

学位論文題名

補体制御膜蛋白質，麻疹ウイルスレセプター；MCP
(membrane cofactor protein；CD46) の構造と機能

学位論文内容の要旨

補体系は抗体依存的な古典的経路及び非依存的な第二経路により活性化し、脊椎動物の感染防御において抗体と共に主要な役割を果たしている。一方、血漿中での無秩序な活性化や自己膜上での活性化を制御し、補体系の活性化を異物表面上に限局する働きを担う補体制御蛋白群が存在する。C3/C5コンバーターゼに働く補体制御因子には、アミノ酸約 60 残基から成る Short Consensus Repeat (SCR) と呼ばれる共通した反復配列が見られ、遺伝子スーパーファミリーを形成している。これらの制御因子のうち、MCP (membrane cofactor protein; CD46) と DAF (decay-accelerating factor; CD55) は補体系に接するほとんどすべての細胞において発現が認められ、自己細胞を自己補体系から守る働きをしている。

また、最近 MCP が麻疹ウイルスのレセプターであることが明らかになった。筆者は MCP (CD46) の補体制御因子と麻疹ウイルスレセプターとしての機能部位の解析を進めてきた。以下にこれまでの研究成果について記す。

1. 補体制御効果における DAF との比較

MCP と DAF はともに 4 個の SCR ドメインを持つ制御蛋白であるが、その制御機構は異なり MCP が I 因子の cofactor として働き、C3b と C4b を不活性化するのに対し、DAF はコンバーターゼの分子集合体に作用し、その解離を促進する。また、両者の細胞膜への結合様式も異なり、MCP の膜貫通型に対し DAF は glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) を介して細胞膜に結合している。これまで、MCP と DAF に関して個々の機能及び作用機序については報告されているが、それぞれの補体制御における役割分担及び補体制御活性の比較は明らかでない。そこで MCP と DAF の細胞上での補体制御効果を比較した。

ヒト MCP、DAF 及び DAF の N 末端に MCP をつないだ MCP-DAF ハイブリッド分子 (MCP-DAF) をハムスター由来の CHO 細胞に stable に発現させた。また、MCP と DAF を両方発現させた CHO 細胞も作製した (MCP+DAF)。これら 4 種のトランスフェクタントを抗 CHO 抗体で感作したのち、ヒト血清を補体源として加え、古典的経路及び第二経路を介したヒト補体系による細胞傷害に対する抵抗性を比較した。その結果、MCP と DAF は共に古典的経路よりも第二経路を効率よく制御すること、古典的経路に対する制御効果は、MCP+DAF>DAF>MCP-DAF>MCP であり、第二経路に対する制御効果は、MCP-DAF>MCP+DAF>DAF>MCP であることが明らかになった。

2. MCP の3種のフェノタイプにおける機能の比較

MCP の細胞外領域は、4 個の SCR ドメインと糖鎖の結合したセリン-スレオニン (ST) に富む領域からなる。ST 領域は、ほぼサイズの等しい3つのエクソン (STA, STB 及び STC) によりコードされ、スプライシングの違いにより3種のフェノタイプ (STABC, STBC 及び STC) が種々の比率で発現している。筆者は、3種のフェノタイプを CHO 細胞に発現させ、フェノタイプ間における MCP の補体制御活性及び麻疹ウイルス感受性について検討した。

MCP の3種のフェノタイプ及び ST 領域を欠損させた変異体 (Δ ST) を CHO 細胞に発現させた。これら4種のトランスフェクタントにつき、補体制御効果を比較した。その結果、古典的経路に対する制御効果は、 $STC > \Delta ST > STBC = STABC$ の順で高かった。一方、第二経路に対する制御効果は、 $STABC \gg STBC > STC$ の順で高く、 ΔST には制御活性は見られなかった。

また、麻疹ウイルスの感受性は ST 領域の長さに反比例し、ST 領域の最も短いフェノタイプ (STC) と ST 領域欠損変異体の感受性は、ST 領域の長い他の2種のフェノタイプ (STABC, STBC) に比べ約 100 倍強かった。ここで見られた感受性の違いは ST 領域に付加した糖鎖がウイルスの細胞への取り込みを阻害することによるものと考えられた。

3. MCP の補体制御および麻疹ウイルス結合ドメインの解析

MCP の細胞表面上における補体制御活性ドメインと麻疹ウイルス結合ドメインを決定する目的で、各 SCR を1つずつ欠損させた変異体を CHO 細胞に発現させ、各変異体のトランスフェクタントについて、補体制御活性及び麻疹ウイルスの感受性を比較した。

各 SCR を1つずつ欠損させた変異体 Δ SCR1-4 を CHO 細胞に発現させた。補体制御活性は、細胞膜より可溶化した各分子の C3b と C4b に対する cofactor 活性と、補体系による細胞傷害の制御活性について解析した。どちらの場合も、 Δ SCR1 でのみ制御活性が見られ、 Δ SCR2, Δ SCR3 及び Δ SCR4 では制御活性は見られなかった。以上の結果より、MCP の補体制御活性 (cofactor 活性) には SCR2, 3 及び 4 が重要であると思われる。一方、麻疹ウイルスの感染は、 Δ SCR3 及び Δ SCR4 を発現した CHO 細胞で見られ、 Δ SCR1 及び Δ SCR2 を発現した CHO 細胞では見られなかった。以上の結果より、MCP の麻疹ウイルス結合ドメインは SCR1 と SCR2 であると思われる。さらに、10 種類の抗 MCP モノクローナル抗体のエピトープと cofactor 活性及び麻疹ウイルス結合の阻害効果について検討し、SCR2 を認識する M75 と M177 が cofactor 活性と麻疹ウイルス結合の両方を完全に阻害することを明らかにした。

4. MCP の膜貫通領域と細胞内領域の麻疹ウイルスレセプター機能における役割

次に、MCP の膜貫通領域と細胞内領域の麻疹ウイルスレセプター機能における役割について解析した。

MCP の細胞膜貫通領域 (TM) を DAF の GPI-anchor に置換した変異体 (MCP-PI), 及び細胞内領域を欠損させた変異体 (Δ CYT) を CHO 細胞に発現させた。このトランスフェクタントにつき麻疹ウイルス感受性を検討した。

その結果、 Δ CYT を発現させた CHO 細胞は麻疹ウイルスに感受性であった。一方、MCP-PI を発現させた CHO 細胞は麻疹ウイルスと結合したが、感染は見られなかった。以上の結果より、麻疹ウイルスの感染 (細胞内への取り込み) にはレセプターとの結合だけでは不十分で MCP を介した情報伝達が必要であること、またこの情報伝達には MCP の細胞内領域は必要ではなく、MCP の細胞膜貫通領域近傍に結合し情報を伝達する別の機能蛋白質が関与する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	長 澤 滋 治
副 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	助教授	加 藤 宏 幸
副 査	助教授	高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

補体制御膜蛋白質，麻疹ウイルスレセプター；MCP
(membrane cofactor protein；CD46) の構造と機能

補体系は生体防御に働く約20種類の血清蛋白質と数種類の膜蛋白質とからなる血液酵素系である。その主要な防御活性としては、侵入細菌の膜表面で連鎖的な酵素の活性化を進め、i；膜障害分子を構築する、ii；標的膜表面にC3bというフラグメントを多数結合させ、食細胞による貪食処理を促す、ことが挙げられる。

このように、補体系は細胞に障害を与える酵素系であるため、自己の細胞も攻撃する危険性を秘めている。しかし、自己の細胞膜での補体活性化は数種類の膜蛋白質によって制御されている。MCPと呼ばれる蛋白質もその一つで、C3転換酵素と呼ばれる分子集合型プロテアーゼの形成反応を阻害することが知られている。

一方、麻疹ウイルスはヒトとサルにしか感染しない。これは、麻疹ウイルスレセプターがこの2種にしか発現していないためである。最近、この麻疹ウイルスレセプターの探索研究が進められ、MCPが麻疹ウイルスレセプターであることが明らかにされた。

従って、MCPには補体制御活性と麻疹ウイルスレセプターの二つの活性部位が存在する可能性を示唆する。MCPは分子量5-7万の糖蛋白質で、その細胞外領域は、SCRと総称されるアミノ酸60残基からなるドメインが4個とセリントレオニンに富む領域(ST-領域)とから構成されている。ST-

領域の遺伝子には3種類(A, B, C型)があり, 蛋白レベルではABC, BC, C型の3種類が発現している.

申請者は, 遺伝子工学的な手法により種々のSCRを欠損したMCP変異体やSTアイソフォームをハムスター細胞(CHO細胞)に発現させ, 補体制御活性と麻疹ウイルスレセプター活性を解析した. その結果, 補体制御活性と麻疹ウイルス感染に関わるSCR部位が異なることや, ST-領域が両活性を調節することを明らかにした.

A) 補体制御因子としての機能部位

1) 補体制御に働くSCRドメインの解析

4個のSCRのうち, N-末端側のSCR1を削除しても補体制御活性には変化が見られなかったが, SCR2, 3, 4のどれ一つを欠いても補体制御活性が消失した. これは, 補体制御活性部位は, これら3種類のSCRから構成されていることを示唆する.

SCRに対する単クローン抗体を用いた解析では, SCR2に結合する単クローン抗体が最も強くMCPの補体活性を阻害した. これは, SCR2が補体制御活性部位の中心的な位置を占めている可能性を示唆する.

2) MCPの補体制御活性に及ぼすST-領域の効果

MCPの補体制御効果はST-領域の長さの影響を受け, ST-領域が最も長いST-ABC型のMCPが最も強く第二経路の活性化を阻害する活性を示した.

ST-ABC型のMCPはガン細胞に発現している場合が多い. これは, ガン細胞が第二経路を介した補体攻撃を回避する機構とも関連して興味深い知見である.

補体系には, 免疫複合体によって活性化が始動する古典的経路と呼ばれる経路もある. MCPは古典的経路も制御するが, ST-領域が長くなるにつれてその制御効果が弱まった.

B) 麻疹ウイルスレセプターとしての機能部位

1) 麻疹ウイルス感染とSCR

SCR1あるいはSCR2を欠損したMCPを発現したCHO細胞には麻疹ウイルスは感染できなかった. 一方, SCR3あるいはSCR4を欠損させても麻疹ウイルス感染には影響を与えなかった. これらの知見は, SCR1, 2の2ドメイ

ンが麻疹ウイルスの感染に必須な領域であることを示唆している。

2) 麻疹ウイルス感染とST-領域

ST-領域は麻疹ウイルス感染には必須ではなく、ST-領域を欠落させたMCPを発現したCHO細胞にも麻疹ウイルス感染が観察された。逆に、ST-領域の最も長いST-ABC型MCPを発現したCHO細胞では、麻疹ウイルスの感染効率が最も低かった。

以上、申請者はMCPの機能部位について、遺伝子工学、ウイルス学、免疫学の手法を駆使して広範囲な研究を行うことにより、MCPの補体制御活性や麻疹ウイルスレセプターの機能部位を明らかにした。

これらの知見は、基礎研究の立場から価値あるだけでなく、医薬品の開発の手掛かりを与える点でも大いに意義あるものである。以上、本研究の業績は博士(薬学)の学位に相応しい業績と評価できる。