

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 抗菌ペプチド L5 の免疫賦活作用

### および、その受容体候補分子カルレティキュリンの機能解析

氏名 奥山 由紀子

[研究の背景と目的] 自然免疫は、感染初期に発動される重要な生体防御機構であり、異物の貪食や抗菌物質による直接的な殺菌作用などがこれに含まれる。しかし、その詳細な分子基盤については不明な点が多い。

L5 ペプチド (L5) は、センチニクバエ由来抗菌ペプチド、ザーペシン B の活性中心を改変した KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub> という配列の合成ペプチドでアミノ酸 11 残基からなる。このペプチドは好中球を活性化して活性酸素を産生させる機能があり、その際、好中球表面の calreticulin (Clr) がペプチド受容体として G-蛋白経路のシグナル伝達に関与することが示されている (1)。修士課程において私は、自然免疫応答における Clr の関わりを吟味する目的で Clr 結合分子を検索し、分泌性の好中球顆粒蛋白である azurocidin が、内在性リガンドとして単球表面の Clr と結合し、単球によるサイトカイン産生を促進することを示した (2)。

博士課程においては、自然免疫応答における Clr の機能を、L5 との相互作用という観点から詳しく検討した。その結果、マウス腹腔に L5 を投与すると好中球が動員されて一過的に感染が防御されること、L5 は Clr を介してある種の細胞の細胞接着、凝集を誘導することが分かった。また、膜貫通ドメインのない細胞表面の Clr のアダプター分子候補の同定を試みたので、以下に報告する。

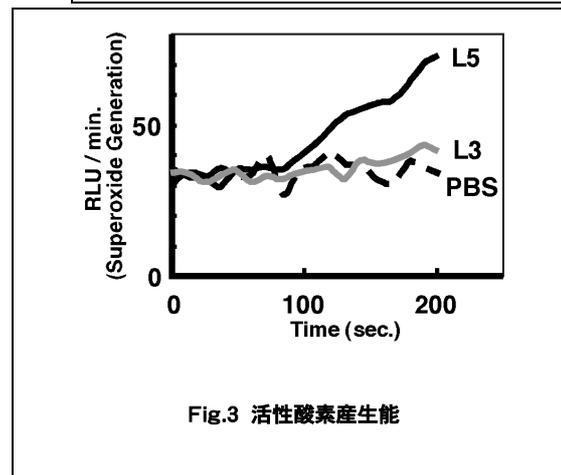
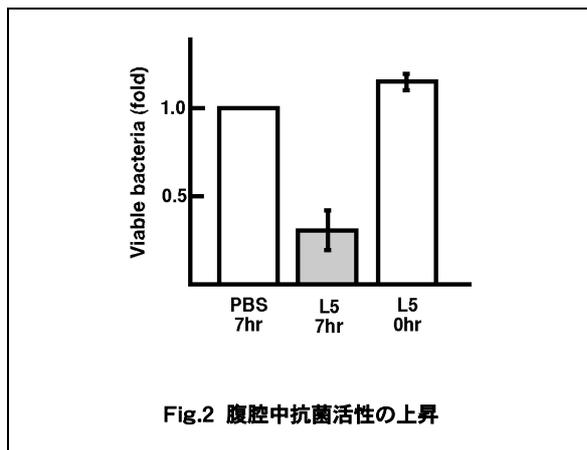
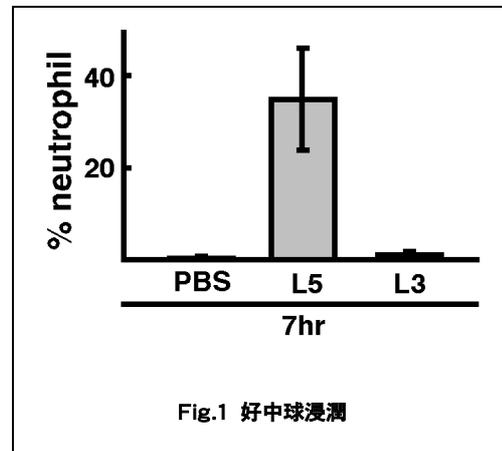
#### [L5 の感染防御効果]

マウス腹腔に毒性の高い *S. aureus* Smith 株を接種すると翌日には全例死亡するが、L5 を前投与しておくことで感染死の阻止が認められた。L5 よりも抗菌活性の高い同系のペプチド L3 にはこのような感染防御効果は見られなかった (Table 1)。また L5 の感染防御効果は、L5 投与後 7 時間を経過しなければ

ば十分発現しなかったので、ペプチド投与後7時間後に腹腔内でどのような変化が起きているかを調べた。その結果、1. 好中球の浸潤が起きること (Fig. 1)、2. 生菌接種により調べた腹腔内の殺菌活性が上昇すること (Fig. 2)、3. 腹腔内細胞の活性酸素産生能が上昇すること (Fig. 3)、が明らかになった。この結果から、L5 を投与すると好中球が腹腔内に遊走、浸潤し、そこで L5 により活性化されて活性酸素を産生するようになるかと考察される。

bacteria	peptide (ug/mouse)	mouse died		% of survival
		day1	2 5	
<i>S.aureus</i> Smith 2x10 <sup>6</sup> cfu/mouse	vehicle	4	0 0	0
	L5 (100)	1	0 0	75
	L3 (100)	4	0 0	0

Table 1. L5 腹腔内投与によるマウス感染死回避



#### [L5 を介する細胞接着および凝集]

L5 投与により腹腔内に好中球の遊走、浸潤が起きることが示されたが、この過程で L5 と種々の細胞との相互作用が想定された。そこで、L5 と細胞との相互作用を、ヒト単球系の THP1、ヒト中皮細胞系の CRL9444 (以上培養細胞)およびヒト血小板を用いて検討した。その結果、L5 により凝集が増強する細胞 (THP1 および血小板) と接着が促進する細胞 (CRL9444) があることが分かった。このような「細胞の動き」は L3 によっては誘導されなかった (Fig. 4, 5, 6)。L5 による「細胞の動き」の誘導に、細胞表面の C1r が関与するかどうかを、血小板を用いて解析した。その結果、抗 C1r 抗体により L5 により誘導される血小板凝集が明瞭に阻害されることが示された (Fig.7)。この結果より、腹腔に投与された L5 は C1r に結合して腹腔内の単球の接着や、腹腔をとりまく中皮細胞にある種の変化を引き起こし、それが引き金となって好中球の浸潤が起きるものと推測される。

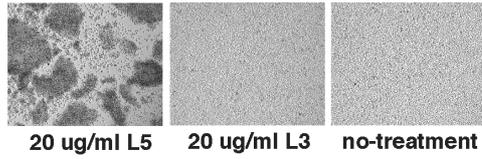


Fig.4 L5 による THP1 細胞凝集

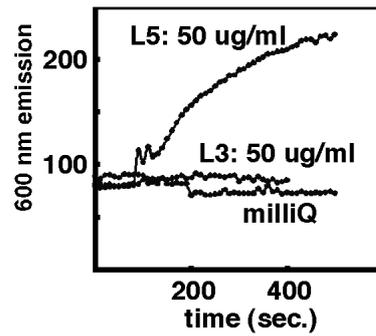


Fig.6 L5 による血小板凝集

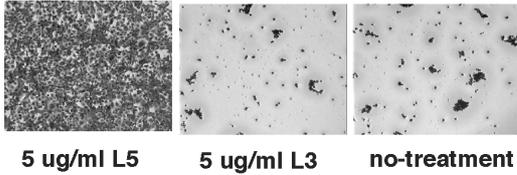


Fig.5 L5 による CRL9444 細胞接着

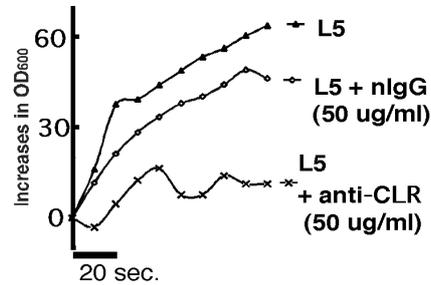


Fig.7 CLR による凝集阻害

[Clr から細胞内へ情報を伝える分子の検索と機能解析]

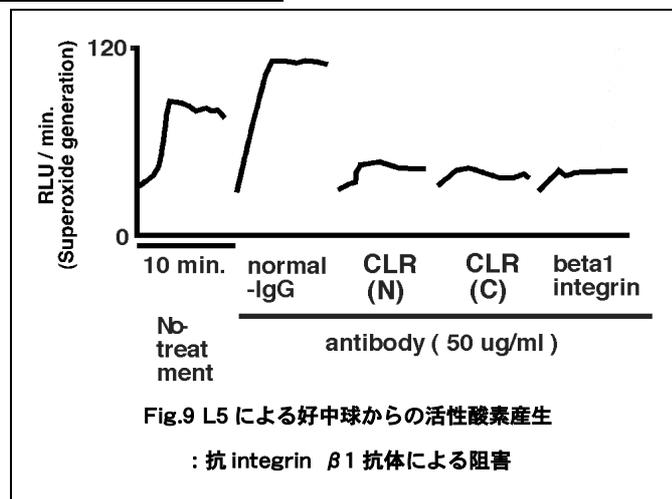
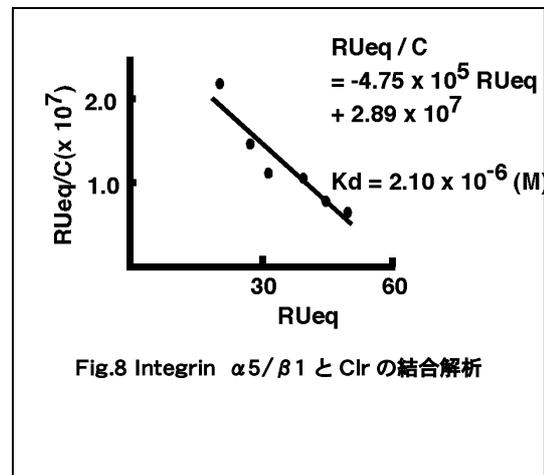
これまでの結果から、L5 が好中球の表面の Clr に結合すると、細胞内へシグナルが伝わり細胞が活性酸素を産生するようになることが分かっている (1)。おそらく単球、中皮細胞あるいは血

小板にも Clr を介したシグナル伝達機構が存在するものと予測される。しかし、Clr には膜貫通ドメインがないことから、受容体として機能するには膜貫通性のアダプター分子の存在が想定された。そこで、ヒト単球系培養細胞 U937 を用いてそのような結合分子の同定を試みた。U937 細胞の膜分画をクロスリンカー処理後、抗 Clr 抗体で免疫沈降し、共沈物をクロスリンカーがはずれる条件で電気泳動した。ついでゲルから共沈した蛋白のバンドを切り出し、トリプシン消化後得られたペプチドを質量分析した (LC/MS/MS)。得られた質量情報に基づき、データベースをサーチして Clr 結合蛋白の候補を得た。再現性をもって沈降し、免疫前抗体では沈降しない分子を候補とした (Table 2)。得られた 8 個の候補分子のうち、細胞膜貫通ドメインを持つものは EGFL (= epidermal growth factor like) 2, Notch 2 の 2 個であった。また細胞膜貫通ドメインを持たないが、 $\beta$ -integrin-like の EGF-like repeat をタンデムに 10 個保持する ITGBL (= integrin  $\beta$  like) 1 も共沈することが分かった。これらの結果を受けて、まず integrin について Clr の結合を確認した。方法は、integrin  $\alpha 5 / \beta 1$  を BIACORE のチップ上に固定化し、リコンビナント Clr をアナライトとして使用した。その結果、明瞭な結合が観察され、結合の  $K_d$  値は  $2.1 \times 10^{-6}$  (M) であった。この値は細胞表面の接着分子同士の結合の  $K_d$  値と同程度である (Fig. 8)。もし、integrin  $\beta 1$  が Clr のアダプター分子であった場合、integrin をブロックすると L5 からのシグナルもブロックされると考えられる。そこで、integrin  $\beta 1$  の抗体を用いて機能阻害実験を行った。その結果、抗 integrin  $\beta 1$  抗体が L5 による好中球活性酸素産生を阻害することが示された (Fig. 9)。この結果は、integrin が Clr のアダプター分子である可能性を示唆している。LC/MS/MS 分析の結果から、Clr は EGF-like domain と結合することが予想されたので、EGF-like domain と同じ構造を持つ recombinant human EGF と Clr の

結合を検討した。この場合にも結合が認められ、結合の  $K_d$  値は  $5.1 \times 10^{-6}$  (M)と算定された。おそらく細胞表面の Clr は EGF-like domain を持つアダプター分子を介して種々のリガンドからのシグナルを細胞内に伝える機能があり、integrin はそのような分子の一つだと考えられる。

Name	a.a.	Trans-membrane	EGF-like repeat
Notch2	2471	Yes	35
EGFL2	2923	Yes	8
ITGBL1	494	No	10
Nel-like 1	810	No	6
titin, cardiac muscle	26926	No	0
sperm associated antigen1	926	No	0
vWF prepropeptide	2813	No	0
down-regulated-in-metastasis	2785	Unknown	0

**Table 2. 免疫沈降、質量分析による Clr 結合蛋白候補の同定**



[まとめ]

合成抗菌ペプチド L5 の腹腔内投与により、*S. aureus* の感染が防御されることが分かった。L5 には好中球の活性化だけでなく、好中球の腹腔内動員や細胞接着、細胞凝集を誘起する活性があり、このような活性発現に細胞表面の Clr が重要な働きをしていることが示された。Clr には膜貫通ドメインがないので、アダプター分子を介して、シグナル伝達に働いているものと思われる。そのようなアダプター候補分子を Clr とのクロスリンクの有無を指標に検索し、複数の候補分子を得た。

(参考文献) (1) Cho JH, Homma KJ, Kanegasaki S, Natori S, *Eur J Biochem.*,1999, 266, 878-885. (2) Okuyama Y, Cho JH, Nakajima Y, Homma KJ, Sekimizu K, Natori S, *J.Biochem*, 2004, 135(2), in press (3) 奥山由紀子,名取俊二, 血液免疫腫瘍, 2002,7, 335-338.