

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06947

研究課題名（和文）コレクチン複合体CL-LKが3MC症候群の病態に与える影響とその分子基盤の解明

研究課題名（英文）Role of collectin CL-LK in 3MC Syndrome and its molecular basis

研究代表者

松田 泰幸（Matsuda, Yasuyuki）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10532252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトにおいて重度の発育不全をきたす遺伝病（3MC症候群）の原因遺伝子コレクチンCL-K1およびCL-L1が、3MC症候群の関連変異によってどのような機能異常が生じるのかを解析した。通常、CL-K1とCL-L1はCL-LKヘテロ複合体を形成するが、3MC症候群関連変異体ではCL-LKヘテロ複合体の形成不全が生じていた。また、CL-LKヘテロ複合体は別の3MC症候群関連因子MASP-3と相互作用することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3MC症候群の発症の分子基盤は不明瞭であり、根本的な治療法や予防法の確立には至っていない。本研究の成果は、ヒトの形態形成を考察するうえで重要な知見になると考えられる。これらの知見を基にさらなる研究が進み、本病態の全体像が分子レベルで解明されれば、本疾患に対する将来的な治療法や予防法の開発などにつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed how mutations associated with the genetic disorder 3MC syndrome, which causes severe developmental deficiencies in humans, affect the functions of the causative genes for collectins CL-K1 and CL-L1. Normally, CL-K1 and CL-L1 form a heterocomplex, CL-LK. However, in 3MC syndrome-associated mutants, the formation of the CL-LK complex was impaired. Additionally, it was revealed that the heterocomplex CL-LK interacts with another 3MC syndrome-associated factor, MASP-3.

研究分野：分子生物学

キーワード：コレクチン 3MC症候群 発生 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) コレクチンは、その内部にコラーゲン様領域と  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域を持つレクチン（糖を認識するタンパク質の総称）である。コレクチンはコラーゲン領域を介してオリゴマー構造を形成しており、糖認識領域を介して宿主細胞や細菌の表層に存在する糖鎖を認識している。
- (2) コレクチンは、「古典的コレクチン」と「新規コレクチン」に分類される。古典的コレクチンは、糖認識領域により微生物などの糖鎖を認識し排除するという、自然免疫関連分子である。例えば、古典的コレクチンに分類されるマンナン結合レクチンは、細菌の膜の構成成分であるマンナン糖鎖を認識することで、1) 補体の活性化、2) 細菌のオプソニン化、3) 細菌凝集能による物理的な排除、といった多岐にわたる作用メカニズムを介して感染防御効果を発揮している。
- (3) 新規コレクチンは、古典的コレクチンの糖認識領域で保存されているアミノ酸配列をベースにスクリーニングされた分子であり、これまでに3種類の新規コレクチン分子（腎臓コレクチン-1（CL-K1）、胎盤コレクチン-1（CL-P1）、肝臓コレクチン-1（CL-L1））が同定されている。これら新規コレクチンは古典的コレクチンと同様に糖結合活性や細菌リガンドへの結合能を示すなど、自然免疫関連分子としての機能を持つことが示されてきた。
- (4) 新規コレクチンは自然免疫のみならず、形態形成にも関与していることが示唆されている。3MC 症候群（Carnevale、Mingarelli、Malpuech、Michels Syndrome）というヒトの形態形成に異常をきたす遺伝子病に新規コレクチンである CL-K1 および CL-L1 の欠損や変異が関与していることが報告されたのである。また、3MC 症候群患者からは、補体の活性化に関わるセリンプロテアーゼ MASP-3（Mannose-binding lectin-associated serine protease-3）の欠損や変異もみつまっている。
- (5) 3MC 症候群は、ヒトにおいて、顔の特徴的な変形、口唇裂や口蓋裂、頭蓋骨癒合症、学習障害、生殖器や手足および膀胱腎臓の異常を含む、様々な発生的特徴を示す常染色体劣性遺伝病である。これまで本疾患の発症原因は不明であったが、この発見により、CL-K1 および CL-L1 が本病態に関与することが示唆されることとなった。しかしながら、3MC 症候群の病態解明には至っていない。CL-K1 および CL-L1 が形態形成においてどのような役割を果たしているのか、その分子機構は未だ不明である。
- (6) コレクチンの中でも CL-K1 および CL-L1 はその遺伝子構造が非常に類似していた。そこで両者の相互作用を検討したところ、CL-K1 と CL-L1 は CL-LK ヘテロ複合体を形成していることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

- (1) 3MC 症候群では、様々な CL-K1 および CL-L1 の変異が報告されており、どちらか一方の遺伝子変異のみで 3MC 症候群が生じうる。CL-K1 と CL-L1 は CL-LK ヘテロ複合体を形成しているため、CL-LK ヘテロ複合体の形成不全が 3MC 症候群に関与する可能性が考えられる。3MC 症候群において報告されている変異型コレクチンにおける CL-LK ヘテロ複合体の形成の有無を明らかにする。
- (2) CL-LK ヘテロ複合体のリガンド結合能や他の 3MC 症候群関連因子との相互作用の検討を行うことで、CL-LK ヘテロ複合体が形態形成においてどのような役割を果たしているのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) CL-LK ヘテロ複合体の調製

本研究では、バキュロウイルス発現系を用いて CL-K1、CL-L1 を共発現させ、組換え CL-LK ヘテロ複合体の発現および精製を行った。ヘテロ複合体を形成しているかどうかは ELISA を用いて検討した。

#### (2) CL-LK ヘテロ複合体のリガンド結合能の測定

これまでは、組換え CL-K1 および組換え CL-L1 のホモ複合体を調製し、様々なリガンドとの結合の有無が解析されてきたが、実際の生体内では CL-LK ヘテロ複合体として存在することが明らかとなったため、バキュロウイルス発現系で精製した CL-LK ヘテロ複合体がこれらのリガンドへの結合能を有しているかどうか ELISA で解析を行った。

#### (3) 変異型コレクチンが CL-LK ヘテロ複合体形成に与える影響の解析

3MC 症候群でみつかわっている変異型 CL-L1 の発現コンストラクトを作製し、バキュロウイルス発現系を用いて CL-K1 と共発現させ、CL-LK ヘテロ複合体を形成しているかどうかを調べた。

#### (4) CL-LK ヘテロ複合体と MASP-3 の相互作用解析

3MC 症候群の発症に関連することが報告されている MASP-3 についてバキュロウイルス発現系を用いて発現・精製を行った。この精製 MASP-3 を CL-LK ヘテロ複合体と混合し、両者の相互作用を ELISA によって評価した。

### 4. 研究成果

(1) これまで CL-LK ヘテロ複合体は血中濃度が低く、生体由来の精製 CL-LK ヘテロ複合体を用いて解析を行うことが困難であったが、タンパク質発現系を利用した組換え CL-LK ヘテロ複合体の発現および精製に関する報告もなく、CL-LK ヘテロ複合体の機能は不明なままであった。本研究では、バキュロウイルスを用いて CL-K1 と CL-L1 を共発現させることにより、CL-LK ヘテロ複合体を効率的に産生することに成功した。

(2) CL-L1 および CL-K1 の発現コンストラクトを作製し、バキュロウイルス発現系を用いて両タンパク質を共発現させたところ、培養上清から CL-L1 および CL-K1 のタンパク質発現をウェスタンブロットティングによって確認できた。また、この精製画分の Sandwich ELISA を行い、CL-K1 および CL-L1 が CL-LK ヘテロ複合体を形成していることを確認した。さらに、両者の相互作用形式を詳細に検討するため、Ca<sup>2+</sup>存在下や EDTA 存在下で Sandwich ELISA を行ったが、両条件でヘテロ複合体の形成が確認された。このことから、CL-K1 および CL-L1 は Ca<sup>2+</sup>依存的に結合活性を示す糖認識領域ではなく、その他の領域（おそらくコラーゲン領域）を介して互いに相互作用をしていると考えられた。

(3) 精製 CL-LK ヘテロ複合体がリガンドとの結合能を示すかどうか ELISA を用いて検討を行った。その結果、細菌表面成分である lipid A、LPS に Ca<sup>2+</sup>依存的に結合した。この結果は組換え CL-LK ヘテロ複合体がレクチン活性を維持していることを示唆するものであった。一方で、DNA や真菌表面成分であるザイモサンには Ca<sup>2+</sup>存在下、Ca<sup>2+</sup>非存在下の両方において結合することが明らかとなった。

(4) 3MC 症候群で報告されている変異型 CL-L1 を野生型 CL-K1 とバキュロウイルス発現系を用いて共発現させ、ウェスタンブロットティングで発現を確認したところ、CL-L1 は感染細胞内で発現が確認できるのに対し、培養上清中からは検出されなかった。一方で、野生型 CL-K1 は培養上清から検出された。このことから、野生型同士では細胞内で CL-LK ヘテロ複合体を形成して培養上清中に分泌されるのに対し、変異型 CL-L1 は細胞内で CL-K1 とうまく相互作用ができずに CL-LK ヘテロ複合体の形成不全が生じているものと考えられた。

- (5) CL-LK ヘテロ複合体と MASP-3 の混合溶液に対して Sandwich ELISA を行い、両者が相互作用することを明らかにした。また、この相互作用は EDTA かつ高い塩濃度環境下では解離することも明らかとなった。

以上のように、本研究では 3MC 症候群で報告されている変異型コレクチンが、CL-LK ヘテロ複合体の形成に影響を与えていることが明らかとなった。また、CL-LK ヘテロ複合体は、3MC 症候群関連因子として報告されたセリンプロテアーゼ MASP-3 と相互作用できることが明らかとなった。これらの結果から、CL-LK ヘテロ複合体はレクチン活性によって胎生期に存在する何らかの特異的なリガンドを認識し、そこに MASP-3 を集積させることによって胎生期の形態形成に関与している可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------