九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Studies on the Molecular of Mechanism C3b Deposition on Microbes in the Horseshoe Crab Complement System

田川, 圭介

https://doi.org/10.15017/1441054

出版情報：九州大学, 2013, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

氏　　名：田　川　圭　介

論文題目：Studies on the Molecular Mechanism of C3b Deposition on Microbes in the Horseshoe Crab Complement Systen
(カブトガニ補体系における微生物への C3b 沈着の分子機構についての研究)

区　　分：甲

論　文　内　容　の　要　旨

生物は感染微生物から身を守るため、様々な生体防御機構を備えている。自然免疫は自己と非自己を認識し、感染微生物などの非自己を速やかに排除する役割を担っている。哺乳類の補体系は血漿中の３０種類以上のタンパク質から成る自然免疫である。その中心的な因子である補体 C3 因子が活性化されることにより、白血球による異物の貪食や膜攻撃複合体の形成などを引き起こす。C3 の活性化には以下の３種類の経路がある。異物に結合した抗体によって引き起こされる経路である古典経路、異物表面上の糖鎖を認識するレクチンと呼ばれるタンパク質によって引き起こされるレクチン経路、C3 因子の自発的な活性化経路である第二経路である。いずれの経路もセリンプロテアーゼカスケードであり、最終的に C3 の切断とその活性化断片である C3b の異物表面上への沈着を引き起こす。C3b の沈着は白血球による貪食や膜攻撃複合体形成の引き金となる。

一方、無脊椎動物の補体系の活性化機構の詳細は不明のままであった。本研究では無脊椎動物の補体系の活性化機構を明らかにするため、日本産カブトガニ（*Tachypleus Tridentatus*）をモデル生物として実験を行った。カブトガニは飼育が容易であり、大量の体液を採取できることから、補体系の分子機構の解明において優れた生物である。当研究室の有木らにより、カブトガニの体液凝固因子である Factor C がグラム陰性細菌の細胞壁成分である Lipopolysaccharide (LPS) を特異的に認識して活性化し、C3 の切断・活性化と C3b の細菌表面上への沈着を引き起こすことが報告されていた（参考図１）。しかし、グラム陽性細菌、真菌に対する C3b の沈着が観察されていたが、その詳細な機構は不明であった。

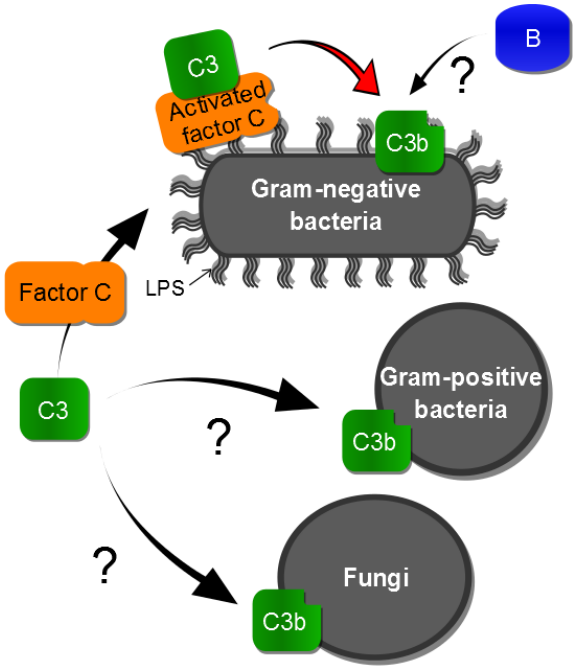
カブトガニの肝膵臓および筋肉より、機能未知のタンパク質である補体 TtC2/Bf-1 および TtC2/Bf-2 因子(以下、B1 または B2)をクローニングした。両者はともに N 末端から complement control protein (CCP) ドメイン、von Willebrand factor (VWF) ドメイン、セリンプロテアーゼ (SP) ドメインを有しており、哺乳類の補体 B 因子と同様のドメイン構造であった。また、特異抗体を用いたウエスタンブロットにより､両者はカブトガニの血漿中に発現していることが判明した。SP ドメインを有していることから､両者は血漿中の補体 C3 因子の活性化において重要な働きをしていると考え、さらに以下の実験を行った。

血漿にグラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌を加えると、B1 および B2 は Mg^{2+}依存的に限定分解

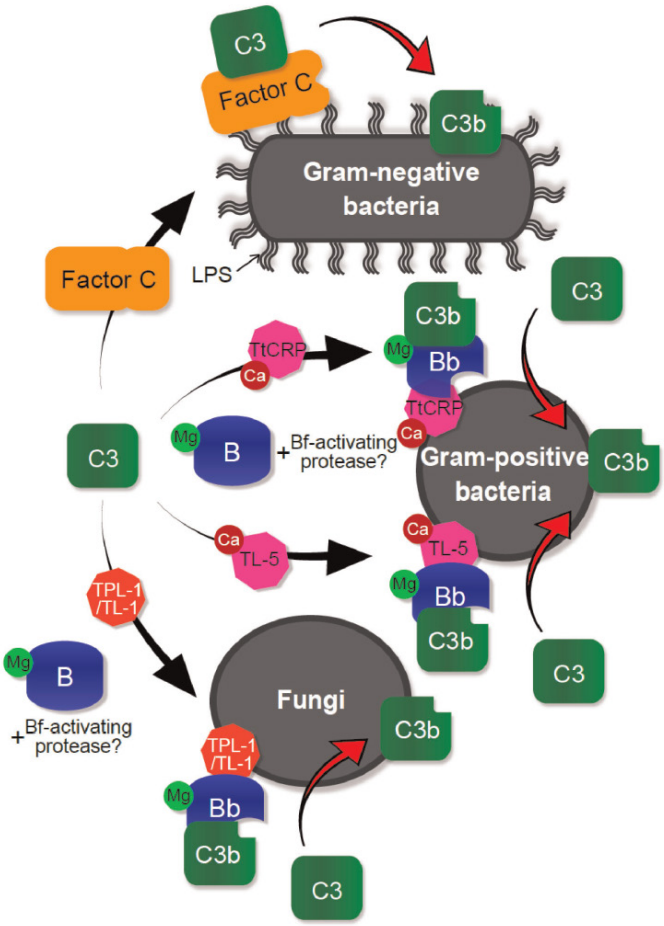
されることが明らかとなった。また、免疫沈降法により両者は血漿中で C3 と複合体を形成していることが判明した。さらにフローサイトメトリーにより C3b のグラム陽性細菌および真菌への沈着には Mg^{2+}が必要であることが判明した。以上のことから、カブトガニの血漿中にグラム陽性細菌および真菌を加えると、何らかのプロテアーゼによって B1 および B2 が活性化され、C3b の菌体表面上への沈着が引き起こされると考えられる。一方、グラム陰性細菌において B1 や B2 は必ずしも必要でないことが示唆された。

また、フローサイトメトリーにより、グラム陽性細菌への C3b の沈着には Ca^{2+}が必要であることが判明した。カブトガニの血漿中には Ca^{2+}要求性のレクチンが複数種存在することが知られており、それらがグラム陽性細菌への C3b 沈着に関与していることを示唆している。血漿に Ca^{2+}要求性レクチンである TtCRP-1 や TL-5A に対する抗体を加えたところ、グラム陽性細菌への C3b の沈着が阻害されたことから、これら 2 種類のレクチンがグラム陽性細菌への C3b の沈着に必要であることが判明した。また、TL-1 に対する抗体は真菌における C3b の沈着において重要であった。

以上より、カブトガニでは感染微生物の種類によって異なる因子の働きにより C3b の活性化と菌体表面上への沈着が引き起こされることが判明した（参考図２）。



参考図１：グラム陰性細菌における
カブトガニ補体 C3 因子の
活性化機構



参考図２：グラム陽性細菌、真菌における
カブトガニ補体 C3 因子の活性化機構