

平成22年 5月24日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770132

研究課題名 (和文) 2状態構造平衡モデルに基づいたM-フィコリンの異物認識機構の解明

研究課題名 (英文) Investigation of self and non-self discrimination mechanism by M-ficolin based on 2-state conformational equilibrium model

研究代表者

谷生 道一 (TANIO MICHIKAZU)

株式会社三菱化学生命科学研究所・研究部門・蛋白質立体構造研究グループ・特別研究員

研究者番号：10416662

研究成果の概要 (和文)：ヒトM-フィコリンの病原体認識には、活性型-不活性型間の2状態構造平衡が重要であるという仮説の検証を通して、その異物認識機構の解明を試みた。その結果、pH依存性2状態平衡の存在を証明し、それに関与する残基の同定に成功した。またM-フィコリンと、C反応性蛋白質との相互作用機構について新たな知見を得た。さらにM-フィコリンのNMR解析のための *Brevibacillus* 発現系を用いた新規安定同位体標識法の確立に成功した。

研究成果の概要 (英文)：The pathogen-recognition mechanism of human M-ficolin was investigated on the basis of our predicted 2-state conformational equilibrium model. We found the evidence of the pH dependent equilibrium between active and non-active states of the protein, and identified its related residues. New findings of the interaction between M-ficolin and C-reactive protein were obtained. In addition, we established the stable isotope labeling method of secreted proteins, such as M-ficolin, by using the *Brevibacillus* expression system for NMR study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：自然免疫、異物認識、構造平衡、フィコリン、NMR、*Brevibacillus choshinensis*

1. 研究開始当初の背景

フィコリンは、自然免疫における異物認識分子として働く生体防御レクチンの一種で、ヒトでは三種 (L、M、H) の存在が知られている。この蛋白質は、N末端側のコラーゲン

様ドメイン (COL) と、C末端側の糖鎖結合能を持つフィブリノーゲン様ドメイン (FBG) によって構成され、3量体を基本単位とする多量体を形成する分泌性蛋白質である。

フィコリンの異物認識機構については、こ

れまでに多くの研究が行われており、認識する病原体の種類や、補体活性レクチン経路への関与などが明らかになり、さらにFBGドメインの結晶構造解析から、その3量体形成機構および基質結合部位が明らかとなった。このような現状にも関わらず、フィコリンによる異物認識および排除の分子機構については未だ不明な点が多い。特に興味深い点として、フィコリンの基質が、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) など生物に普遍的に存在する糖鎖であり、守るべき自己細胞表面にも存在しているにも関わらず、フィコリンが病原体のみを認識するという事実が挙げられる。

我々は、世界で初めてM-フィコリンFBGドメインの結晶構造を明らかにし、3量体化によって形成される基質結合部位の規則的な空間配置が、病原体表面の高密度基質の認識に不可欠であるという知見を得た。さらにその活性解析から、基質結合領域にHis残基由来と予想される、pH依存性の活性型-不活性型間2状態構造平衡が存在するという独自のモデルを導き、これらの結果を基に、M-フィコリンの異物認識機構に関して、以下の仮説を提唱した。

- (1) この2状態構造平衡では、基質に直接結合するAsp282-Cys283間ペプチド結合における *cis* (活性型) -*trans* (不活性型) 異性を伴うため、単量体での基質結合能が極めて低くなる。
- (2) 単量体での基質結合能は極めて低いが、多量体形成による多価化により、病原体表面の高密度基質との接触確率を増加させ、親和性を高める。
- (3) 基質密度の低い自己細胞表面には、多量体形成による多価化の効果が無いため結合しない。

低基質結合能分子の多量体形成は、自然免疫の生体防御レクチンでは極めて多く見られる。上記の仮説が証明されれば、単量体の基質結合能が低いほど、かつ多量体形成数が多いほど、自己-非自己識別能が高いという、生体防御レクチンにおける一般法則も導かれる可能性がある。

これまで考えられていたフィコリンの異物認識機構では、多量体形成の重要性は指摘されていたが、実際に多量体化の有無による活性について十分に比較検証された例がなく、また個々の単量体における低親和性の重要性については全く注目されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、多量体を形成する種々の生体防御レクチンによる異物認識機構の一般法則の発見を目指し、M-フィコリンの異物認識における多量体形成の必要性と、低親和性の要因となる2状態構造平衡モデルの検証を目

的とした。

本研究目的のためには、多量体形成の有無による活性解析、およびAsp282-Cys283間ペプチド結合の *cis-trans* 異性化平衡の検証を行わなければならない。そこで本研究期間における到達目標として、(1) 単量体および多量体 M-フィコリンの基質結合活性の比較検証、(2) NMR を用いた単量体 M-フィコリンの溶液構造の解析の2つを設定した。

3. 研究の方法

(1) 試料調製

ヒトM-フィコリン全長、FBGドメイン、およびその種々の変異体蛋白質は、*Brevibacillus choshinensis* 分泌発現システム (Takara Bio) を用いて調製した。発現蛋白質はいずれもC末端側に6xHisタグを付けるように設計した。一般的にフィコリンは、天然状態で12-18量体という多量体を形成しているが、*Brevibacillus* により発現させた全長M-フィコリン (full) は、SDS-PAGEおよび動的光散乱 (DLS) 解析から、3量体のみを形成していることが明らかとなった。このため、多量体と三量体のM-フィコリンの活性比較は不可能となった。一方、三量体M-フィコリンFBGドメイン (FD1) は、Phe127およびLeu128をそれぞれSerなどに置換すると、容易に単量体FBGドメイン (SS) となることがDLS解析により明らかとなった。これらの事より、full、FD1およびSSの活性解析を行い、COLドメインの有無による活性比較 (full対FD1)、単量体と3量体FBGドメインの活性比較 (SS対FD1) を行った。

(2) GlcNAc 結合活性測定

活性測定には、GlcNAc アガロース (Sigma) を用いたブルダウンアッセイ法およびZonal Affinity Chromatography (ZAC) 法を用いた。ブルダウンアッセイ法では、GlcNAc アガロース 20 μ l の入ったMicroSpinカラム (GE Healthcare) に、100 μ l の目的蛋白質溶液 (0.1-0.2 μ g/ml 蛋白質、50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂) を添加し、4°C で2時間インキュベートすることで、GlcNAc に結合した蛋白質を分離した。結合した蛋白質は、100 μ l の結合緩衝液により一度洗浄した後、100 μ l のGlcNAc 溶液 (0.5 M GlcNAc、50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂) により溶出した。フロースルー、洗浄溶液および溶出液の各溶液中の目的蛋白質の濃度を、カラムに添加する前のそれと比較し、結合の有無および強弱を判断した。

ZAC法では、500 μ l GlcNAc アガロースをTricorn emptyカラム 5/20 (GE Healthcare) に導入し、AKTAexplore 10Sシステム (GE Healthcare) に接続した。全ての操作は、4°C で行い、試料条件は0.2 mg/ml 蛋白質、50 mM

MES-NaOH pH 7.0、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂で行った。また、基準となる非結合試料における溶出位置の確認には、0.5 M GlcNAcを含む緩衝液を用いた試料で行った。カラムは予め、使用する緩衝液にて平衡化した後に、試料の添加を行った。流速は毎分0.1 mlで行い、試料添加後50分間送液を続け、280 nmの吸光度変化およびSDS-PAGEにより溶出蛋白質の解析を行った。

(3) GlcNAc 結合-解離実験

FD1の2状態平衡の存在を確かめるために、300 µlのFD1溶液(0.1 µg/ml FD1、50 mM MES-NaOH pH 7.0 or 6.2、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂)を、GlcNAc アガロース 20 µlの入ったMicroSpin カラムへ添加し4°Cで2時間インキュベートした。その後、GlcNAc カラムに結合したFD1の洗浄操作による解離実験、およびフロースルー溶液中のFD1のGlcNAc結合活性測定を行った。

解離実験では、FD1が結合したGlcNAcカラムを、300 µl各結合緩衝液にて4°Cで2時間インキュベートし、その作業を3回繰り返した。この洗浄作業後にカラムに結合して残ったFD1を、300 µl GlcNAc 溶液にて溶出した。

フロースルー溶液中のFD1の活性解析では、200 µlのフロースルー溶液を新たなGlcNAcカラムを用いて、4°Cで2時間インキュベートし、結合したFD1を200 µl GlcNAc 溶液にて溶出し、2回目のフロースルー溶液中のFD1と共に濃度解析を行った。

(4) 安定同位体標識法確立

Brevibacillus 分泌発現システムを用いた安定同位体標識には、クロレラ工業のC. H. L. 培地が、菌の発育および目的蛋白質の発現のいずれにも適していることが我々の研究で明らかとなっていた。そこで、この発現系によるアミノ酸選択的安定同位体標識法の確立のために、非標識C. H. L. 培地に、¹⁵N 標識アミノ酸を100 mg/lとなるように添加したC. H. L. 培地を調製した。モデル試料として、比較的安定でNMR信号の帰属がすでに成されている12-kDa ヒトFK506結合蛋白質(FKBP)を用いた。Pro以外の19種類のアミノ酸について、各¹⁵N 標識アミノ酸含有C. H. L. 培地を作成し、各培地から得られた標識FKBPの¹H-¹⁵N HSQC NMR スペクトル解析から、*Brevibacillus*を用いて選択的に標識出来るアミノ酸について検討した。その結果、9種類のアミノ酸において選択的標識が可能であることが判明した。この結果を踏まえ、M-フィコリンの安定同位体標識試料を作成し、NMR スペクトルを測定した。

(5) M-フィコリンとCRPの相互作用解析 最近になりフィコリンが急性期蛋白質で

あるC反応性蛋白質(CRP)と相互作用し、認識する病原体を広げている可能性が示された。これは、フィコリンの新たな異物認識機構が存在することを示しているが、CRPとフィコリンとの相互作用機構については不明な点が多い。そこで、プルダウンアッセイ法およびZAC法を応用して、CRPとM-フィコリンとの相互作用解析を行った。試料として、CRPとフィコリンの混合溶液(0.2 mg/ml CRP、0.2 mg/ml full、FD1またはSS、50 mM MES pH 7.0、150 mM NaCl、5 mM CaCl₂)を用い、実験は全て4°Cで行った。また、Hisタグ精製のHis-Accept(HA)レジン(Nacalai Tesque)も、プルダウンアッセイ法に用いた。

4. 研究成果

(1) M-フィコリンのHis依存性活性および2状態平衡の証明

これまでの我々の研究で、FD1は3残基のHisに由来すると予想されるpH依存活性を示すことが明らかとなっていた。そこで、FD1に含まれる6つのHis残基(132、194、215、251、284および297)に変異を加えたFD1のGlcNAc結合活性を、プルダウンアッセイ法を用いて解析した。その結果、6つのHis残基のうち、His251、His284およびHis297が基質結合能に不可欠な残基であることが分かり、これらがFD1のpH依存活性の原因であると結論した。また、GlcNAc結合-解離実験より、GlcNAcカラムを素通りしたFD1でも、新たなGlcNAcカラムへアプライすると、pHに依存して結合することが分かった。一方、GlcNAcカラムに結合したFD1も、緩衝液で洗浄することで、pHに依存して解離することも分かった。これらの結果は、FD1が溶液中で容易に活性型-不活性型の2状態平衡になっていることを示しており、この平衡状態の存在により、フィコリンは容易に基質と結合し、かつ解離もすると考えられる。これはまた、自己細胞表面のような低基質密度表面に、多量体フィコリンが接触しても、単量体が基質に結合した状態とほぼ同じであるため、容易に解離出来ることを意味しており、これが自己を認識しない機構であると考えられる。

(2) full-FD1およびFD1-SSの活性比較

いずれも3量体であるfullとFD1のプルダウンアッセイ法によるGlcNAc結合活性比較を行った結果、両者の挙動に大きな差は確認されなかった。これは、GlcNAc結合にはCOLドメインの存在の影響がほとんど無いことを示している。一方、三量体FBGドメインであるFD1と単量体FBGドメインであるSSでは、明らかにSSの方が、結合活性が低下しており、プルダウンアッセイ法では、SSのほとんどが素通り画分に溶出されていた。しかし、ZAC法による解析から、SSは結合能を

失っているのではなく、極めて弱い結合能を示すことが分かった。単量体化のために変異を加えた Phe127 および Leu128 は、基質結合部位 (Cys283 付近) とは、一次構造および三次構造上、大きく離れた位置にあることから、これらの変異が基質結合能に直接影響するとは考えにくい。従って SS の基質に対する弱親和性は、単量体 FBG ドメイン特有の性質であると考えられ、多量体形成は、基質結合能を増加させるために不可欠であることが分かった。さらに、この多量体化の効果は、病原体表面のような高基質密度表面に対してのみ有効であるため、非自己認識に極めて重要であることを示唆している。

(3) M-フィコリンの CRP 相互作用部位

CRP と full, FD1 および SS との各相互作用を比較するために、GlcNAc レジンおよび HA レジンをを用いたプルダウンアッセイを行った。GlcNAc レジンをを用いた一連の実験では、FD1 のみが CRP と結合し、full および SS とは結合しないという結果を得た。一方、HA レジンをを用いた実験では、full, FD1 および SS いずれも CRP と相互作用しないという結果になった。これらの結果から、CRP は 3 量体 FBG ドメインに結合するが、単量体 FBG ドメインには結合しないことが明らかとなり、CRP が結合する部位は、His タグの存在する C 末端領域に近い領域であることが示唆された。C 末端領域は、立体構造上、FBG ドメインと COL ドメインの接続領域に近接していることから、full が CRP と結合しなかったのは、COL ドメインの存在が立体障害となって、CRP との相互作用を阻害するためと予想した。そこで、FD1 の His タグを、C 末端ではなく、本来 COL ドメインが存在するはずの N 末端に付与した蛋白質を作成し、その活性をプルダウンアッセイ法により解析したところ、GlcNAc レジンおよび HA レジンをを使った場合のいずれにおいても、CRP との相互作用は観測されなかった。これは CRP と M-フィコリンとの相互作用が、N 末端側の COL ドメインにより阻害されることを明確に示しており、CRP は、M-フィコリンの FBG ドメインにおける、COL ドメインとの接続領域近傍に結合することを強く示唆している。一方、ZAC 法による解析では、CRP は弱いながらも full と相互作用していることが明らかとなった。これらの結果から、CRP は M-フィコリンと相互作用するが、その結合能は、COL ドメインの構造に依存し、おそらく COL ドメインの折れ曲がりにより、促進されるものと考えられた。このような COL ドメインの折れ曲がり、多量体フィコリンが病原体表面に分布する GlcNAc 等の基質に結合したときに誘起されると予想され、CRP と M-フィコリンの相互作用は、フィコリンの病原体結合後により起こりやす

いということを示唆している。

(4) M-フィコリンの安定同位体標識

M-フィコリンの病原体認識機構に関するさらなる研究促進には、NMR を用いた解析が必要だと考え、そのための *Brevibacillus* 分泌発現系によるアミノ酸選択的安定同位体標識法の確立を試みた。FKBP をモデル蛋白質として用いた解析から、この発現系では、Ala、Arg、Asn、Cys、Gln、His、Lys、Met および Val の 9 残基において、選択的に標識されることが明らかとなった。この方法を応用し、SS の安定同位体標識試料を作成し、 ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトル測定にも成功した。しかし、 $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]$ Cys および $[\alpha\text{-}^{15}\text{N}]$ His 選択的標識 SS の各 ^1H - ^{15}N HSQC NMR スペクトルでは、基質結合に関与すると予測される Cys283 および His284 の NMR 信号が観測されなかったため、現時点では 2 状態構造平衡モデルの検証には至っていない。これは、基質結合領域が不均一構造を取っているため、NMR 信号の広幅化が起こったものと推察されたが、今後さらなる検討が必要と思われる。

(5) 総括

本研究により、① M-フィコリンの 2 状態平衡の存在証明、② 活性に関与する His 残基の同定、③ 多量体化による FBG ドメインの基質結合能増加の証明、④ CRP との相互作用機構の新たな知見の獲得、および ⑤ フィコリンを含む分泌性蛋白質の NMR 解析のための新規安定同位体標識法の確立をすることに成功した。本研究は、代表者らが世界で初めて成功した M-フィコリン FBG ドメインの結晶構造解析および機能解析結果を基に設計されている。特に弱相互作用に着目して行われた本研究から得られた成果は独自性の高いものとなっており、Asp282-Cys283 間ペプチド結合の *cis-trans* 異性化平衡についての証拠は得られなかったものの、当初の目的をほぼ達成出来たと確信している。本研究結果から、単量体では基質に対して低親和性を示すことが「自己の非認識」に重要であるのに対し、高基質密度のみを認識出来るように多量体を形成することで「非自己の認識」を成し遂げるといふ、自己-非自己識別機構の一般的法則の存在が示唆された。これらの成果は今後、フィコリンを含む多量体形成病原体認識蛋白質の構造・機能解析を進展させ、さらには創薬応用へ繋がるものと期待される。

また、本研究で用いられた ZAC 法は、極めて弱い分子間相互作用解析に適している解析法であり、通常はカラムに固定化した基質分子と流液中に含まれる分子との相互作用解析に用いられるものであるが、本研究ではそれをさらに進展させ、互いに弱く相互作用し得る 2 分子を同時に送液し、その相互作用

を評価するという新しい試みを行った。この方法は、未完成の解析法であるが、定性的な解析には十分使用出来ることを、本研究で示すことが出来た。今後、CRP-フィコリン間のような、弱相互作用に対する新たな解析法として発展するものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Tanio, M., Wakamatsu, K., and Kohno, T. Binding site of C-reactive protein on M-ficolin, *Mol. Immunol.* 47, 215-221 (2009) 査読有.
- ② Tanio, M., Tanaka, R., Tanaka, T., and Kohno, T. Amino acid-selective isotope labeling of proteins for nuclear magnetic resonance study: Proteins secreted by *Brevibacillus choshinensis*, *Analytical Biochemistry*, 386, 156-160 (2009) 査読有.
- ③ Tanio, M., and Kohno, T. Histidine-regulated activity of M-ficolin, *Biochemical Journal*, 417, 485-491 (2009) 査読有.

[学会発表] (計5件)

- ① 谷生道一、楠英樹、田中利好、田中剛史、河野俊之、*Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系を用いたアミノ酸選択的安定同位体標識試料作成、第48回NMR討論会、2009年11月10-12日、九州大学医学部百年講堂
- ② 谷生道一、河野俊之、M-フィコリンのC反応性タンパク質結合部位、日本生物物理学会第47回年会、2009年10月30日-11月1日、アスティとくしま
- ③ 谷生道一、田中利好、田中剛史、河野俊之、*Brevibacillus choshinensis* を用いた組換えタンパク質の分泌生産および安定同位体標識試料調製、日本蛋白質科学会第9回年会、2009年5月20-22日、熊本全日空ホテルニュースカイ
- ④ 谷生道一、近藤伸、杉尾成俊、河野俊之、M-フィコリンの3価認識単位の構造平衡、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月3-5日、福岡国際会議場
- ⑤ 谷生道一、田中利好、田中剛史、河野俊之、*Brevibacillus choshinensis* 分泌発現系を用いた ^{15}N 安定同位体標識

試料作成、第47回NMR討論会、2008年11月12-14日、筑波大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷生 道一 (TANIO MICHIKAZU)
株式会社三菱化学生命科学研究所・研究部門・蛋白質立体構造研究グループ・特別研究員
研究者番号：10416662

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し