◆ 総 説 ◆

自然免疫の一翼を担うフィブリノーゲン様ドメイン含有 タンパク質ファミリーの構造と生理機能

極 檀 聡 太 郎*, 嘉 悦 洋, 水 口 純, 岩 永 貞 昭

Structure and physiological function of proteins with fibrinogen-like domain,
involved in innate immunity

Soutaro GOKUDAN, Hiroshi KAETSU, Jun MIZUGUCHI, and Sadaaki IWANAGA

フィブリノーゲン（フィブリン）の存在は、そのゾルゲル変換という視覚的にも明らかな特徴により、歴史的にも古くから知られていたが、実際にヒト血漿から精製され、構造研究が盛んになったのは 1950 年代後半である。その後、種々の動物からフィブリノーゲンが精製・解析されると、フィブリノペプチドが分子進化の一例として極めてユニークであることなども判った。一方、技術の進歩に伴い、タンパク質レベルに加えて遺伝子レベルの解析が可能になると、あらゆる生物から新規分子の発見や構造解析のラッシュが始まり、これらの中にフィブリノーゲン様の構造を持つものが続々と同定された。それらの機能解明はこれからであるが、驚くべきことに、機能の解っているもののほとんどは血液凝固ではなく、自然免疫や血管新生、発生分化など、実に多様な機能に携わっている事が判明した。この様に、これまで凝固因子の代表と認識されてきたフィブリノーゲン分子であるが、その構造を持つものが多数発見されたことにより、フィブリノーゲン様ドメインは、多細胞動物界全般に普遍的に存在する、新たな構造・機能ドメインとして再定義できよう。この古くて新しい概念であるフィブリノーゲン様ドメインについて、本稿では、主に自然免疫の一翼を担うファミリーであるフィコリンとタキレクチンを中心に解説する。

Key words: innate immunity, fibrinogen-like domain, ficolin, tachylectin-5, lectin pathway, opsonin, carbohydrate recognition domain

はじめに

フィブリノーゲンは、ヒト血漿中に通常 2.5

～ 3.0mg/mL の濃度で存在する約 340kDa の糖タンパク質で、不溶性フィブリン凝塊への変換および血小板凝集への関与などを介して、血液

略 語

FREPs	: fibrinogen-related proteins	MBL	: mannose-binding lectin
GlcNAc	: <i>N</i> -acetylglucosamine	MASP	: MBL-associated serine protease
LPS	: lipopolysaccharide	GBL	: glucose-binding lectin
SLE	: systemic lupus erythematosus	CRD	: carbohydrate recognition domain
GalNAc	: <i>N</i> -acetylgalactosamine	TL5A	: tachylectin-5A
Sia-LacNAc	: neuraminic acid (α 2-3)	TL5B	: tachylectin-5B
	<i>N</i> -acetylactosamine		

* (財)化学及血清療法研究所, 血液製剤研究部 [〒 860-8568 熊本市大窪 1-6-1]

The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, KAKETSUKEN [1-6-1, Okubo, Kumamoto, 860-8568, Japan]
Tel: 096-344-2183 Fax: 096-344-9234 e-mail: gokudan@kaketsuken.or.jp

図1 フィブリノーゲンの電子顕微鏡像と結晶構造

図aは、ヒトフィブリノーゲンの電子顕微鏡像 (回転投影画像解析像)。スケールバーは、50nm。図bは、図aの電子顕微鏡像の輪郭をトレースし、イメージ化したもの。“D”と“E”はそれぞれD領域とE領域を示す。フィブリノーゲンの全体像はヤジロベエに似ている。

図c, dはウシフィブリノーゲンの結晶構造。青はA α 鎖、緑はB β 鎖、赤は γ 鎖を表す。A α 鎖、B β 鎖、 γ 鎖が、それぞれジスルフィド結合で結合したモノマー (A α -B β - γ) が、中央のE領域で、それぞれのアミノ末端同士で結合したダイマー (A α -B β - γ)₂を構成している。“CH₂O”は糖鎖。“ β hole”は β 鎖のカルボキシル末端に存在する空間で、“pocket b”とも呼ばれる。そこには、フィブリノペプチドBが限定分解された後に新たに出てくる構造のbノブ (B knob; Gly-His-Arg) が結合する。 γ holeは γ 鎖のカルボキシル末端に存在する空間で、そこには、フィブリノペプチドAが限定分解された後、新たに出てくる構造のaノブ (A knob; Gly-Pro-Arg) が結合する。この“ γ hole”は“polymerization pocket a”, または“pocket a”とも呼ばれ、本文中では、こちらの呼称を用いている。図cとdは、それぞれ見る角度を90度回転させたもの。(図a, bは文献2より転載許可取得。図c, dは文献3より転載許可取得“Copyright (2004) National Academy of Sciences, U.S.A.”.)

凝固反応で中心的役割を果たしている¹⁾。

フィブリノーゲンは、3種のサブユニット、A α 、B β および γ 鎖が対になって構成され、その全体像は、3個の球状の単位が、2本の棒で連結されたかたちをとる (図1)^{2), 3)}。この球状の単位のうち、中央に位置するものをE領域、両端をD領域、棒の部分をコイルドコイル領域と呼ぶ。このうちD領域は、主としてB β 鎖と γ 鎖がそれぞれ独立して折りたたまれた部位に相当し、この領域には、フィブリノーゲンがフィブリン凝塊を形成する際に重要な、pocket a (γ hole) や pocket b (β hole), および活性化XIII因子によりクロスリンクされるアミノ酸残基がある³⁾。

このD領域を形成するB β および γ 鎖のカルボキシル末端側領域は、互いに一次および三次構造上、高い相同性を有しており、この領域は“フィブリノーゲン様ドメイン”ともよばれる。近年、自然免疫や血管新生、発生分化に関与する数多くの機能分子群が、フィブリノーゲン様ドメインを含むことが明らかにされている。

そうした機能分子群のなかで、フィコリンはフィブリノーゲン様ドメインとコラーゲン様ドメインをもつタンパク質であり、哺乳類からホヤにいたる広範な動物種に、組織特異的に複数種、見出されている^{4), 5)}。このフィコリンファミリー各々の構造、機能および生理的意義については、未だ不明な点が多いが、ヒトおよびホ

表1 フィブリノーゲン様ドメイン含有タンパク質の代表例*1

動物種	名称とドメイン構造の概略*2	タンパク質の名称	質量数*3	推定される主要発現組織	結合物質	推定される生理的機能
ヒト (<i>Homo sapiens</i>)		Ficolin				
		Ficolin/P35	31kDa (1) 35kDa (2) 320kDa (3)	肝臓	GlcNAc エラスチン コルチコステロイド	オプソニン 補体活性化
		博多抗原	30kDa (1) 35kDa (2) 650kDa (3)	肝臓 肺	GlcNAc GalNAc フコース	補体活性化
		Ficolin/P35-related protein	33kDa (1)	肺臓	GlcNAc	?
	Angiopoietins				
		Angiopoietin-1	70-75kDa (3)	心内膜 (心臓形成時) 血管内皮細胞の 間充織細胞 (血管発生時)	TIE-2*2	血管新生
		Angiopoietin-2	70-75kDa (3)	卵巣, 胎盤, 子宮 (血管新生の盛んな組織)	TIE-2*2	血管新生
		Tenascin*4
	Tenascin-C	210-300kDa (2)	上皮周辺緻密間質 (発生期) 間質 (組織修復/再生時) 癌間質	ヘパリン インテグリン	細胞接着 の調節
		Tenascin-X	over 400kDa (1)	精巣, 骨格筋, 心筋, 平滑筋 (胎児期)	?	コラーゲン沈着 の調節
		Tenascin-R	160/180kDa (1)	オリゴデンドロサイト (胎児期後半から新生児期)	?	ニューロンと グリアの接着
		p190	190kDa (2)	主に脳組織 [他に卵巣, 膀胱, 大腸 肺, 心臓, 小腸, 精巣]	コンタクトチン	ニューロンと グリアの接着 (有髄神経の形成)
	Caspr (contactin-associated transmembrane receptor)				

ハリネズミ (<i>Echinococcus europaeus</i>)	*5 Erinacin	1000kDa (4) ($\alpha_0\beta_{10}$)	毒へびの出血因子 のインヒビター
	subunit α subunit β	? ? ?
ホヤ (<i>Halocynthia roretzi</i>)	Ficolins	p40 (AsFCN1) 35kDa (1) 40kDa (2) 180/240kDa (3)	肝臓 N-アセチル基 + ヒラノース環 補体活性化?
	p50 (AsFCN3) 38kDa (1) 50kDa (2) 150/300/450kDa (3)	肝臓 GlcNAc ?
巻貝 (<i>Biomphalaria glabrata</i>)	FREPs	FREP1~15 [fibrinogen -related proteins] 43-56kDa (1) 65kDa (3)	? フコース 生体防御物質 [感染時に 高発現]

シヨウジョウバエ (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Scabrous	84kDa (1)	エンドソーム ? 粗神経形成 過程に関与

カブトガニ (<i>Tachyleus tridentatus</i>)	Tachylectin-5	Tachylectin-5A 31kDa (1) 40-42kDa (2) 72-74kDa (3) 210/300kDa (4)	小腸 心臓 N-アセチル基 自己非自己認識 抗菌活性増強
	Tachylectin-5B 33kDa (1) 41kDa (2) 72kDa (3) 160kDa (4)	顆粒細胞 N-アセチル基 自己非自己認識 抗菌活性増強

*1 ほかに, フィブリノーゲン様ドメインをもつタンパク質は, 脊椎動物ではMAP (microfibril-associated glycoprotein), FGL (fibrinogen-like protein), intelectinが, 無脊椎動物ではsialic-acid binding lectin (slug) が知られる. また, ウニからも, フィブリノーゲン様の配列を持つ遺伝子が固定されている.

*2 FBG, fibrinogen-like domain; CL, collagen-like domain; CC, coiled-coil domain; EGF, epidermal growth factor (EGF)-like domain; FN3, fibronectin type III modules; DISK, discoidin/factor V homology region; NRX, neuroxin-like domain; PGY, glue domain containing PGY repeats; TMD, transmembrane domain; PRO, proline-rich domain; IgSF, immunoglobulin superfamily;

*3 括弧内は分析法: (1), cDNA analysis; (2), SDS-PAGE reduced; (3), SDS-PAGE non-reduced; (4), gel filtration; (5), mass spectrometry

*4 Tenascin については, まとまった総説があるので参考されたい. (坂倉昭好, 日下部守昭: 生化学 72:365-372, 2000.)

*5 表中のドメイン構造はsubunit β のもの. subunit α の全アミノ酸配列は不明であるが, 部分アミノ酸配列から, カルボキシル末端にフィブリノーゲン様ドメインをもつことがわかつている.

や血清中に存在するフィコリンは、**レクチン活性**^{脚注1)}を示し、自然免疫系との関連が示唆されている。また、無脊椎動物であり、かつ進化的に哺乳類から程遠い位置にあるカブトガニの血清レクチンにも、フィブリノーゲン様ドメインを含むものが見出されており⁶⁾、これも感染防御において重要な役割を果たしている(表1)。

ほかにも、発生分化や、組織の修復、再生期などにおいて多彩な生理機能をもつことで知られている細胞外マトリクスタンパク質のテネイシンファミリー⁷⁾、血管新生に関与する**アンジオポイエチン**⁸⁾⁻¹⁰⁾、脚注2)、淡水性巻貝の感染防御因子であるFREPs (fibrinogen-related proteins)^{11), 12)}、ショウジョウバエの個眼の発達に関連するScabrous¹³⁾などが、フィブリノーゲン様ドメインを有している(表1)。それぞれは生理機能面で異なる成分であるが、いずれも機能を発現する上で、フィブリノーゲン様ドメインを介して結合物質を認識すると考えられている。すなわち、フィブリノーゲン様ドメインは分子間認識に関与すると推定される。

本稿では、数多くのフィブリノーゲン様タンパク質(ゲノム情報から、ヒトでは少なくとも26種類存在する¹⁴⁾)のなかから、特に自然免疫系に関連するものに焦点を絞り、それらの構

造と生理機能について概説する。

1. フィコリン

フィコリンは、コラーゲン様とフィブリノーゲン様の、2つのドメインを構造上の特徴とするタンパク質で、最初、ブタ子宮細胞膜上のトランスフォーミング増殖因子結合タンパク質として精製された^{15), 16)}。その後、ヒトとマウスから、最近では、ホヤのような原索動物からも、同様のドメイン構造をあわせもつ成分が同定されている^{5), 17), 18)}。現在、こうしたドメイン構造を含むタンパク質は、フィコリンファミリーと呼ばれている⁴⁾(表1, 図2)。

このうち、ヒトでは“フィコリン/P35”のほか、“フィコリン/P35 関連タンパク質”、および“博多抗原”という3種が同定されている。これら3種のフィコリンのうち、血清に存在するフィコリン/P35と博多抗原は、初期感染防御に関与している⁴⁾。また、最近報告されたホヤ体液のフィコリンも、ヒト血清フィコリンと同様の生理機能を果たすることが明らかにされつつある⁴⁾。これら以外の脊椎動物においても、例えば、**ハリネズミ**¹⁹⁾、脚注3)、**アフリカツメガエル**²⁰⁾において、複数種のフィコリンが同定

脚注1) レクチンは、狭義には「酵素や抗体を除く、多価の糖結合性タンパク質、もしくは糖タンパク質」を意味してきたが、その一部には、酵素活性をもつものもあるほか、免疫グロブリンスーパーファミリー様構造をもつレクチンも存在するなど、多くの例外があることがわかり、現在は柔軟に解釈されている。また、多価であるという点についても、いまや絶対的なものではない。レクチン活性とは、古くから、ヒトやヒツジなどの赤血球を凝集する活性の有無を指標としていることが多く、本稿ではこれに準ずる。

脚注2) アンジオポイエチンとは、血管内皮細胞上の受容体型チロシンキナーゼであるTIE2のリガンドとしてクローニングされた分子で、現在、アンジオポイエチン-1と-2の2種がよく知られ、いずれもカルボキシル末端側にフィブリノーゲン様ドメインを含む。TIEは、チロシンキナーゼの網羅的クローニングにより、1992年に発見された分子で、免疫グロブリンスーパーファミリーとEGF様ドメインをあわせもつチロシンキナーゼ(Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains)であることから、TIEと命名された。TIEには、TIE1とTIE2があるが、これらのノックアウトマウスによる研究や異常症の発見から、血管新生に関与することがわかっている。アンジオポイエチンのノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの解析から、アンジオポイエチン-1と-2は、それぞれTIE2のアゴニストとアンタゴニストとして、機能していると考えられている。アンジオポイエチン-1、-2以外に、その構造ホモログが数種クローニングされているが、機能は不明であった。最近になって、これらのうちの一つであるアンジオポイエチン様増殖因子(AGF, angiopoietin-related growth factor)が³⁾、血管新生や創傷治癒に関与することが発表された。(尾池雄一: バイオサイエンスとインダストリー 62: 36-37, 2004., Oike Y *et al*: Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood in print*.)

脚注3) ハリネズミの筋肉組織から単離されたerinacinは、毒ヘビ、*Bothrops jararaca*、の出血因子のインヒビターとしてはたらくメタロプロテアーゼインヒビターである。このタンパク質は、 α および β の2種類のサブユニットから構成されるが($\alpha_{10}\beta_{10}$)、それぞれのサブユニットは、コラーゲン様とフィブリノーゲン様の2つのドメイン構造からなり、フィコリンに類似している¹⁹⁾。

図2 フィコリンのドメイン構造の構成と構造モデル

フィコリンの構造を理解するためには, 機能的類似成分であるマンノース結合レクチン (mannose-binding lectin: MBL) を説明に加えるとわかりやすい。MBLは, オプソニン機能とレクチン経路による補体系の活性化能をもち, 自然免疫の担い手として認知されている **C型レクチン**^{脚注4)}で, コラーゲン様ドメインと糖鎖認識領域 (CRD, carbohydrate recognition domain) からなり, フィコリンとドメイン構造がよく似ている。MBLはカルボキシル末端側に CRD をもつ一方で, フィコリンはフィブリノーゲン様ドメインをもつ。フィコリン/P35は, 3分子のサブユニットがコラーゲン様ドメイン上の結合を介してトリプルヘリックスを, カルボキシル末端側領域はフィブリノーゲン様ドメインによる球状の構造を形成している。そして, アミノ末端側のジスルフィド結合を介して4量体を構成する。(文献4を参考に作成)

されている。このようなフィコリンファミリーのうち, 自然免疫と関連している, ヒトおよびホヤのフィコリンについて, 以下に詳述する。

1. ヒトのフィコリン

1. 1. 1. フィコリン/P35

フィコリン/P35は, ヒト血清をマンナン固定化カラムに添加し, GlcNAc (N-acetylglucosamine) で溶出した画分から発見された糖タンパク質であり, SDS-PAGE の還元下で 35kDa, 非還元下で 320kDa を示すが²¹⁾, これは本成分が, 12個のサブユニットから構成されるためである。P35という名称は還元下の質量数に由来し, cDNA 解析によると, このサブユニットは 313 アミノ酸残基からなる²¹⁾。このサブユニットは, アミノ末端側よりシステインを含んだ 12 アミノ酸残基の短いセグメントの後, 2個の Gly-Xaa-Yaa 繰り返し構造, 6 アミノ酸残基のギャップを経て, 再び 15 個の Gly-Xaa-Yaa の繰

返し構造を含むコラーゲン様ドメイン, 次のでネックとよばれる短いセグメントと連なり, さらにカルボキシル末端側にヒトフィブリノーゲン β あるいは γ 鎖のカルボキシル末端側と約 35% の相同性をもつフィブリノーゲン様ドメインを含む。以上の構造をもつサブユニットが 3つ, アミノ末端側のシステイン残基を介してジスルフィド結合し, この3量体がさらに分子間ジスルフィド結合をすることで, 計12のサブユニットからなる4量体を形成しているという^{4), 17)} (図2)。

フィコリン/P35の産生臓器は主に肝臓である。また, 大腸菌に結合するタンパク質“L-フィコリン”としても知られているほか²²⁾, ヒト血清中のエラスチン結合タンパク質として報告された“EBP-37”²³⁾や, コルチコステロイド結合タンパク質の“Hucolin”²⁴⁾も, フィコリン/P35と同一であると考えられている。フィコリン/P35はGlcNAcを特異的に認識するレクチ

ン活性を示し、これにより GlcNAc を非還元末端にもつリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) を有する細菌 (例: *Salmonella typhimurium*) を認識して結合する。フィコリン/P35 は、このように細菌表層の糖鎖に直接結合することでオプソニンとして機能する²¹⁾ ほか、補体レクチン経路活性化能をもつことが明らかにされている⁴⁾ (後述)。また、最近、フィコリン/P35 がグラム陽性菌の表層成分であるリポテイコ酸に直接結合し、補体レクチン経路を活性化することが報告された²⁵⁾。

1. 1. 2. 博多抗原 (Hakata antigen)

博多抗原は、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) の患者血清から、自己免疫抗原として博多の地で同定されたことから命名された²⁶⁾。その後、cDNA の解析により、フィコリンファミリーに属するタンパク質であることが判明した²⁷⁾。博多抗原は、肺組織、肝臓で生合成され、産生量は肝より肺が多い。組織染色では、気管支上皮細胞のほか、II 型肺胞上皮細胞、胆管上皮細胞と肝細胞で染色され、肺胞液や胆汁に分泌されると考えられている²⁸⁾。

博多抗原は、“H-フィコリン”または“ β 2 thermolabile macroglycoprotein”ともよばれる²⁹⁾。275 アミノ酸残基からなる糖タンパク質で、血清中濃度は 7 ~ 23 $\mu\text{g/mL}$ である。還元下で 35kDa を示すが、血清中では主として 650kDa の 18 量体 (3 分子 $\times$ 6) で存在する^{27), 29)}。また、フィコリン特有のドメイン構造をもつ博多抗原は、フィコリン/P35 ならびにフィコリン/P35 関連タンパク質に対し、約 48% の配列相同性を示す。コラーゲン様ドメインには、11 個の Gly-Xaa-Yaa 繰り返し構造があり、5 個のヒドロキシプロリンを含んでいる²⁹⁾。フィブリノーゲン様ドメインは、ヒトフィブリノーゲン β あるいは γ 鎖のカルボキシル末端側と約 30% の相同性があり、グルコサミン、ガラクトース、マンノースおよびフコースを含む複合型糖鎖が 1 箇所結合している。フィコリン/P35 と同様、

レクチン活性を示し、GlcNAc のほかに GalNAc (N-acetylgalactosamine) とフコースを認識する。フィコリン/P35 と同様、これらの糖鎖構造を表層にもつた細菌と結合することが確認されているほか、レクチン経路により補体系を活性化する³⁰⁾。

稲葉と大河内らの調査によると、日本人およびスウェーデン人の 99.9% 以上は博多抗原を有しているが、まれに博多抗原をもたず、これに対する抗体を保有する人もいるという。その病態との関連は未だ不明であるが、SLE 患者の 4.3% および他の自己免疫疾患患者の 0.3% に、この博多抗原に対する抗体が確認されている³¹⁾。先に述べたように、現在まで多種多様な生物種から数多くのフィコリンが同定されているが、具体的に病態との関連について直接考察した報告はほとんどなく、今後の研究が望まれる。

1. 1. 3. フィコリン/P35 関連タンパク質

フィコリン/P35 関連タンパク質は、肺や好中球、単球で主に生合成される。その cDNA 塩基配列は明らかにされているが、いまだタンパク質として単離されてない³²⁻³⁴⁾。前述のフィコリン/P35 とアミノ酸レベルで 80% の相同性があり、両者は第 9 染色体、9q34 にコードされ、エクソン-イントロン構造はよく保存されている。主な違いはコラーゲン様ドメインにあり、フィコリン/P35 関連タンパク質は、Gly-Xaa-Yaa の繰り返しが 21 個と、フィコリン/P35 より 4 個多い。フィコリン/P35 関連タンパク質のフィブリノーゲン様ドメインは、ヒトフィブリノーゲン β と γ 鎖のカルボキシル末端側と約 37% の相同性がある。本成分は血清には無く、細胞膜上にあるという説³⁵⁾ もあり、今後の詳細な研究が待たれる。フィコリン/P35 関連タンパク質は、別名 “フィコリン-1”³³⁾ または “M-フィコリン”³⁴⁾ と呼ばれることがある。

表2 ヒトおよびホヤの補体系活性化に関わるレクチン群

動物種	タンパク質の名称	質量数 (native form)	補体成分 活性化能*
ヒト	フィコリン		
	フィコリン/P35	35kDa (320kDa)	有り
	博多抗原	35kDa (650kDa)	有り
コレクチン	MBL (mannose-binding lectin)	31kDa (200-600kDa)	有り
ホヤ	フィコリン		
	p40 (AsFCN1)	40kDa (180/ 240kDa)	有る可能性大
	p50 (AsFCN3)	50kDa (150/ 300/ 450kDa)	未調査
C型レクチン	GBL (glucose-binding lectin)	36kDa (70/ 140/ 210kDa)	有り

* MASPと複合体を形成し, かつ補体成分C3を活性化することを指標にしている.

1. 2. ホヤ (Ascidian) のフィコリン

見城らは, マボヤ (solitary ascidian) 体液から GlcNAc 固定化カラムを用いて, 分子量の異なる p40 と p50 の2種の成分を同定し, cDNA 解析により, それらはコラーゲン様とフィブリノーゲン様ドメインをあわせもつフィコリンであることを明らかにした⁵⁾. カルボキシル末端側にあるフィブリノーゲン様ドメインは, 哺乳類のフィコリンと 45.4 ~ 52.4% の相同性をもつ. 一方, コラーゲン様ドメインは Gly-Xaa-Yaa の繰り返しで5個で, 哺乳類フィコリンのものと比して短い. また, p40 と p50 は還元条件下において, それぞれ 40kDa と 50kDa を示すが, 非還元下では, p40 が 180kDa および 240kDa, p50 が 150kDa, 300kDa および 450kDa を示し, これらは他の生物種のフィコリンと同様, それぞれのサブユニットがジスルフィド結合した多量体であった. p40 と p50 は, とともに GlcNAc を認識するレクチン活性を示すが, p40 は GlcNAc 以外にも, GalNAc, Sia- LacNAc (neuraminic acid (α 2-3) N-acetyllactosamine) と結合する⁵⁾. 様々な糖タ

ンパク質, およびウシ血清アルブミンに任意の糖鎖を結合させた“ネオ糖タンパク質”を用いた結合特性の解析によると, p40 の結合活性には N-アセチル基とピラノース環の存在が重要であるという⁵⁾.

一方, 補体成分の“C3”や, “C3 レセプター”, “B 因子”, マンノース結合レクチン (mannose-binding lectin, MBL) と複合体を形成して補体系活性化に寄与する“MASP (MBL-associated serine protease)”のホモログも, マボヤ体液中に存在している. それらが原始的な補体の第二経路とレクチン経路を構成し, 異物排除システムとしてはたらいっていると推測されている³⁶⁾. この中で, MASP は C3 を活性化し, そのレクチン経路は感染防御機構として機能すると推定されるが, MBL のホモログは未だ同定されてない. また, フィコリン p40 や p50 とは別に, グルコース結合レクチン (glucose-binding lectin, GBL) が見出されており, MASP と複合体を形成することが示されている³⁷⁾. GBL は MBL と同様, CRD (carbohydrate recognition domain) をもつ C 型

図3 補体系の進化の概略図

獲得免疫 (acquired immunity) は、脊椎動物のなかでも、サメなどの軟骨魚類以降に出現した高等動物にみられる。補体系の活性化経路は、古典経路と第二経路、レクチン経路の3つがあるが、古典経路は、免疫グロブリンを必要とする経路であり、獲得免疫をもたない動物には存在しない。これらの補体活性化経路全てにおいて、C3は中心的な役割を果たす成分であるが、これは無脊椎動物であるウニやホヤなどにも存在する。これらの動物種には、補体第二経路において、C3をC3aとC3bに変換する成分であるB因子のホモログも存在している。ホヤでは、レクチン経路を介して補体系を活性化するMASPやフィコリン、MBLに似た機能をもつglucose-binding lectin (GBL)が同定されており、レクチン経路は、少なくともホヤなどの原索動物が出現する前から存在したと考えられる。(文献38より転載許可取得)

レクチン (C-type lectin)^{脚注4)}であるが、オプソニン作用を示さず、コラーゲン様ドメインもない。ホヤフィコリンであるp40も、MASPと複合体を形成して、C3を直接活性化するといわれており、p40とGBLは生体防御レクチンとして機能するという(表2)³⁸⁾。

ヤツメウナギからも“MASP”のホモログ³⁹⁾、また、ムラサキウニから“C2/Factor B”様の配列を含む成分、さらに“C3”のホモログが同定されている⁴⁰⁾ことも加味すると、補体活性化機構の中で、レクチン経路と第二経路は、獲得免疫が現れるはるか昔から存在したといえよう(図3)。

1. 3. 自然免疫における血清フィコリンの機能と糖鎖認識

周知のように、免疫系は、一般的に獲得免疫と自然免疫(先天性免疫, innate immunity)に大別されるが、目的とするところは異物を認識し、排除することである。獲得免疫は、サメなどの軟骨魚類以降に出現した生物のみに見られる。一方、自然免疫は、ほとんど全ての多細胞生物で働く異物排除機構で、異物の表面に存在する糖鎖の配置や空間密度を利用して、非自己を認識している(いわゆるパターン認識メカニズム)^{41), 42)}。

一方、自然免疫機構の一つである補体系は、はじめに補体第一成分であるC1複合体が、抗

脚注4) 動物レクチンのうち、Ca²⁺依存性の結合活性を示す一群を、C型レクチンと呼ぶ。C型レクチンの糖鎖結合活性は、これらの一群において、構造的によく保存されている糖鎖認識領域(CRD, carbohydrate recognition domain)が担っている。

図 4 補体系の活性化の模式図

細菌などの異物が生体に侵入したとき、補体成分は連鎖的に活性化し、炎症反応の惹起、異物のオプソニン化や膜障害複合体の形成により、それらを排除する。補体系の活性化経路は、古典経路、第二経路、レクチン経路が知られている。第二経路は、古典経路やレクチン経路による活性化の際に、増幅経路 (amplification loop) としてもはたらく。いずれの経路においても中心的役割を果たす成分は C3 であり、C3 が C3a と C3b に転換されることで以降の反応がすすみ、最終的に異物排除を行う。

(a) 古典経路。C1 複合体は、花束状構造をした C1q に、プロテアーゼ前駆体である C1s と C1r が集合して構成される。C1 複合体が、異物の表層に結合した複数の免疫グロブリンに C1q を介して結合すると、C1r は不活性型から活性型に変化する。活性型の C1r は C1s を活性化し、C4 と C2 を C4bC2a に変換する。C4bC2a は、C3 転換酵素としての活性をもち、C3 を限定分解して C3a と C3b に転換し、このうち C3b は異物表層に結合する。

(b) レクチン経路。MBL やフィコリンは、MASP-1 (または MASP-3) と MASP-2、および sMAP と複合体を形成している。この複合体が、細菌表層の糖鎖に結合することで、C1q 複合体のように、MASP が不活性型から活性型に変化し、C3 を C3a と C3b に、C4 と C2 を C4bC2a に変換する。MASP-1 (または MASP-3) と MASP-2 は、異なった基質特異性を示し、前者は C3 と C2 を、後者は C4 と C2 を限定分解する。

(c) 第二経路。D は D 因子、B は B 因子を示している。D 因子は、血液中にはじめから活性型で存在している。分子内にチオエステル結合をもつ C3 は、その一部が、水分子と反応して C3(H₂O) となっている。この C3(H₂O) は、B 因子と結合し、この複合体は D 因子により分解されて、C3(H₂O) Bb となる。これは C3 転換酵素としての活性をもち、C4bC2a 同様、C3 を C3a と C3b に転換し、補体を活性化する。

いずれの経路においても、C3b が異物表層に結合することになる。この異物表層に結合した C3b は、D 因子と B 因子の作用をうけて、C3bBb を形成する。これも C3 転換酵素活性をもち、C3 の転換を行う。このようにして、C3 の転換は増幅されることから、第二経路は増幅経路と呼ばれることがある。(文献 38 より転載許可取得)

体の Fc 部位に結合することで活性化する古典経路が発見されたため、抗体を補うものという意味で補体と呼称された。しかしながら、その後、第二経路およびレクチン経路による補体活性化機構が発見され⁴⁾、感染防御における重要

な役割が明らかとなった。以下、図 4 に沿って、補体系について簡単に説明する。

C1q は C1 複合体の垂成分で、血清では C1r と C1s の 2 つのセリンプロテアーゼ前駆体に結合することで、補体活性化に寄与している。

表3 フィコリンとマンノース結合レクチンの認識する糖鎖

	認識する糖鎖** (不等号は結合の強さ)	Ca ²⁺ 要求性
<u>フィコリン</u>		
フィコリン/P35	GlcNAc	—
博多抗原	GlcNAc, GalNAc, フコース	—
フィコリン/P35関連タンパク質	GlcNAc?	?
<u>コレクチン</u>		
MBL*	GlcNAc>マンノース/フコース > ManNAc>>マルトース>グルコース	+

* MBL, mannose-binding lectin

** GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; ManNAc, *N*-acetylmannosamine

C1 複合体のなかで、実際に異物に結合した抗体の Fc 部位を直接認識する分子は、この C1q である。C1q は花束状の構造をしており、その束の部分に C1s と C1r が結合する。コレクチン^{脚注5)}の1種である MBL は、血清中で多量体を形成しており、その全体像は C1q とよく似ている。血清フィコリンも多量体を形成し、同様の花束状構造をもつ^{4), 38)}。

MBL は、血清中で3種類のMASP (MASP-1 ~ -3) およびMASP-2の部分構造体 (sMAP) と複合体を形成している。MBL が、細菌などの異物表層の糖鎖を認識して結合すると、この複合体は補体成分 C2, C4, および C3 を限定分解し、補体の活性化を導く。これがレクチン経路である³⁸⁾。レクチン経路の重要性は、MBL 欠損者が易感染を呈することから知ることができる^{43), 44)}。

一方、フィコリン/P35 や博多抗原も、MASP や sMAP と複合体を形成することが明らかになり、MBL と同様に異物認識後、これらのプロテアーゼの活性化がおき、補体系を活性化することが判明した^{4), 30)}。MBL のコラーゲン様ドメイン内の Gly54 が Asp に置換されたものは、MASP と複合体を形成できないことから、MBL-MASP 複合体形成にはコラーゲン様

ドメインが関連しているようである⁴⁵⁾。MBL との構造類似性から、フィコリンにおいても、MASP との複合体形成にはコラーゲン様ドメインが関与するものと推測される。

周知の如く、自然免疫機構には食細胞による異物排除がある。コレクチンは食細胞の貪食能を亢進させるオプソニン作用をもつが、これはコラーゲン様ドメインと、食細胞上の C1q レセプターとの結合を介したものと推定されている⁴⁶⁾。フィコリンもオプソニン作用を示し、かつ、コラーゲン様ドメインをもつレクチンであることから、そのレセプターは共通の分子ではないかと推測されるが、同定はされていない。

以上より、糖鎖のような生物界に普遍的な構造体を認識することが、自然免疫系の分子基盤の一環であることは明らかである。MBL とフィコリンは、糖鎖を介して異物に結合するという生理機能面はよく似ているが、それぞれの糖鎖結合特性は異なる。MBL は C 型レクチンの一種であり、Ca²⁺ 依存的に多様な糖鎖を認識する⁴⁷⁾。一方、血清フィコリンは Ca²⁺ 非依存的な糖鎖認識能を有する。フィコリン/P35 は、GlcNAc を認識するものの、マンノースは認識しない^{21), 脚注6)}。また、MBL は複合型糖鎖

脚注5) C 型レクチンの中でも、コラーゲン様ドメインをもつものをコレクチンと呼ぶ。MBL 以外に、肺胞サーファクタントタンパク質やコングルチニンなどが知られる。(若宮伸隆, 鈴木定彦: 蛋白質核酸酵素 45: 655-663, 2000.)

脚注6) フィコリン/P35 は、最初に、マンナン固定化カラムで精製された。しかし、フィコリンはマンノースに結合しない。一見矛盾するこの事象は、フィコリン/P35 が CNBr 活性化セファロースとアミノ基の反応で形成する構造 (-CNH-NH-) に結合し、精製されたことによると説明されている。

の非還元末端にガラクトースがあると, 次の GlcNAc に結合できないが, フィコリンは結合できる. 博多抗原は, GlcNAc のほか, 複数種の糖鎖を認識する³⁰⁾ (表 3). また, コラゲナーゼ処理したフィコリン/P35 のフィブリノーゲン様ドメインにもレクチン活性があることから, フィコリンの糖鎖認識機能はフィブリノーゲン様ドメインによるものと推定されている⁴⁸⁾.

先に述べたように, フィコリンはエラスチンやコルチコステロイドといった糖以外の成分にも結合するので^{23), 24)}, こうした分子認識は, 獲得免疫における抗原抗体反応のような厳密な特異性をもつものではなく, 比較的柔軟なものと推察される.

2. 無脊椎動物の生体防御因子としてのフィブリノーゲン様ドメイン含有タンパク質

獲得免疫をもたない無脊椎動物は, 異物認識排除を全て自然免疫機構, すなわち, 先に述べたレクチンによる異物の認識に加え, Toll 様レセプターを介した抗菌物質の産生や, 体液の凝固や貪食作用, さらに, プロフェノール酸化酵素系を介したキノン類や, 活性酸素の発生などの防御反応を通して, 生体の恒常性を維持している⁴⁹⁻⁵¹⁾. これまでに様々な動, 植物種から, 数多くの自然免疫系に関連したタンパク質が報告されており, それらの中には, フィブリノーゲン様ドメインを含む成分も数種知られている^{38), 52)}.

例えば, 淡水性の巻貝 (*Biomphalaria glabrata*) が吸虫に感染されたとき, その血漿中に高濃度に発現するタンパク質群のあることが知られている^{11), 12)}. これらは感染を契機として発現する急性期タンパク質であることから, 異物排除機構に関連するといわれている. こうした急性期タンパク質群をコードする遺伝子解析により, これら一群の全てが, カルボキシル末端側にフィブリノーゲン様ドメインをもつことが判明した. これらは, 通常, FREPs (fibrinogen-related

proteins) と呼ばれており, フィブリノーゲン様ドメインのほかに, アミノ末端側に免疫グロブリンスーパーファミリー (immunoglobulin superfamily, IgSF) と類似した領域をもつことが特徴である. FREPs のそれぞれの生理機能, 構造については, 未だ不明な点が多く, 今後の詳細な研究が待たれる.

一方, カブトガニ血漿由来のタキレクチン-5 は, フィブリノーゲン様ドメインを含み, 後述するように, 他に例をみないユニークなレクチン活性を示すタンパク質であり⁶⁾, 他の分子と共役して異物排除に働いていることが推定されている. 本成分は X 線解析により三次構造が明らかにされているが, フィブリノーゲン様ドメインを含むタンパク質で三次構造が解かれているものは, 唯一, タキレクチン-5A のみである.

2. 1. タキレクチン-5A と-5B の性質

カブトガニ血漿中に存在する強力な赤血球凝集素については, 古くは野口英世の報告に始まり, 1970 ~ 80 年にかけてウシ顎下腺ムチンやキチン, GalNAc 固定化カラムを用いた部分精製の報告がある⁵³⁾⁻⁵⁵⁾. その構造や機能の詳細については永らく不明のままであったが, 最近になって, 血漿からタキレクチン-5A (Tachylectin-5A, TL5A と略), および-5B (TL5B) が高度に精製され, cDNA 解析により, これらがフィブリノーゲン様ドメインをもつことが判明した⁶⁾. 糖や LPS のほか, 様々な化合物を用いた赤血球凝集活性阻害実験により, 両者は通常のレクチンとは異なり, 糖鎖より単純, かつ普遍的な構造体である *O*-ないし *N*-アセチル基のみを認識して結合する, 極めてユニークなものであることがわかった. タキレクチン-5 は, カブトガニ血漿を親水性ビニルポリマー樹脂にアセチル基を付与した担体に吸着させ, GlcNAc により溶出できる⁶⁾. GlcNAc への親和力の違いにより 2 種に分画され, 25 mM

の GlcNAc で溶出するものが TL5A, 250 mM の GlcNAc で溶出するものが TL5B である。

両者は Ca^{2+} 存在下で強い赤血球凝集活性と細菌凝集活性を示し、この活性は EDTA で阻害され、かつ阻害は可逆的である⁶⁾。両者とも血漿中の濃度は約 10 $\mu\text{g/mL}$ であり、異物侵入の初期の段階で、その表面に吸着することが想像されるが、単独では抗菌活性を示さない。しかし、TL5A および TL5B は、ともにカプトガニ顆粒細胞内に存在する抗菌タンパク質であるビッグディフェンシン⁵⁶⁾の抗菌活性を著しく増大させる作用を示し、特にグラム陽性菌に対し顕著である⁶⁾。従って、これらはカプトガニ体液中の生体防御因子として注目されるレクチンといえよう。

2. 2. タキレクチン-5A および-5B と フィブリノーゲンの構造類似性

TL5A は 269 アミノ酸残基、TL5B は 289 残基からなる糖タンパク質で、両者の間には分子全体で約 45% の配列相同性がある⁶⁾。特に、カルボキシル末端側の約 200 残基はフィブリノーゲン様構造を示し、フィブリノーゲン β や γ 鎖のカルボキシル末端側、およびフィコリンのフィブリノーゲン様ドメインと、実に約 40 ~ 50% の配列相同性を有している (図 5)。一方、アミノ末端側には、一般的に知られるドメイン構造はない。両者とも、約 40kDa のサブユニットがジスルフィド結合した 2 量体を基本単位としている。電子顕微鏡像とゲルろ過による解析から、血清中では、この構造単位が 4 ~ 8 個、非共有結合により集合した複合体を構成しており、フィコリンなどの花束状構造に似たプロペラ状構造を示す (図 6)。

2001 年、Kairies らは、GlcNAc と分子複合

体を形成した TL5A の結晶化に成功し、その三次構造を明らかにした (図 7a)⁵⁷⁾。TL5A 分子は、大きく 3 つのドメイン (A, B, および P) に区分できる (図 7b)。ドメイン A (Asp45 ~ Trp89) は 2 つの短い α ヘリックスと小さな逆平行 β シートからなり、Cys49 と Cys80 の間にジスルフィド結合がある。ドメイン B (Thr90 ~ Ala180, Pro253 ~ Phe264) は 7 つの逆平行 β ストランドから構成され、ドメイン A と P の中間に位置する。ドメイン P (Gly181 ~ Leu252) は 3 本の短い α ヘリックスと小さな逆平行 β シートを含むが、残りはランダムな二次構造が大半を占める。このドメイン P は、 Ca^{2+} 結合部位とリガンド (GlcNAc) 結合部位が存在する機能的に重要な領域である (図 7c, d)。この 8 番目の α ヘリックスのカルボキシル末端側に位置する Ca^{2+} 結合部位は、一般的な Ca^{2+} 結合モチーフである EF ハンド構造^{脚注 7)}とは異なった構造をしている (図 7c)。

注目されるのは、TL5A の三次構造が全体的にフィブリノーゲン γ 鎖と酷似することである (図 8)。すなわち、一次構造上よく保存されている Ca^{2+} 結合部位の位置がほとんど一致するのみでなく、フィブリン形成時の γ 鎖上の “polymerization pocket a” の位置が、TL5A ではリガンド結合部位となっている。一次構造上、 γ 鎖の “pocket a” を構成する 7 個のアミノ酸残基のうち、5 個が TL5A でも保存されている (図 5)。また、TL5A はリガンド結合部位に cis- ペプチド結合を有しているが、フィブリノーゲン γ 鎖も同様に Lys338-Cys339 に cis- ペプチド結合をもち、これは “pocket a” の機能上必要な構造である。両者の大きな違いは、 γ 鎖の Ca^{2+} 結合部位とリガンド結合部位の両端に位置する P-1 および P-3 とよばれる 2 個のループ構造が、TL5A では非常に短いことである。

脚注 7) EF ハンド構造とは、 Ca^{2+} 結合構造様式の一つで、2 つの直交する α ヘリックスとそれを繋いでいるループ構造からなり、結合 Ca^{2+} はループ中に位置する。いわゆる典型的なヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフの一つで、歴史的に、最初にパルプアルブミン中に見出されたとき、E 番目と F 番目の α ヘリックスとその間のループに Ca^{2+} が結合しており、その様子を “手” に例えたことから、この名称がついた。

TL5A	1	QNKELCDVTSSTGLLDSIKVMASHVKEQLKDKG-----TSEVAQPIVS	43
TL5B	1	DVHHHAACSTVC SLKGLLDSVSDLTDLAKERLATLQNPICSKDKA-----FYMETYTNVTQNKAEKN	62
HFCL	1	LQAADTCPEVKMVGLGSDK-LTILRCGCPGLPGAPGDKGEAGTNGKRGERGPGPPGKAGPPGPNGAPGEBQPC	74
Collagen-like domain of ficolin/P35			
TL5A	44	PDPTDCADILLNGYRSSGGYRIWPKSWMTVGTNLNVYCDMETDGGGWTVIQRRGNYGNPSDYFYKPKWKNYKLGFG---	117
TL5B	63	GLPINCATVYQQGNRTSGIYMIWPLFLNHPISVF--CDMETAGGGWTVIQRRGDFGQPIQNFYQTWESYKNGFG---	134
HFCL	75	TGPRTCCKDLLDRGHFLSGWHTIYLPDCRPLTVL--CDMDTDGGGWTVFQRRVDG---SVDIFYRDWATYKQGF---	142
HFBE	211	CEEIIRKGGGTSEMYLIQPDSSVKPYRVY--CDMNTENGGWTVIQNRQDG---SVDFGRKWDYKQGFGNVA	277
HFGA	153	CQDIANKGAKQSGLYFIKPLKANQQFLVY--CEIDGSGNGWTVFQKRIDG---SVDFFKNWIKYKEGFGHLS	219

TL5A	118	-----NIEKDFWLGNDRIFALTNQARNY--MIRFDLKDENDTRYAIYQDFWIENEDYLYCLHIGNY--SGDAGN	181
TL5B	135	-----NLTKDFWLGNDRIFVLTNQDSV--VLRVDLEDFFGGRRYAEAVEFLVRSEIELYKMSFKTY--KGDAGD	199
HFCL	143	-----SRLG EFWLGNDRINHALTAQGT--ELRVDLVDFEDNYQFAKYRSFKVADEAEKYNLVLGAFVEGSGAGD	207
HFBE	278	TNTDGKNYCGLPGEYWLGNDRKISQLTRMGPT--ELLIEMEDWKGDVKVKAHYGGFTVQNEANKYQISVNKY--RGTAGN	351
HFGA	220	PTG-----TTEFWLGNDRINHALTAQGT--ELRVDLVDFEDNYQFAKYRSFKVADEAEKYNLVLGAFVEGSGAGD	287

TL5A	182	SFGR-----HNGHNFSTIDKDHD-----THETHCAQTYKGGWYDRCHESNLNGLYLNGLNG-----EH	233
TL5B	200	SLSQ-----HNNMPFTTKDRDND-----KWEKNCAEAYKGGWYNACHHSNLNGLYLRG-----PH	250
HFCL	208	SLTF-----HNNQSFSSTKDQDND-----LNTGNCVAFMQGAWWYKNCVSNLNGRYLRG-----TH	259
HFBE	352	ALMDGASQLMGENRTMTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTS DPRKQCSKEDGGGWYNYRCHAANPNGRYYWGQYTWDMAK	430
HFGA	288	AFDGDFDGDSPDKFFTHNGMQFSTWDNDNDKF-----EGNCAEQDGSQGWYNKCHAGHLNGVYQGGTYSKASTP	360

TL5A	234	NSYADGIEWRAWKGYHSLPQVEMKIRPVEFNIGN	269
TL5B	251	EESAVGVNWWYQWRGHNYSLKVSSEMIRPIIFVP--GEGLPK	289
HFCL	260	GSFANGINWKSCKGYNYKYVSEMKV RPA	288
HFBE	431	HGTD DGVVMMNWKGSWYSMRKMSMKIRPFFPQQ	461
HFGA	361	NGYDNGI I WATWKT R WYSMKKT T M K I I P F N R L T I G E G Q Q H L G G A K Q A G D V	411

図5 タキレクチン-5A と-5B のアミノ酸配列

タキレクチン-5 とヒトのフィコリン/P35, およびフィブリノーゲン β と γ 鎖のアミノ酸配列の比較. TL5A はタキレクチン-5A を, TL5B はタキレクチン-5B を, HFCL はフィコリン/P35 を, HFBE はヒトフィブリノーゲン β 鎖を, HFGA はヒトフィブリノーゲン γ 鎖をそれぞれ示す. フィブリノーゲン β および γ 鎖は, D 領域に相当する部位を記載した. タキレクチン-5 と一致しているアミノ酸を太字で示す. フィコリン/P35 のアミノ末端側領域にみられるコラーゲン様ドメインは, タキレクチン-5 にはない (囲み部分). タキレクチン-5 のアミノ酸配列中の下線は, N 結合型糖鎖が付与される可能性のある部位を示す. ▲と▼は, タキレクチン-5A とフィブリノーゲン γ 鎖のカルシウム結合に関連するアミノ酸残基を, ☆は, タキレクチン-5A の GlcNAc 結合に関連するアミノ酸残基を, ★は, フィブリノーゲン γ 鎖の pocket a を構成するアミノ酸残基をそれぞれ示す. タキレクチン-5A とフィブリノーゲン γ 鎖において, これらの機能部位はよく保存されている. 一方で, フィブリノーゲン γ 鎖の, 活性化 XIII 因子により架橋されるアミノ酸残基 (◆) に相当する残基は, タキレクチン-5 やフィコリン/P35 にはない. また, フィブリノーゲン γ 鎖のインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合部位を*で示す (190-202 および 346-358). (文献 6 より転載)

図6 タキレクチン-5A とタキレクチン-5B の電子顕微鏡像と構造モデル

A, B はタキレクチン-5A の, C はタキレクチン-5B のネガティブ染色像. D は電子顕微鏡像をもとに描いたタキレクチン-5 の構造モデル. フィコリンなどの花束状構造に似たプロペラ状構造を示す. TL5A, タキレクチン-5A ; TL5B, タキレクチン-5B (文献 6 より転載)

図7 タキレクチン-5Aの結晶構造と主な機能部位

(a) タキレクチン-5Aのリボンモデルによる立体図。GlcNAcはボール&スティックモデルで、カルシウムイオンは金色球で示している。

(b) タキレクチン-5Aのトポロジーダイアグラムによる二次構造の配列模式図。 α ヘリックスは赤、 β ストランドは青色でそれぞれ示している。図中に表記しているように、タキレクチン-5Aは大きく3つのドメイン(A, B, およびP)に区別される。各ドメインは、フィブリノーゲン γ 鎖のドメイン構造との類似性より名づけられた。

(c) カルシウム結合部位を拡大した図。酸素原子は赤、窒素原子は青のボール&スティックで、水分子は赤色球、カルシウムイオンは金色球でそれぞれ示している。カルシウム結合部位は8番目の α ヘリックスのカルボキシル末端側に位置している。

(d) GlcNAc結合部位を拡大した図。水素結合を黄色の破線、疎水的相互作用を緑色の破線、水分子は赤色球(図中“WAT”)でそれぞれ表している。注目すべきは、Cys219の-NHが、GlcNAcのアセトアミド部位の酸素原子と水素結合をしている点である。Ala237を底辺にして、Tyr210, Tyr236, Tyr248, His220で形成される漏斗状の空間が、リガンド結合部位を構成している。なお、タキレクチン-5Aの8量体(2分子 $\times$ 4)形成時の電子顕微鏡像(図6)を組み合わせると、それぞれのモノマーで覆い隠される部分の面積は約580Å²と推測される。(文献57より転載)

図8 タキレクチン-5Aとフィブリノーゲン γ 鎖の三次構造類似性

タキレクチン-5A(灰色)とフィブリノーゲン γ 鎖(黄色)の三次構造を重ね合わせている。カルシウムイオンは、それぞれ同じ色の球で示した。両者のカルシウム結合部位は、ほとんど一致している。図中のボール&スティックは、GlcNAcと、フィブリノーゲン γ 鎖と結合するGPRGペプチド(A-knob)を重ねて描いたもの。リガンド結合部位においても両者はほぼ一致している。(文献57より転載)

このような機能領域であるドメイン P における共通点, ならびに相違点から推察するに, 進化の過程において, レクチン活性を担う部位が, 他のタンパク質を認識したり, 重合する部位へ変化するなどして, フィブリノーゲン分子の原型ができたのではなかろうか. また, TL5A とフィコリンは一次構造と機能面で類似していることから, フィコリンの三次構造も, TL5A およびフィブリノーゲン γ 鎖によく似ていると推察される.

なお, TL5A と TL5B, ならびにフィコリンファミリーには, フィブリノーゲン γ 鎖のカルボキシル末端側に位置する, 活性化 XIII 因子によるクロスリンク部位は見当たらない (図 5). 従って, 活性化 XIII 因子を介して, タキレクチン-5 やフィコリンが重合体を形成する可能性はないと考える^{脚注 8)}.

2. 3. カブトガニ血漿成分から垣間見る フィブリノーゲンの祖先遺伝子

フィブリノーゲンは, 脊椎動物の血液凝固反応の最終産物となるタンパク質であるが, カブトガニの体液凝固反応において, 同様の機能を担うものはコアギュローゲンである⁵⁸⁾. コアギュローゲンは, 175 アミノ酸残基から成る単純タンパク質で, 構造的にはフィブリノーゲンと全く異なるものであり, その三次構造は, 意外なことに, 神経成長因子やトランスフォーミング増殖因子 β , ショウジョウバエの自然免疫系に關与する spätzle などと似ている⁵⁹⁾. 一方で, 昆虫やエビなどの他の無脊椎動物ではビテロゲニンが同様の機能を担っているが⁶⁰⁾, これもフィブリノーゲンやコアギュローゲンとは, 構

造的に全く異なるタンパク質である. 約 10 億年前, フィブリノーゲン α 鎖が遺伝子重複により祖先遺伝子より分岐し, 6 億年前に β 鎖と γ 鎖が分岐したといわれている⁶¹⁾. カブトガニの祖先である三葉虫の繁栄期は, その直後の古生代^{脚注 9)}であることを考慮すると, フィブリノーゲンの祖先遺伝子は異物認識レクチンであった可能性がある. その傍証として, フィブリノーゲンの B β と γ 鎖のカルボキシル末端側に類似した領域が, C 型レクチン様の分子認識に機能している.

ゲノムの解析がヒトを含めた数種について完了しているが, それによるとフィブリノーゲン様ドメインを含む遺伝子は, ヒトで 26 個, ショウジョウバエでは 10-11 個, 線虫で 6 個が確認され, 酵母やシロイヌイズナでは見出されていない¹⁴⁾. こうして見ると, 少なくともフィブリノーゲン様ドメイン遺伝子は, 多細胞動物の下等なものから高等動物まで広く存在し, その産物は主に糖鎖認識に機能している可能性が高いと考える.

おわりに

フィブリノーゲンは, 血液凝固反応の基本因子として同定され, 過去, 多くの研究者により精力的に研究され, その分子構造や生理機能が明らかにされた. 一方, 近年の分子生物学領域における飛躍的な進歩に伴い, フィブリノーゲン様ドメインをもつタンパク質群が数多く発見されている. しかし, 残念ながら, それらの生理機能や構造について詳細にわかっているものはほんの一部である. 唯一, 三次構造の解かれた TL5A において, フィブリノーゲン γ 鎖と全

脚注 8) ただし, 活性化 XIII 因子共存下において, フィコリン分子側のグルタミン残基がアミン受容体となり, フィブリノーゲン/フィブリン分子側のリジン残基と架橋結合する可能性は残る. 従来から, α_2 -プラスミンインヒビターのほか, フィブロンекチンや, α_2 -マクログロブリンなどが, 活性化 XIII 因子共存下でフィブリノーゲン/フィブリン分子と架橋結合することが知られている.

脚注 9) 古生代は地質時代区分において, 先カンブリア時代の後, 中生代の前に相当する. 約 5 億 7500 万年前に始まり, 2 億 4700 万年前に終わった.

体構造が類似し、かつ機能部位が一致していたことは極めて興味深い。おそらく、フィコリンファミリーも同じような構造をもつであろう。多種多様なフィブリノーゲン様ドメイン含有タンパク質において、その認識分子はそれぞれ異なっているが、機能する部位の構造は酷似すると推測される。それ故に、フィブリノーゲン様ドメインの基本構造は、分子間認識の重要な構造モチーフと捉えることができよう。

本稿では、フィブリノーゲン様ドメインをもつタンパク質の中でも、自然免疫に機能するものを中心に述べてきた。これらは生物界に極めて普遍的に存在する糖鎖やアセチル基のような単純な構造を認識することで、自己、非自己を分別する。このような構造は、当然、宿主にも存在するが、異物である細菌やウイルスなどの表層ではより密集したものであろう⁴¹⁾。本稿で紹介した各成分は多量体を形成しており、それ故、リガンド構造が空間的に密集している異物に対して、より強い親和力を示す（パターン認識機構⁴¹⁾）と考えられる。フィコリンはコラーゲン様ドメインをもち、生理的条件下においては多量体を形成している。一方で、このような複合体形成モチーフを有しない、カプトガニのタキレクチン-5も、血清中では多量体を形成している。このマルチマー形成如何により、その分子の生理的な認識対象は変化するのであろう。

フィブリノーゲン様ドメインを有するタンパク質群の構造や機能の解析は、フィブリノーゲンそのものにも応用可能な幅広い知見をもたらす情報源であり、かつ分子進化を考察する上でも注視される対象と考える。

謝辞： 稿を終えるにあたり、執筆の機会を与えていただきました、国立循環器病センター研究所の宮田敏行先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Blombäck B: Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* **83** : 1-75, 1996.
- 2) Weisel JW, Francis CW, Nagaswami C, Marder VJ: Determination of the topology of factor XIIIa-induced fibrin γ -chain cross-links by electron microscopy of ligated fragments. *J Biol Chem* **268** : 26618-26624, 1993.
- 3) Brown JH, Volkmann N, Jun G, Henschen-Edman AH, Cohen C: The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 85-90, 2000.
- 4) Matsushita M, Fujita T: Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev* **180** : 78-85, 2001.
- 5) Kenjo A, Takahashi M, Matsushita M, Endo Y, Nakata M, Mizuochi T, Fujita T: Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Biol Chem* **276** : 19959-19965, 2001.
- 6) Gokudan S, Muta T, Tsuda R, Koori K, Kawahara T, Seki N, Mizunoe Y, Wai SN, Iwanaga S, Kawabata S: Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 10086-10091, 1999.
- 7) Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sasakura T: Tenascin: An extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* **47** : 131-139, 1986.
- 8) Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87** : 1161-1169, 1996.
- 9) Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87** : 1171-1180, 1996.
- 10) Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for TIE2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* **277** : 55-60, 1997.
- 11) Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES: A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 8691-8696, 1997.
- 12) Leonard PM, Adema CM, Zhang SM, Loker ES: Structure of two *FREP* genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the *FREP* gene family in the snail, *Biomphalaria glabrata*. *Gene* **269** : 155-165, 2001.
- 13) Baker NE, Mlodzik M, Rubin GM: Spacing differentiation in the developing *Drosophila* eye: a fibrinogen-related lateral inhibitor encoded by *scabrous*. *Science* **250** : 1370-1377, 1990.
- 14) Venter JC *et al*: The sequence of the human genome. *Science* **291** : 1304-1351, 2001.
- 15) Ichijo H, Ronnstrand L, Miyagawa K, Ohashi H, Heldin CH, Miyazono K: Purification of transforming growth factor- β 1 binding proteins from porcine uterus membranes. *J Biol Chem* **266** : 22459-22464, 1991.
- 16) Ichijo H, Hellman U, Wernstedt C, Gonez LJ, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Miyazono K: Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. *J Biol Chem* **268** : 14505-14513, 1993.

- 17) Ohashi T, Erickson HP: Oligomeric structure and tissue distribution of ficolins from mouse, pig and human. *Arch Biochem Biophys* **360**: 223-232, 1998.
- 18) Fujimori Y, Harumiya S, Fukumoto Y, Miura Y, Yagasaki K, Tachikawa H, Fujimoto D: Molecular cloning and characterization of mouse ficolin-A. *Biochem Biophys Res Commun* **244**: 796-800, 1998.
- 19) Omori-Satoh T, Yamakawa Y, Mebs D: The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. *Toxicon* **38**: 1561-1580, 2000.
- 20) Kakinuma Y, Endo Y, Takahashi M, Nakata M, Matsushita M, Takenoshita S, Fujita T: Molecular cloning and characterization of novel ficolins from *Xenopus laevis*. *Immunogenetics* **55**: 29-37, 2003.
- 21) Matsushita M, Endo Y, Taira S, Sato Y, Fujita T, Ichikawa N, Nakata M, Mizuochi T: A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem* **271**: 2448-2454, 1996.
- 22) Lu J, Le Y, Kon OL, Chan J, Lee SH: Biosynthesis of human ficolin, an *Escherichia coli*-binding protein, by monocytes: comparison with the synthesis of two macrophage-specific proteins, C1q and the mannose receptor. *Immunology* **89**: 289-294, 1996.
- 23) Harumiya S, Omori A, Sugiura T, Fukumoto Y, Tachikawa H, Fujimoto D: EBP-37, a new elastin-binding protein in human plasma: Structural similarity to ficolins, transforming growth factor- β 1 binding proteins. *J Biochem* **117**: 1029-1035, 1995.
- 24) Edgar PF: Hucolin, a new corticosteroid-binding protein from human plasma with structural similarities to ficolins, transforming growth factor- β 1 binding proteins. *FEBS Lett* **375**: 159-161, 1995.
- 25) Lynch NJ, Roscher S, Hartung T, Morath S, Matsushita M, Maennel DN, Kuraya M, Fujita T, Schwaebler WJ: L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. *J Immunol* **172**: 1198-1202, 2004.
- 26) 稲葉頌一, 大河内一雄: 2名のSLE患者にみられた新しいヒト血清同種沈降抗体について. *医学の歩み* **107**: 690-691, 1978.
- 27) Sugimoto R, Yae Y, Akaiwa M, Kitajima S, Shibata Y, Sato H, Hirata J, Okochi K, Izuhara K, Hamasaki N: Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J Biol Chem* **273**: 20721-20727, 1998.
- 28) Akaiwa M, Yae Y, Sugimoto R, Suzuki SO, Iwaki T, Izuhara K, Hamasaki N: Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. *J Histochem Cytochem* **47**: 777-785, 1999.
- 29) Yae Y, Inaba S, Sato H, Okochi K, Tokunaga F, Iwanaga S: Isolation and characterization of a thermolabile β -2 macroglycoprotein ('thermolabile substance' or 'Hakata antigen') detected by precipitating (auto) antibody in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Biochim Biophys Acta* **1078**: 369-376, 1991.
- 30) Matsushita M, Kuraya M, Hamasaki N, Tsujimura M, Shiraki H, Fujita T: Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J Immunol* **168**: 3502-3506, 2002.
- 31) Inaba S, Okochi K, Yae Y, Niklasson F, de Verder CH: Serological studies of an SLE-associated antigen-antibody system discovered as a precipitation reaction in agarose gel: The Hakata antigen-antibody system. *Fukuoka Igaku Zasshi* **9**: 284-291, 1990.
- 32) Endo Y, Sato Y, Matsushita M, Fujita T: Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene. *Genomics* **36**: 515-521, 1996.
- 33) Harumiya S, Takeda K, Sugiura T, Fukumoto Y, Tachikawa H, Miyazono K, Fujimoto D, Ichijo H: Characterization of ficolins as novel elastin-binding proteins and molecular cloning of human ficolin-1. *J Biochem* **120**: 745-751, 1996.
- 34) Lu J, Tay PN, Kon OL, Reid KB: Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9. *Biochem J* **313**: 473-478, 1996.
- 35) Lu J, Le Y: Ficolins and the fibrinogen-like domain. *Immunobiol* **199**: 190-199, 1998.
- 36) Nonaka M: Evolution of the complement system. *Curr Opin Immunol* **13**: 69-73, 2001.
- 37) Sekine H, Kenjo A, Azumi K, Ohi G, Takahashi M, Kasukawa R, Ichikawa N, Nakata M, Mizuochi T, Matsushita M, Endo Y, Fujita T: An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: Novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J Immunol* **167**: 4504-4510, 2001.
- 38) Fujita T: Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **2**: 346-353, 2002.
- 39) Endo Y, Takahashi M, Nakao M, Saiga H, Sekine H, Matsushita M, Nonaka M, Fujita T: Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates. *J Immunol* **161**: 4924-4930, 1998.
- 40) Smith LC, Clow LA, Terwilliger DP: The ancestral complement system in sea urchins. *Immunol Rev* **180**: 16-34, 2001.
- 41) Janeway CA Jr: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54**: 1-13, 1989.
- 42) Medzhitov R, Janeway CA Jr: Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**: 295-298, 1997.
- 43) Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchtein A, Monteil MA, Turner MW: Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* **345**: 886-889, 1995.
- 44) Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A: Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* **346**: 941-943, 1995.
- 45) Matsushita M, Ezekowitz RA, Fujita T: The Gly-54 $\rightarrow$ Asp allelic form of human mannose-binding protein (MBP) fails to bind MBP-associated serine protease. *Biochem J* **311**: 1021-1023, 1995.
- 46) Tenner AJ: Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr Opin Immunol* **11**: 34-41, 1999.
- 47) Lu J, Teh C, Kishore U, Reid KB: Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta* **1572**: 387-400, 2002.
- 48) Le Y, Lee SH, Kon OL, Lu J: Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. *FEBS Lett* **425**: 367-370, 1998.
- 49) Medzhitov R, Janeway C Jr: Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* **173**: 89-97, 2000.
- 50) 岩永貞昭: 特集に寄せて—自然免疫を担う主要システム—. *生体の科学* **51**: 180-186, 2000.
- 51) Kawabata S, Beisel HG, Huber R, Bode W, Gokudan S, Muta

- T, Tsuda R, Koori K, Kawahara T, Seki N, Mizunoe Y, Wai SN, Iwanaga S: Role of tachylectins in host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *Adv Exp Med Biol* **484** : 195-202, 2001.
- 52) Iwanaga S: The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr Opin Immunol* **14** : 87-95, 2002.
- 53) Shishikura F, Sekiguchi K: Agglutinins in the horseshoe crab hemolymph: purification of a potent agglutinin of horse erythrocytes from the hemolymph of *Tachypleus tridentatus*, the Japanese horseshoe crab. *J Biochem* **93** : 1539-1546, 1983.
- 54) Matsumoto I, Yamaguchi H, Seno N, Shibata Y, Okumura T: Specificity of Japanese horseshoe crab lectin prepared by chitin adsorbent, in Hirano S, Tokura S (eds): *Proceeding of the Second International Conference on Chitin and Chitosan*. Tottori, The Japanese Society of Chitin and Chitosan, 165-170, 1982.
- 55) Shimizu S, Ito M, Niwa M: Lectins in the hemolymph of Japanese horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*. *Biochim Biophys Acta* **500** : 71-79, 1977.
- 56) Saito T, Kawabata S, Shigenaga T, Takayenoki Y, Cho J, Nakajima H, Hirata M, Iwanaga S: A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: Isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity. *J Biochem* **117** : 1131-1137, 1995.
- 57) Kairies N, Beisel HG, Fuentes-Prior P, Tsuda R, Muta T, Iwanaga S, Bode W, Huber R, Kawabata S: The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 13519-13524, 2001.
- 58) Iwanaga S, Kawabata S, Muta T: New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J Biochem* **123** : 1-15, 1998.
- 59) 岩永貞昭: カプトガニ血球細胞に存在するコアグロゲンの立体構造. *日本血栓止血学会誌* **11** : 205-210, 2000.
- 60) Hall M, Wang R, van Antwerpen R, Sottrup-Jensen L, Söderhäll K: The crayfish plasma clotting protein: A vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 1965-1970, 1999.
- 61) Doolittle RF: The structure and evolution of vertebrate fibrinogen. *Ann NY Acad Sci* **408** : 13-27, 1983.