

血清レクチンとメタロプロテアーゼとの相互作用のもつ生理的・病理的意義

平野 真*

Functional interaction of a serum lectin with metalloproteases

Makoto HIRANO*

ABSTRACT: Mannan-binding protein (MBP) is a Ca^{2+} -dependent lectin known as a host defense factor involved in innate immunity, and recognizes mannose, fucose, and *N*-acetylglucosamine residues. The biological responses of MBP to exogenous ligands have been studied extensively, however, little is known about its role to endogenous ligands. We have identified meprins, matrix metalloproteases, as novel endogenous MBP ligands in the renal proximal tubules of mouse. We found that the binding of MBP to meprins resulted in significant decreases in the proteolytic and matrix-degrading activities, indicating that MBP is an important regulator for the local modulation of meprin proteolytic activity. On the other hand, focusing on the pathogenic role of the interaction of MBP with meprins, we clarified that, in an acute renal failure caused by ischemia/reperfusion injury, the binding of MBP with meprins triggers the complement activation on the renal proximal tubules through the lectin pathway.

Keywords : mannan-binding protein, meprin, matrix metalloprotease, ischemia/reperfusion injury, complement activation

(Received September 14, 2012)

1. はじめに

近年、ヒトゲノムプロジェクトにより約 30 億個にもおよぶ全塩基配列が決定された。この後、タンパク質をコードする遺伝子数が約 2 万 2 千であり、当初考えられていたよりも遙かに少ないことが明らかになった。これはカラシナの遺伝子数とほぼ同数であり、人体は非常に少ない遺伝子で生命現象を営んでいることになる。しかし、これらの遺伝子によってコードされたタンパク質の多くは、糖鎖付加やリン酸化、脂質修飾といった翻訳後修飾を経て、完全な分子として機能するようになる (1)。すなわち、DNA を鋳型として直接的な支配を受けて作られる DNA, RNA, タンパク質から得られる半ばデジタルな情報のみによって、複雑な生命現象を解明することは不可能である。したがって、翻訳後修飾を受けた機能分子

の働きを解明することはポストゲノム時代の大きな課題であると考えられる。

糖鎖付加は主要な翻訳後修飾の一つであり、ヒトが有するタンパク質のうち、約半数が糖鎖付加を受けるといわれている (2)。近年、質量分析や NMR などの糖鎖構造解析技術や糖鎖関連遺伝子のノックアウトマウスなどを用いた研究により、糖鎖が発生や分化、免疫応答などの様々な生命現象に関与し、また、がんや糖尿病などの様々な疾患に糖鎖異常が関与することが明らかにされた。

糖鎖のもつ情報は多様な糖鎖構造という形で表現されており、これらの情報を解読しているのがレクチンと呼ばれる糖認識分子である。レクチンはその糖認識特異性により、生命科学の様々な分野において重要なツールとして用いられている。近年、種々の動物組織、血清中に見いだされ、これらは動物レクチンと呼ばれている。このなかで、血清マンナン結合タンパク質 (mannan-binding protein: MBP) は補体活性化などを引き起こす先天性生体防御因子として知られ、その外来リガンドとして細菌、真菌、ウイルスなど広範な病原微生物の細胞表面糖鎖が

*成蹊大学 理工学部 物質生命理工学科 助教
Department of Materials and Life Science, Faculty of Science
and Technology, Seikei University
e-mail: mhirano@st.seikei.ac.jp

多数報告されている (3, 4)。しかしながら、これまで MBP の内在性リガンド (生体内に存在し、MBP と相互作用し得る分子) とその生物学的意義に関する知見はほとんど得られていなかった。本稿では、著者らにより明らかにされた MBP と内在性リガンドとの相互作用とその生理学的 (5)、病理学的意義 (6) について概説する。

2. 血清マンナン結合タンパク質 (MBP)

MBP は、マンノース結合タンパク質あるいはマンナン結合レクチンとも称される。酵母マンナンを固定化したアフィニティーカラムにより、ウサギ血清から初めて単

離され、以後、ヒトをはじめとする哺乳動物血清中に広く分布することが明らかとなった。MBP はマンノース、フコース、*N*-アセチルグルコサミン残基を特異的に認識する Ca^{2+} 依存性のレクチン (C 型レクチン) である。ヒト MBP は 31 kDa のサブユニットからなるホモオリゴマーである。MBP のドメイン構造にはアミノ (N) 末端側から、高システイン領域、Gly-Xaa-Yaa のトリプレット配列の繰り返しを含むコラーゲン様領域、ネック領域、そして、カルボキシ末端に糖認識ドメイン (carbohydrate recognition domain: CRD) が存在する。このようなサブユニット 3 分子が高システイン領域において、ジスルフィド結合により結合し、構造単位を形成する。さらに、こ

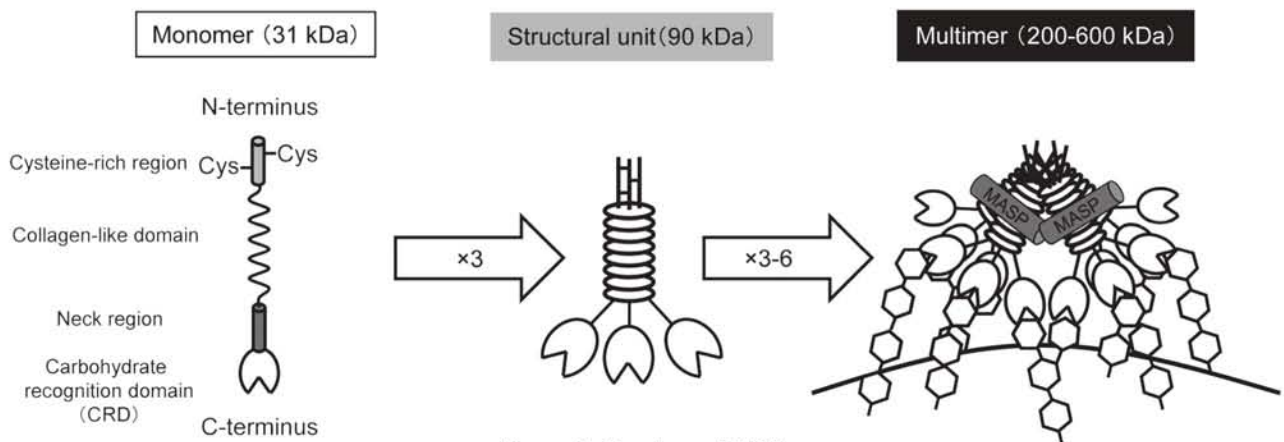


Figure 1. Structure of MBP.

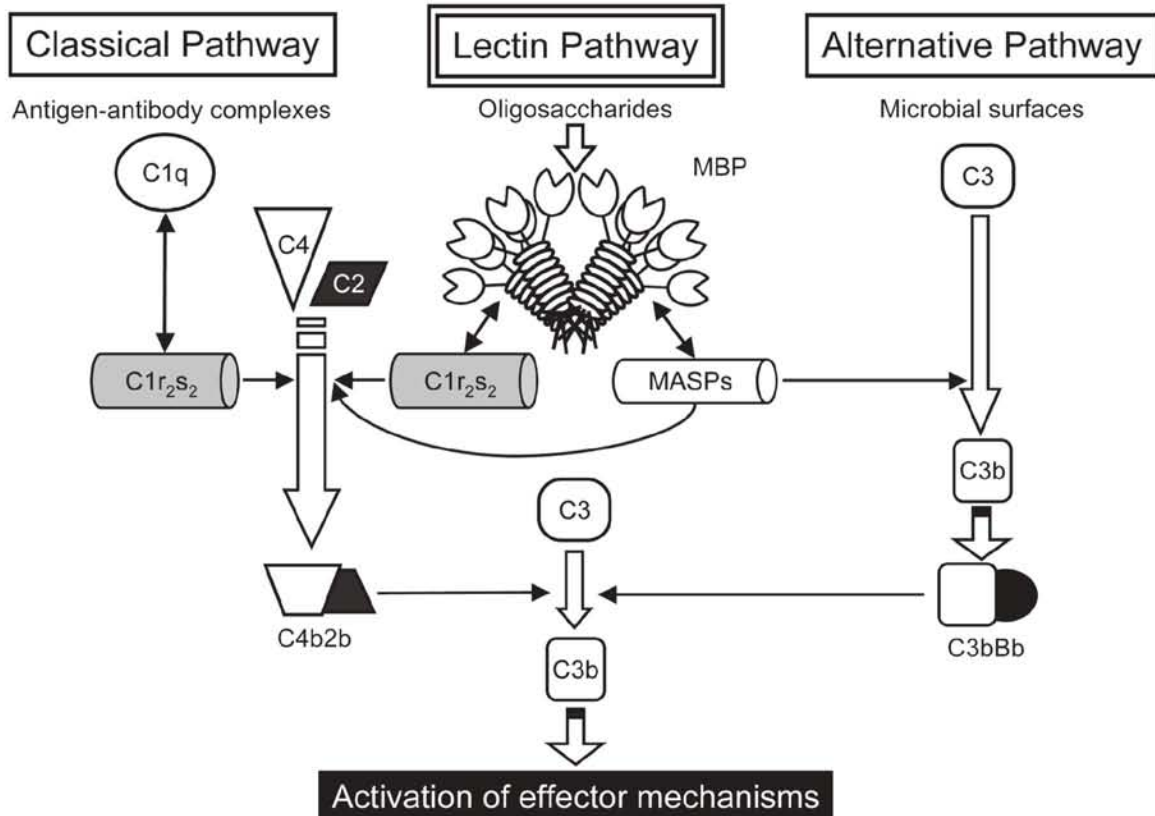


Figure 2. Three pathways for complement activation.

の構造単位がN末端で束ねられ、3-6量体として、多価リガンド結合部位をもつ花束状の構造を形成する (Fig. 1)。これにより、MBPは細胞表面に存在する糖鎖パターンを解読することが可能となり、微生物表面糖鎖を認識し、レクチン経路 (Lectin Pathway) を介して補体系を活性化する。

補体活性化には古典経路 (Classical Pathway), 第二経路 (Alternative Pathway), レクチン経路 (Lectin Pathway) の三つの経路が存在する (Fig. 2)。古典経路では抗原抗体複合体と補体成分C1qとの結合が引き金となり、C4およびC2からC3転換酵素であるC4b2bが産生される。第二経路 (代替経路) ではC3と菌体成分との直接の相互作用が引き金となる。レクチン経路においては、まずMBPがバクテリア、ウイルス、真菌、寄生物などの細胞表面に存在する糖鎖パターンを認識して結合する。これにより、MBPと結合して存在するMBP結合セリンプロテアーゼ (MASPs) が活性化され、C4をC4bに加水分解し、補体活性化カスケード反応が引き起こされる。いずれの経路においてもC3の活性化に収束し、最終的に膜侵襲複合体形成による殺細胞作用やオプソニン作用を示す。このような機能から、MBPの外来異物に対する反応性はよく検証されてきた。

3. マウスにおけるMBPの内在性リガンドの発現と同定

正常6週齢雄性BALBc/Crマウスの各種臓器におけるMBPの内在性リガンドの発現分布を調べるため、ビオチン化したMBPを用いて組織染色を行った。その中で、特に、腎臓では髄質における内在性リガンドの発現は観察されなかったが、皮質の近位尿細管刷子縁における非常に限定的な発現が観察された (Fig. 3)。

そこで、この腎臓におけるMBPの内在性リガンドに注目して研究を進めた。この内在性リガンドを同定するた

め、マウス腎臓膜タンパク質を界面活性剤の一種であるNP-40で可溶化後、MBPアフィニティークロマトグラフィーを用いて得られたEDTA溶出画分について還元条件でのSDS-PAGEを行い、CBBで染色した。これにより83 kDaと91 kDaの位置に主要な2本のバンドが観察された。この2本のバンドについて質量分析によるプロテオミクス解析を行ったところ、83 kDaの方がmeprin α サブユニット、91 kDaの方がmeprin β サブユニットと同定された。

4. meprins

meprinsは高度に糖鎖付加を受けた亜鉛依存性マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) であり、腎臓や小腸の上皮細胞において豊富に局在しており、特に腎臓の近位尿細管刷子縁に存在する膜タンパク質全体の約5%をも占めることが知られている (7)。また、meprinの機能は未だ明らかにはされていないが、尿中のペプチドを近位尿細管において再吸収されやすい大きさに分解する、細胞外マトリックスを分解し、そのリモデリングに寄与するなどが考えられている (8)。meprin β は膜結合型タンパク質であり、meprin α も膜貫通領域を有するが、生合成過程で小胞体上のプロテアーゼによりinserted domain (I domain) で切断され、分泌型となる。それぞれのサブユニットがジスルフィド結合によりホモあるいはヘテロダイマーを形成し (9, 10)、さらにこれらのダイマーが相互作用することで1-10 MDaにもおよぶ巨大なプロテアーゼ複合体となる (11)。

マウスmeprin上のN-型糖鎖付加のポテンシャルサイトは α では10箇所、 β では9箇所存在する。また、N末端側に位置するプロテアーゼ領域には α 、 β ともにN-型糖鎖付加のポテンシャルサイトが3箇所存在し、これらの糖鎖付加部位はmeprinの触媒部位と非常に近い部分に位置している (Fig. 4)。また、meprin上の糖鎖付加部位に変異を

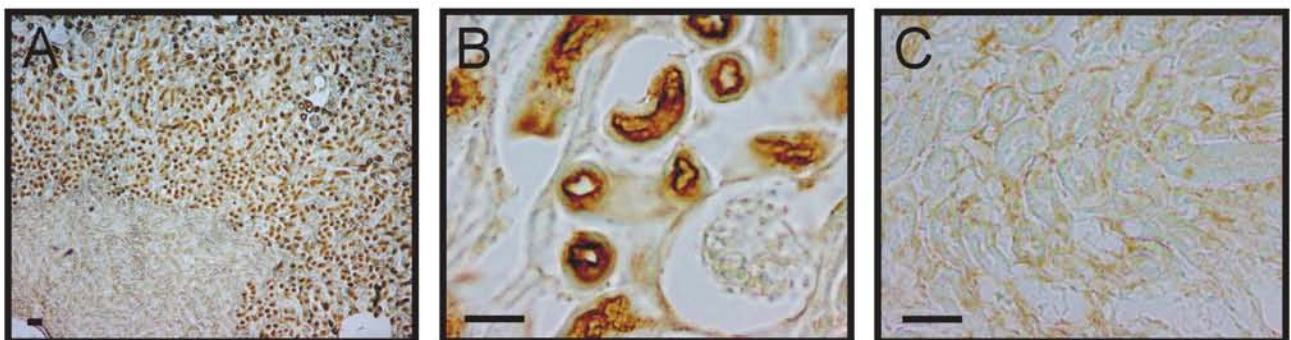


Figure 3. The detection of endogenous MBP ligands in mouse kidney. The cryosections of 6-week-male BALBc/Cr mouse tissues were stained with biotinylated human MBP. The sections were stained by an indirect peroxidase technique with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as a chromogenic substrate and counterstained with hematoxylin. (A) kidney, (B) renal cortex, and (C) renal medulla. Scale bars, 200 μ m and 50 μ m for (A) and (B, C), respectively.

加えた変異型meprinを用いた研究により、糖鎖がmeprinの酵素活性やオリゴマー形成、安定性に非常に重要な役割を果たしていることが示されている (12, 13)。meprinの基質としては angiotensin, bradykinin, parathyroid hormone (PTH) のような生理活性ペプチドやcollagen IV, fibronectin, laminin, nidogenなどの細胞外マトリックスの構成タンパク質などが知られている (8)。そして、meprinを高発現するがん細胞では、このような基底膜を構成する細胞外マトリックスの構成タンパク質を分解することにより、周辺組織へのがん細胞の浸潤や転移が促進されるという報告がある (14, 15)。

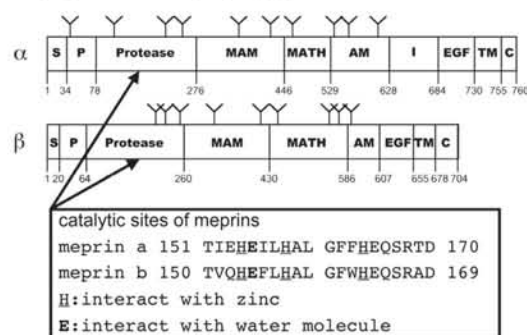


Figure 4. Schematic diagrams of the domain structure of mouse meprin α and β . S, N-terminal signal peptide; P, prosequence; Protease, catalytic domain; MAM, meprin A5 protein tyrosine phosphatase μ domain; MATH, meprin-and-TRAF-homology domain; AM, after MATH domain; I, inserted domain; EGF, epidermal growth factor-like domain; TM, C-terminal transmembrane region; C, cytoplasmic region; Y, potential N-glycosylation site.

5. MBPとmeprinsとの相互作用

MBPとmeprinの結合の性質を検討するために、meprinをpeptide-N-glycanase F (PNGase F) あるいはendo- β -N-acetylglucosaminidase H (endo H) で消化し、消化物についてMBPレクチンプロットを行った。全てのN-型糖鎖を根元から切断するPNGase Fの処理により結合性が消失したことから、MBPとmeprinの相互作用にはN-型糖鎖が必須であり、O-型糖鎖は関与していないことが明らかとなった。一方、N-型糖鎖の内の高マンノース型糖鎖を選択的に切断するendo Hで処理するとmeprinの結合性が約3分の1にまで低下した。このことからMBPは主として高マンノース型糖鎖を認識して結合するが一部、複合型糖鎖も結合に関与することが明らかとなった。

6. MBPのmeprinsプロテアーゼ活性への影響

meprinがメタロプロテアーゼであることから、meprinのもつプロテアーゼ活性に与えるMBPの影響について

検討した。

まず、meprinのプロテアーゼ活性測定において一般的によく用いられる基質であるカゼインを用いて検討したところ、meprinのプロテアーゼ活性はMBPにより効果的に阻害され、MBPによる濃度依存的な阻害を受けるということが明らかとなった (Fig. 5)。次に、meprinに分解されることが知られる生理活性ペプチドの一つであるPTHを基質としてmeprinのプロテアーゼ活性の抑制について検討したところ、この基質を用いた場合にもMBPによりプロテアーゼ活性は50%程度ではあるが抑制された。さらに、MBPとmeprinとの結合阻害剤としてマンノースを添加した場合にはMBPとmeprinの結合が阻害され、MBPを加えていない場合と同程度のプロテアーゼ活性が観察された。これらはレクチンが酵素活性を調節していることを示す初めての結果である。

また、MMPやセリンプロテアーゼといった酵素群と同様に、ある種のがん細胞ではmeprinのプロテアーゼ活性が上昇しており、これにより細胞外マトリックスが破壊され、がん細胞の浸潤や転移を促進するという報告がある (14, 15)。これらの知見をもとに細胞外マトリックスの構成タンパク質の一つであるcollagen IVとMMPの研究において基質として頻繁に用いられるgelatinを基質としてMBPによるmeprinのプロテアーゼ活性抑制について検討した。meprinのプロテアーゼ活性はMBPにより顕著に阻害され、その阻害はPTHの場合と同様にマンノースにより解除された。以上の結果から、PTHのような生理

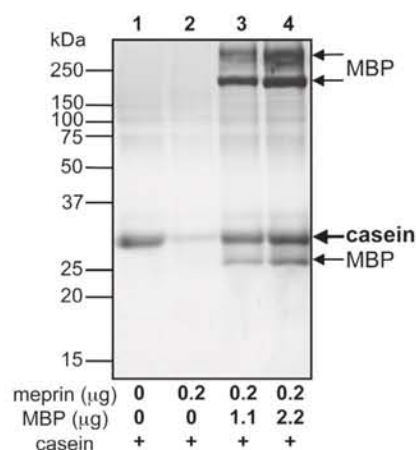


Figure 5. The effect of MBP on the proteolytic activity of meprins. The purified meprins were preincubated without or with 1.1 or 2.2 μ g MBP at room temperature for 1 h before the addition of casein as a substrate. Reactions were performed in a total volume of 20 μ L at 37°C for 6 h. The reaction was terminated by the addition of 10 mM EDTA, and samples subjected to electrophoresis on a 15% non-reducing SDS-PAGE gel. Proteins were visualized with CBB. For control lane 1, casein was incubated without meprins; lane 2, meprins treated without MBP; lane 3, meprins treated with MBP; lane 4, meprins treated with 2 times MBP.

活性ペプチドから細胞外マトリックスの構成タンパク質のような分子のmeprinによる分解に対してMBPは幅広い阻害活性を持つことが明らかとなった。MMPsの内在性モジュレーターとしてTIMPs (tissue inhibitors of metalloprotease) が知られている (16) が、これらの結果からMBPがmeprinに対してTIMPsのような役割を果たすことが示唆された。

7. MBPによるmeprinsのプロテアーゼ活性阻害機構

このMBPによるmeprinのプロテアーゼ活性阻害機構として、meprinとMBPとの相互作用によりmeprinのコンフォメーション変化が引き起こされている、あるいはMBPがmeprinの酵素活性中心付近の糖鎖に結合することにより、基質が活性中心にアクセスできず、酵素-基質複体の形成を阻害しているなどが考えられた。そこで、この機構について検討するために、蛍光標識された合成低分子ペプチドを用いてmeprinのアミダーゼ活性に与えるMBPの影響について調べた。その結果、MBPは濃度を上昇させてもmeprinのアミダーゼ活性を阻害することは出来なかった。

以上の結果から、MBPによるmeprinのプロテアーゼ活性阻害機構について次のように考察した。まず、基質がタンパクのような大きな分子の場合、MBPはmeprinの活性中心付近の糖鎖に結合することにより基質が活性中心に接近するのを阻害し、基質の分解を妨げることが可能となる (Fig. 6A) が、基質が充分小さい場合には、MBPがmeprinの活性中心付近の糖鎖に結合していても基質は自由に活

性中心にアクセス出来るため、MBPはmeprinの酵素活性を阻害できない (Fig. 6B) と考えることができる。

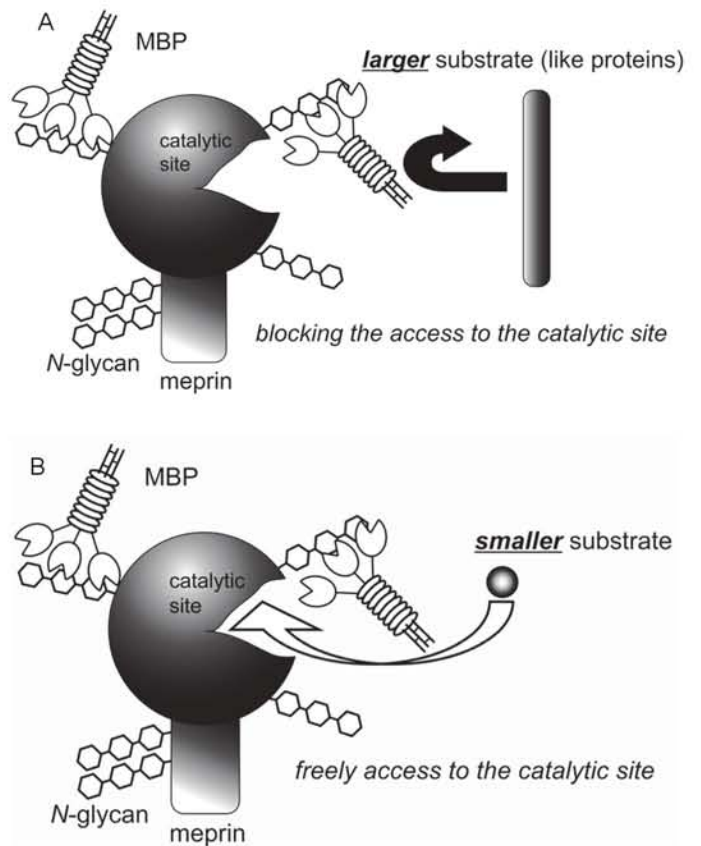


Figure 6. Inhibitory mechanism of MBP on the proteolytic activity of meprins for (A) larger substrate and (B) smaller substrate.

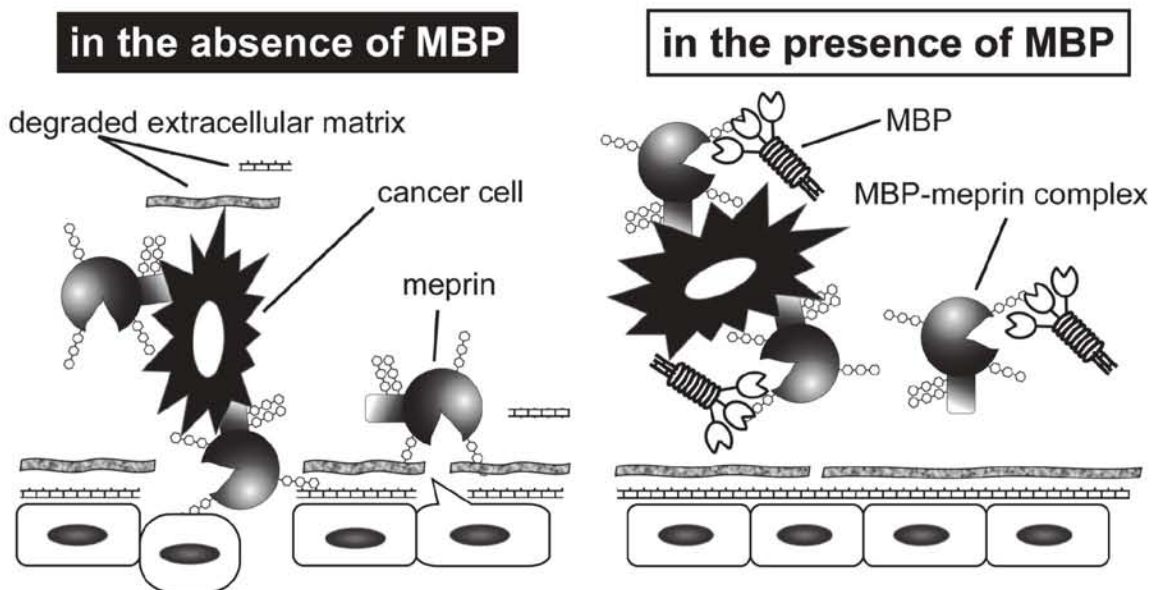


Figure 7. Hypothetical model of function of MBP-meprins interaction for the migration of cancer cells.

8. MBPによるmeprinsプロテアーゼ活性阻害作用の生理学的意義

本研究ではMBPがmeprinのプロテアーゼ活性を阻害することを明らかにした。最後にMBPとmeprinとの相互作用がもつ意義について、がん細胞の浸潤をモデルとして以下のように考察する (Fig. 7)。まず、MBPが存在しない場合には組織中でmeprinのプロテアーゼ活性が上昇しているがん細胞により細胞外マトリックスが破壊される。これによりがん細胞の周辺組織への浸潤が容易となり、さらに転移の可能性も高まる (Fig. 7A)。一方、MBP存在下ではがん細胞が発現しているmeprinのプロテアーゼ活性がMBPにより阻害されるため、細胞外マトリックスの破壊が抑制され、がん細胞の浸潤や転移を防ぐことが可能である (Fig. 7B) と考えられる。

以上、本研究により明らかとなった知見は、meprinが促進するがん細胞の浸潤をMBPが抑制し得ることを示している。

9. 虚血性腎障害とMBPによる補体活性化

次に、MBPの主要な機能の一つである補体活性化に着目し、MBPとmeprinとの相互作用のもつ病理学的意義について検討した。

急性腎不全の中でも、虚血性腎障害のモデルとして用いられる腎虚血再灌流 (IR) マウスにおいてその障害にレクチン経路を介する補体活性化が関与していることが、近年、MBPノックアウトマウスを用いた研究で示されている (17, 18) が、その機構についての詳細は不明であった。著者はこの補体活性化に腎臓におけるMBPの内在性リガンドであるmeprinが関与している可能性を考えた。

10. 急性腎不全

急性腎不全 (Acute renal failure) は急激な腎機能の低下の結果、体液の恒常性が維持できなくなった状態のことを指し、急性腎不全と診断された患者全体の死亡率は50%近くにのぼる (19, 20)。

急性腎不全はその原因により腎前性急性腎不全 (Prerenal acute renal failure)、腎後性急性腎不全 (Postrenal acute renal failure)、腎性急性腎不全 (Intrinsic acute renal failure) の大きく三つに分類される (Fig. 8)。腎性急性腎不全では急性腎炎などの糸球体病変、感染症などによる急性間質性腎炎、ショックなどによる虚血やシスプラチンなどの腎毒性物質による尿細管壊死のような腎実質の

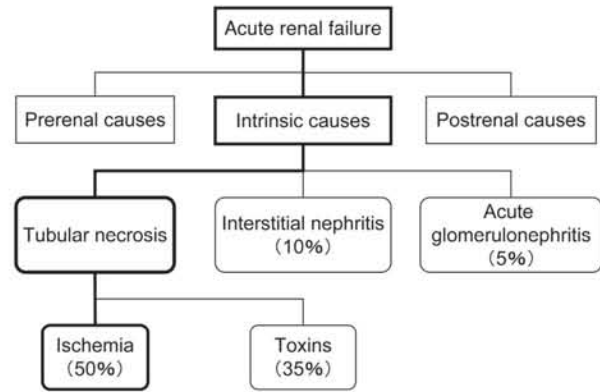


Figure 8. Main categories of acute renal failure.

障害が原因となる。臨床的にはショックなど虚血によって引き起こされる尿細管壊死性急性腎不全は腎性急性腎不全全体の約50%にもおよび、虚血は腎性急性腎不全の重要な因子であると考えられている (21)。

腎虚血によって尿細管壊死が引き起こされる過程には様々な分子が関与するが、近年、補体系が関与していることが明らかにされた (22)。

マウスやラットなどでは二種類のMBP遺伝子が存在し、それぞれ血清型MBP (S-MBP) と肝臓型MBP (L-MBP) をコードしており、認識する微生物は異なる (23) が、ともに補体活性化能を有する (24, 25)。また、マウスやラットの腎臓においてはS-MBPが生合成されていることが知られる (26, 27)。最近のSおよびL-MBPダブルノックアウトマウスを用いた研究により、虚血性腎障害においてMBPによるレクチン経路を介した補体活性化が尿細管に決定的なダメージを与えることが明らかにされた (17, 18)。そして、腸の虚血再灌流障害においてはIgMを介したMBPによる補体活性化が引き起こされることが示された (28)。しかし、腎臓の虚血再灌流ではIgMの沈着は観察されず (29)、MBPがどのような分子をターゲットとして認識しているのかなど、虚血再灌流障害における補体活性化の詳細な機構は不明であった。

ここで、上述した腎臓におけるMBPの極めて特異的な内在性リガンドであるmeprinは、近位尿細管刷子縁に存在する膜タンパク質の約5%をも占めるタンパク質であり (7)、数MDaもの非常に大きな分子複合体を形成する (11) ことからMBPが認識する糖鎖パターンを呈してMBPと相互作用することにより補体系を活性化する可能性が考えられた。

そこで、腎虚血再灌流の際、meprinがMBPの標的分子となっている可能性を考え、腎虚血再灌流におけるレクチン経路による補体活性化の機構について、*in vitro*実験および実験的虚血再灌流モデルマウスを用いた*in vivo*実験により検討した。

11. 虚血性腎障害モデルマウスにおけるMBP, meprins, 補体成分C3bの局在

虚血性腎障害におけるMBP, meprins, 補体成分の挙動を調べるため、実験的に腎虚血再灌流 (IR) モデルマウスを作製した。ここではマウスの両方の腎動脈血流を血管用鉗子で40分間停止させることにより腎臓を虚血状態にし、その後、鉗子を除去することにより再灌流を引き起こした。この際、腎動脈の血流を停止させなかったマウスをshamとして以下の研究では用いた。

虚血後6時間経過したIRモデルマウス腎臓のパラフィン切片を作製して免疫組織染色を行い、meprin β とS-MBPの局在について共焦点顕微鏡で調べた。shamマウスではmeprin β は皮質の近位尿細管刷子縁において強く発現していたが、髄質における発現は全く観察されなかった (Fig. 9A)。また、S-MBPはほとんど検出されなかった (Fig. 9B)。一方、IRマウスではmeprin β は皮質のみならず、わずかながら髄質でも検出された (Fig. 9G)。また、S-MBPは尿細管においてshamマウスに比べて非常に強く染色された (Fig. 9H)。皮質部分の拡大写真 (Fig. 9E, K) では、IRマウスの近位尿細管において刷子縁の脱落による形態変化が観察された。また、IRマウス腎臓の近位尿細管においてmeprin β が一部S-MBPと共局在しているのが観察された (Fig. 9K)。髄質部分の拡大写真では、shamマウスにおいてはmeprin β , S-MBPいずれも検出されなかった (Fig. 9F)。一方、IRマウスにおいて、meprin β およびS-MBPが検出され、それらが一部共局在しているのが観察された (Fig. 9L)。

Fig. 10Bに示すように、C3はshamマウスではほとんど検出されなかったが、IRマウス尿細管に大量に沈着しているのが観察された (Fig. 10H)。なお、データには示していないが、meprin α の場合でもmeprin β と同様の局在が見られた。また、L-MBPは検出されなかった。

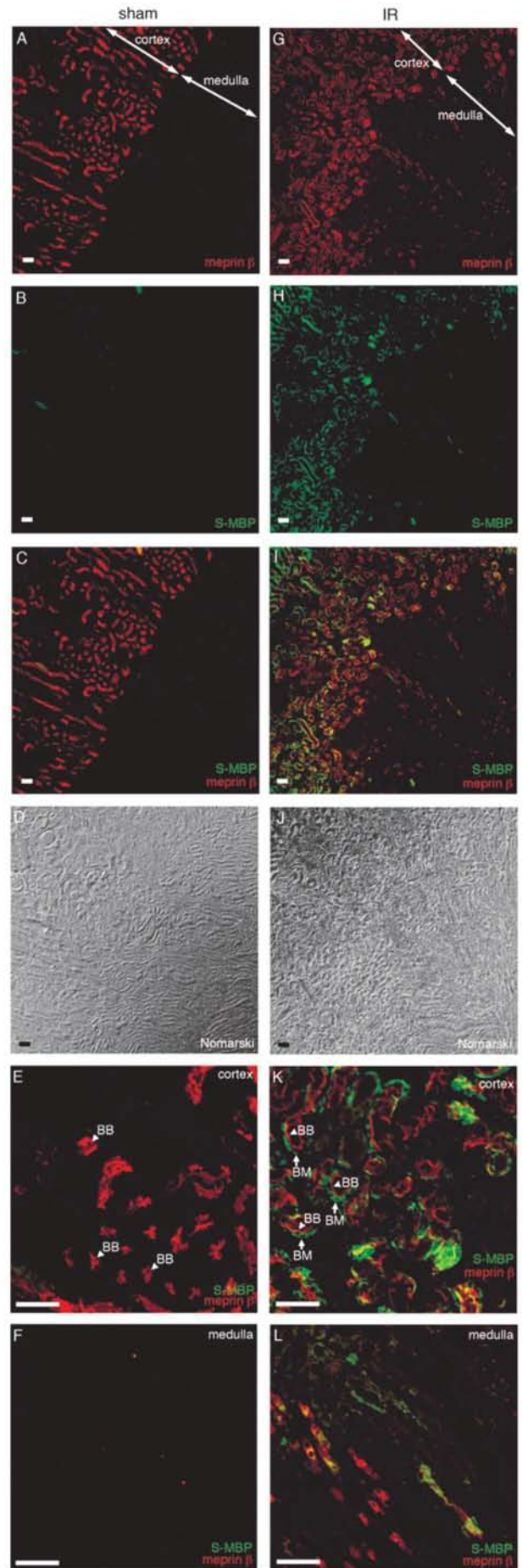


Figure 9. Localization of S-MBP and meprin β in renal I/R-operated mouse kidney. Representative kidney paraffin sections (10 μ m) were harvested following renal I/R (reperused for 6 h) and stained with both anti-meprin β and anti-S-MBP antibodies. Cortical and medullary regions are indicated with double arrows in A and G. (A) Meprin β (red) was localized strictly in the cortex. (G) Meprin β was localized not only in the cortex but also in the medulla. (B) S-MBP (green) was not detected. (H) S-MBP massively deposited in the cortex and, in addition, S-MBP was weakly detected in the medulla (H). (C) Overlay image of A with B. (I) Overlay image of G with H shows that S-MBP is colocalized with meprin β mostly in the cortex. (D and J) Nomarski microphotographs of A–C and G–H, respectively. (E, K, F, and L) Higher magnification views of cortical regions of C and I, and medullary regions of C and I, respectively. Arrowheads and arrows indicate the brush border membranes (BB) and the basolateral membranes (BM) of the proximal tubules, respectively. (E) Meprin β was strictly localized on the brush border membrane of the proximal tubules, but S-MBP was not detected. (K) The brush border membranes of the proximal tubules changed morphologically. S-MBP was partially colocalized with meprin β on the base of the brush border membrane of the proximal tubules. (F) Neither S-MBP nor meprin β were detected. (L) S-MBP was partially colocalized with meprin β . Bars, 100 μ m.

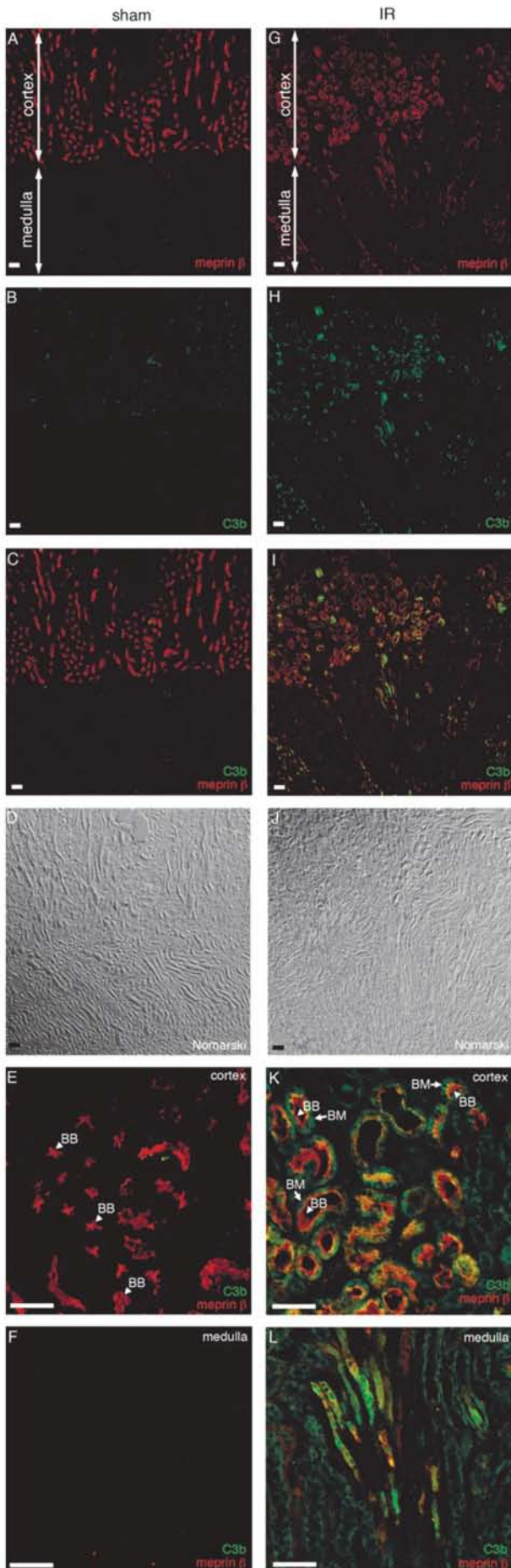


Figure 10. Localization of C3b and meprin β in renal I/R-operated mouse kidney. Representative kidney paraffin sections (10 μ m) were harvested following renal I/R (reperfused for 6 h) and stained with both anti-meprin β and anti-C3b antibodies. Cortical and medullary regions are indicated with double arrows in A and G. (A) Anti-meprin β (red) strictly stained the cortex. (G) Anti-meprin β stained not only the cortex but also the medulla. (B) C3b (green) was not detected. (H) C3b was detected abundantly in the cortex and weakly in the medulla. (C) Overlay image of A with B. (I) Overlay image of G with H shows that C3b is colocalized with meprin β mostly in the cortex. (D and J) Nomarski microphotographs of A–C and G–I, respectively. (E, K, F, and L) Higher magnification views of cortical regions of C and I, and medullary regions of C and I, respectively. Arrowheads and arrows indicate the brush border membranes (BB) and the basolateral membranes (BM) of the proximal tubules, respectively. (E) Meprin β was strictly localized on the brush border membrane of the proximal tubules. No signals of C3b were detected. (K) C3b was colocalized with meprin β mostly on the base of the brush border membrane of the proximal tubules. (F) Neither C3b nor meprin β were detected. (L) C3b was partially colocalized with meprin β . Bars, 100 μ m.

12. 腎障害モデルマウス腎臓におけるMBPとmeprinsとの相互作用

IRモデルマウス腎臓におけるS-MBPとmeprinsとの相互作用を*in vivo*で検証するため、*in situ* proximity ligation assayを行った (Fig. 11A)。この方法は、対象となる2種類の抗体を用いて、それぞれが40 nm以内の近傍に存在することを組織切片上、あるいは、細胞内で証明することができる手法である (30)。ここでは、マウス腎臓切片上にて、通常の免疫組織染色と同様に、S-MBPおよびmeprin β に対する一次抗体を反応させ、(+) 鎖、あるいは、(-) 鎖のオリゴヌクレオチドが標識された二次抗体を反応させた (Fig. 11A-a)。すると、それぞれのタンパク質が近傍に存在する場合には、二次抗体に標識されたオリゴヌクレオチドがハイブリダイズし、円形のオリゴヌクレオチドを形成する (Fig. 11A-b)。ここに特異的なプライマーとDNAポリメラーゼを添加し、インキュベートすると、円形オリゴヌクレオチドを鋳型とするPCR産物が伸長される (Fig. 11A-c)。ここにPCR産物特異的な蛍光プローブを添加することで、目的タンパク質の相互作用を組織上で蛍光シグナルとして、検出することが可能となる (Fig. 11A-d)。本法により、shamマウスでは、S-MBPとmeprin β との相互作用を示す蛍光シグナルは検出されなかったが、一方、IRマウス腎臓では、近位尿細管上皮細胞の刷子縁において、S-MBPとmeprin β が相互作用していることが明らかとなった (Fig. 11B)。S-MBPとmeprin α でも同様の結果が得られた。以上の結果から、IRマウス腎臓において、S-MBPとmeprinsが相互作用していることが示され、これらの相互作用により、補体系が活性化されることが示唆された。

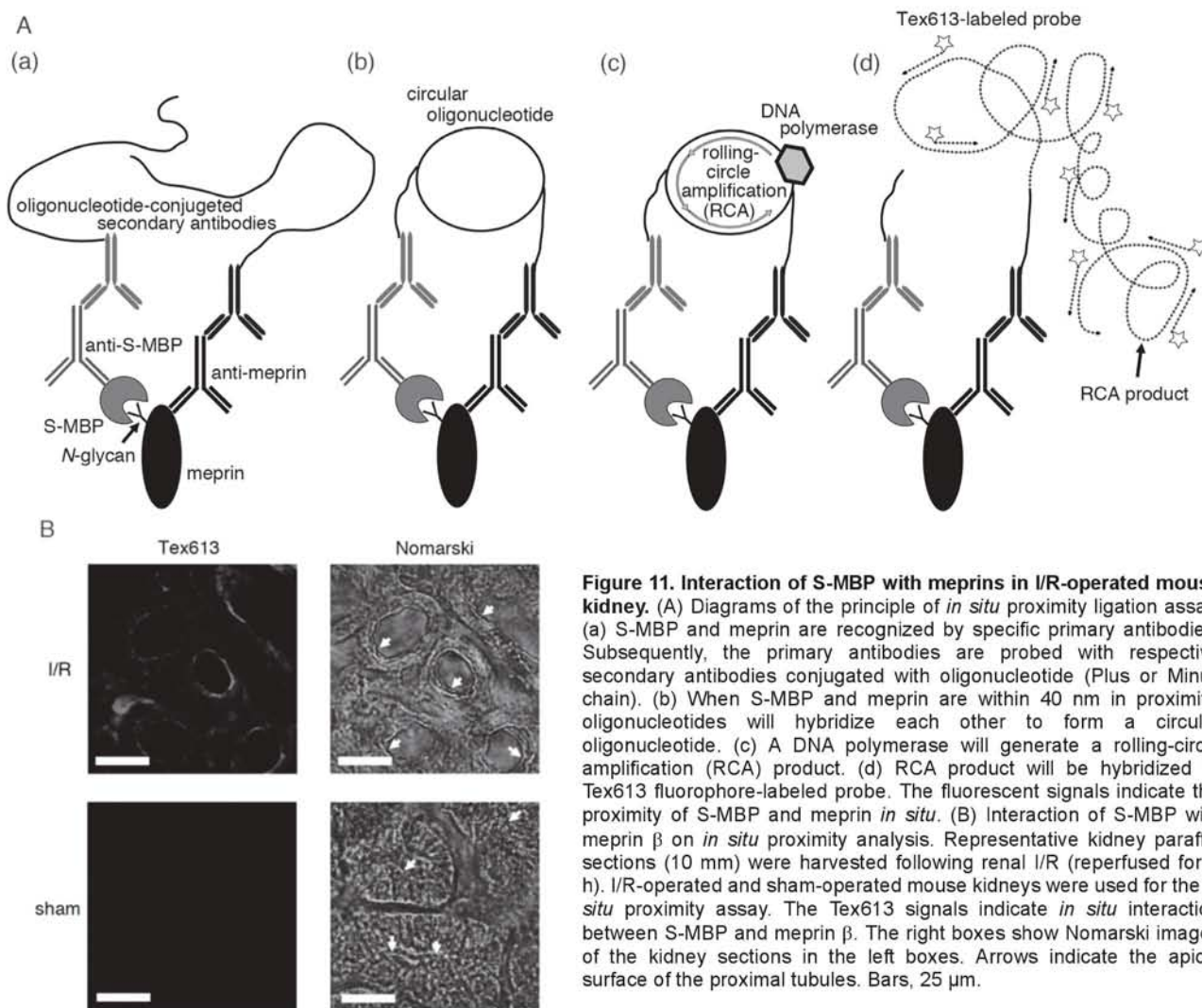


Figure 11. Interaction of S-MBP with meprins in I/R-operated mouse kidney. (A) Diagrams of the principle of *in situ* proximity ligation assay. (a) S-MBP and meprin are recognized by specific primary antibodies. Subsequently, the primary antibodies are probed with respective secondary antibodies conjugated with oligonucleotide (Plus or Minus chain). (b) When S-MBP and meprin are within 40 nm in proximity, oligonucleotides will hybridize each other to form a circular oligonucleotide. (c) A DNA polymerase will generate a rolling-circle amplification (RCA) product. (d) RCA product will be hybridized to Tex613 fluorophore-labeled probe. The fluorescent signals indicate the proximity of S-MBP and meprin *in situ*. (B) Interaction of S-MBP with meprin β on *in situ* proximity analysis. Representative kidney paraffin sections (10 μ m) were harvested following renal I/R (reperfused for 6 h). I/R-operated and sham-operated mouse kidneys were used for the *in situ* proximity assay. The Tex613 signals indicate *in situ* interaction between S-MBP and meprin β . The right boxes show Nomarski images of the kidney sections in the left boxes. Arrows indicate the apical surface of the proximal tubules. Bars, 25 μ m.

13. MBPとmeprinsの相互作用による補体活性化

MBPとmeprinとの相互作用によりレクチン経路を介した補体活性化が引き起こされるか否かを*in vitro*の系で検討した。この系ではプラスチックプレートにmeprinsを固定化した後、MBP、MASPs、補体成分C4、HRP標識したC4bに対する抗体を順に加え、HRPの発色基質によりC4bの沈着の程度を測定し、これを補体活性化の指標とした。また、meprinsと同様にMBPが認識する高マンノース型糖鎖を持つことが知られるIgM Fcをmeprinの比較対象として用いた。その結果、L-MBPの場合にはmeprin、IgM Fcいずれを固定化した場合でも補体活性化は引き起こされなかったが、一方、S-MBPではどちらを固定化しても補体は活性化された。そして、その程度はmeprinsを固定化した場合には、IgM Fcを固定化した場合と比較して約3倍の高い値を示した。以上の結果から、S-MBPとmeprinが相互作用することで効果的に補体系を活性化することが明らかとなった。

14. 腎障害モデルマウス腎臓におけるMBPとmeprinsのタンパク質量とmRNA発現量

虚血再灌流によるmeprin α , β およびS-MBPのタンパク質量の変化を検討するために、腎臓のSDS抽出物についてウェスタンブロットによる半定量解析を行った。IRによりmeprin α では約30%に、meprin β では約70%にまでタンパク質量は減少していた。一方、S-MBPのタンパク質量はIRにより約4倍にまで増加した。meprinのタンパク質量の減少については尿細管細胞の壊死および生合成の遅延によるものと考えられる。しかし、S-MBPは元来腎臓のメサングウム細胞に発現しており(27)、IRによるS-MBPのタンパク質量の増加が腎臓内でのS-MBP産生量増加に起因する可能性が考えられた。そこで、リアルタイムPCRによってS-MBP mRNAの発現量について検討した。しかしながら、IRによるS-MBP mRNAの発現量に変化は認められなかった。この結果と糸球体は約200 kDa以上の分子を通過させない(31)ことから、IRによる

腎臓におけるS-MBPタンパク質量の増加は腎臓におけるS-MBPの発現量の増加や糸球体を素通りしたS-MBPが尿細管に沈着したことによるのではなく、近位尿細管周辺に張り巡らされた血管から流出したS-MBPが尿細管に沈着したことによると推察された。

虚血性腎障害は、具体的には、出血性ショックや腎移植などにより引き起こされる(32)。腎臓が虚血状態に陥ると、物質の再吸収を担い、腎臓において最も多くエネルギーを必要とする近位尿細管上皮細胞が最初に低酸素によるダメージを受け、刷子縁の脱落が観察されるようになる(33, 34)。また、細胞の極性が失われ、正常時にはバソラテラル側に存在する接着分子などがアピカル側へ移行する(35, 36)。そして、アピカル側に発現するプロテアーゼがバソラテラル側へ移行すると基底膜が破壊される(16)。このようにして細胞同士や細胞と基底膜との接着が弱まる(37)。その一方で、腎臓内の血管においては炎症反応が引き起こされており、活性化された白血球が炎症性サイトカインや炎症メディエーターを放出し、血管透過性が亢進する(22)。このような状況下で、血液中のS-MBPが尿細管に移行することが可能であると考えられる。

15. MBPとmeprinsとの相互作用がもつ病理的意義

以上のことから、腎虚血再灌流障害において、循環血中のS-MBPが尿細管に移行し、尿細管細胞上のmeprinと相互作用することでレクチン経路を介した補体活性化が引き起こされ、S-MBPとmeprinとの相互作用が尿細管壊死の引き金となることが示唆された。

本研究では虚血性腎障害の初期段階におけるレクチン経路を介した補体活性化機構の詳細について明らかにし、MBPとmeprinとの相互作用がもつ病理学的意義に新たな知見を加えることができた。

参考文献

- 1) Seet, B. T., I. Dikic, M. M. Zhou, and T. Powson. 2004. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 473-483.
- 2) Ben-Dor, S., N. Esterman, E. Rubín, and N. Sharon. 2004. Biases and complex patterns in the residues flanking protein N-glycosylation sites. *Glycobiology* **14**: 95-101.
- 3) Neth, O., D.L. Jack, A.W. Dodds, H. Holzels, N.J. Klein and M.W. Turner. 2002. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect. Immun.* **68**: 688-693.
- 4) Turner, M. W. 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol. Immunol.* **40**: 423-429.
- 5) Hirano, M., B. Y. Ma, N. Kawasaki, K. Okimura, M. Baba, T. Nakagawa, K. Miwa, N. Kawasaki, S. Oka, and T. Kawasaki. 2005. Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin α and β . *J. Immunol.* **175**: 3177-3185.
- 6) Hirano, M., B. Y. Ma, N. Kawasaki, S. Oka, and T. Kawasaki. 2012. Role of interaction of mannan-binding protein with meprins at the initial step of complement activation in ischemia/reperfusion injury to mouse kidney. *Glycobiology* **22**: 84-95.
- 7) Bond, J. S. and R. J. Beynon. 1986. Meprin: a membrane-bound metalloendopeptidase. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**: 263-290.
- 8) Bond, J. S. and R. J. Beynon. 1995. The astacin family of metalloproteases. *Protein Sci.* **4**: 1247-1261.
- 9) Marchand, P., J. Tang, and J. S. Bond. 1994. Membrane association and oligomeric organization of the alpha and beta subunits of mouse meprin A. *J. Biol. Chem.* **269**: 15388-15393.
- 10) Gorbea, C. M., P. Marchand, W. Jiang, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, and J. S. Bond. 1993. Cloning, expression, and chromosomal localization of the mouse meprin beta subunit. *J. Biol. Chem.* **268**: 21035-21043.
- 11) Ishmael, F. T., M. T. Noreum, S. J. Benkovic, and J. S. Bond. 2001. Multimeric structure of the secreted meprin A metalloproteinase and characterization of the functional protomer. *J. Biol. Chem.* **276**: 23207-23211.
- 12) Kadowaki, T., T. Tsukuba, G. P. Bertenshaw, and J. S. Bond. 2000. N-linked oligosaccharides on the meprin A metalloproteinase are important for secretion and enzymatic activity, but not for apical targeting. *J. Biol. Chem.* **275**: 25577-25584.
- 13) Ishmael, S. S., F. T. Ishmael, A. D. Jones, and J. S. Bond. 2006. Protease domain glycans affect oligomerization, disulfide bond formation, and stability of the meprin A metalloprotease homo-oligomer. *J. Biol. Chem.* **281**: 37404-37415.
- 14) Lottaz, D., C. A. Maurer, D. Hahn, M. W. Büchler, and E. E. Sterchi. 1999. Nonpolarized secretion of human

- mepirin alpha in colorectal cancer generates an increased proteolytic potential in the stroma. *Cancer Res.* **59**: 1127-1133.
- 15) Rösmann S., D. Hahn, D. Lottaz, M. N. Kruse, W. Stöcker, and E. E. Sterchi. 2002. Activation of human mepirin-alpha in a cell culture model of colorectal cancer is triggered by the plasminogen-activating system. *J. Biol. Chem.* **277**: 40650-40658.
- 16) Kaushal, G. P., P. D. Walker, and S. V. Shah. 1994. An old enzyme with a new function: purification and characterization of a distinct matrix-degrading metalloproteinase in rat kidney cortex and its identification as mepirin. *J. Cell Biol.* **126**:1319-1327.
- 17) de Vries B, S. J. Walter, C. J. Peutz-Kootstra, T. G. Wolfs, L. W. van Heurn, and W. A. Buurman. 2004. The mannose-binding lectin-pathway is involved in complement activation in the course of renal ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Pathol.* **165**: 1677-1688.
- 18) Moller-Kristensen M, W. Wang, M. Ruseva, S. Thiel, S. Nielsen, K. Takahashi, L. Shi, R. A. Ezekowitz, J. C. Jensenius, M. Gadjeva. 2005. Mannan-binding lectin recognizes structures on ischaemic reperfused mouse kidneys and is implicated in tissue injury. *Scand. J. Immunol.* **61**: 426-434.
- 19) Levy, E. M., C. M. Viscoil and R. I. Horwitz. 1996. The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. *JAMA.* **275**: 1489-1494.
- 20) Oppert, M., C. Engel, F. M. Brunkhorst, H. Bogatsh, K. Reinhart, U. Frei, K. U. Eckardt, M. Loeffler, and S. John. 2007. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock—a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **0**: gfm610v1-gfm610.
- 21) Thadahani, R., M. Pascual, and J. V. Bonventre. 1996. Acute renal failure. *N. Engl. J. Med.* **334**: 1448-1460.
- 22) Bonventre, J. V. and A. Zuk. 2004. Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? *Kidney Int.* **66**: 480-485.
- 23) Phaneuf, L. R., B. N. Lillie, M. A. Hayes, and P. V. Turner. 2007. Binding of mouse mannan-binding lectins to different bacterial pathogens of mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **118**: 129-133.
- 24) Hansen, S., S. Thiel, A. Willis, U. Holmskov, and J. C. Jensenius. 2000. Purification and characterization of two mannan-binding lectins from mouse serum. *J. Immunol.* **164**: 2610-2618.
- 25) Liu, H., L. Jensen, S. Hansen, S. V. Petersen, K. Takahashi, A. B. Ezekowitz, F. D. Hansen, J. C. Jensenius, and S. Theil. 2001. Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute phase responses. *Scand. J. Immunol.* **53**: 489-497.
- 26) Wagner, S., N. J. Lynch, W. Walter, W. J. Schwaeble, and M. Loos. 2003. Differential expression of the murine mannose-binding lectins A and C in lymphoid and nonlymphoid organs and tissues. *J. Immunol.* **170**: 1462-1465.
- 27) Morio, H., H. Kurata, R. Katsuyama, S. Oka, Y. Kozutsumi, and T. Kawasaki. 1997. Renal expression of serum-type mannan-binding protein in rat. *Eur. J. Biochem.* **243**: 770-774.
- 28) Zhang, M., K. Takahashi, E. M. Alicot, T. Vorup-Jensen, B. Kessler, S. Thiel, J. C. Jensenius, R. A. B. Ezekowitz, F. D. Moore, and M. C. Carroll. 2006. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J. Immunol.* **177**: 4727-4734.
- 29) Park, P., M. Haas, P. N. Cunningham, L. Bao, J. J. Alexander, R. J. Quigg. 2002. Injury in renal ischemia-reperfusion is independent from immunoglobulins and T lymphocytes. *Am. J. Physiol.* **282**: F352-F357.
- 30) Söderberg O., M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstråle, K. J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L. G. Larsson, and U. Landegren. 2006. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods.* **3**: 995-1000.
- 31) Tang, S., K. N. Lai, and S. H. Sacks. 2002. Role of complement in tubulointerstitial injury from proteinuria. *Kidney Blood Press. Res.* **25**: 120-126.
- 32) Bonventre, J. V. and J. M. Weinberg. 2003. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**: 2199-2210.
- 33) Donohoe, J. F., M. A. Venkatachalam, D. B. Bernard, and N. G. Levinsky. 1978. Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: Structural-functional correlations. *Kidney Int.* **13**: 208-222.
- 34) Goligorsky, M. S., W. Lieberthal, L. Racusen, and E. E. Simon. 1993. Integrin receptors in renal tubular

- epithelium: New insights into pathophysiology of acute renal failure [editorial]. *Am. J. Physiol.* **264**: F1-F8.
- 35) Molitoris, B. A. and J. Maas. 1999. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am. J. Med.* **106**: 583-592.
- 36) Fanning, A. S., L. L. Mitic, and J. M. Anderson. 1999. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 1337-1345.
- 37) Zuk, A., J. V. Bonventre, D. Brown, and K. S. Martin. 1998. Polarity, integrin and extracellular matrix dynamics in the post-ischemic rat kidney. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* **275**: C711-C731.