

学位論文題名

霊長類の補体制御因子 Membrane Cofactor Protein(MCP,CD46)

—構造ならびに麻疹ウイルスレセプターとしての機能—

学位論文内容の要旨

[序論]

ヒト MCP (membrane cofactor protein, CD46) は生体内の有核細胞すべてに発現する膜蛋白で、プロテアーゼ I 因子による C3b/C4b 分解・不活性化反応のコファクターとして働き、自己細胞上での補体活性化を制御する。MCP は補体制御蛋白に共通な SCR を 4 個と O 結合型糖鎖で修飾されたセリン-トレオニンに富むドメイン (ST) から構成される細胞外領域の後に、膜貫通ドメイン (TM) と細胞質ドメイン (CYT) を連ねた I 型膜蛋白である。ST と CYT ドメインにはそれぞれ 3 種類 (ST^A, ST^B, ST^C) と 2 種類 (CYT1, CYT2) の多型が存在する。最近、MCP は麻疹ウイルス (MV) のレセプターとして機能するという報告がなされ、注目されている。

MV は霊長類に感染するにもかかわらず、ヒト以外の MV レセプターの構造は明らかにされていない。そこで、申請者はサル由来細胞株、Vero と B95a 細胞から MCP ホモログの cDNA を単離し、その蛋白構造ならびに機能解析を行ったので以下に報告する。

[結果]

1) Vero 細胞に発現する MCP ホモログの cDNA クローニングおよびその機能解析

はじめに、Vero 細胞の cDNA ライブラリーをヒト MCP cDNA をプローブとしてスクリーニングしたところ、33 個の陽性クローンが得られた。この中から選択した 1 つのクローン (V2, 1.3 kb) について全塩基配列を決定した。その予想される全一次構造はヒト MCP に高い相同性 (86%) を示すとともに、SCR, ST^C, TM, CYT2 に相当する各ドメインから構成されていた。

MV 感受性実験には Nagahata 野生株と CAM ワクチン株を用いた。どちらの MV 株も Vero-MCP cDNA を発現させたハムスター由来の CHO 細胞に感染した。その感染性はヒト MCP を発現させた CHO 細胞と同程度であった。次に、可溶化試料を用いて、I 因子によるヒト C3b の切断率を指標に補体制御活性を測定したところ、Vero-MCP はヒト MCP と同等の活性を示した。

2) B95a 細胞に発現する MCP ホモログの cDNA クローニングおよびその機能解析

次に、B95a 細胞から MCP ホモログの単離を試みたところ、89 個の陽性クローンを得た。そのうち、3 種類の cDNA クローン、B1 (1.7 kbp), B2 (3.0 kbp), B3 (1.3 kbp) について全塩基配列を決定した。これらの翻訳領域から予想されるアミノ酸配列をヒト MCP と比較したところ、比較的高い相同性 (76-80%) を示した。従って、得られた 3 種のクローンは MCP ホモログ (B95a-MCP) であると考えられた。B2 は ST^B 体をコードしていた。しかしながら、B1 と B3 クローンは共に SCR1 を欠損する MCP 分子種コードしていた。ヒトや Vero の MCP には SCR1 欠損体は存在しない。そこで、B95a-MCP の SCR1 領域について RT-PCR により解析したところ、SCR1 領域を含む mRNA は確認されたが、その発現量は SCR1 領域を欠損する mRNA と比較すると、約 1/10 と低かった。

まず、SCR1 欠損体と ST^B 体の B95a-MCP を発現させた CHO 細胞の MV 感受性について検討したところ、Nagahata と CAM 株は SCR1 欠損体の細胞に感染しなかった。また、SCR1 を含む

ST^B体の細胞が示すMV感受性はヒトやVeroのMCPを発現させたCHO細胞よりも低く、CAM株が、その細胞に極めて弱い感染性を示しただけで、Nagahata株は全く感染しなかった。しかしながら、本研究で用いたMV Nagahata野生株はB95a細胞自体には高い感染性を示すことから、B95aにMVレセプターとして機能する他のMCP分子種の存在が予想された。

そこで、先にB95a細胞から得られた陽性クローンのうち、未解析であった数種のクローンについて全塩基配列を決定したところ、新たにSCR1を含むST^C体をコードするクローンを得た。CAM株はこの分子種を発現させたCHO細胞に、ヒトやVeroのMCPを発現させたCHO細胞と同程度に感染したが、Nagahata株では高濃度で感作しても全く感染しなかった。なお、3種のB95a-MCP、SCR1欠損体、ST^B体、ST^C体はすべてヒトMCPと同様の補体制御活性を示した。

3) MVに対するMCPの結合部位の解析

Buchholzらにより提唱されたヒトMCP上のMV結合部位を構成するアミノ酸残基(Asp27, Lys29, Arg69, Asp70)がB95a-MCPではGlu27, Asp29, Pro69, Asn70に置換されていた。この置換によって、B95a-MCPはNagahata株のレセプターとして機能しない可能性が考えられた。そこで、それら4個のアミノ酸残基をヒトMCPのものに置き換えた3種のB95a-MCP変異体(SCR1*, SCR2*, SCR1-2*)を発現させたCHO細胞を作製した。NagahataとCAM株のヒトMCPを介した感染を阻害するmAb, M75とM177は共にwild-type(ST^C体)のB95a-MCPに結合しなかったものの、SCR1*とSCR1-2*変異体には結合した。また、3種の変異体はwild-typeと同様の補体制御活性を示した。

次に、3種の変異体を発現させたCHO細胞のMV感受性を比較したところ、いずれもCAM株にはwild-typeやヒトのMCPを発現させたCHO細胞と同程度に感染したが、Nagahata株では感染が認められなかった。また、MVの結合はCAM株においては見られたが、Nagahata株では認められなかった。一方、NagahataとCAM株のH蛋白の一次構造(617アミノ酸)を比較したところ、その相同性は約98%で、両者間で異なるアミノ酸残基は14個存在した。

[結論]

申請者は本研究で、ヒトと同じ旧世界ザルに属するアフリカミドリザル由来のVero細胞から単離したMCPホモログは構造上ヒトMCPに高い類似性を示すとともに、補体制御因子/MVレセプターとして機能することを明らかにした。また、旧世界ザルより下等な新世界ザルに属するマーモセット由来のB95a細胞から数種のcDNAを単離し、全一次構造を決定した。これらのドメイン構造はヒトMCPと同じSCRやST、CYTなどから形成されているが、その多くはSCR1を欠損するMCP分子種であり、MV感受性がSCR1欠損体では全く認められないことを明らかにした。しかし、このSCR1欠損体もSCR1を含むMCP分子種と同様に補体制御因子として働くことを見出した。一方、CHO細胞に発現させた各MCP分子種のMV感受性はMV株により異なり、CAM株には感受性を示すが、Nagahata株には感受性を示さないことを明らかにした。その一方、B95a-MCPのST^C体に置換導入した変異体でもNagahata株に対するレセプターとしての機能は回復しないことを明らかにした。

以上の知見は、B95a細胞に主に発現するMCPはMVレセプターとして機能しないSCR1欠損体であるが、SCR1を含むMCP分子種であってもその分子上にNagahata株のH蛋白との相互作用部位が存在しないため、MVレセプターとして機能し得ないことを示唆する。しかしながら、B95a細胞はNagahata株に対して非常に強い感受性を示すことから、マーモセットなどの下等な霊長類ではMCP以外の膜因子がMVに対する主要なレセプターとして機能している可能性を強く示唆する。現在、筆者のみならず他の多くの研究者がこの未知因子の解析を進めている。

[発表論文]

- Murakami, Y., Fukui, A., Seya, T., Ueda, S. and Nagasawa, S. (1999) *Int. J. Mol. Med.* 3, 25-32.
Murakami, Y., Seya, T., Kurita M., Fukui, A., Ueda, S. and Nagasawa, S. (1998) *Biochem. J.* 330, 1351-1359.
Murakami, Y., Seya, T., Kurita, M. and Nagasawa, S. (1996) *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1541-1545.

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 高 橋 和 彦
副 査 助 教 授 松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

霊長類の補体制御因子 Membrane Cofactor Protein(MCP,CD46)

—構造ならびに麻疹ウイルスレセプターとしての機能—

MCPはgp45-70やCD46とも呼ばれる補体制御分子で、霊長類の細胞膜に発現し、自己補体による細胞膜障害を制御している。

最近、ヒトMCPは麻疹ウイルスレセプターとしても機能することや、MCPはSCRと呼ばれる4個のドメインを有し、そのN-末端側から二つのSCR1、SCR2が麻疹ウイルス結合に重要なことが明らかにされている。しかし、アミノ酸60残基からなるSCR1、SCR2のウイルス結合部位の詳細については明らかでない。ヒトと同様にサルも麻疹ウイルス感受性の動物であるが、はたしてサルのMCPが麻疹ウイルスレセプターとして機能するかについては明らかでなかった。

本博士論文は、サルのMCPのクローニング並びにその麻疹ウイルスレセプターとしての機能を詳細に解析した研究成果を集大成したものであり、以下のような興味深い知見が紹介されている。

1 ; サル由来培養細胞のMCP遺伝子のクローニング

麻疹ウイルスの継代培養には、旧世界ザルに属するアフリカミドリザル由来の培養細胞 (Vero細胞) や新世界ザルに属するマーモセット由来の培養細胞 (B95a細胞) が用いられている。この両者から、MCPcDNAをクローニングし、ヒトMCPと80%以上の構造相同性のあることを明らかにした。特に、vero細胞のMCPの方がヒトMCPと高い相同性を示した。

2 ; マーモセットMCPの麻疹ウイルスレセプター機能

Vero細胞のMCPcDNAをハムスター細胞に導入し、そのMCPを強制発現させ、麻疹ウイルス感受性を検討したところ、Vero細胞MCPはヒトMCPと同じような麻疹ウイルス感受性を示した。一方、マーモセットのMCPを強制発現させた細胞では、麻疹ウイルス野生株のNagahata株は感染性を示さなかった。Nagahata株はマーモセット細胞自体に対しては高い感染性を示すところから、マーモセット細胞にはMCP以外の未知の麻疹ウイルスレセプターが発現している可能性を示唆する。

3 ; マーモセットMCPのアミノ酸残基改変による麻疹ウイルス感受性の回復実験

ヒトMCPのアミノ酸残基を順次置換させ、麻疹ウイルスとの結合に関与するアミノ酸残基を同定しようとする研究がヨーロッパで活発に進められている。この置換実験から、麻疹ウイルスとの結合部位に必須とされるアミノ酸残基が推定されている。マーモセットMCPにはこの必須アミノ酸残基の数が所が変異しているところから、これらの変異が麻疹ウイルス感受性を喪失させたと予想された。そこで、それらのアミノ酸をヒト型へ置換させたが、麻疹ウイルス感受性は回復しなかった。これは、麻疹ウイルスとの結合部位は数個のアミノ酸残基から構成されるのではなく、広い範囲が結合部位として関与している可能性を示唆する。

上記の研究成果は、麻疹ウイルスレセプターとしてのMCPの機能部位に関する研究領域において重要な知見であり、博士（薬学）の学位を受けるに値する業績と評価した。