

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11185

研究課題名(和文) 尿路病原性大腸菌に対する異所性肺コレクチンの生体防御機能の分子基盤解明

研究課題名(英文) Role of surfactant proteins A and D in host defense against uropathogenic Escherichia coli.

研究代表者

有木 茂 (Ariki, Shigeru)

札幌医科大学・医療人育成センター・准教授

研究者番号：80464478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、尿路病原性大腸菌に対する生体防御における、肺コレクチンの構造と機能の相関を、野生型の肺コレクチンおよびキメラタンパク質を用いて解析した。コレクチンの機能は解析緩衝液の組成により予想以上に変化することが明らかとなった。さらに、菌体凝集作用や菌体増殖抑制作用を示すのに必要なタンパク質の領域も明らかにすることができた。二種類の肺コレクチンが共存したときには、予想に反して相乗的な効果はみられず、むしろ競合するような結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、異所性に発現している肺コレクチンの機能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を行い、コレクチンによる尿路病原性大腸菌に対する自然免疫機構の全体像が明らかにできれば、尿路感染症のリスク評価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 the correlation between structure and function of lung collectins in host defense against uropathogenic Escherichia coli. The function of collectins dramatically changed depending on the composition of the analysis buffer. We also identified the region of the proteins required to exhibit the bacterial cell aggregation and the bacterial cell growth inhibitory activities. When the two types of lung collectins (SP-A and SP-D) coexisted, no synergistic effect was observed, but rather competitive effect was obtained.

研究分野：生化学

キーワード：自然免疫 コレクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 肺コレクチン(肺サーファクタントタンパク質 A および D、以下 SP-A および SP-D と省略)は、肺胞 II 型細胞で産生され肺胞腔に分泌されるタンパク質で、肺サーファクタントの構成成分として発見された。コレクチンとは、コラーゲン様の構造を示すドメインをあわせもつコレクチン(糖を認識するタンパク質の総称)である。肺コレクチンは、宿主細胞や細菌の表層に存在する糖鎖を認識することで、呼吸器の自然免疫において重要な役割を果たす生体防御レクチンである。
- (2) 肺コレクチンの主要な発現組織は呼吸器であるが、胃、泌尿器などの組織においても発現が確認されている。しかしながら、これら異所性に発現している肺コレクチンの機能を解析した報告は少なく、呼吸器以外の組織でどのような役割を果たしているのかは不明であった。
- (3) 尿路感染症を繰り返す患者では、尿中における肺コレクチンの濃度が有意に低いことが報告されていた。そこで、尿路病原性大腸菌に対する肺コレクチンの生体防御機能を解析したところ、SP-A と SP-D はいずれも尿路病原性大腸菌が尿路上皮へ接着するのを抑制した。一方で、尿路病原性大腸菌を凝集する作用や、増殖を抑制する作用の解析では、SP-A と SP-D は異なる挙動を示した。
- (4) 尿路上皮で発現している肺コレクチンが生体防御機能を果たしていることは明らかとなったが、上述したような作用の違いを説明するためには、肺コレクチンの構造と機能の相関を解析する必要があると考えられた。

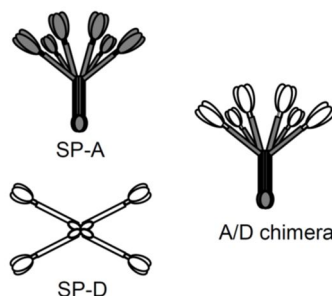
### 2. 研究の目的

- (1) 肺コレクチンはそれぞれ特徴的なオリゴマー構造を形成している。SP-A は 18 量体を形成し、花束のような構造をしている。一方、SP-D は 12 量体を形成し、十字架のような構造をしている。このようなオリゴマー構造の違いが、尿路病原性大腸菌に対する作用にどのような影響を与えるのかを明らかにする。
- (2) 生体内では SP-A と SP-D は共存している。これまでは個々のタンパク質の機能解析を行ってきたが、両者が共存した場合、単に相加的な作用を示すのか、あるいは相乗的な効果がみられるのかを解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) SP-A と SP-D のキメラタンパク質の調製

肺コレクチンのオリゴマー構造は、それぞれのタンパク質の N 末端側領域により規定される。一方、糖認識の特異性は C 末端側領域により規定される。したがって、SP-A の N 末端側領域と SP-D の C 末端側領域を組み合わせたキメラタンパク質 (A/D chimera) を作成すると、オリゴマー構造は SP-A のような花束構造であるが、糖認識の特異性は SP-D というようなタンパク質となる。本研究では、このような組換えタンパク質を調整し、SP-A や SP-D と機能を比較した。



#### (2) 大腸菌に対する凝集作用の測定

大腸菌の懸濁液に肺コレクチンを混合して一定の時間静置する。静置後に吸光度を測定することで細菌を凝集する活性を評価することができる。使用する緩衝液を変更したり、肺コレクチンを混合して加えるなど、様々な条件下で解析を行なった。

#### (3) 大腸菌に対する増殖抑制作用の測定

大腸菌と肺コレクチンを混合して培養し、一定時間後に寒天培地に培養液を播いてコロニーを形成させる。形成されたコロニー数をカウントすることで増殖抑制作用を評価した。使用する培養条件を変えたり、肺コレクチンを加えるなど、様々な条件下で解析を行

なった。

#### (4) 大腸菌への結合能の解析

大腸菌の懸濁液にコレクチンを混合し、一定時間インキュベートした後に遠心分離により大腸菌を回収する。回収した大腸菌に結合しているコレクチンをウエスタンブロットイングにより検出した。

#### 4. 研究成果

緩衝液の条件を変化させた場合の活性をまとめると、下表のような結果になった。これらから分かることを以下にまとめる。

	Ca <sup>2+</sup> 存在下			Ca <sup>2+</sup> 非存在下		
	SP-A	SP-D	A/Dchimera	SP-A	SP-D	A/Dchimera
凝集	-	++	+	-	-	-
増殖抑制	-	++	-	++	-	+

- (1) 大腸菌に対する凝集活性を示すには、SP-DのC末端側領域(糖認識領域)を含むことが必須である。コレクチンの糖認識領域はCa<sup>2+</sup>依存性(C型レクチン)であり、凝集活性が完全にCa<sup>2+</sup>に依存していることも、糖認識領域が重要であることを裏付けている。オリゴマー構造は必須ではないが、十字架様のオリゴマー構造が最適である。これらの結果は、以前の研究成果から推定されるものと矛盾はなく予想通りの結果であった。
- (2) 大腸菌の増殖を抑制する活性には、コレクチンのN末端側領域が重要であると考えられる。今回の解析では、N末端側領域のアミノ酸配列そのものが重要なのか、あるいはオリゴマー構造が重要なのかは明確にできなかったが、今後の解析で明らかにしていきたい。興味深い点は、Ca<sup>2+</sup>の有無で必要となるN末端側領域が異なることである。すなわち、Ca<sup>2+</sup>存在下ではSP-Dの、非存在下ではSP-AのN末端側領域が重要であると考えられる。
- (3) 表のように活性の有無が生じるのは、条件によってはそもそもコレクチンが大腸菌に結合できないからである可能性がある。そこで、コレクチンと大腸菌の結合を解析してみたが、Ca<sup>2+</sup>の有無に関わらず、すべてのコレクチンが大腸菌に結合していた。結合しているにも関わらず、Ca<sup>2+</sup>の有無で活性が大きく異なることから、コレクチンはCa<sup>2+</sup>の有無によって異なるリガンドを認識していると考えられる。本研究の当初計画では、尿路病原性大腸菌の表面に存在するコレクチンのリガンドを単離・分析する予定であったが、技術的な理由でリガンドの単離には至らなかった。今後、リガンドの単離に継続して取り組み、コレクチンと尿路病原性大腸菌の結合の詳細を明らかにしていきたい。
- (4) コレクチンを混合して解析に使用することで相乗的な効果が得られるのかを解析した。様々な条件を検討したが、相乗的な効果は見られなかった。むしろ、SP-AはCa<sup>2+</sup>存在下におけるSP-Dの増殖抑制活性を阻害する傾向がみられた。A/D chimeraについては、SP-Aとは相加的に、SP-Dに対しては抑制的な効果を示した。

以上のように、本研究では大腸菌に対する生体防御機能におけるコレクチンの構造・機能相関について多くの知見を得ることができた。研究開始当初には、コレクチン間に相乗的な効果があると予想していたが、むしろ抑制的にはたらくことは意外な結果であった。これまで、コレクチンの機能解析に関する報告において、SP-AとSP-Dを混合して解析したというものはほとんどなく、*in vitro*での生化学的な解析結果から生理機能を議論する上では重要な知見になるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takamiya Rina, Takahashi Motoko, Maeno Toshitaka, Saito Atsushi, Kato Masaki, Shibata Takahiro, Uchida Koji, Ariki Shigeru, Nakano Miyako	4. 巻 1864
2. 論文標題 Acrolein in cigarette smoke attenuates the innate immune responses mediated by surfactant protein D	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129699 ~ 129699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2020.129699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有木茂、齋藤充史、高宮里奈、高橋素子
2. 発表標題 サーファクタントタンパク質Aによる尿路病原性大腸菌の排除機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------