



## $\alpha_2$ -マクログロブリンの欠損マウス

上村 晃 一朗\*, 水口 純\*, 中垣 智 弘\*

Targeted Inactivation of the Mouse  $\alpha_2$ -Macroglobulin Gene

Koichiro KAMIMURA\*, Jun MIZUGUCHI\*, Tomohiro NAKAGAKI\*

**Key words:**  $\alpha_2$ -macroglobulin deficient mice, murinoglobulin, transforming growth factor  $\beta$ , inducible nitric oxide synthase

### はじめに

プロテアーゼインヒビターの  $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ M) は、相手となるプロテアーゼをほとんど選択することなく捕獲し、阻害することが知られている<sup>1)</sup>。この捕獲機構は“trapping”と呼ばれ、相手のプロテアーゼの活性中心に結合するのではなく、プロテアーゼ分子を  $\alpha_2$ M 分子内に取り込むものであって、ほかのプロテアーゼインヒビターとは異なる機構によっている。まず、 $\alpha_2$ M に遭遇したプロテアーゼが  $\alpha_2$ M 分子内にある bait (餌を意味する) 領域を基質のように切断する。ヒト  $\alpha_2$ M の bait 領域は 681~710 番目付近のアミノ酸配列内にあり、多くのプロテアーゼによって認識・切断されやすい物理化学的構造をもつ。Bait 領域が切断された  $\alpha_2$ M は分子内の Cys<sup>949</sup>-Glu<sup>952</sup> 側鎖間のチオエステル結合の開裂とともに、立体構造変化をおこしつつ、相手プロテアーゼを包み込むように捕獲し、その結果、プロテアーゼは高分子量基質から隔離されることになる。なお、 $\alpha_2$ M に捕獲されたプロテアーゼの多くは、通常、低分子基質を水解する。この構造変化に伴って  $\alpha_2$ M 分子表面に  $\alpha_2$ M のレセプターである Low density lipoprotein receptor-related pro-

tein (LRP) への結合部分が露出し、 $\alpha_2$ M-プロテアーゼ複合体はエンドサイトーシスによって貪食細胞に取り込まれ分解される。 $\alpha_2$ M は、感染したウィルスや細菌が分泌する様々なプロテアーゼを捕獲し、クリアランスするという感染防御上有用でかつ巧妙な仕組みを有している。また、 $\alpha_2$ M は神経増殖因子(NGF) やトランスフォーミング成長因子 (TGF- $\beta$ ) などのサイトカインと上記の構造変化なしに結合することから、プロテアーゼインヒビターとしての機能の他にサイトカインのキャリアーでもあると考えられている<sup>2)</sup>。

$\alpha_2$ M については、現在までに次のようなタンパク質構造・遺伝子・生合成などの知見がある<sup>1)3)4)</sup>。①ヒト  $\alpha_2$ M は、1451 アミノ酸残基からなる分子量約 18 万の糖蛋白質サブユニットがジスルフィド結合で架橋され、その二量体が更に非共有結合により会合して分子量約 73 万の四量体として存在する。②  $\alpha_2$ M は触媒基の種類に依存することなく、ほとんどのプロテアーゼ活性を阻害する。③遺伝子は、約 4.5 kb で第 12 染色体 p13-14 上に位置する。④肝臓で合成された後、分泌され、血中で 2~4 mg/ml の濃度で循環している。⑤  $\alpha_2$ M 分子内には Cys<sup>949</sup> と Glu<sup>952</sup> の間で形成されたチオエステル結合

\* (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)  
Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

が存在し, この準安定な結合の開裂が構造変化の原動力となっている。

### $\alpha_2$ M 欠損マウスから得られる情報

1995年, Umansら<sup>5)</sup>のグループは欠損マウス ( $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup>) を作製するために, 相同組換え技術によりマウス  $\alpha_2$ M のエクソンの16-18番を不活性化させたES細胞を導入した胚を構築した。ヘテロ接合体 ( $\alpha_2$ M<sup>+/-</sup>) 同士の掛け合わせにより,  $\alpha_2$ M<sup>+/+</sup> (23%),  $\alpha_2$ M<sup>+/-</sup> (56%),  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> (21%) が産出された。ノーザンブロットィングでマウス肝臓中に  $\alpha_2$ M の mRNA が検出できず,  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> であることが確認された。 $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> では胚の生育は正常で順調に成長した。報告では<sup>5)</sup>, 20組の  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> のカップルがそれぞれ3~15匹の子を出産し, その性比は, 49/51% (雄/雌) であり, 3代にわたってなんら表現型上に異常は見られなかった。 $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> は最長15カ月間生存した。これらのことから判断すると,  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> は発育・生殖能は正常であり, かつ  $\alpha_2$ M は通常の生理機能を営む上で必要不可欠ではないことになる。ただし, マウスには同じ  $\alpha_2$ M 族に分類される murinoglobulin (MUG) が存在するので,  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> では MUG が  $\alpha_2$ M の役割を代償している可能性がある。事実, 出産前後における MUG の遺伝子発現の増加を比べると,  $\alpha_2$ M<sup>+/+</sup> が4倍なのに対し  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> は14倍であるにもかかわらず両者の血中濃度に差はないので, MUG 蛋白が  $\alpha_2$ M の代替物として大量に消費されているようである<sup>5)</sup>。

$\alpha_2$ M<sup>+/+</sup> に比べて,  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> は, エンドトキシン (LPS) 耐性になることがあげられる。LPS を腹腔へ投与した場合には,  $\alpha_2$ M<sup>+/+</sup> は15時間以内に80%のマウスが死亡するのに対し,  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> では1日経過しても10%しか死亡せず, エンドトキシンへの抵抗性を獲得していることが観察された (図1)。しかし, LPS を  $\alpha_2$ M<sup>+/+</sup> および  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup> の足蹠へ投与すると, 様々な大きさの静脈血栓が両マウスで見られるが, 動脈血栓は何れにも観察されず両マウス間に差は認

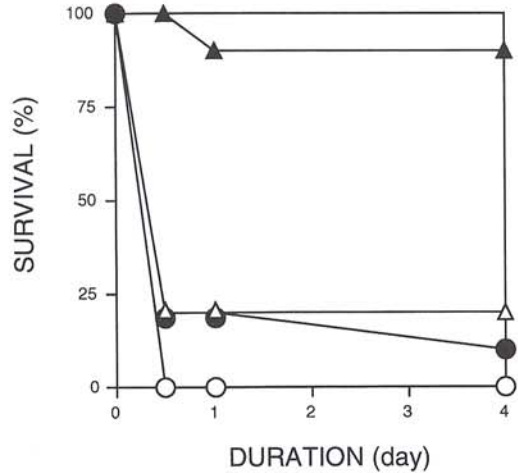


図1 腹腔へのLPS (*Escherichia coli* 由来)の投与に対する生存試験 (文献3より引用・改変)

$\alpha_2$ M<sup>+/+</sup>,  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup>それぞれ10頭ずつにLD<sub>50</sub> (28.3 mg/kg) 量及びLD<sub>50</sub>の5倍量のLPSを腹腔に投与した。15時間以内に $\alpha_2$ M<sup>+/+</sup>は80%が死亡しているのに対して, 1日経過しても $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup>ではLD<sub>50</sub>量投与で10%しか死亡していない。○; LPSをLD<sub>50</sub>の5倍量投与した $\alpha_2$ M<sup>+/+</sup>, ●; LPSをLD<sub>50</sub>量投与した $\alpha_2$ M<sup>+/+</sup>, △; LPSをLD<sub>50</sub>の5倍量投与した $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup>, ▲; LPSをLD<sub>50</sub>量投与した $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup>。(転載許可取得)

められなかった。腹腔へLPSを投与することで見られる抵抗性の機序として以下のような仮説が提唱されている。エンドトキシン刺激で遊離されるTGF- $\beta$ は, 炎症反応に関与する誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を抑制することが知られている。iNOSにより過剰に合成されたNOは, 細胞内に蓄積し, 組織に対して傷害性を有するため, ある場合には, iNOSの発現を抑制した方が生体にとって有益である。 $\alpha_2$ M<sup>+/+</sup>ではサイトカインTGF- $\beta$ が $\alpha_2$ Mと結合し, その作用が阻害されるのに対し,  $\alpha_2$ M<sup>-/-</sup>では, LPS刺激により遊離したTGF- $\beta$ が $\alpha_2$ Mに結合しないため<sup>6)</sup>, iNOSの発現をより強く抑制することになり, 結果としてエンド

トキシンに対して抵抗性が増大する。なお、同じ  $\alpha_2M$  族の MUG には TGF- $\beta$  結合能はない。この説を支持する事象として、iNOS ノックアウトマウスではエンドトキシンショックに対する抵抗性が高いと報告されている<sup>7)</sup>。一方、 $\alpha_2M$  中和抗体を用いてプロテアーゼインヒビターとしての  $\alpha_2M$  を阻害したモルモットに、緑膿菌由来のエラスターゼを静脈注射により投与すると、XII 因子/kallikrein-kinin 経路の活性化を介して致死的なショックを引き起こすことが報告されている<sup>8)</sup>。

なお、ヒトでは、 $\alpha_2M$  の完全な欠損についての報告はなく、MUG のような代替物もないので、 $\alpha_2M$  欠損は致死性であると想定する専門家が多い。

### おわりに

以上を要約すると、①  $\alpha_2M^{-/-}$  は、発生、生育、更に生殖においては  $\alpha_2M^{+/+}$  との間に差は見られない。従って、見かけ上、 $\alpha_2M$  はマウスの通常の生理機能には必要不可欠なものではないかも知れない。ただし、他の  $\alpha_2M$  ファミリー蛋白質 MUG を有するマウスの例が、本来 MUG をもたないヒトに直接対応しうるか疑問である。②  $\alpha_2M^{-/-}$  では、エンドトキシン全身投与に対する抵抗性が増大した。同様のことは、iNOS 欠損マウスでも観察されており、このエンドトキシン耐性機構は  $\alpha_2M$  が炎症性サイトカイン TGF- $\beta$ 、iNOS、そして NO へと繋がる連鎖の関与という面から説明されている。

謝辞：御校閲を戴きました山本哲朗先生（熊本大学医学部教授）、岩永貞昭先生（藤田保健衛生大学客員教授）に深謝いたします。

### 文 献

- 1) Van Leuven F: Human  $\alpha_2$ -macroglobulin: structure and function. Trends Biochem Sci 7:185-187, 1982.
- 2) Crookston KP, Webb DJ, Wolf BB, Gonias SL: Classification of  $\alpha_2$ -macroglobulin-cytokine interactions based on affinity of noncovalent association in solution under apparent equilibrium conditions. J Biol Chem 269:1533-1540, 1994.
- 3) Sottrup-Jensen L, Stepanik TM, Kristensen T, Wierzbicki DM, Jones CM, Lönblad PB, Magnusson S, Petersen TE: Primary structure of human  $\alpha_2$ -macroglobulin. V. The complete structure. J Biol Chem 259: 8318-8327, 1984.
- 4) Hilliker C, Overbergh L, Petit P, Van Leuven F, Berghe HV: Assignment of mouse  $\alpha_2$ -macroglobulin gene to chromosome 6 band F1-G3. Mammal Genome 3: 469-471, 1992.
- 5) Umans L, Serneels L, Overbergh L, Lorent K, Van Leuven F, Berghe HV: Targeted inactivation of mouse  $\alpha_2$ -macroglobulin gene. J Biol Chem 270: 19778-19785, 1995.
- 6) Webb DJ, Wen J, Lysiak JJ, Umans L, Leuven FV, Gonias SL: Murine  $\alpha_2$ -macroglobulins demonstrate divergent activities as neutralizers of transforming growth factor- $\beta$  and as inducers of nitric oxide synthesis. J Biol Chem 271: 24982-24988, 1996.
- 7) MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chertrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N: Altered response to bacterial infection and endotoxin shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Cell 81: 641-650, 1995.
- 8) Khan MMH, Shibuya Y, Nakagaki T, Kambara T, Yamamoto T: Alpha-2-macroglobulin as the major defence in acute pseudomonas septic shock in the guinea-pig model. Int J Exp Path 75: 285-293, 1994.