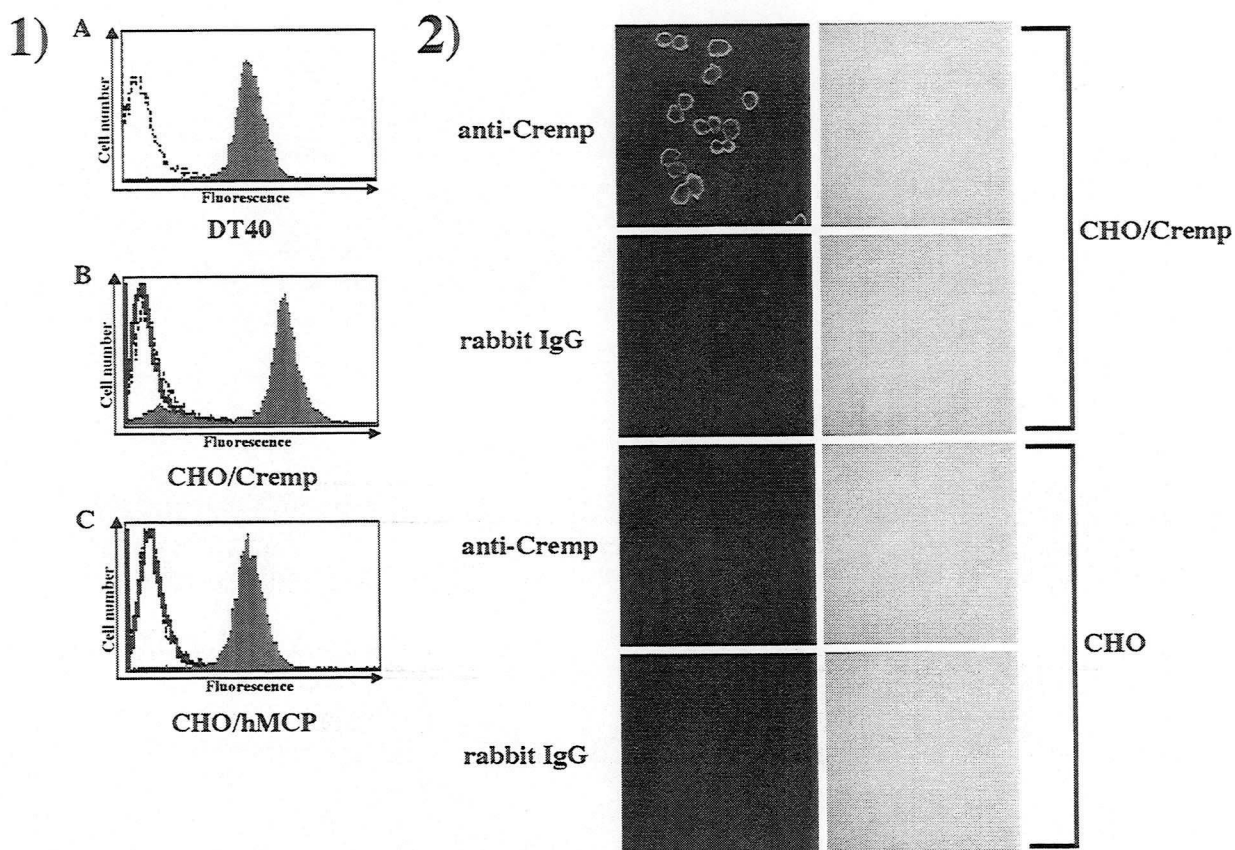
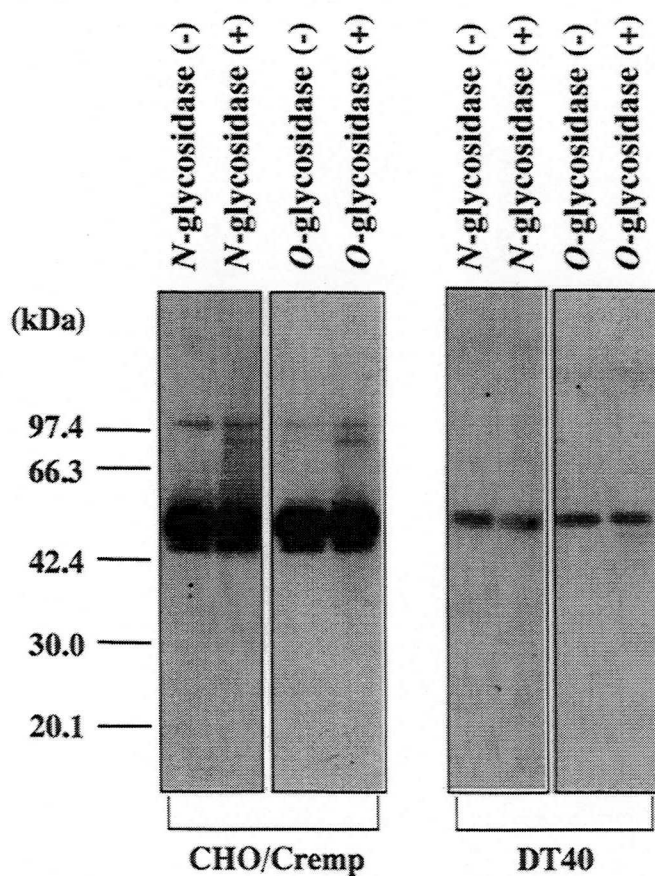


図1-6 Crempの発現局在

1 Flow cytometry (FACS) による解析 Crempの細胞での局在を調べるために、ニワトリのB細胞株、DT40 (A)とCHO細胞に恒常的にCrempを発現させた細胞株、CHO/Cremp (B)を用いてFACSを行った。また、CHO細胞にヒトMCPを発現させた細胞株、CHO/hMCPにおけるMCPの発現も合わせて示した (C)。なお、CrempおよびMCPの検出には、それぞれの特異的抗体を用いた。

2 免疫染色による局在解析 CHO/Crempに発現するCrempをウサギ抗Cremp抗体を用いて、細胞の免疫染色を行った。

A)



B)

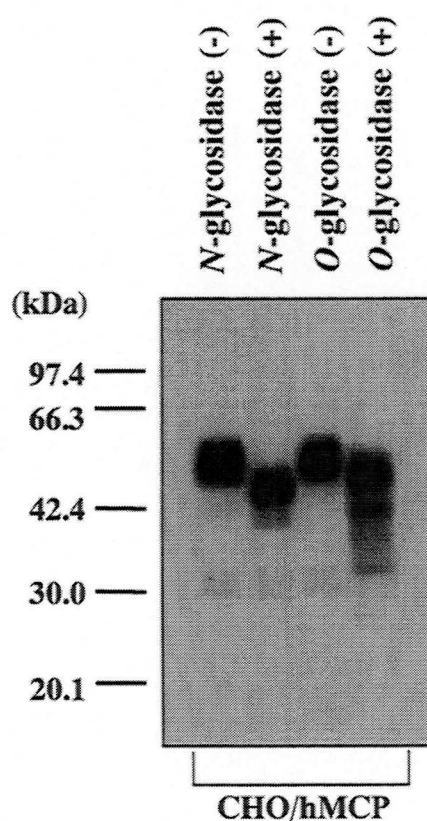


図1-7 Crempの糖鎖修飾

CHO/CrempとDT40由来のCrempをN-または、O-glycosidase処理によりその糖鎖修飾を検討した (A)。また、ポジティブコントロールとしてCHO/hMCPも同様に検討した (B)。

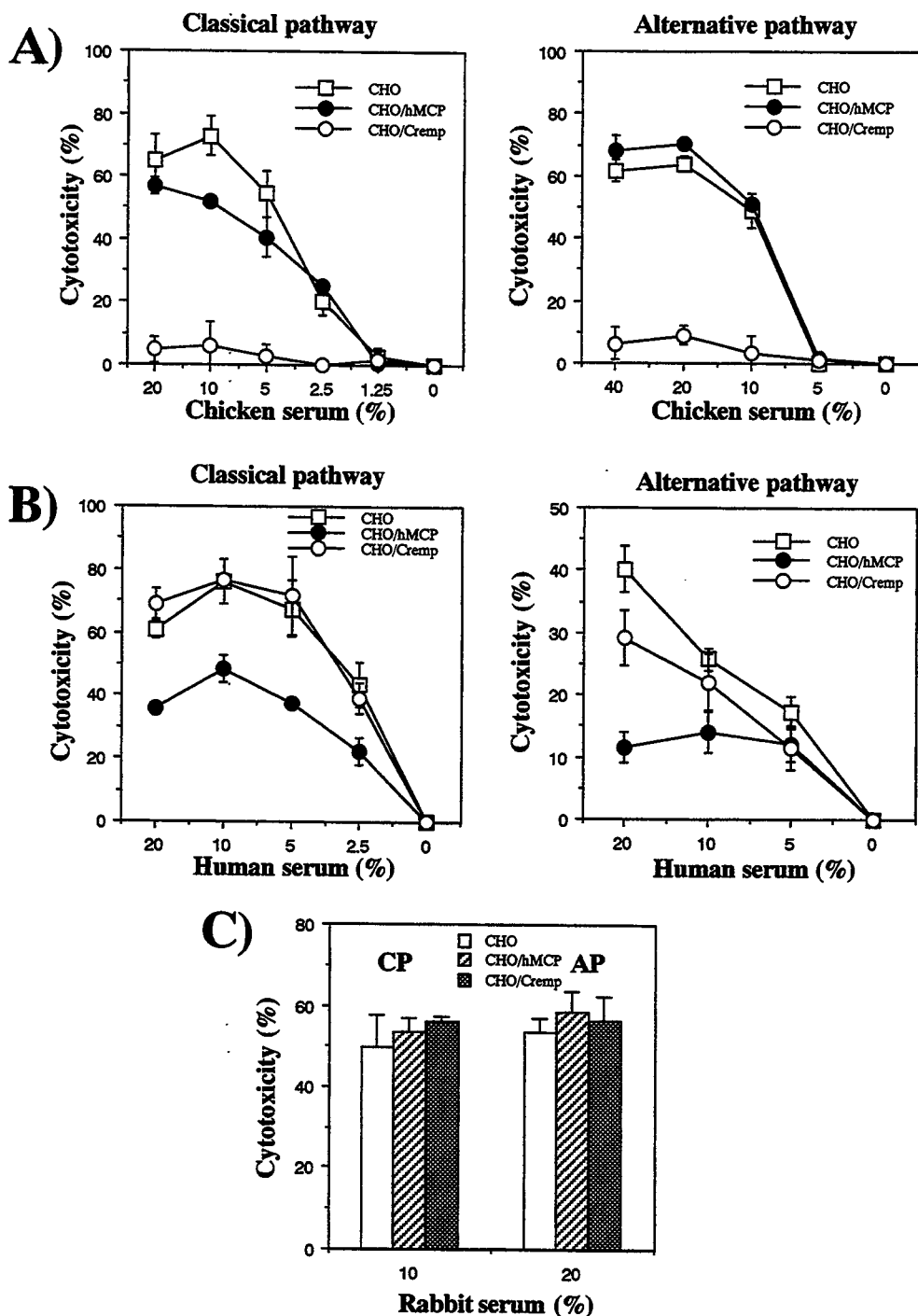


図1-8 Crempの補体制御活性の解析

CHO/Cremp (○)、CHO/hMCP (●)、CHO (□) 細胞を ^{51}Cr でラベルし、その細胞を $65\text{ }\mu\text{g/ml}$ (古典的経路; Classical pathway, CP) と $130\text{ }\mu\text{g/ml}$ (第二経路; Alternative pathway, AP) の抗CHO細胞抗体で感作した。また、補体系は、様々な濃度のニワトリの血清をGVB $^{2+}$ (CP)と 0.03 M EGTA-GVB (AP) 用いて希釈し、その細胞障害活性から、Crempの補体制御活性を測定した (A)。ヒトの血清を用いた時の抗CHO細胞抗体は、 $130\text{ }\mu\text{g/ml}$ (CP) と $650\text{ }\mu\text{g/ml}$ (AP) を用いた (B)。ウサギの血清の場合は、抗CHO細胞抗体を $65\text{ }\mu\text{g/ml}$ (両経路) を用いて細胞を感作した。また血清量は、 10% (CP) と 20% (AP) を用いた。また、CHO、CHO/hMCP、CHO/Cremp 細胞は、それぞれopen、hatch、blackカラムで示した (C)。以上の実験は、再現性を取るために、triplicateで計3回行った。また、エラーバーは、SDを示した。

1-4 考察

本章の結果から、ニワトリにおいて補体制御分子が存在することが明らかとなった。今回、筆者が単離したニワトリの補体制御分子 Cremp は、ヒトの DAF や MCP と同様に細胞膜に局在し、自己補体の活性化から自己細胞を守る役割を持つと考えられる。Cremp は、5 つの SCR ドメイン、1 つの SCR-like ドメイン、細胞膜貫通領域、細胞内領域をもつ I 型の細胞膜タンパク質であり、Cremp の SCR1-2 は、ヒト DAF の SCR2-3 に、SCR3-4 はヒト MCP の SCR3-4 にそれぞれ 43.6%、45.3%と高い相同性を示した。また、DAF、MCP の SCR2-4 は、補体を制御するうえで、重要なドメインであることが示されている (ref 22-23)。Cremp は、SCR ドメインを 5 つ持っていて、分子自体の骨格は、齧歯類の Crry に近い骨格をしている。しかし、分子間の総合的な相同性から単純に Crry のホモログとは考えにくい。このことから、Cremp は、DAF、MCP の祖先タンパク質であるか、ヒトとは異なる進化のなかで、鳥類特異的に存在する補体制御タンパク質であると考えられる。

最近報告された、ニワトリの MHC 上の遺伝子は、ヒトの約 1/10 程度の遺伝子しか存在せず、ニワトリではおそらく数少ない遺伝子で生理機能を担っていると考えられる (ref 24-25)。また、Cremp は、広範囲な組織で多量に発現する。このため、Cremp は、ニワトリで主要に働く補体制御タンパクであることが考えられる。また、補体因子でも、Factor B と C2 のハイブリット様分子が広範囲な下等生物で存在する (ニワトリ、コイ、ヤツメウナギ) (ref 26-28)。Cremp は、MCP と DAF のハイブリット様分子であることから、これら補体関連分子は、進化の過程で遺伝子重複、遺伝的組み換えなどの複雑な遺伝子の変化をとげていると考えられる。

ニワトリで、現在までに分子レベルで単離されている補体関連因子は、極くわずかである。ニワトリでは、補体系の主要な因子、C3 が、分子レベルで単離されている (ref 29)。また、古典的経路の成分である C4 も単離されており、ニワトリでは IgY というクラスの抗体が産生される。このことから、ニワトリにおいても抗体依存的な古典的経路が存在し、機能していると考えられる。一方、抗体非依存的な経路も、ファブリキウス嚢を破壊した抗体産生不能なニワトリが zymosan などの第二経路活性化物質で補体を活性化することができることから、存在していると考えられる (ref 30-31)。このように、ニワトリの生体内では、抗体依存的、非依存的な両補体活性化経路が存在し、*in vitro* で解析した補体制御活性が、*in vivo* においてもその機能を反映していると考えられる。そのため、本研究で証明した Cremp の補体活性化制御能は、*in vivo* においても古典的経路、第二経路を制御していることが推測される。また、この結果から、ほ乳類における自己細胞をその細胞膜上で自己補体の活性化か

ら防ぐ現象が鳥類でも保存されており、Cremp は、ほ乳類以外の動物ではじめて証明された自己細胞保護型補体制御分子である。

また、ほ乳類では、胎盤を通して胎児が成長するが、これは、母親にとっては、抗原になりうる (allo 抗原)。この時、母親の補体の活性化が引き起こされるが、この攻撃から逃れる機構には、膜型の補体制御分子が主に関与していると思われる (ref 20)。しかし、ニワトリのような卵生の動物では、この機構があてはまらず、補体制御分子は、どのように関与するのかは不明である。しかし、ニワトリの Cremp は広範囲な組織で発現することから、産卵されるまでの間、Cremp が卵細胞に発現し、母親の卵巣や輸卵管内で自己補体から卵細胞を守っている可能性は考えられる。

今後の解析では、Cremp の補体の制御様式、つまり Factor I (ニワトリの場合、単離されていないのでそれに相当するプロテアーゼ) の cofactor 活性もしくは、C3 コンバーターゼの解離を促進する decay-acceleration 活性のどちらか、または両方が機能しうるのかを調べる必要があると思われる。さらに、その制御作用がどのドメインに寄与するのかを調べることも重要なことと考えられる。また、ヒトを含めたほ乳類には、いくつかの補体制御分子が存在する。鳥類では、今回の Cremp がはじめて単離された補体制御分子であるが、このことを考えると鳥類の補体制御分子が他にも存在する可能性がある。ヒトの補体制御 SCR タンパク質は、RCA と呼ばれる遺伝子集落をヒト第一染色体の長腕、1q32 に形成する (ref 1-2)。ニワトリでも、この遺伝子集落が保存されているのなら、その染色体の解析から Cremp 以外の SCR タンパク質の単離も期待できる。Cremp 以外の補体制御分子の単離は、さらなる鳥類の補体系、さらには、基本免疫系の理解につながると考えられる。

近年、ほ乳類の補体制御分子は、多機能分子であることが報告されている。CR1 は、B リンパ球や貪食細胞上で C3 で標識された細胞 (オプソニン化細胞) を認識して、抗原の提示または貪食を助けることが知られ、CR2 は、B リンパ球上で CD19 や TAPA-1 と複合体を形成し、細胞に抗体産生のシグナルを伝える働きをもつ (ref 32-35)。さらに最近では、マウス Crry やヒト MCP が、T 細胞の増殖や IL-4 の分泌を促進させる co-stimulator であることも分かっている (ref 36-37)。また、SCR タンパク質は、精巣や精巣上体に特異的に発現しているが (ref 13-18)、その生理的意義は、不明である。一方、このような SCR タンパク質は、多くの微生物レセプターとして知られている (表 1)。このように、ほ乳類での補体制御分子の機能解析は進んでいるが、鳥類では、これらの機能のうちどれだけ保存されているのかは不明である。Cremp は、鳥類で最初に発見されたほ乳類の機能に類似する補体制御分子であるため、さらに詳細な Cremp の解析から、鳥類の補体系や免疫機構の解明につながることを期待する。

＜第二章＞ヤツメウナギの血漿型補体制御タンパク質 (laSCRp) の単離と機能解析

第一章で示したように、ニワトリの補体制御タンパク質、Cremp を本研究において単離した (ref 38)。軟骨魚類以上の動物種の補体系は、抗体を介して、活性化する経路 (古典的経路) とそれ以外の経路 (第二経路、レクチン経路) から成っている。しかし、自然免疫系のみで構成されているヤツメウナギの免疫系は、古典的経路以外の補体系が活性化していると考えられる。

本章では、補体制御分子が存在未知であるさらに下等な動物、円口類のヤツメウナギを実験材料に用い、ヤツメウナギの補体制御分子の単離を行った。また、その分子を解析することで、自然免疫系でのみ構成されるヤツメウナギの補体制御系の機能を検討した。

2-1 実験材料および試薬

2-1-1 抗体

ウサギ抗ヤツメウナギ C3 ポリクローナル抗体は、東京大学の野中勝博士により供与されたものを用いた (ref 39-40)。ウサギ抗ヤツメウナギ laSCRp ポリクローナル抗体は、筆者が免疫、精製したものを用いた (2-2-4 参照)。マウス抗 Flag モノクローナル抗体は、Sigma 社より購入した。二次抗体は、第一章と同様のものを用いた (1-1-1 参照)。

2-1-2 組織、血清

1-1-3 参照。

2-1-3 溶液および緩衝液の組成

本章で使用した主な緩衝液等の組成を項目ごとにまとめて示した。

1) Ni-NTA agarose カラムを用いたタンパク質精製

可溶化バッファー	: 1% (v/v) Triton X-100, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mg/ml IAA, 1 mM PMSF
平衡化バッファー	: 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
洗浄バッファー	: 20 mM imidazole, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
溶出バッファー 1	: 50 mM imidazole, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
溶出バッファー 2	: 200 mM imidazole, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
溶出バッファー 3	: 500 mM imidazole, 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

2) 酵母培養

YPD 培地	: 1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% Dextrose
--------	---

2-2 実験方法

2-2-1 ヤツメウナギの SCR protein (laSCRp) の cDNA クローニング

laSCRp の cDNA の単離は、東京大学の野中勝博士により供与されたヤツメウナギ肝臓の cDNA ライブラリーを鋳型に用いた。ヤツメウナギ肝臓の cDNA 断片は、クロ

ーニングベクター pBluescript II SK の *Eco* RI サイトに組み込まれており、laSCRp の cDNA 断片を得るために pBluescript II SK のマルチクローニングサイトの DNA 配列上のプライマーと、1-2-1 で作製した縮重プライマーを用いて、nested PCR を行った (図 2-2)。また、PCR のスケジュールは下記のとおりである。

1st PCR		2nd PCR
94°C 2 min		1st PCR reaction 1 µl を鋳型として
94°C 30 sec	} 20 cycles	94°C 2 min
50°C 1 min		94°C 30 sec
72°C 90 sec		50°C 1 min
		72°C 90 sec
		4°C
		} 35 cycles

さらに全長の cDNA 配列を得るために、確認された塩基配列に適合するプライマーを作製し、順次新たな cDNA 断片を得て全長の cDNA 配列を決定した (図 2-2)。また、このようにして得られた cDNA 断片は、すべて TA クローニングベクター、pCR-2.1 にサブクローニングし、ABI 310 シークエンサーによって DNA 配列を解析した。

2-2-2 ヤツメウナギの組織の RNA blot 解析

1-2-2 参照。

2-2-3 laSCRp の stable transfectant の樹立

クローニングされた laSCRp の cDNA の N 末端に Flag tag、C 末端にヒスチジンが 6 つ付加するような構造をもつ DNA 配列をほ乳類発現ベクター pFLAG-CMV-1 (Sigma 社) の *Eco* RI サイトに挿入したプラスミド DNA を構築した。このプラスミド DNA と、ネオマイシン耐性遺伝子を発現するほ乳類発現ベクター pCXN-2 のプラスミド DNA をそれぞれ 10 µg、0.5 µg ずつ、直径 10 cm の培養皿で 70~80% confluent の RK13 細胞に lipofectAMINE Reagent を用いて導入した。その後、0.6 mg/ml G418 でプラスミド DNA が導入された細胞を選択した。数日後、選択された細胞をペニシリンキャップを用いて単離した。laSCRp の発現の確認は、マウス抗 Flag モノクローナル抗体を用いて protein blot 解析によって行った。

2-2-4 ウサギ抗 laSCRp ポリクローナル抗体の作製

laSCRp の stable transfectant の細胞質中には、多量の laSCRp が発現していた為、laSCRp に対するポリクローナル抗体の作製は、この stable transfectant を抗原として用いた。

以下の方法は、1-2-3 参照。

2-2-5 ヤツメウナギの組織の protein blot 解析

1-2-4 参照。

2-2-6 Recombinant laSCRp の精製

1×10^8 個の laSCRp stable transfectant を 10 mM EDTA で回収し、PBS で 3 回洗浄した。10 ml の可溶化バッファーで細胞を可溶化し、4°C、13,000 g、20 分間の遠心分離で不溶化したものを除いた。15 volume の平衡化バッファーで平衡化した Ni-NTA agarose (Qiagen 社) 1.5 ml を PD-10 カラム (Amersham Pharmacia 社) につめ、10 ml の可溶化物を加えた (バッチ法)。一晩、4°C で転倒混和後、40 ml の洗浄バッファーで洗浄し、溶出バッファー 1~3 まで順に 20 ml ずつ溶出していく。SDS-PAGE、CBB 染色で laSCRp の溶出を確認後 (図 2-1)、溶出画分は、PBS に対して透析し、解析に用いるまで -80°C で保存した。

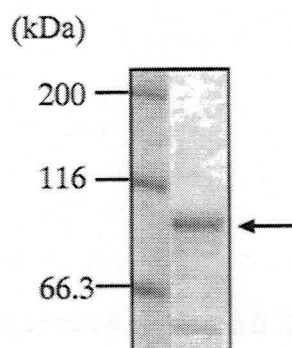


図2-1 recombinant laSCRpの精製

2-2-7 糖鎖消化処理

laSCRp の糖鎖付加を調べるために、*N*-glycosidase を用いて糖鎖消化処理を行った。laSCRp は、血清中の 100 μ g 由来のタンパク質と精製された recombinant タンパク質を用いた。方法は、1-2-8 参照。また、反応させたサンプルは SDS-PAGE で分離し、ウサギ抗 laSCRp 抗体による protein blot 解析でシグナルを検出した。

2-2-8 C3 沈着活性の測定

出芽酵母 (L-40; *Saccharomyces cerevisiae*) を YPD 培地で 30°C、一晩培養後、各 2×10^6 個の出芽酵母を PBS で 3 回洗浄した。0~50%のヤツメウナギ血清を含む GVB²⁺を加え、計 100 μ l の反応系で 25°C、30 分間、補体の活性化を行った。FACS バッファーで 3 回の洗浄後、一次抗体 (ウサギ抗ヤツメウナギ C3 抗体; 1/100 希釈, ウサギ抗 laSCRp 抗体; 25 μ g/ml) で反応させた (以下の操作は、1-2-6 参照)。

2-3 実験結果

2-3-1 ヤツメウナギ SCR protein (laSCRp) の cDNA クローニング

ヤツメウナギの補体制御分子を単離するために、第一章で用いた (図 1-2)、様々な動物種由来の MCP の縮重プライマーと、ヤツメウナギの肝臓の cDNA ライブラリーを用いて nested PCR を行った (図 2-2)。その結果、950 bp の SCR ドメインに相当する配列が検出された。さらに数回の PCR を行い、ヤツメウナギ SCR タンパク質の cDNA の ORF と polyadenylation signal、poly (A) 配列を含む 3'UT を単離することができた (図 2-3)。さらに、正確な cDNA 配列を得るために、ヤツメウナギの肝臓由来の total RNA を用いて RT-PCR を行い、独立した 12 クローンの cDNA 配列からヤツメウナギの SCR タンパク質の cDNA 配列を確認し、決定した。

このようにして得られた、ヤツメウナギの SCR タンパク質の cDNA 配列は、28 アミノ酸のシグナル配列、8 つの SCR ドメインと 1 つの SCR-like ドメインを持つ分泌型の SCR タンパク質と予測された (図 2-3)。Lamprey SCR protien (laSCRp) は、SCR ドメインを 8 個もつその分子骨格から、ヒトの分泌型補体制御因子、C4bp の α 鎖のホモログと考えられた。しかし、分子全体の C4bp の α 鎖との相同性は低く、さらに既知の SCR タンパク質との相同性も有意な差がみられなかった。そこで、SCR1-8 の個々の SCR ドメインに対する相同性について調べたところ、SCR2-3 は、ヒトの C4bp の α 鎖の SCR2-3 と 34.3%、SCR5 はヒトの Factor H の SCR2 と 39.3%、SCR6-7 は、ヒトの DAF の SCR3-4 と 34.4%のそれぞれ 30%を越える相同性を示した (図 2-4)。また、これら相同性の高い配列は、それぞれの分子で機能ドメインとして知られる部分である。そのため、laSCRp は、ヤツメウナギの生体内で補体の制御に関係する分子であることが考えられた。

2-3-2 laSCRp の mRNA とタンパク質の組織分布

laSCRp のヤツメウナギでの発現分布を mRNA とタンパク質レベルで調べた。mRNA は、laSCRp の ORF 全長のプローブ (2055 bp) を用いて RNA blot 解析により検討した。その結果、2.5 kb の肝臓のみの発現が検出された (図 2-5A)。さらに、ウサギ抗 laSCRp 抗体を作製し、タンパク質レベルでの発現分布を protein blot 解析で調べた。その結果、laSCRp は、血清に多量に存在し、肝臓をはじめ様々な臓器で少量存在していることが分かった (図 2-5B)。また、血清に存在するものは、93 kDa と 82 kDa の 2 種類存在し、今回単離した、laSCRp は、その recombinant の分子量から後者のタイプと考えられた。さらに、非還元条件下でも同様の分子量になることからヒトの C4bp のように多量体を形成する分子ではなく、単量体で機能する分子と考えられ

た。以上のことから、laSCRp は、肝臓で生合成され、血液中に分泌される分泌型タンパク質であり、肝臓をはじめ様々な臓器では、血管を通じて接着するか、細胞内に多少蓄積していることが考えられた。

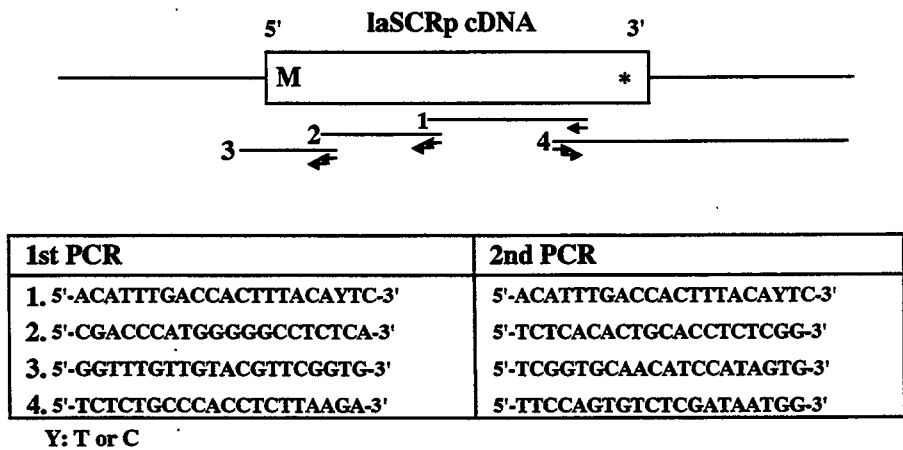
2-3-3 laSCRp の糖鎖付加

laSCRp の SCR2 には 2 つの、SCR3 には 3 つの、SCR5 には 1 つの、計 6 つの N-結合型糖鎖付加配列が存在する (図 2-3)。実際、RK13 細胞で作製した recombinant laSCRp は、SDS-PAGE 上で、アミノ酸配列から予測される分子量 74 k (Flag と His×6 を合わせた分子量; 76 k) を越える分子量 82 kDa を示す。この分子量の違いが糖鎖によるものかを調べるために、N-glycosidase を用いた、糖鎖消化処理を行った。その結果、recombinant では、N-glycosidase 処理後 76 kDa の分子量にシフトした。また、血清中の laSCRp も 2 つのタイプが共通に 4~6 kDa の分子量のシフトがみられた (図 2-6)。特に、血清中の低分子量のものは、recombinant laSCRp と糖鎖消化前後で分子量がほぼ同じであった。このことから、laSCRp は、N-結合型糖鎖を持つ分子で、血清中の 2 タイプのものは、N-結合型糖鎖修飾に由来するものではなく、その他の修飾か、alternative splicing 型の分子もしくは、タンパク質の構造が非常によく似た分子であると考えられた。

2-3-4 ヤツメウナギ血清中の C3 の沈着と laSCRp の相関性

ヤツメウナギは、抗体を持たない動物であるが、C3、Factor B、MASP などの補体因子が cDNA レベルで単離されていることから (27, 39-41)、古典的経路以外の補体活性化経路が存在することが考えられる。実際に、ヤツメウナギの C3 は、第二経路活性化物質である酵母の細胞壁成分の zymosan によってその沈着が誘導される (ref 39)。そこで、出芽酵母 (L-40; *Saccharomyces cerevisiae*) を用いて、補体活性化時のヤツメウナギの血清中の C3 と laSCRp との関係を調べた。その結果、C3 は、血清量依存的にその結合量が上昇し、それに応じて laSCRp も結合量が増加することが分かった (図 2-7)。さらに、EDTA 存在下 (第二経路の活性化は、 Mg^{2+} が必要とされる) では、C3、laSCRp のどちらも酵母に対する結合性が全く無くなることから、laSCRp は、おそらく補体の活性化依存的に活性型 C3 (C3b) に結合すると考えられた。

A)



B)

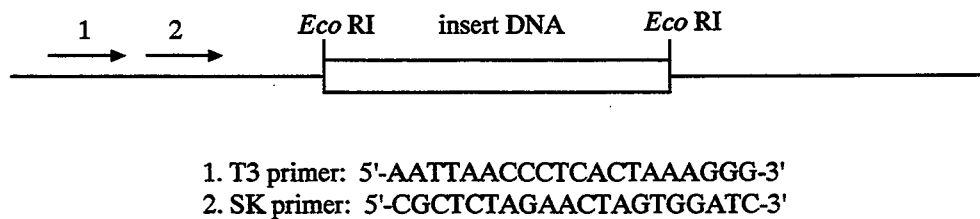


図2-2 laSCRpのcDNA配列をクローニングするための戦略

laSCRpに特異的なプライマー (A, 矢印) とライブラリーのベクターpBluescript II SKに対するプライマー (B, 矢印) を用いて、nested PCRを行い、laSCRpのDNA断片 (1~4) を得た (A) (図1-2参照)。また、pBluescript II SKに対するプライマーとその作製場所を示した (B)。なお、開始メチオニン、ストップコдонはMとasteriskでそれぞれ示した。

TCCACGCGTGGGAAAATATTGCCATGGGGCCCAATGGATATTGGATCAAAATGCGTATTCTCTGCGGGATTCTGCTGATCTGCATCATTGTTGCACCGG 100
 M G P N G Y W I K C V F S A G F L L I C T I V A P A 26

CTAATGCAGCTCCTAGCCTTGACACAACATTTCAAACCTTCATCTACAGAAGAAGAGAGCTTGACCCCACTTCACGCCACACCTCCGCTTTTCAACACTAT 200
 N A A P S L D T T F Q T S S T E E S L T P L H A T P P L F N T M 59

GGTTCCTCACCTTGGCACAACATTTCAAACCTTCACCTCCAGAACAGAGAGCTTGACCCCACTTCATCCATACCTCCGCTTTTCAACACTATGGATGTT 300
 V P H L G T T F Q T S P P E Q E S L T P P Q S I P P L F N T M D V 92

GCACCGAAGCTACACAACATTTCAAACCTTCATCTACAGAAGAAGAGAGCTTGACCCCACTTCATCCATACCTCCGCTTTTCAACACTATGGATGTT 400
 A P N V Q Q T P I I I V P P R P S P G K T P K G S C S T P P D L P H 126

ACTCGGACGCTGAGTGGGTGGAGCAGGACATCTACAGGAGGGGCAATTTGGTTCACATACGCTGCCAGAGTGGCTTCACTGACATCCAGGCCCGCGG 500
 S D V V S G W S E D I Y R E G H L V T Y A C Q S G F T D I Q A R R 159

CTTCTCATTGTGTGCGAAAGTATAACGACTCTCCGGGCAAACTGCGCTGGAGCAGCCCGTACTTCTGTGTCAAATCACTGTGGGCGTCCGGAGAAC 600
 F S I V C E S D N D S P G K L R W S S P Y F L C Q I T C G R P E N 192

CCTGCCAACGGGTTTGTGAAGGACAATTTACACCTTTGGGTCCACAGTCACATTCAAGTGTGAGAGGATACTTCGTGTTGGAGCGAACAATTTCCA 700
 P A N G F V E G Q F Y T F G S T V T K C R R G Y F V F G A 226

CATGTCAAGATGACGGAATTTGGGATACTTAGTTCGGAGTCCGAGAGGTGTCAGTGTGAGAGGCCCATGCGGTGAGCAGCAGGAGGCGGTGTTAAA 800
 C Q D D G N W D N L V P E C R E V Q C E R P P W V E H G E A V L N 259

CATCGATGACACAACATTTTATTACATATGAATGTGACCCAGGCTTCATCTGAGCGGCAATTTCACTTCAGTGCCTCGATAATGGACATGGGGCCCG 900
 I D D I T Y E C Q P G F I L D G F Q C L D W G P 292

AAAATCTTCTTACTGCGAGACCCCTTCACATGTGCAAGCATCCGCCCCCATCGCCAACGCCATGCAGTTGTGGAGCACTCAGCAGACTACGAGCTGG 1000
 K N L P Y C R P L H M C K H P P P I A N A M Q L W S T Q Q S Y E L G 326

GCACGAACGTGCGCTACCGCTGCAACCCGGGTACACAGTGTGCGCGACTCGCTCTACTTCATCGTGTGCGTCAACATCGACGGTCTGGCCAAGTGGAC 1100
 T N V R Y R C N P G Y T V S R D S S Y F I V C V N I D G L A K W T 359

CCGCGAGAAGCTCAAGTGCAGCTCCGAAACAGTGCAGCTTCCAGAGGAAATGAAATGGGTATTTTAAATGGAACGGATTTTCATGTATGGAGCAGATATC 1200
 P Q K L K C Q P K Q C S F P G E I E N G Y F D F M Y G A H I 392

GTATATCACTGTAACCCAGGATATATTATGGGAGAAAGGCAAAATGCAAGAGAGTGCATGGCTGATGGAATTTGGTTACCAAACTCTCTGTGTGTGAAC 1300
 V Y H C N H G Y I M G E R Q M T R E C M A D G N W L P N S P V C E P 426

CCGTGCAGTGCAGAGCCTCTTGAATCCCTCACGGGACCATCAGCGTTCCAGCAGCTGATATTGACAGCGCTCATCCGGTATCGTGCACAGCGCAA 1400
 V Q C P E P L E I P H G T I S V P S S L I F D S V I R Y R C N G K 459

AATGCAGCTGATGGGTCCAGCCTCGGCACATGCCAAGCGGACAGCAGTGGAGTACCACGAGCCCATATGCATGGCTGTCTCTGCCACCTCTTAAG 1500
 M Q L M G P S L R T C Q A D S T W S D H E P I C M A V L C P P L K 492

AATATCGAAGTGAAGTGGCTGGGCGGGGAAAGGACCCAGCAGTGTGTGAGGTTTGTGCTGCAACGAAGGTTTTTGTGGCTGGGCGAGGATACAAATCA 1600
 N I E H G K W L G G E G T D S V V R F S C N E G F L L A G Q D T I T 526

CTTGCTTCCGAAATGGGCACTGTGAGGATATCCACCCACTTGTGAGCTGTGCTGCTCCACCGACCTGGACCGATATGCCCATACCTCAGATCAT 1700
 C L P N G Q W S G Y P P T C Q P V C P P P T L D R Y A A I P Q I I 559

CAGAGACAAGCAGTACTTCAAGTGGAGAGAGAGTGGAGTTTCACTGCGCGGAGGCTATCGCGATTGGTCTACACCTCGTGTGCAACAAAGTGGCAT 1800
 R D K Q Y F T V G E R V E F H C G G G Y R D W S Y T L V C N K W H 592

AGGTGGCAGCAGTGGGAAAGCACTTCTTACATCCCTCGGGATGGAATGCGTGGCATTCTGTTACAGGCCAAAGCCAACTTAAATGCAGTTATTGCAA 1900
 R W Q Q V E K H F L H P S G W K C V A F C Y R P K P N L N A V I A R 626

GGAGCTACGAACACATAGACTTTTACCCCGTGGTAAATGATGCTATTTTGAATGCAAGCTGGATATACCTCCGAAGCCTATGGATACATACGGAATG 2000
 S Y E H I D F Y P V G K Y A Y F D C K L G Y T S E A Y G Y Y M E C 659

TGCAGTCGACAAAGGAGTGAAGTACTTGAAGCCCTACAAAAAGCAGCTGTATTGCTGGCAGAAGATGGTACTGAAAGGTGCTCGCAAGTGTCCG 2100
 A V D K G G E T Y W K P Y K K A R C I A G R R W Y * 684

CCGATCAGAGCTCTGCGATGGGCACTTTGATCGCATACGATGTTCACTCTGCTGCAATGTTTTTTTTTAAATGACATGTATTGCGTGGCGTCATTA 2200
 CTGATCATTCTGTATTGGAATAAATCAATAAATCTGCTGATGCAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2271

図2-3 Lamprey SCR protein (laSCRp) のcDNAとアミノ酸配列

laSCRpのcDNA配列と予測されるアミノ酸配列を示した。laSCRのcDNAを得るために用いた、縮重プライマーは、矢印で示した。また、シグナルペプチド (SP) を下線で、N-型糖鎖付加配列を白抜き文字で、polyadenylation signalを二重下線でそれぞれ示した。

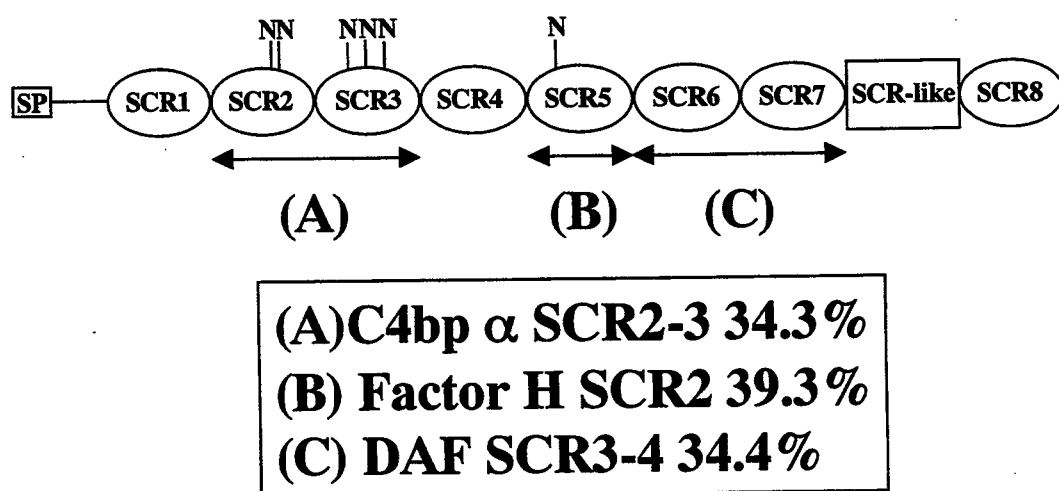
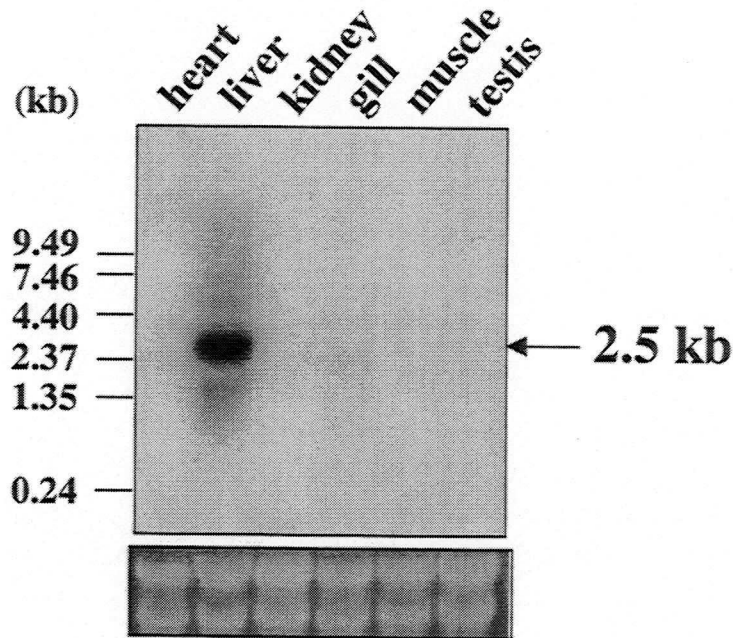


図2-4 laSCRpと既知のSCRタンパク質とのアミノ酸の相同性

laSCRpの個々のSCRドメインと既知のSCRタンパク質との相同性を示した。上段にlaSCRpの模式図を示した。laSCRpのSCR2-3は、ヒトのC4bpのSCR2-3と34.3% (A)、SCR5はヒトのFactor HのSCR2と39.3% (B)、SCR6-7は、ヒトのDAFのSCR3-4と34.4% (C) の高い相同性を示した。

A)



B)

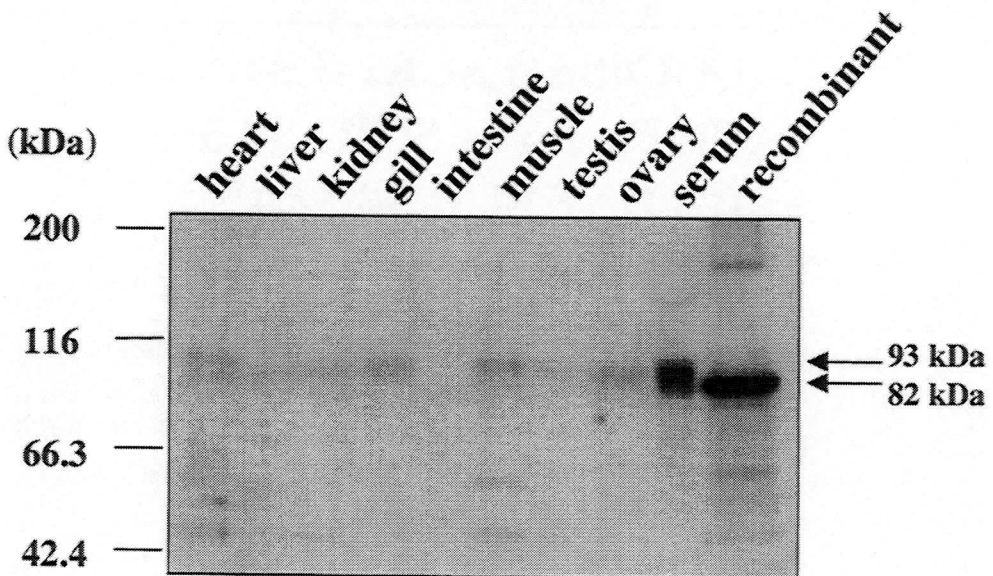


図2-5 laSCRpのmRNAとタンパク質の組織分布

A laSCRpのmRNAの組織分布 様々なヤツメウナギ組織のtotal RNAを各20 μ gずつ1.0% (w/v) アガロースゲルで分離し、laSCRpのORFの塩基配列をプローブに用いて、laSCRpのmRNAを検出した。

B laSCRpのタンパク質の組織分布 様々なヤツメウナギの組織の可溶化物 (100 μ g) を用いて、protein blot解析を行った。この図は、還元条件下、7.5% (w/v) アクリルアミドゲルでlaSCRpポロクローナル抗体を用いてlaSCRpタンパク質を検出したものを示した。

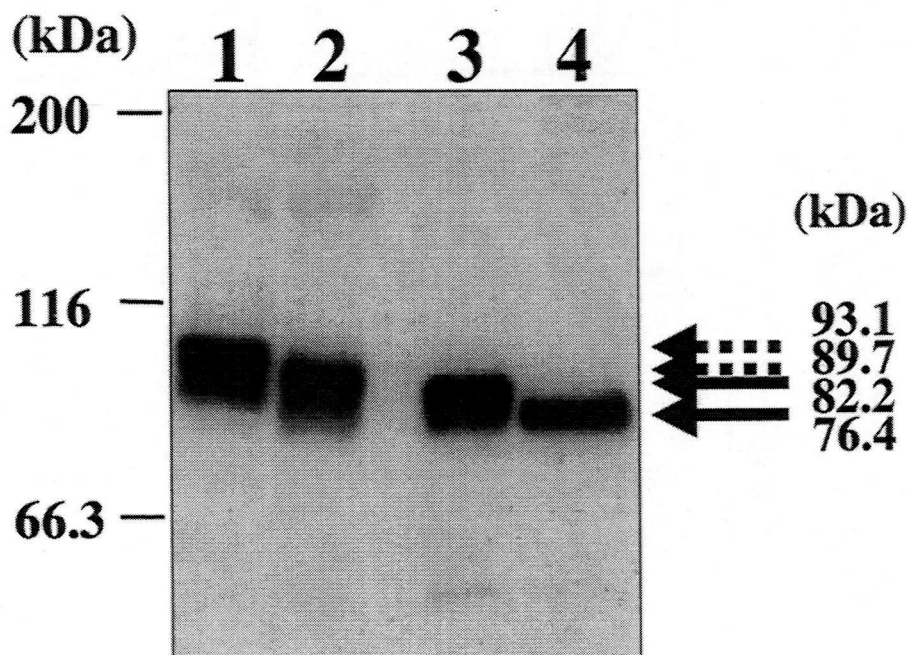


図2-6 laSCRp の糖鎖処理

血清由来のlaSCRp (レーン1、*N*-glycosidase未処理、レーン2、*N*-glycosidase処理) と recombinantのlaSCRp (レーン3、*N*-glycosidase未処理、レーン4、*N*-glycosidase処理) のN-結合型糖鎖消化を行った。血清中の高分子量のlaSCRpは、約3.4 kDa (93.1→89.7 kDa) の、recombinantのlaSCRpは、約6 kDa (82.2→76.4 kDa) の分子量のシフトがあった。また、血清由来のlaSCRpの低分子量のものは、recombinant laSCRpと糖鎖処理前後でほぼ同じ分子量を示した。

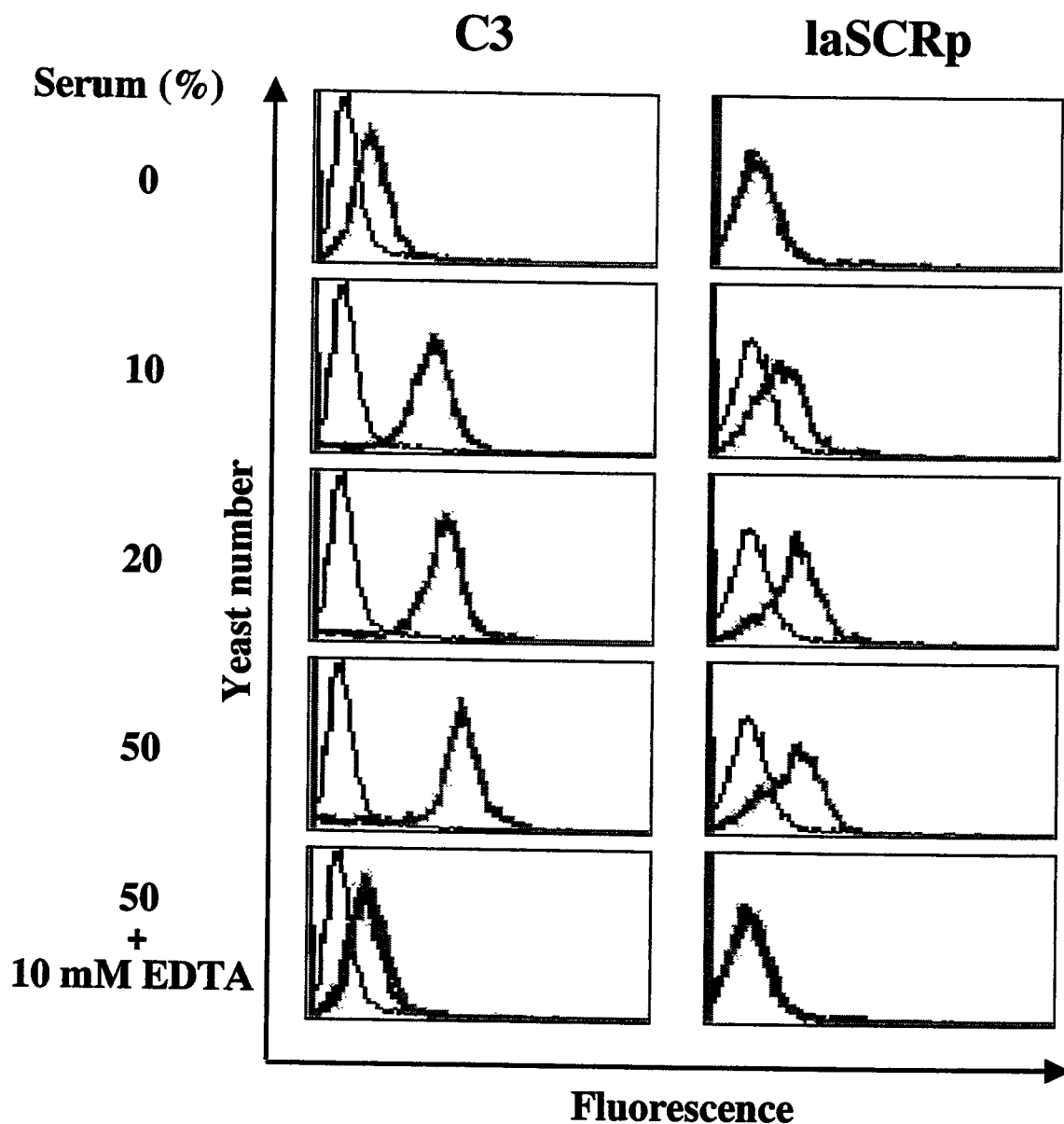


図2-7 ヤツメウナギのC3の沈着とIaSCRpの相関性

ヤツメウナギの補体系の活性化とIaSCRpとの関係を調べるために、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた、血清中のC3とIaSCRpの結合量をFACSで調べた。C3、IaSCRp (薄線) は、それぞれ特異的なポリクローナル抗体で検出した。また、コントロールのIgGは、濃線で示した。

2-4 考察

現在までに、ヤツメウナギでは、補体系で中心的な役割をする補体因子 C3、第二経路で機能する Factor B、さらにレクチン経路で機能する MASP の 3 つの補体系タンパク質の一次構造を示す報告がなされている (ref 27, 40, 41)。この 3 つのタンパク質の存在から、ヤツメウナギでは少なくとも第二経路、レクチン経路の存在が示唆される。実際に、第二経路活性化物質である、出芽酵母の細胞壁構成成分 zymosan 上でヤツメウナギ C3 の沈着が誘導される (図 2-7) (ref 39)。一方、免疫グロブリンに依存する古典的経路の存在を証明しうる分子は、未だ同定されていない。この理由には、1) ヤツメウナギでは、免疫グロブリンの機能が知られておらず、抗体を持たない動物であると考えられている。2) ほ乳類の C3 は、 α 、 β の 2 つのサブユニットから成るのに対し、ヤツメウナギの C3 は、 α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットから成り (ref 39-40)、C4 と構造的に類似する。このことにより、ヤツメウナギは、C4 を持たない動物種と考えられていることに起因する。さらに、ヤツメウナギには、補体の活性化を介したオプソニン化の存在も示唆されているが、これも第二経路または、レクチン経路によるものと考えられる。そのためオプソニン化は、もともと第二経路かレクチン経路に由来する初期免疫機構と考えられる。このように、ヤツメウナギの補体系はごく少数の補体因子の解析の報告のみで、その制御機構に至っては存在の必要性を含めて全く解明されていない。本章の結果は、世界で初めて、抗体を持たない円口類のヤツメウナギにおいて補体制御分子の存在を示唆する結果である。

ほ乳類より下等生物の細胞膜結合型補体制御分子は、前章で報告した鳥類の Cremp が初めて報告された分子である (ref 38)。一方、可溶型の分子では、硬骨魚類のサンドパスで C4bp、Factor H に類似する、SBP1 という分子の報告がある (ref 10-12)。この分子は、SCR を 17 個もつ分子で、血清中のプロテアーゼのコファクターとして働き、ニジマスの C3b を限定分解する機能をもつと考えられる。今回筆者が単離した分子は、硬骨魚類よりもさらに下等な動物であるヤツメウナギにおいて単離された分子であり、その分子構造は、8 つの SCR ドメインと 1 つの SCR-like ドメインを持つ分泌型の SCR 型タンパク質であった。この分子は、分子骨格がヒトの C4bp α 鎖と類似しているが、その分子全体の相同性や単量体で存在することから、ヒトの C4bp のホモログタンパク質ではないと考えられる。また、laSCRp は、分子全体の相同性が既知の SCR タンパク質と有意差がないことから、単純に既知の SCR タンパク質のホモログとも考えにくい。laSCRp の個々の SCR ドメインは、SCR2-3 がヒトの C4bp α 鎖の SCR2-3 に 34.3%、SCR5 がヒトの Factor H の SCR2 に 39.3%、SCR6-7 が、ヒトの DAF の SCR3-4 に 34.4%の高い相同性を示す。これら相同性から、laSCRp は、ヒ

トで報告されている様々な SCR 型タンパク質のハイブリットタンパク質であることが示唆される。ニワトリの Cremp は、MCP と DAF に類似したドメイン構造を保持する。ニワトリよりさらに下等な動物であるヤツメウナギでは、さらにプロトタイプの SCR タンパク質が存在し、今回単離した laSCRp は、脊椎動物における SCR タンパク質のプロトタイプに近いタンパク質であるかもしれない。さらに、これら分子の相同性の高い部分は、補体制御の機能ドメインに相当する。このことから、laSCRp は、補体を制御する分子と考えられる。

今回単離した、laSCRp は、血清中では、少なくとも 2 種類存在すると考えられる。マウス、ラットの Factor H は、血小板上でシアル酸を介して細胞膜に結合しているタイプが存在する (ref 42)。齧歯類では、血小板には CR1 が発現しておらず、CR1 の代わりに分泌型の Factor H が血小板で IAR (immune adherence receptor) として機能していると考えられる。この機能は、少ない遺伝子で生命現象を維持する下等生物では有用であり、ヤツメウナギ由来の laSCRp にも同じような修飾がある可能性がある。また、ヒトでは、いくつかの Factor H に類似するタンパク質 (Factor H-related protein) が単離されている。laSCRp の protein blot 解析の結果から、laSCRp は、様々な臓器で分子量の異なるタイプが存在し、血清中には少なくとも 2 種類の分子が存在する。このことから、laSCRp も 1 種類の分子だけではなく、alternative splicing を受けた分子や糖鎖などの修飾を受けた分子が多数存在すると考えられる。

さらに、laSCRp は、出芽酵母上で C3 の沈着依存的に結合量を増加し、EDTA 存在下でその活性を失うことから、補体の活性化依存的に作用しうる分子である。また、下等生物の補体制御系の反応には、2 価の金属イオンが必要とされる (SBP-1 の場合は、 Ca^{2+} イオンが必要) (ref 43)。そのため、laSCRp も C3b との結合で 2 価の金属イオンを必要とし、おそらく C3b を介して酵母に結合していることが考えられる。今後は、さらに詳細な分子間の補体制御活性を示す解析を行い、laSCRp の補体制御能を検討する予定である。

＜第三章＞マウス MCP の解析

ヒトの MCP の mRNA は、4.0 kb と 1.5 kb のものが存在し、4.0 kb のものは、いくつかの alternative splice form が存在し、広範囲にわたってその発現が確認される (ref 44-45)。一方、1.5 kb の mRNA は、精巣に特異的に発現し、精子では、先体部に局在する。その機能は、MCP の抗体で精子と卵の結合、融合が顕著に阻害されることから (ref 19, 46)、MCP は従来の補体制御機能に加え、受精のステップに必要な因子であることが推測される。

一方、マウスの MCP は、発現分布が精巣に限られる (ref 16)。マウスでは広範囲に発現する Crry が補体制御の主要な分子と考えられるため (ref 9, 20)、マウスにおいて MCP は、体細胞で機能する補体制御分子とは考えにくい。そのため、マウス MCP は、ヒト MCP よりも精巣に特殊化したタンパク質であると考えられる。また、その他、既知の補体制御型 SCR タンパク質も精巣または、精巣上体に発現が集中している (ref 13-18) 。この解釈としては、子宮の補体因子の攻撃から精子を防御していることが考えられる。しかし、直接的な証拠はなく、その発現分布のみの解釈であると言わざるえない。本研究では、MCP の補体制御と受精因子としての関わりをより生理的に調べるために、ジーンターゲット法を用いてその解析を行った。

3-1 実験材料および試薬

3-1-1 抗体

ハムスター抗マウス DAF モノクローナル抗体 (RIKO-3) は、名古屋大学の岡田秀親博士により供与されたものを用いた (ref 47)。マウス抗マウス acrosome モノクローナル抗体 (OBF 13) は、大阪大学の岡部勝博士から供与されたものを用いた (ref 48)。ヤギ抗マウス C3 ポリクローナル F(ab')₂ は、Cappel 社より購入した。ウサギ抗マウス MCP ポリクローナル抗体は、筆者が免疫、精製したものを用いた (3-2-5 参照)。二次抗体は、第一章のもの (1-1-1 参照) に加え、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ハムスター IgG 抗体 (Cappel 社)、FITC 標識ヤギ F(ab')₂ 抗ハムスター IgG (Southern Biotechnology Associates 社)、FITC 標識ブタ抗ヤギ IgG 抗体 (CALTAG 社) を用いた。

3-1-2 動物

Acrosin/Enhanced green fluorescent protein (EGFP) マウスは、大阪大学の岡部勝博士から供与されたものを用いた (ref 49)。マウス MCP -/- /acrosin/EGFP マウス (EGFP-MCP KO) は、マウス MCP 欠損マウスと acrosin/EGFP マウスとの交配で得た、MCP +/- /acrosin/EGFP 同士の交配から得た。また、その遺伝子型の選択は、PCR で行った。

3-1-3 組織、血清

1-1-3 参照。

3-1-4 溶液および緩衝液の組成

本章で使用した主な緩衝液等の組成を項目ごとにまとめて示した。

1) DNA blot 解析

泳動バッファー (1×TAE) : 0.04 M Tris, 0.04 M 酢酸, 1 mM EDTA (pH 8.0)

ゲルローディングバッファー : 50% (w/v) グリセロール, 1% BPB

変性バッファー : 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl

中和バッファー : 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 3 M NaCl

その他の緩衝液等は、1-1-5 参照。

2) 精子培養関係

TYH 培地 : 119.4 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.7 mM CaCl₂,
1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25.1 mM NaHCO₃,
5.6 mM グルコース, 0.5 mM sodium pyruvate,
54 µg/ml penicillin-G, 74 µg/ml streptomycin,

0.4% (w/v) BSA, 0.0006% phenol red

3) FACS (2)

PLP 固定液 : 1% パラホルムアルデヒド, 75 mM リジン塩酸塩,
37.5 mM リン酸バッファー (pH 7.4),
10 mM sodium periodate

3-2 実験方法

3-2-1 MCP 遺伝子欠失ベクターの作製

129/SVJ マウス由来のゲノム DNA を鋳型として、MCP の 5'UT を含む 5'側の短腕を PCR で増幅した。プライマーは、以下の通りである。

Forward primer 1 : 5'-TTGCGGCCGCGCATCCCAGTCTTAATTAAGGT-3'

Forward primer 2 : 5'-TTGCGGCCGCTAATAGTCCCCTCCCTATG-3'

Reverse primer : 5'-CCCTCGAGAGCCAGAGAGCAAGTTTAA-3'

なお、PCR に用いたプライマーには、5'側に *Not* I サイト (Forward primer 1, 2)、*Xho* I サイト (Reverse primer) を付加した。

3'側の長腕には、129/SVJ マウス由来のゲノム DNA ライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法により単離した、MCP のエキソン 4-6 を含む約 6 kb の DNA 断片を用いた。また、この DNA 断片には、5'側に *Eco* RI サイト、3'側に *Sal* I サイトを付加した。これら短腕、長腕は、遺伝子欠失用ベクター、pPNT ベクターに組み込み、MCP のエキソン 1-3 をネオマイシン耐性遺伝子に置き換えるようなターゲティングベクターを作製した (図 3-2A)。

3-2-2 MCP 欠損マウスの作製

マウス MCP 遺伝子を欠失させるために、3-2-1 で作製したターゲティングベクターを (図 3-2A)、D3 embryonic stem (ES) cell にエレクトロポレーション法により導入した。G418 で選択後、そのゲノム DNA から PCR により 6 個のポジティブコロニーを選別した。さらに、予想どおり相同組み換えが起こっている細胞株を DNA blot 解析により、3 クローン選別した。この 3 つの細胞株は、C57BL/6N マウスの blastocyst 期の胚にインジェクションした。その結果、germ line にターゲティングアレルをもつキメラマウスが生まれ、そのマウスと野生型マウスとの交配により、MCP ヘテロ (+/-) マウスを得た (F1 マウス)。さらに、F1 マウス同士の交配により、MCP -/- マウスを得た (F2 マウス)。解析には、主に、F2 マウスまたは、F2 マウス同士の交配から得た F3 マウスを用いた。

3-2-3 DNA blot 解析

ゲノム DNA は、ES 細胞やマウスの尾から既報の方法に従って抽出した (ref 49)。各遺伝子型のゲノム DNA は、*Bam* HI 制限酵素により消化し、電気泳動後、ゲルの変性、中和を経て、ナイロン膜 (Hybond-N⁺membrane) に転写した。その転写膜は、MCP のエキソン 7 に相当する塩基配列 (92 bp) をプローブとし、ハイブリダイゼーションバッファー (Express hybridization buffer) と 60°C、1 時間反応させた。数回の洗浄後、その転写膜は、BAS 2000 Bio-Image Analyzer (Fuji Photo film 社) によって解析した。

3-2-4 RNA blot 解析

1-2-2 参照。

3-2-5 ウサギ抗マウス MCP ポリクローナル抗体の作製

マウス MCP に対するポリクローナル抗体を作製するために、MCP の抗原の作製を行った。マウス MCP タンパク質を発現させるためのプラスミド DNA は、MCP の N 末端に Kozak 配列、C 末端にヒスチジンが 6 つ付加するように構築した DNA 配列をほ乳類発現ベクター pME18s の *Eco* RI サイトに挿入し、作製した。MCP 抗原として、このプラスミド DNA を RK13 細胞に lipofectAMINE Reagent を用いて導入し、細胞そのものを用いた。以下の方法は、1-2-3 参照。

3-2-6 マウスの組織の protein blot 解析

1-2-4 参照。

3-2-7 糖鎖消化処理

MCP の糖鎖付加を調べるために、*N*-glycosidase を用いて糖鎖消化処理を行った。方法は、1-2-8 参照。また、反応させたサンプルは SDS-PAGE で分離し、ウサギ抗マウス MCP 抗体による protein blot 解析でシグナルを検出した。

3-2-8 免疫染色

精巣上体から精子を分離し、40°C、5 分間の乾燥でスライドガラスに精子を付着させた。以下の方法は、1-2-7 参照。また、マウス MCP は、20 µg/ml の抗体濃度のウサギ抗マウス MCP 抗体を用いて検出した。

3-2-9 FACS

マウス MCP と DAF の精子膜表面上と先体内膜の発現、および精子中の total protein 量を FACS で調べた。精子の膜表面は、精巢上体から精子を分離し、PBS で数回洗浄後、抗体反応を行った。先体内膜は、精子を TYH で 2 時間培養後、終濃度 $10\ \mu\text{M}$ Ca^{2+} イオノフォア A23187 (Sigma 社) で 20 分間培養したものを用いた。また、FACS の方法は、1-2-6 に従った。MCP と DAF の total protein 量は、PLP 固定液を用いて行った。詳細は、精巢上体の精子を PBS で洗浄後、ボルテックスで攪拌しながら PLP 固定液を 1 ml 加え、 4°C 、20 分間静置した。再度 PBS で洗浄後、 $0.4\ \text{mg/ml}$ saponin/10% goat serum (二次抗体と同じ動物種) /FACS バッファーで室温、1 時間静置した。同様のバッファーで各一次抗体 (ウサギ抗マウス MCP 抗体; $50\ \mu\text{g/ml}$, ウサギ抗マウス DAF 抗体; $25\ \mu\text{g/ml}$) を希釈した抗体反応液で 4°C 、1 時間反応、数回の洗浄後、二次抗体を反応させた。

3-2-10 体外受精

8 週齢の雌の BDF1 マウスを過排卵させるために、マウスの腹腔に 5 IU の pregnant mare serum gonadotropin (PMS) (Sigma 社) を注入、48 時間後に 5 IU の human chorionic gonadotropin (hCG) (Sigma 社) を注射した。13-15 時間後に卵管膨大部から未受精卵を回収し、TYH 培地で培養し、 0.01% (w/v) Hyaluronidase (Sigma 社) により卵丘細胞を取り除いた。また、透明帯を取り除く場合は、acidic tyrode (Sigma 社) を用いた。精巢上体から得た精子は、TYH 培地で 37°C 、2 時間培養後、終濃度 $1-2 \times 10^5$ sperms/ml になるように卵細胞の含まれる培地に加えた。

3-2-11 輸卵管中における受精率の測定

3-2-10 のように過排卵マウスを準備し、hCG 注射後に各遺伝子型の雄マウスを同ゲージに入れた。次の日の朝、雌の室にプラグを確認後、卵管膨大部より卵細胞を採取した。またこの時、細胞質が異常な卵細胞は取り除いた。受精卵と未受精卵の違いは、Hoechst 33342 (Sigma 社) 染色によって、前核を染め蛍光顕微鏡下で観察することで、確認した。

3-2-12 C3 沈着解析

MCP 欠損マウスの精子上での C3 の沈着は、FACS によって調べた。精巢上体から分離した精子 (1×10^7 個) は、TYH 培地で 37°C 、2 時間の前培養を行った。また、先体反応後の精子は、終濃度 $10\ \mu\text{M}$ の Ca^{2+} イオノフォアを加え調製した。数回の洗浄後、それらの精子は、1/10,000 希釈の OBF 13 で感作を行い、 GVB^{2+} で希釈した 10%

マウス血清を加え、37°C、20 分間で補体の活性化を助長した。その精子は、数回の洗浄後、1/50 希釈のヤギ抗マウス C3 抗体で精子上の C3 沈着量を測定した。

3-2-13 先体反応の解析

MCP の先体反応での関与を調べるために、MCP $-/-$ マウスに acrosin/EGFP マウスを交配し、EGFP-MCP KO となるダブルトランスジェニックマウスを作製した (3-1-2 参照)。また、この解析のコントロールマウス (野生型 EGFP マウス) は、GFP-MCP KO を作製する時に生まれた同腹のマウスを用いた。精巢上体から分離した精子は、TYH 培地で 37°C、20 分間の Swim-up 後、15 分間隔で経時的に自発的な先体反応を FACS によって解析した。また、この実験は、独立した 5 個体を行い再現性を確認した。

3-3 実験結果

3-3-1 マウス MCP の組織分布と糖鎖修飾

マウス MCP の mRNA は、ヒト MCP とは異なり、精巣に特異的に発現していることが報告されている (ref 16)。タンパク質レベルでの発現分布を確認するために、ウサギ抗マウス MCP 抗体を作製し、様々なマウス組織での protein blot 解析を行った。その結果、タンパク質レベルでも同様に精巣特異的な MCP の発現が確認された (図 3-1A)。また、精子での MCP も精巣の MCP と同じ 46.4 kDa の分子量のタンパク質が発現し、*N*-glycosidase 処理後の分子量が計算上の分子量、35.9 k になることから、ヒト MCP と同様に (ref 50)、精子上のマウス MCP は、N-結合型糖鎖のみの修飾がなされていることが分かった (図 3-1B)。

3-3-2 MCP 欠損マウスの作製とその確認

マウス MCP のゲノム配列は、11 個のエキソンから成っており、1 番染色体に位置している (ref 51)。今回、MCP 欠損マウスを作製するために、エキソン 1-3 をネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、MCP 遺伝子を欠失させた (図 3-2A)。また、正常に相同組み換えが起こっていることを確認するために、ES 細胞または、マウスの尾からゲノム DNA を抽出し、*Bam* HI 消化後、エキソン 7 の部分の DNA をプローブとして DNA blot 解析で確認した。その結果、それぞれの遺伝子型、+/+ で 22 kb、-/- で 14 kb、+/- で両方のバンドが予想どおり検出された (図 3-2B-1)。さらに、5'側は、図 3-2A に示されるプライマーを用いた PCR 解析で、それぞれの遺伝子型で予想される DNA の増幅が検出された (図 3-2B-2)。

次に、MCP 欠損マウスの MCP の転写、翻訳レベルでの発現について調べた。マウスの精巣から total RNA を抽出後、MCP の ORF 全長のプローブを用いて、RNA blot 解析を行った。その結果、+/+ では正常な 1.5 kb の、-/- では 0.9 kb のトランケートした mRNA が発現していることが分かった (図 3-2C)。そこで、このトランケートした mRNA が翻訳されているのかを調べるために、精巣と精子の protein blot 解析を行った。その結果、RNA レベルでは、トランケートした MCP が発現しているにもかかわらず、タンパク質レベルでは、全く発現していないことが確認された (図 3-2D)。そのため、タンパク質レベルでの MCP 欠損マウスが作製されていることが分かった。

3-3-3 精子上の MCP の発現局在

ほ乳類の一般的な受精のステップは、次のような順序で進行するとされている (ref

52)。1) まず初めに、精子は、卵細胞の外側にある透明帯 (zona pellucida) と結合する。2) 精子は、透明帯と結合し、先体反応を起こす。先体 (acrosome) は、精原細胞の細胞小器官由来の器官で、先体反応は、先体外膜と細胞膜との融合によって外側の膜が遊離し、先体内膜 (inner acrosome membrane) が露出する現象である。また、実験的にこの反応は、 Ca^{2+} イオノフォアによって誘導可能である。3) 先体反応を終えた精子は、透明帯を通過し、4) 卵細胞の細胞膜と結合、融合し、卵細胞を活性化させる (図 3-3)。

ヒトの MCP は、精子が受精を成功させるのに重要な役割をもつ先体部に発現局在が示される。そこで、マウス MCP が精子のどの部分に発現するのかを調べるために、免疫染色によって検討した。その結果、MCP は、先体全体に蛍光を発しているため、精子の先体の全域に発現していると考えられた (図 3-4A)。さらに詳細な発現局在は、FACS で解析した。その解析では、精子の細胞膜表面と先体内膜、さらに、精子全体の MCP タンパク質を調べた。その結果、精子の先体内膜が強く蛍光を発することが分かった。さらに、マウス MCP は、ヒト MCP とは異なり、精子の細胞膜表面上にも発現していることが分かった (図 3-4B)。また、MCP と同じ SCR タンパク質の DAF の発現局在は、ヒト DAF と同様の細胞膜表面に限られることも分かった (図 3-4B)。なお、MCP 欠損マウスは、どの解析においてもその発現が検出されなかった (図 3-4AB)。

3-3-4 F2 マウスの遺伝子型

F1 マウス同士を交配して得られる F2 マウスの遺伝子型は、野生 (+/+) : ヘテロ (+/-) : ホモ (-/-) = 26 : 58 : 28 (匹) とほぼメンデルの法則に従った。また、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。

3-3-5 MCP 欠損雄マウスの平均産仔数と受精率

MCP 欠損マウスの受精能力の検討を行った。まず初めに、それぞれの遺伝子型の雌雄の自然交配から平均産仔数をもとめた。その結果、MCP 欠損マウスからは、正常にその子が生まれ、精子で発現する MCP の欠損が原因では、不妊にならないことが分かった (表 3-1)。さらに、体外受精の結果からも、正常に精子が卵細胞に受精することが分かった (表 3-2)。しかし、雄の野生型マウスの平均産仔数、7.4、7.9 に対して、雄の MCP 欠損マウスの平均産仔数 8.2、9.0 と若干数ながら、MCP 欠損マウスのほうが多く出産される傾向があることが分かった。さらに、近交系マウスの C57BL/6N マウス、DBA/2N マウスの雌と交配させても、MCP 欠損マウスのほうが約 1 匹多く出産される同じ傾向を示した (図 3-5A)。さらに、過排卵させたマウスの

交配により得た受精卵から、受精率をもとめた。その結果、-/-は+/+よりも 10%程度の受精率が上昇していることが分かった (図 3-5B)。

3-3-6 MCP 欠損マウス精子への補体成分 C3 の沈着

精巣上の MCP の補体制御能を調べるために、精子に対するマウスの補体成分 C3 の沈着量を調べた。その結果、野生型マウスと比較すると MCP 欠損マウスは、先体反応後の精子で若干 C3 の沈着量が上昇するものの、顕著な差は認められなかった (図 3-6)。C3 の分解産物の沈着を考慮すると、MCP は、完全に補体制御分子として機能していないとは言い切れないが、補体制御に主要に働く分子ではないことが分かった。また、MCP の補体制御能が直接、受精率に関係しないことも分かった。

3-3-7 MCP 欠損マウス精子による先体反応の経時変化

受精率の違いをさらに詳細に調べるために、EGFP マウスの精子を用いた先体反応の速度の違いを調べた。この EGFP マウスの EGFP には、acrosin という先体部に局在するプロテアーゼのプロモーターとシグナルペプチドを融合させているため、その精子は、通常、先体部で蛍光を発している。この精子が、一度先体反応すると GFP は先体の外に分泌され先体部の蛍光が消失する (図 3-7)。この性質を利用して、より正確な先体反応の経時変化を調べるために、EGFP-MCP 欠損マウスを作製し、その解析を行った。

精子は、TYH という特殊な培地で飼うことで、自然に先体反応を起こす。精巣上体から得た精子を TYH 培地でインキュベーション後、15 分ごとに FACS によって先体反応した精子の割合 (%) をもとめた。その結果、有意に MCP 欠損マウスの方が先体反応しやすいことが分かった (図 3-8)。この結果から、MCP は、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。

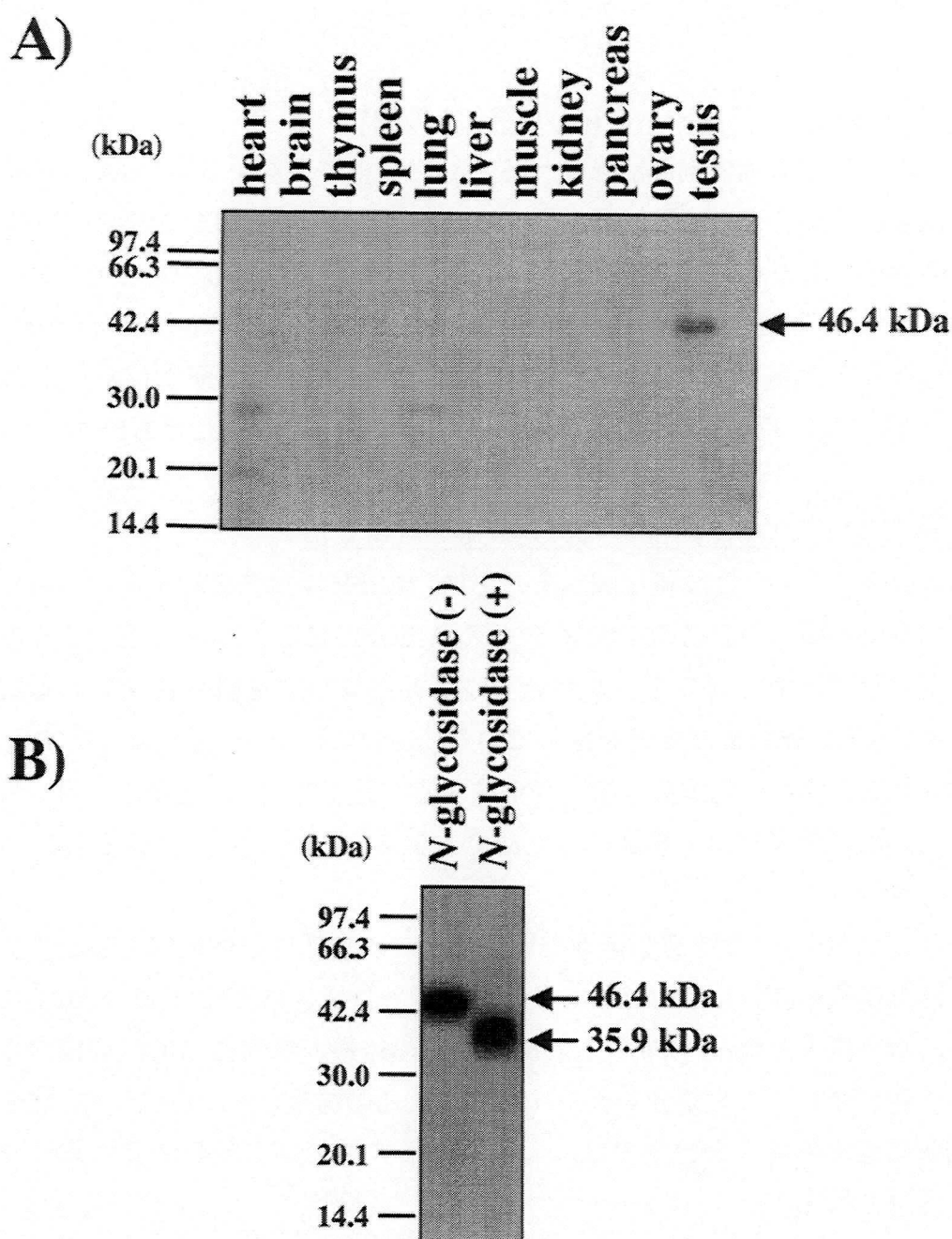


図3-1 マウスMCPの組織分布と糖鎖修飾

A マウスMCPの組織分布 様々なマウス組織を可溶化し、それぞれタンパク質量100 μ gずつを12.5% (w/v) アクリルアミドゲルを用いて、非還元下でSDS-PAGE、protein blot解析を行った。また、マウスMCPは、マウスMCPポリクローナル抗体を用いて検出した。

B マウスMCPの糖鎖修飾 精巣上体の精子を可溶化後、*N*-glycosidaseを用いて糖鎖を消化した。*N*-glycosidase未処理の精子可溶化物は、46.4 kDaの分子量を示すのに対して、処理したものは、35.9 kDaの分子量にシフトした。

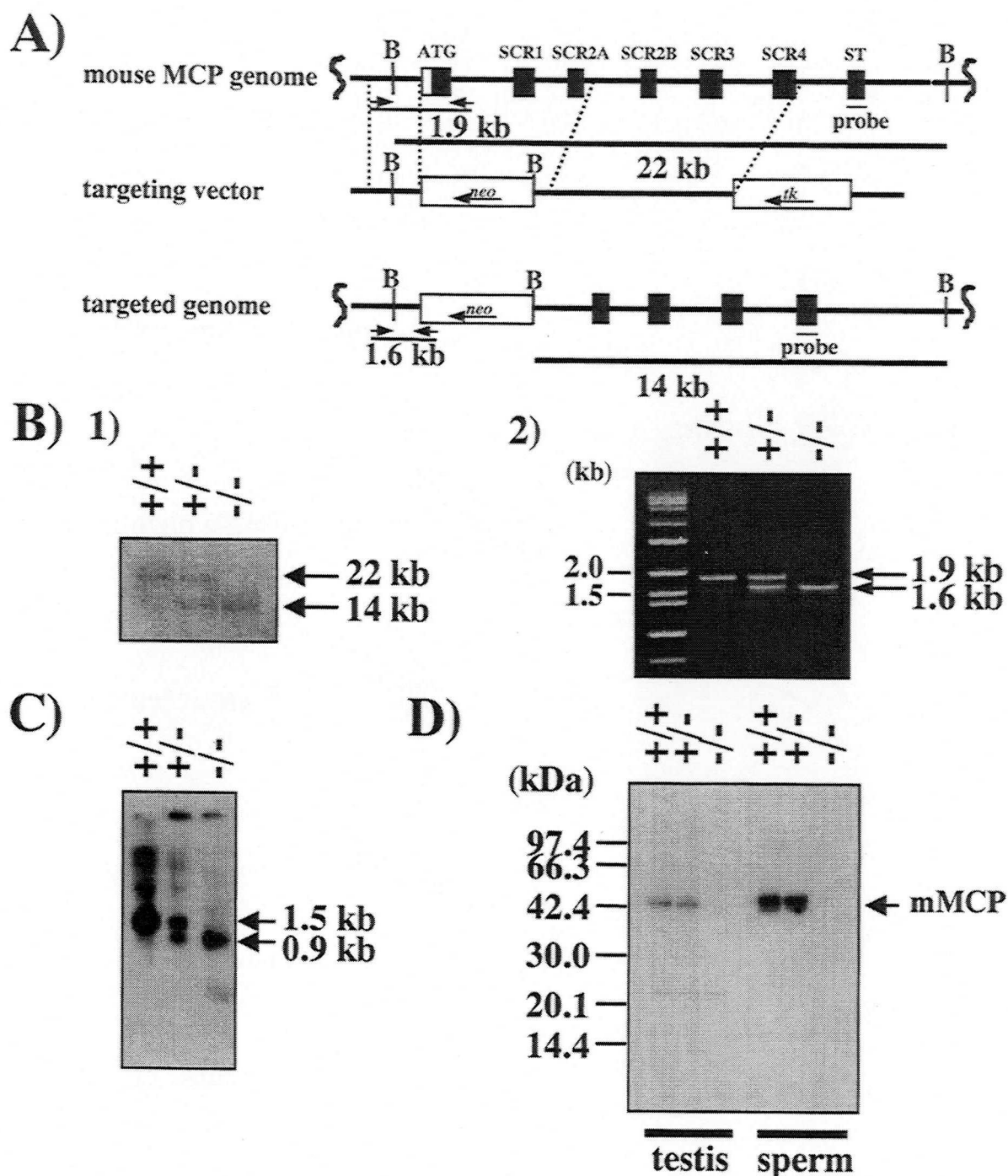


図3-2 MCP欠損マウスの作成とその確認

A MCP欠損マウスのターゲティングベクター マウスMCPのエキソン1-3をネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、MCP遺伝子を欠失させた。

B DNA blot 解析 マウス尾からゲノムDNAを抽出後、*Bam* HI (B) 消化したゲノムDNAを0.8% (w/v) アガロースゲルで分離した。DNAをナイロン膜に転写後、エキソン7 (ST) の塩基配列をプローブとして、DNA blot解析を行った (1)。また、5'側の配列の確認は、図に示されたプライマーを用いてPCRを行った (2)。

C RNA blot 解析 各遺伝子型のマウスの精巣からtotal RNAを抽出し (20 μ g)、MCPの全長のcDNAをプローブに用いて、RNA blot解析を行った。

D Protein blot 解析 各遺伝子型の精巣、精子のタンパク質を可溶化し、各タンパク質を100 μ gずつ非還元条件下、12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルのSDS-PAGEで分離した。PVDF膜に転写後、マウスMCPポリクローナル抗体でMCPを検出した。

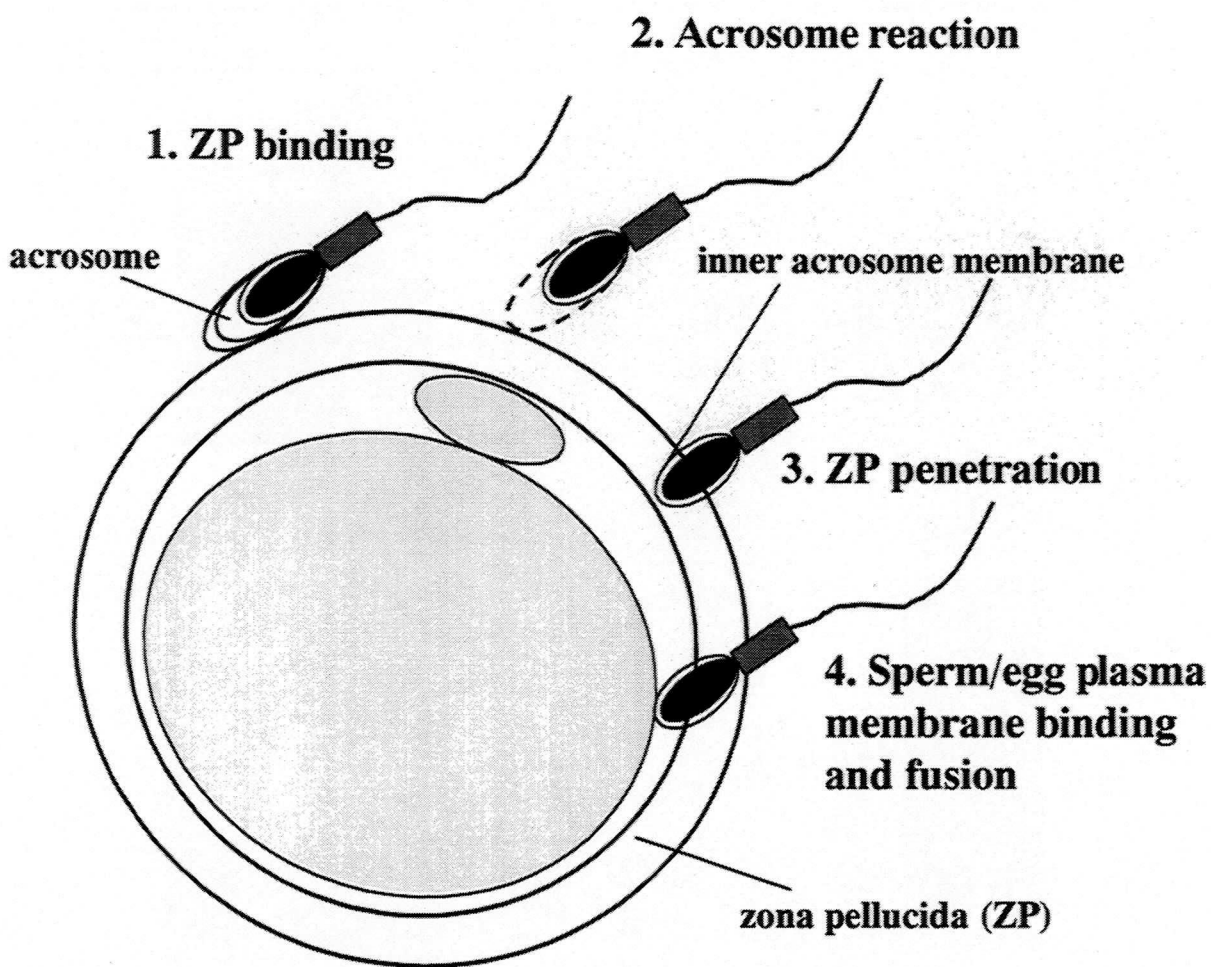
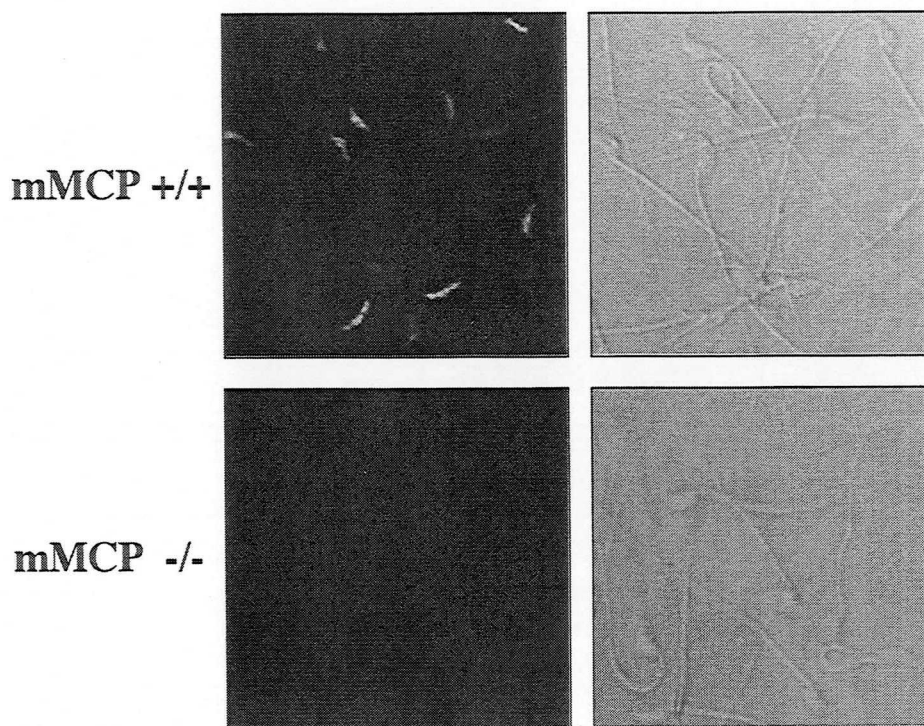


図3-3 一般的なほ乳類の受精のステップ 1. 精子の透明帯への結合 精子が透明帯と結合すると、先体反応と呼ばれる反応が起きる。2. 先体反応 先体 (acrosome) は、精原細胞の細胞小器官由来の器官で、先体反応は先体外膜と細胞膜との融合によって外側の膜が遊離し、先体内膜 (inner acrosome membrane) が露出する現象。3. 透明帯への貫入 4. 卵細胞と精子の結合、融合 このステップを終えると卵細胞の活性化が起き、受精が完了する。

A)



B)

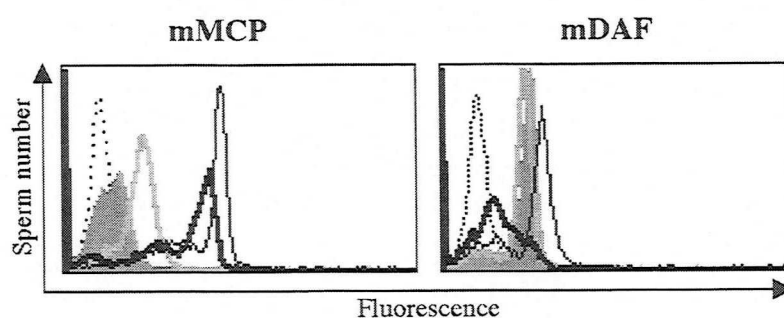


図3-4 MCPの精子での発現局在

A 精子の免疫染色 マウスMCPポリクローナル抗体を用いて、精子の免疫染色を行った。

B FACSによるMCP、DAFの発現局在解析 さらに詳細な発現局在を調べるために、FACSによる解析を行った。その解析では、精子の細胞膜表面 (薄線)、先体内膜 (太線)、精子全量のMCPまたは、DAFタンパク質 (細線) について調べた。また、コントロールIgGを点線、MCP欠損マウスの精子における全量のMCPを中塗りで示した。

表3-1 各遺伝子型の自然交配産仔数

Male genotype	Female genotype MCP -/-		MCP +/+	
	No. of mating	Litter size	No. of mating	Litter size
MCP -/-	20	8.2±2.1	21	9.0±2.4
MCP +/+	10	7.4±1.3	16	7.9±1.8

表3-2 体外受精

Male genotype	Cumulus free egg		Zona free egg	
	No. of eggs examined	No. of sperm bound/egg	No. of eggs examined	No. of sperm bound/egg
MCP -/-	30	5.7±3.0	23	29.4±11.0
MCP +/+	30	5.6±3.4	25	25.4±13.6

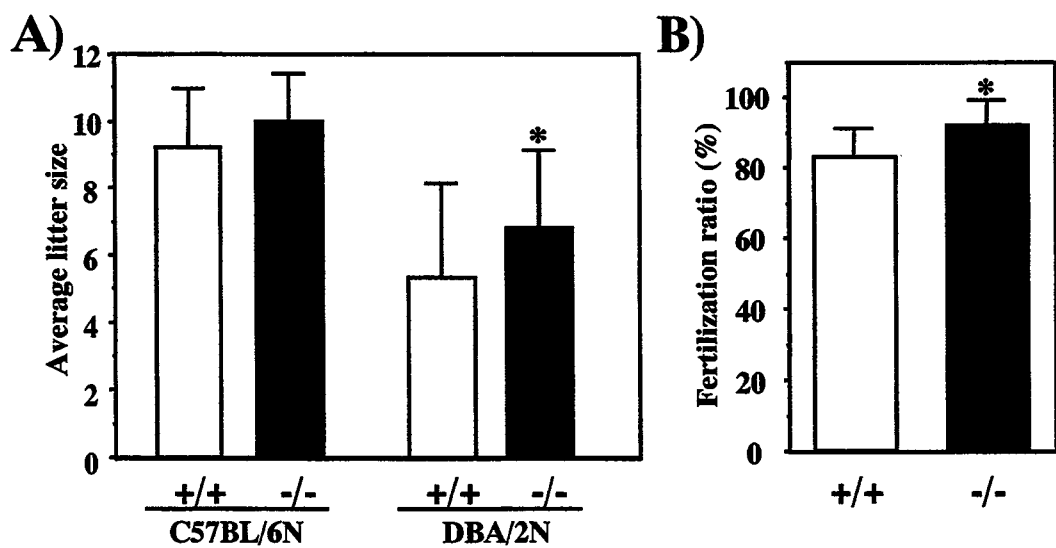


図3-5 MCP欠損雄マウスと近交系雌マウスとの自然交配と輸卵管内での受精率
A 近交系マウスとの自然交配 近交系雌マウス、C57BL/6N、DBA/2Nとの交配から一腹ごとの平均産仔数をもとめた。C57BL/6Nは、14例、DBA/2Nは、32例のデータを示した。また、asteriskは、有意差を示している ($P < 0.03$)。
B 輸卵管内での受精率 PMS、hCGを用いて過排卵させたマウスと交配させ、卵管膨大部にある受精卵の数から受精率をもとめた。10例のデータを示した。また、asteriskは、有意差を示している ($p < 0.02$)。

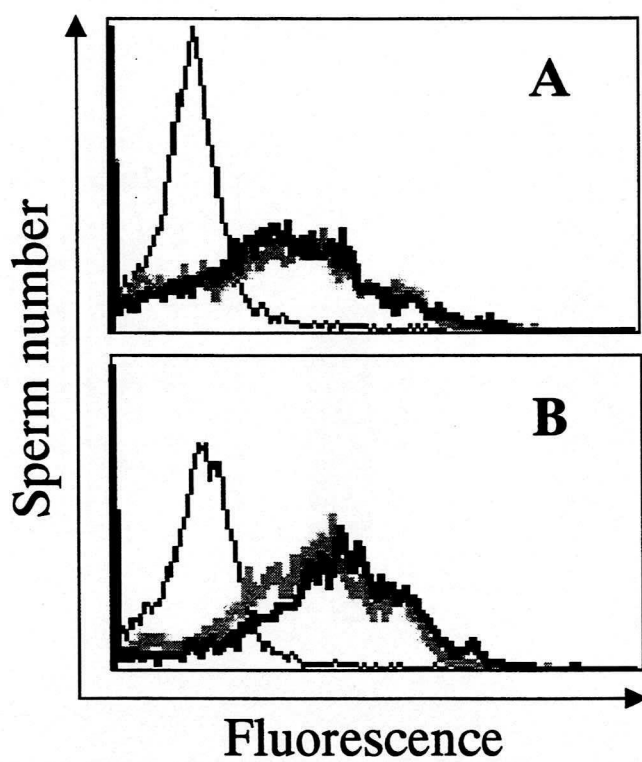
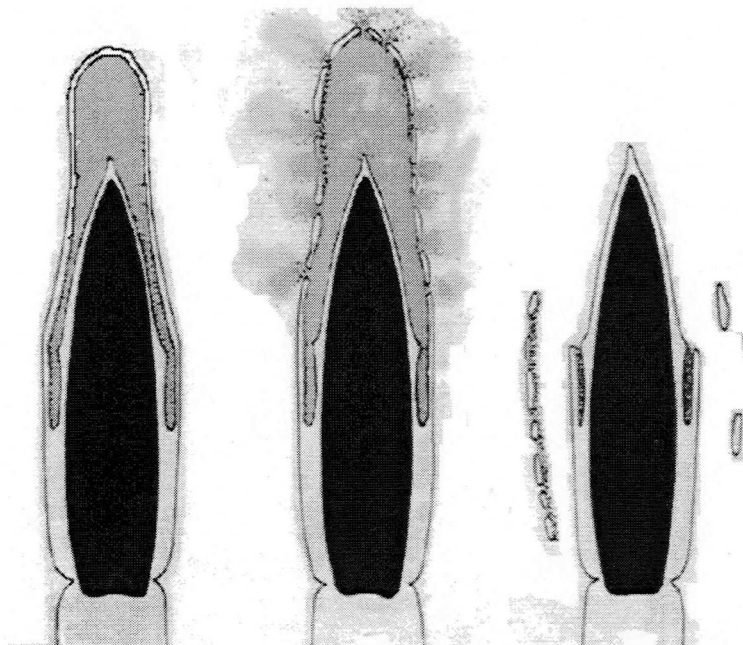


図3-6 MCP欠損マウス精子の補体因子C3の沈着
野生型マウス (薄線) とMCP欠損マウス (濃線) の精子における、補体因子C3の沈着量をFACSで調べた。また、先体反応前の精子 (A) と先体反応後の精子 (B) について検討した。

A)



B)

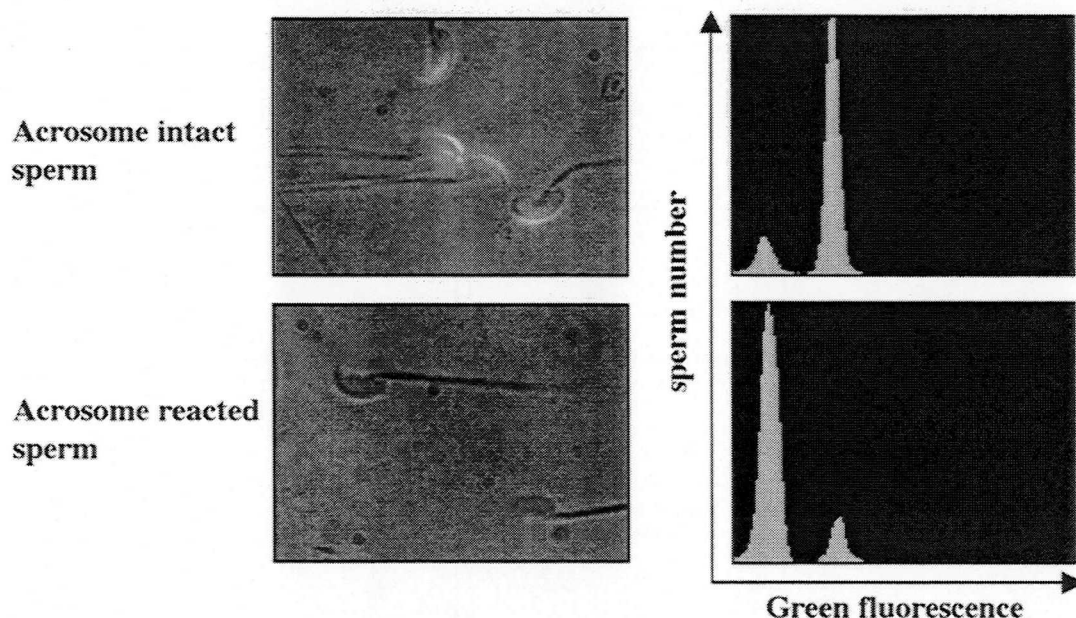
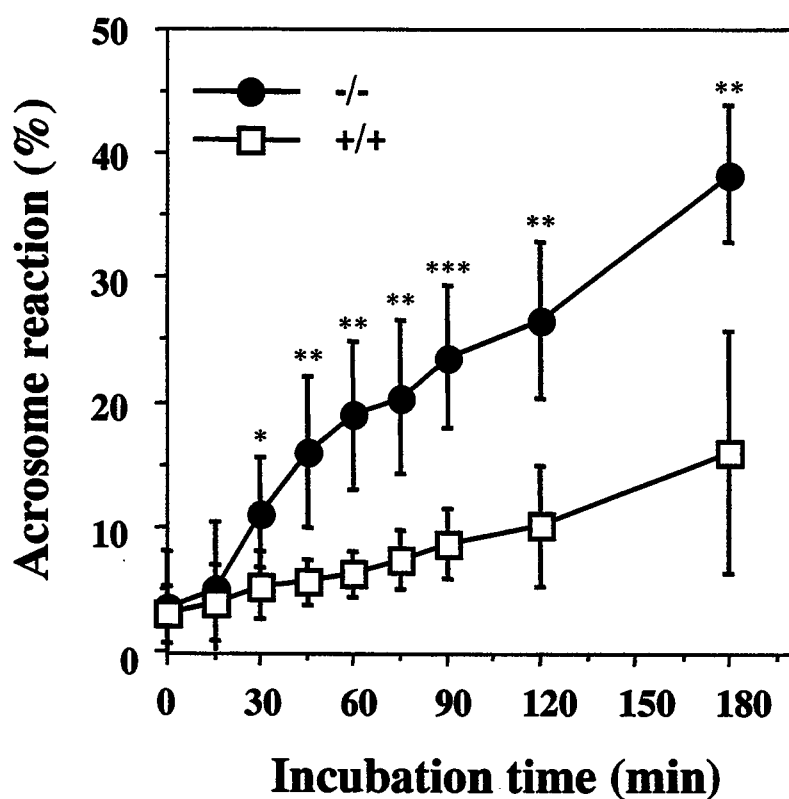


図3-7 EGFPマウスを用いた先体反応の解析

A EGFPマウスの先体反応 EGFPマウスのEGFPには、acrosinという先体部に局在するプロテアーゼのプロモーターとシグナルペプチドを融合させているため、その精子は通常、先体部で蛍光を発している。この精子が、一度先体反応するとEGFPは先体の外側に分泌され先体部の蛍光が消失する。

B EGFPマウスの先体反応前後の精子 EGFPマウスの精子は、図に示すようにEGFPが先体部で発現する。また、FACSでは、先体反応前の精子は、EGFPの蛍光を発するピークで検出され、先体反応後の精子は、蛍光が消失したピークで検出される。この性質を利用して、より正確な先体反応の経時的変化を調べることができる。

A)



B)

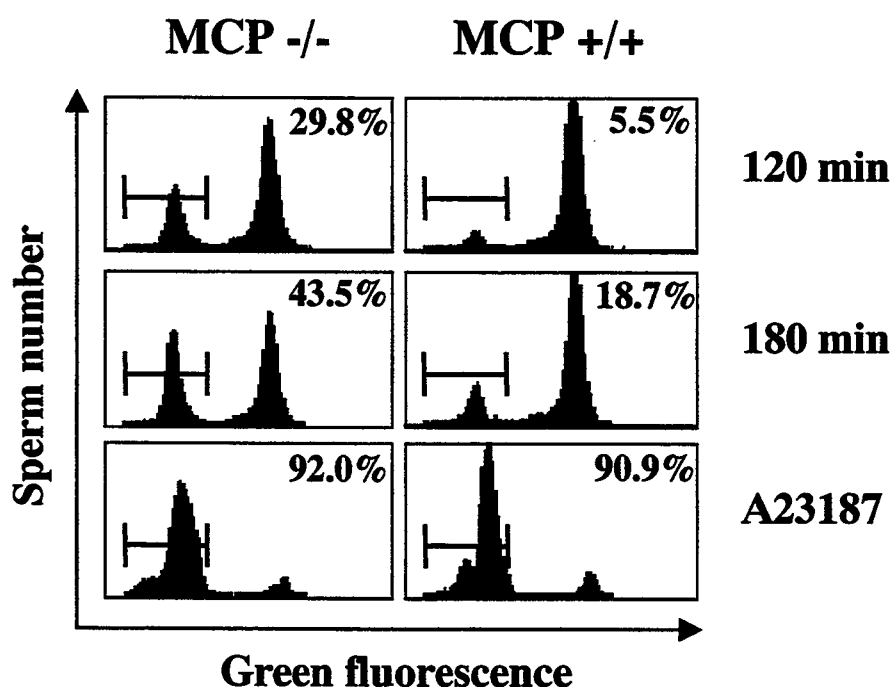


図3-8 MCP欠損雄マウスの精子による先体反応の経間的変化

精巢上体から得た精子をTYHで培養後、15分間ごとにFACSによってその蛍光を解析し、Bのように全体の精子数のうち左側のピーク占有率から、先体反応した精子の割合(%)をもとめた(A)。A23187は、 Ca^{2+} イオノフォアを加えて、完全に先体反応を起こしている精子を示した。また、* $P < 0.03$ 、** $P < 0.006$ 、*** $P < 0.001$ はそれぞれ有意差を示した。

3-4 考察

本章の結果から、マウス MCP は、mRNA、タンパク質の両方で精巣特異的に発現し、精子で発現する MCP は、N-結合型糖鎖修飾のタンパク質で、主に先体内膜に発現が局在することが明らかとなった。この性質は、ヒトの精巣特異的な MCP の性質と類似し、マウス MCP を解析することにより、ヒトの精巣型 MCP の機能を予測しうると考えられる。

ヒトの MCP は、C3b、C4b に結合し、Factor I のコファクターとして補体を制御する分子として知られているが、その他、麻疹、ヒトヘルペスタイプ 6 両ウイルスのレセプターであることも知られている (ref 53-54)。また、精巣型ヒト MCP の機能は、2つのグループによって精子と卵細胞の結合、融合に関与する分子であることが予測された (ref 19, 46)。2つのグループのうち Anderson, D. J.らは、卵細胞の細胞膜表面上に補体レセプター CR1 および CR3 が発現し、C3b ダイマーをヒトの卵細胞と培養することで C3b が卵細胞膜に付着すること、同様に、精子においても C3b ダイマーが先体に付着し、さらに抗ヒト C3 抗体または、抗ヒト MCP 抗体を精子に処理すると、精子と卵細胞の結合、融合が同程度阻害されることから、精子上の MCP と卵細胞上の補体レセプターが C3b ダイマーを介して結合することを予測した。

しかし、CR1、CR3、C3 各欠損マウスは、受精可能であり (ref 35, 55, 56)、今回作製した MCP 欠損雄マウスもまた、受精可能である。このことから、これらの分子の卵細胞、精子の相互作用の関与は、上記のような仮説だけでは説明できない。さらに、他の SCR タンパク質、GPI 型 DAF、Crry の欠損マウスも、受精に関しては何ら異常は見いだされていない (ref 20, 57)。これら、補体制御タンパク質は、体細胞中に数種類存在し、共同して補体の制御を行っている (ref 58)。そのため、それぞれのタンパク質 1 つのみの欠損では、補体制御や受精のステップでの機能を他の SCR タンパク質が補う可能性がある。そのため、これらのタンパク質の精子上での役割を調べるためには、機能補佐を起こさない実験系が必要であると考えられる。MCP や DAF などの補体制御分子が、両方存在しない時の精子を解析することや、生体内で、C3 が全く存在しない状態でさらに MCP、DAF のような補体制御分子が欠損した時の受精状態を解析することが望まれる。

本研究の結果から、マウス MCP は、先体反応を負に制御している分子と考えられた。この現象を精子におけるヒト MCP の解析結果と比較すると、ヒトとマウスの MCP は、その機能に矛盾が生じる。しかし、ヒトの精子をヒト MCP 抗体で処理した時、精子と卵細胞との結合、融合を有意に阻害するという現象は、ヒトの MCP に抗体が結合することで、ヒト MCP を介した先体反応の負のシグナルが入り、先体反応をし

ている精子が減少し、結果的に、卵細胞と精子の結合、融合が阻害されるとも考えられ、ヒト MCP においてマウス MCP と同様の機能が保存されていることが推測できる。このことを証明するためには、精子をヒト MCP 抗体で処理した時の先体反応を起こした精子の割合を調べる必要があると考えられる。

また、ヒトとマウスでは、受精に用いられる分子が異なる。マウスにおいて ADAM (A disintegrin and a metalloprotease) ファミリーの fertilin (ADAM1、2 のヘテロダイマー) と cyritestin (ADAM3) は、卵細胞と精子の相互作用に重要な分子である (ref 59-61)。しかし、ヒトにおいて、それら分子のうち ADAM1、ADAM3 は、pseudogene であり (ref 62-63)、卵細胞と精子の相互作用に必要とされない分子である。今回解析したマウス MCP は、ヒト MCP とは異なり、受精に直接影響する分子ではないことが明らかになった。このことから、マウスの MCP の機能は、種間の違いにより、ヒトの MCP とは異なる機能を保持する可能性も考えられる。

精子の先体反応は、受精を完成するうえで非常に重要なステップの 1 つである。これまで、先体反応に関わる分子は、多数報告されている。その中でも、最近報告された、PLC (Phospholipase C) $\delta 4$ 欠損雄マウスは、透明帯との結合で先体反応が誘導されないことで、不妊になることが示された (ref 64)。このことから、精子の先体反応は、イノシトール 1, 4, 5-トリスリン酸 (IP_3) のシグナル伝達を介した Ca^{2+} の流入が必要であると考えられる。さらに、セリンプロテアーゼである acrosin 欠損雄マウスは、従来予測されていた、卵透明帯を構成する糖タンパク質の限定分解に問題がなく、有意に先体反応の遅延が認められた (ref 65)。本研究で示された、MCP 欠損雄マウスは、補体の制御ではなく、野生マウスに比べ先体反応が有意に早くなり、その受精率、産仔数にもこの現象が反映する。しかし、acrosin、MCP とともに、その現象から先体反応の制御に関わる分子であることが示唆されるが、さらに詳細な分子間での役割は知られていない。もし、細密な分子間の関係を明らかにすることができれば、先体反応の分子機構の解明に近づく結果になると考えられる。

今回、筆者は、マウスの MCP が、先体反応を制御する分子であることを明らかにした。マウスの補体制御分子は、MCP 以外にも精巣または、精巣上体に非常に多く発現している。しかし、これら分子の発現意義は、はっきりとは知られていない。そのため、それらの分子 (細胞膜貫通型 DAF、C4bp、sp56、CD59b) の機能解析と欠損マウスの作製が期待され、また、これらの分子の様々な組み合わせでの欠損マウスや抗体による機能阻害によりさらに重要な機能が明らかになると考えられる。

<結論>

- 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、C4bp α 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。
- 6) MCP の遺伝子を欠失させたマウスを作製した。
- 7) マウスの MCP は、精巢特異的に発現し、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、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。

<総括>

本研究では、マウス、ニワトリ、ヤツメウナギの補体制御分子について解析し、いくつかの新しい知見を得ることができた。補体制御分子は、今回解析した、獲得免疫を持たない動物種であるヤツメウナギのような下等な動物種から、ヒトに至るまで幅広い動物種で保存されていることが明らかになった。ヒトの SCR 型補体制御分子の遺伝子は、染色体 1q32 に位置し、RCA と呼ばれる遺伝子集落を形成することが知られている (ref 1-2)。これら SCR タンパク質は、分子の保持する個々の SCR ドメインの相同性から解析した分子系統樹により、さらに 2 つのグループに分けることができる (図 5A) (ref 66)。1 つ (Group 1) は、Factor H や Factor H-related protein のグループである。このグループには、サンドバスの SBP1 も含まれる。もう 1 つ (Group 2) は、C4bp α 、CR1、MCP、DAF が含まれるグループである。このグループには、今回単離したニワトリの Cremp、ヤツメウナギの laSCRp も含まれると考えられる (図 5B)。Group 1 と Group 2 は、染色体上でも 7 Mb も離れており、別々の祖先分子に由来すると考えられる。Group 1 は、*C. elegans* において、Factor H の類似分子 (F36H2.3) が遺伝子レベルで単離されており (補体制御能があるのかは不明) (ref 67)、このグループの分子は、進化的に古い分子であることが推測できる。一方、Group 2 では、現在まで祖先分子に相当するものが単離されていない。しかし、本研究で単離した Cremp や laSCRp は、Group 2 で高く保存されている補体制御に必須な SCR ドメインを保持しており、現在までに報告されている下等動物の補体制御タンパク質で、最も進化的に古い動物種であることから、既知のほ乳類の SCR タンパク質よりも祖先分子に近い分子であることが考えられる。特に、laSCRp の SCR ドメインは、部分的に両グループの機能ドメインが高く保存されていることから、両グループ共通のプロトタイプに近い分子と考えられる。両グループに共通に保存されている laSCRp の保持する SCR ドメインにより、Group 1 は、laSCRp の SCR5 様のものから、Group 2 は、SCR2-3 もしくは、SCR6-7 様のものから派生して現在のような機能分子が形成されたと推測される。このように、Cremp、laSCRp の単離と機能解析の結果から、SCR タンパク質のプロトタイプ分子を探索することが可能であり、この結果は、ヒトを含めて現存する SCR タンパク質の補体制御に最も重要な SCR ドメインを明らかにすると共に、今まで不明であった下等生物の免疫系の一端を解明する結果である。

ほ乳類のヒトとマウスでは、補体制御分子は補体の制御以外に機能していることが多数報告されている。本研究では、マウスの MCP が、補体制御分子でありながら、受精のステップの先体反応で機能する分子であることを明らかにした。マウスでは、

ヒトとほぼ同様の種類の補体制御分子が発現しているが、それらの発現分布は極端に精巣に集中している。これは、進化の過程の中で、精巣で発現する分子が補体の制御分子として利用されたのか、補体制御分子が進化上のある地点で受精に利用されたのかは不明であり、興味深い問題である。ほ乳類よりも下等な動物で単離されたニワトリの Cremp は、ヒトの MCP 同様に全身に発現している。このことから、少なくとも鳥類の Cremp は、補体制御を主要な働きとする分子のようである。しかし、精巣型 Cremp や Cremp 以外の精巣特異的な補体制御分子が存在し、MCP と同様の機能を保持している可能性も考えられる。これらは、受精のモデル動物として利用される、ウニやホヤにおいて、細胞膜結合型補体制御分子の存在と機能を解析することにより明らかになる可能性がある。

また、SCR タンパク質の受精での役割を調べるためには、人為的に遺伝子欠損動物を作製できるマウスを用いて、MCP 以外の SCR タンパク質の遺伝子欠損動物を作製し、精子上の SCR タンパク質の機能を解析することが必要と考えられる。本研究で解析した、マウス MCP の機能は、今までの推測とは反した結果になったが、精子の MCP 本来の機能の発見に至る結果となった。このことにより、本研究では、SCR タンパク質の新しい機能を見出し、受精の生理現象の一端を解明することができたと考えられる。

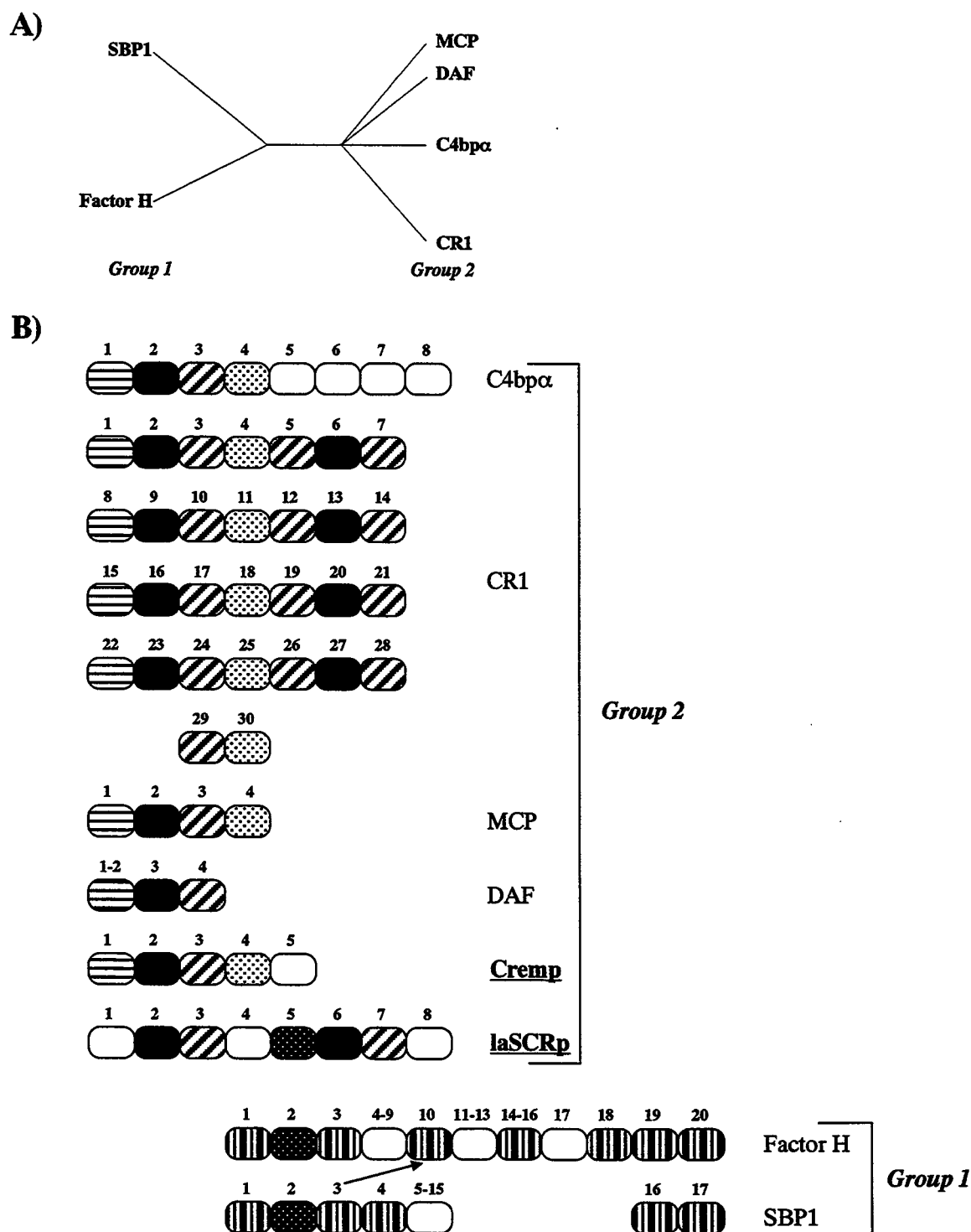


図5 分子系統樹と類似するSCRドメイン

A 分子系統樹 既知のSCRタンパク質のneighbor-joining treeを作製した (ref 66)。

B 類似するSCRドメイン 個々のSCRドメインの相同性から、類似するものを同じ模様で示した。黒塗り (■)、白点 (■) は、2つのエキソンから成り、機能的に必須なドメインを示した。Crempは、エキソン-イントロン構造からこのドメインが、2つのエキソンから成ることが分かっている (データには示さない)。laSCRpは、2つのエキソンから成るのかは、現在のところ不明である。なお、SBP1、Cremp、laSCRp以外の分子は、ヒトに由来する分子の結果を示した。

<謝辞>

本研究を遂行するにあたり、終始適切な御指導、御助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学専攻、西澤恭子教授に深く感謝致します。

終始適切な御助言、御討論を賜りました、大阪府立成人病センター研究所、瀬谷司博士、松本美佐子博士、大阪大学遺伝情報実験施設、岡部勝博士に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験材料を御供与下さいました、京都大学、武田俊一教授、東京理科大学、後飯塚僚教授、東京大学、野中勝教授、名古屋大学、岡田秀親教授に深く感謝致します。

本論文を審査していただきました、本研究科、八木清仁教授、前田正知教授に深く感謝致します。

本研究は、大阪府立成人病センター研究所、病理学部門、免疫学部門、および大阪大学遺伝情報実験施設の諸先生方や研究員の皆さん、同期を含めた学生の皆さんの御協力、御支援なしでは成り立たず、多方面で私を支えてくれた方々へ深く感謝致します。

最後に、21 年間の長期の学生生活を経済面、精神面で常に支えてくれた家族に言葉では言い表せないほど心から感謝致します。

2002 年 3 月 井上直和

<参考文献>

- 1 Carroll, M. C., Alicot, E. M., Katzman, P. J., Klickstein, L. B., Smith, J. A. and Fearon, D. T. 1988. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. *J. Exp. Med.* 167:1271-80.
- 2 Liszewski, M. K., Post, T. W. and Atkinson, J. P. 1991. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* 9:431-55.
- 3 Sunyer, J. O., Zarkadis, I. K. and Lambris, J. D. 1998. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol. Today.* 19:519-23.
- 4 Al-Sharif, W. Z., Sunyer, J. O., Lambris, J. D. and Smith, L. C. 1998. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. *J. Immunol.* 160:2983-97.
- 5 Nonaka, M., Azumi, K., Ji, X., Namikawa-Yamada, C., Sasaki, M., Saiga, H., Dodds, A. W., Sekine, H., Homma, M. K., Matsushita, M., Endo, Y. and Fujita, T. 1999. Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Immunol.* 162:387-91.
- 6 Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M. and Hoffmann, J. A. 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:11427-32.
- 7 Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M. and Kafatos, F. C. 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell.* 104:709-18.
- 8 Ji, X., Azumi, K., Sasaki, M. and Nonaka, M. 1997. Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:6340-5.
- 9 Kim, Y. U., Kinoshita, T., Molina, H., Hourcade, D., Seya, T., Wagner, L. M. and Holers, V. M. 1995. Mouse complement regulatory protein Crry/p65 uses the specific mechanisms of both human decay-accelerating factor and membrane cofactor protein. *J. Exp. Med.* 181:151-9.
- 10 Kaidoh, T. and Gigli, I. 1989. Phylogeny of regulatory proteins of the complement system. Isolation and characterization of a C4b/C3b inhibitor and a cofactor from sand bass

- plasma. *J. Immunol.* 142:1605-13.
- 11 Dahmen, A., Kaidoh, T., Zipfel, P. F. and Gigli, I. 1994. Cloning and characterization of a cDNA representing a putative complement-regulatory plasma protein from barred sand bass (*Parablax neblifer*). *Biochem. J.* 301 (Pt 2):391-7.
 - 12 Kemper, C., Zipfel, P. F. and Gigli, I. 1998. The complement cofactor protein (SBP1) from the barred sand bass (*Paralabrax nebulifer*) mediates overlapping regulatory activities of both human C4b binding protein and factor H. *J. Biol. Chem.* 273:19398-404.
 - 13 Simpson, K. L. and Holmes, C. H. 1994. Differential expression of complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. *Immunology.* 81:452-61.
 - 14 Spicer, A. P., Seldin, M. F. and Gendler, S. J. 1995. Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse decay-accelerating factor genes. Duplicated genes encode glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms. *J Immunol.* 155:3079-91.
 - 15 Bookbinder, L. H., Cheng, A. and Bleil, J. D. 1995. Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science.* 269:86-9.
 - 16 Tsujimura, A., Shida, K., Kitamura, M., Nomura, M., Takeda, J., Tanaka, H., Matsumoto, M., Matsumiya, K., Okuyama, A., Nishimune, Y., Okabe, M. and Seya, T. 1998. Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem. J.* 330:163-8.
 - 17 Qian, Y. M., Qin, X., Miwa, T., Sun, X., Halperin, J. A. and Song, W. C. 2000. Identification and functional characterization of a new gene encoding the mouse terminal complement inhibitor CD59. *J. Immunol.* 165:2528-34.
 - 18 Nonaka, M., Wang, G., Mori, T., Okada, H. and Nonaka, M. 2001. Novel androgen-dependent promoters direct expression of the C4b-binding protein alpha-chain gene in epididymis. *J. Immunol.* 166:4570-7.
 - 19 Okabe, M., Nagira, M., Kawai, Y., Matzno, S., Mimura, T. and Mayumi, T. 1990. A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. *Fertil. Steril.* 54:1121-6.
 - 20 Xu, C., Mao, D., Holers, V. M., Palanca, B., Cheng, A. M. and Molina, H. 2000. A critical role for murine complement regulator *crpy* in fetomaternal tolerance. *Science.* 287:498-501.
 - 21 Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* 108:193-9.

- 22 Iwata, K., Seya, T., Yanagi, Y., Pesando, J. M., Johnson, P. M., Okabe, M., Ueda, S., Ariga, H. and Nagasawa, S. 1995. Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46. *J. Biol. Chem.* 270:15148-52.
- 23 Brodbeck, W. G., Mold, C., Atkinson, J. P. and Medof, M. E. 1996. Localization of classical and alternative pathway regulatory activity within the decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 156:2528-33.
- 24 The MHC sequencing consortium. 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature.* 401:921-3.
- 25 Kaufman, J., Milne, S., Gobel, T. W., Walker, B. A., Jacob, J. P., Auffray, C., Zoorob, R. and Beck, S. 1999. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature.* 401:923-5.
- 26 Kjalke, M., Welinder, K. G. and Koch, C. 1993. Structural analysis of chicken factor B-like protease and comparison with mammalian complement proteins factor B and C2. *J. Immunol.* 151:4147-52.
- 27 Nonaka, M., Takahashi, M. and Sasaki, M. 1994. Molecular cloning of a lamprey homologue of the mammalian MHC class III gene, complement factor B. *J. Immunol.* 152:2263-9.
- 28 Nakao, M., Fushitani, Y., Fujiki, K., Nonaka, M. and Yano, T. 1998. Two diverged complement factor B/C2-like cDNA sequences from a teleost, the common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol.* 161:4811-8.
- 29 Mavroidis, M., Sunyer, J. O. and Lambris, J. D. 1995. Isolation, primary structure, and evolution of the third component of chicken complement and evidence for a new member of the alpha 2-macroglobulin family. *J. Immunol.* 154:2164-74.
- 30 Koch, C., Josephsen, J., Nicolaisen, E. M. and Simonsen, M. 1982. Complement mediated lysis in chickens. *Dev. Comp. Immunol.* 6:141-9.
- 31 Ohta, H., Yoshikawa, Y., Kai, C., Yamanouchi, K. and Okada, H. 1984. Lysis of horse red blood cells mediated by antibody-independent activation of the alternative pathway of chicken complement. *Immunology.* 52:437-44.
- 32 Fearon, D. T. 1984. Cellular receptors for fragments of the third component of complement. *Immunol. Today.* 5. 105-10.
- 33 Hebell, T., Ahearn, J. M. and Fearon, D. T. 1991. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science.* 254:102-5.
- 34 Fearon, D. T. and Carter, R. H. 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B

- lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:127-49.
- 35 Molina, H., Holers, V. M., Li, B., Fung, Y., Mariathasan, S., Goellner, J., Strauss-Schoenberger, J., Karr, R. W. and Chaplin, D. D. 1996. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93:3357-61.
 - 36 Fernandez-Centeno, E., de Ojeda, G., Rojo, J. M. and Portoles, P. 2000. Crry/p65, a membrane complement regulatory protein, has costimulatory properties on mouse T cells. *J. Immunol.* 164:4533-42.
 - 37 Astier, A., Trescol-Biemont, M. C., Azocar, O., Lamouille, B. and Rabourdin-Combe, C. 2000. CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J. Immunol.* 164:6091-5.
 - 38 Inoue, N., Fukui, A., Nomura, M., Matsumoto, M., Nishizawa, Y., Toyoshima, K. and Seya, T. 2001. A novel chicken membrane-associated complement regulatory protein: molecular cloning and functional characterization. *J. Immunol.* 166:424-31.
 - 39 Nonaka, M., Fujii, T., Kaidoh, T., Natsuume-Sakai, S., Nonaka, M., Yamaguchi, N. and Takahashi, M. 1984 Purification of a lamprey complement protein homologous to the third component of the mammalian complement system. *J. Immunol.* 133:3242-9.
 - 40 Nonaka, M. and Takahashi, M. 1992. Complete complementary DNA sequence of the third component of complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing proteins. *J. Immunol.* 148:3290-5.
 - 41 Endo, Y., Takahashi, M., Nakao, M., Saiga, H., Sekine, H., Matsushita, M., Nonaka, M. and Fujita, T. 1998. Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates. *J. Immunol.* 161:4924-30.
 - 42 Alexander, J. J., Hack, B. K., Cunningham, P. N. and Quigg, R. J. 2001. A protein with characteristics of factor H is present on rodent platelets and functions as the immune adherence receptor. *J. Biol. Chem.* 276:32129-35.
 - 43 Kaidoh, T. and Gigli, I. 1987. Phylogeny of C4b-C3b cleaving activity: similar fragmentation patterns of human C4b and C3b produced by lower animals. *J. Immunol.* 139:194-201.
 - 44 Post, T. W., Liszewski, M. K., Adams, E. M., Tedja, I., Miller, E. A. and Atkinson, J. P. 1991. Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J. Exp. Med.* 174:93-102.
 - 45 Shida, K., Nomura, M., Matsumoto, M., Suzuki, Y., Toyoshima, K. and Seya, T. 1999.

- The 3'-UT of the ubiquitous mRNA of human CD46 confers selective suppression of protein production in murine cells. *Eur. J. Immunol.* 29:3603-8.
- 46 Anderson, D. J., Abbott, A. F. and Jack, R. M. 1993. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90:10051-5.
 - 47 Ohta, R., Imai, M., Fukuoka, Y., Miwa, T., Okada, N. and Okada, H. 1999. Characterization of mouse DAF on transfectant cells using monoclonal antibodies which recognize different epitopes. *Microbiol. Immunol.* 43:1045-56.
 - 48 Okabe, M., Adachi, T., Takada, K., Oda, H., Yagasaki, M., Kohama, Y. and Mimura, T. 1987. Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. *J. Reprod. Immunol.* 11:91-100.
 - 49 Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Parvinen, M., Baba, T., Nishimune, Y. and Okabe, M. 1999. Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS. Lett.* 449:277-83.
 - 50 Hara, T., Suzuki, Y., Nakazawa, T., Nishimura, H., Nagasawa, S., Nishiguchi, M., Matsumoto, M., Hatanaka, M., Kitamura, M. and Seya, T. 1998. Post-translational modification and intracellular localization of a splice product of CD46 cloned from human testis: role of the intracellular domains in O-glycosylation. *Immunology.* 93:546-55.
 - 51 Nomura, M., Tsujimura, A., Shida, K., Matsumoto, M., Matsuda, Y., Toyoshima, K. and Seya, T. 1999. Membrane and secretory forms of mouse membrane cofactor protein (CD46) generated from a single gene through alternative splicing. *Immunogenetics.* 50:245-54.
 - 52 Snell, W. J. and White, J. M. 1996. The molecules of mammalian fertilization. *Cell.* 85:629-37.
 - 53 Dorig, R. E., Marcil, A., Chopra, A. and Richardson, C. D. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 75:295-305.
 - 54 Santoro, F., Kennedy, P. E., Locatelli, G., Malnati, M. S., Berger, E. A. and Lusso, P. 1999. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell.* 99:817-27.
 - 55 Wessels, M. R., Butko, P., Ma, M., Warren, H. B., Lage, A. L. and Carroll, M. C. 1995. Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:11490-4.
 - 56 Lu, H., Smith, C. W., Perrard, J., Bullard, D., Tang, L., Shappell, S. B., Entman, M. L., Beaudet, A. L. and Ballantyne, C. M. 1997. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil

- emigration in Mac-1-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 99:1340-50.
- 57 Sun, X., Funk, C. D., Deng, C., Sahu, A., Lambris, J. D. and Song, W. C. 1999. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:628-33.
 - 58 Brodbeck, W. G., Mold, C., Atkinson, J. P. and Medof, M. E. 2000. Cooperation between decay-accelerating factor and membrane cofactor protein in protecting cells from autologous complement attack. *J. Immunol.* 165:3999-4006.
 - 59 Cho, C., Bunch, D. O., Faure, J. E., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P. and Myles, D. G. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science.* 281:1857-9.
 - 60 Shamsadin, R., Adham, I. M., Nayernia, K., Heinlein, U. A., Oberwinkler, H. and Engel, W. 1999. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol. Reprod.* 61:1445-51.
 - 61 Nishimura, H., Cho, C., Branciforte, D. R., Myles, D. G. and Primakoff, P. 2001. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev. Biol.* 233:204-13.
 - 62 Jury, J. A., Frayne, J. and Hall, L. 1997. The human fertilin alpha gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochem. J.* 321 (Pt 3):577-81.
 - 63 Grzmil, P., Kim, Y., Shamsadin, R., Neesen, J., Adham, I. M., Heinlein, U. A., Schwarzer, U. J. and Engel, W. 2001. Human cyritestin genes (CYRN1 and CYRN2) are non-functional. *Biochem. J.* 357 (Pt 2):551-6.
 - 64 Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N. and Takenawa, T. 2001. Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science.* 292:920-3.
 - 65 Yamagata, K., Murayama, K., Okabe, M., Toshimori, K., Nakanishi, T., Kashiwabara, S. and Baba, T. 1998. Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* 273:10470-4.
 - 66 Krushkal, J., Bat, O. and Gigli, I. 2000. Evolutionary relationships among proteins encoded by the regulator of complement activation gene cluster. *Mol. Biol. Evol.* 17:1718-1730.
 - 67 Krushkal, J., Kemper, C. and Gigli, I. 1998. Ancient origin of human complement factor H. *J. Mol. Evol.* 47:625-630.