

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05739

研究課題名(和文) M-フィコリン-C反応性タンパク質複合体の可逆的凝集機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of reversible coaggregation of M-ficolin-C-reactive protein complex

研究代表者

谷生 道一 (Tanio, Michikazu)

国立感染症研究所・次世代生物学的製剤研究センター・主任研究官

研究者番号：10416662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血中のヒト自然免疫病原体認識タンパク質であるC反応性タンパク質(CRP)とM-フィコリンを混合するとカルシウム依存可逆的共凝集活性を示すことを新たに発見した。その分子機構解明として、複合体・凝集体におけるCRPとM-フィコリン異物認識ドメイン(FD1)の分子配置および関与するカルシウムの役割について検証した。その結果、FD1はCRPの基質結合部位にカルシウムを介して結合することが明らかとなり、FD1の基質結合部位は複合体の溶解度に関与することが示唆された。また、FD1の基質結合部位に位置するAsp282をAsnに変異させると、野生型FD1に比べ2倍以上高い共凝集活性を示す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

CRPとM-フィコリンの共凝集活性の生物学的意義は現段階では不明である。しかし、CRP濃度は動脈硬化症と相関があること、M-フィコリンは細菌感染等で活性化されたマクロファージにより産出されること、共凝集活性はpH低下により促進されること、動脈硬化巣ではpH低下が観測されることから、この共凝集現象は動脈硬化の形成に関与する可能性が考えられる。CRPとM-フィコリンは共に感染細菌の排除にも関与すると考えられていることから、本現象は、細菌感染が動脈硬化形成の要因の1つと成り得ることを示唆しており、今後も研究を進めることで、動脈硬化防止や治療法開発等への新たな知見に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Human C-reactive protein (CRP) and M-ficolin are the pathogen-recognition proteins of the innate immune system. It was newly found that a mixture of both proteins reversibly co-aggregates in a calcium-dependent manner. The molecular mechanism of the co-aggregation of CRP and M-ficolin ligand-binding domain (FD1) is investigated. FD1 was found to bind to the ligand-binding site of CRP through intrinsic calcium ions in CRP. The ligand-binding site of FD1 was suggested to contribute to the solubility of the FD1-CRP complex. In addition, it was found that the mutation of Asp-282 of FD1, which locates at its ligand-binding site, to Asn results in more than 2-fold higher co-aggregation activity with CRP as compared with the case using the wild-type FD1.

研究分野：生物物理学

キーワード：C反応性タンパク質 M-フィコリン 凝集 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、高血圧や糖代謝異常、細菌感染などにより、血管内皮で炎症が惹起され続けることで発症する慢性炎症疾患である。障害を受けた血管内膜では、酸化 LDL を取り込み泡沫化したマクロファージが集積することで、血管狭窄や閉塞の原因となる粥状硬化巣（プラーク）を形成する。症状がさらに進行すると、プラークはカルシウムを主成分とする石灰化状態へと変化する。これらの事は、泡沫化マクロファージが集積しなければプラーク形成は起こらず、またカルシウム供給源を絶てば石灰化が防げることを示唆する。しかし、泡沫化したマクロファージがなぜ血管内皮で集積するのか、そして、石灰化のためのカルシウムはどこから供給されるのかは明らかではない。また、動脈硬化巣では C 反応性タンパク質（CRP）の沈着が確認されている¹⁾。CRP（図 1A）は、炎症時に血中濃度が数倍～1000 倍以上に上昇する急性期タンパク質で、心筋梗塞などの冠動脈疾患のリスク評価としても有用なマーカーとして知られる。このため動脈硬化形成に CRP が何らかの形で関与していると考えられているが、明確な知見は得られていない。CRP は水溶性タンパク質であるため、この沈着は動脈硬化巣で CRP が何らかの理由で凝集することを意味している。一方、動脈硬化巣では CRP 以外にも様々な自然免疫関連タンパク質が検出されており、ヒト自然免疫の病原体認識タンパク質である M-フィコリンもその一つである²⁾。我々はこれまで、M-フィコリンと CRP との相互作用解析を行ない、CRP が M-フィコリン異物認識ドメイン（FD1；図 1B）の C 末端領域に結合することを明らかにしたが³⁾、その研究過程において、FD1 と CRP を低 pH (<~6.5) 環境下において混合すると、カルシウム依存の可逆的共凝集現象を示すことを独自に発見した（図 1C）。この凝集現象の生物学的意味は全く不明であるが、M-フィコリンは活性化マクロファージから産生されること⁴⁾、動脈硬化病変組織では局所的に pH が低下 (<~6) することから⁵⁾、炎症により形成された動脈硬化巣でのマクロファージ集積および CRP 沈着に、M-フィコリン-CRP 複合体の凝集形成現象が関与していると推測した。カルシウム要求性の共凝集体は、石灰化のためのカルシウム供給源になる可能性も高い。従って、FD1-CRP 複合体形成機構および凝集形成機構の分子レベルにおける解明およびカルシウム結合様式の解明は、動脈硬化形成機構の解明に繋がることが期待された。

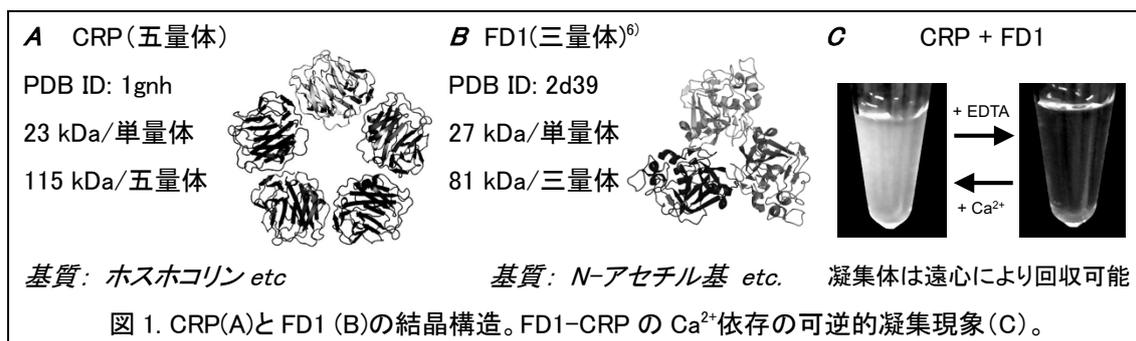


図 1. CRP(A)と FD1 (B)の結晶構造。FD1-CRP の Ca²⁺依存の可逆的凝集現象(C)。

2. 研究の目的

本研究では、FD1-CRP 複合体形成および凝集形成機構を分子レベルで解明することを目的とし、① FD1-CRP 複合体・凝集体の分子配置の解明、② FD1-CRP 複合体・凝集体形成に関与するカルシウム数および結合部位の解明を行う。また血中の CRP 濃度は炎症マーカーとして有用であることから、この FD1 との共凝集反応を利用した、簡易かつ低コストの CRP 検査法開発の基盤構築として、③ FD1-CRP の高凝集活性条件の解明を行う。

3. 研究の方法

① **FD1-CRP 複合体・凝集体の分子配置の解明**: 種々の変異体 FD1 を用いて、溶液状態ではブルダウン法により、共凝集状態では沈殿形成の有無により CRP 接触領域を探索する。また共凝集形成の検出方法の確立も行う。共凝集形成は pH 依存性であることから、基質結合部位の pH 依存構造変化が確認されている FD1 の His 変異体と、CRP との複合体・凝集体形成活性を調べる。また低温電子顕微鏡による複合体・凝集体の観察を試みる。

② **複合体・凝集体形成に関与するカルシウム数および結合部位の解明**: CRP と FD1 はいずれもカルシウム依存基質結合活性を有していることから、両タンパク質のいずれか、または両方の基質結合部位が複合体・凝集体形成に関与することが推測された。そこで両タンパク質の基質による複合体・凝集体形成阻害の有無を検証し、関与するカルシウム結合部位等の知見を得る。また不活化 FD1 変異体を用いて、CRP との相互作用の有無を検証する。

③ **高凝集活性条件の解明**: FD1 との凝集現象を利用した新規 CRP 検査技術の開発基盤として、ヒト血清存在下において、高効率で凝集する pH、希釈率等の条件探索を行う。必要に応じて、高凝集活性を有する FD1 変異体の探索を行う。

4. 研究成果

① FD1-CRP 複合体・凝集体の分子配置の解明

これまでの研究で、生理的条件 (pH 7.4, 140 mM NaCl) における FD1-CRP 混合溶液を、FD1 の基質である *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 固定化カラムにアプライすると、FD1 だけでなく CRP も GlcNAc 溶出分画に溶出されることから、FD1 と CRP が溶液中で複合体を形成すること、および複合体形成は FD1 の基質結合能に干渉しないことが分かっている (図 2A 左)³⁾。また変異体 FD1 を用いた CRP との相互作用解析から、FD1 の C 末端領域に CRP が会合することが分かっている³⁾。FD1 の GlcNAc 結合活性にはカルシウムが必須であるが、GlcNAc の結合の有無が FD1-CRP 複合体形成に影響しないことから、複合体形成には FD1 のカルシウムは関与していないと考えられた。一方、CRP は基質であるホスホコリン (PC) との結合に二つのカルシウムイオンが関与することから、複合体形成に CRP の基質結合部位が関与することが予想された。そこで、溶液状態の FD1-CRP 複合体に PC を添加し、プルダウン解析を行った (図 2A 右)。その結果、CRP はフロースルー分画にほぼ全て確認され、GlcNAc 溶出分画には FD1 のみが溶出された。これより、FD1-CRP 複合体は、CRP の PC 結合部位を介して形成されることが明らかとなった。これはまた、PC が凝集体形成も阻害される可能性を示唆した。そこで、凝集体形成を濁度変化としてリアルタイムで検出する濁度解析法を新たに確立し、FD1-CRP 凝集体形成が PC で阻害されるかどうか検証した (図 2B)。コントロール実験として、PC の代わりに EDTA を添加した試料の測定を行った。その結果、カルシウム添加により形成した凝集体は EDTA および PC のいずれかの添加でも溶解するが、再度カルシウムを添加すると、EDTA 添加試料のみが再凝集した。これは、PC が凝集体形成を完全に阻害していることを示しており、FD1-CRP 複合体および凝集体は、CRP の基質結合部位を介していることが明らかとなった⁷⁾。

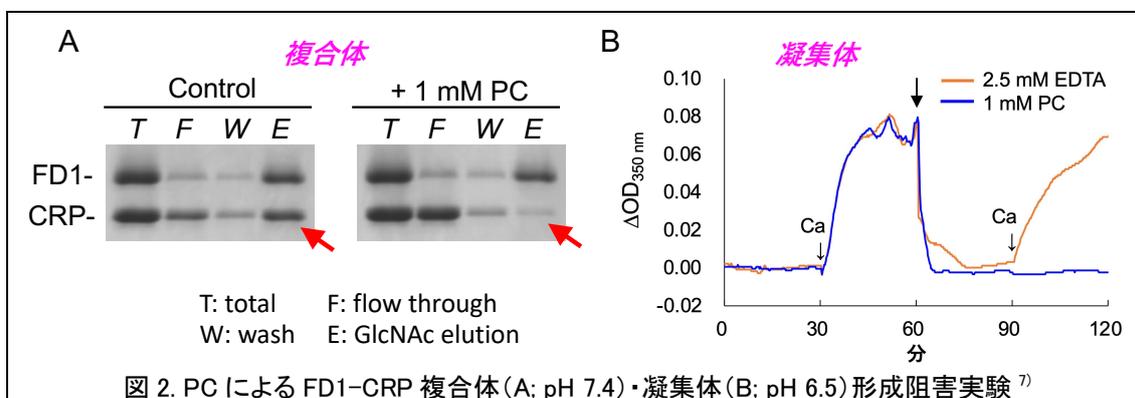


図 2. PC による FD1-CRP 複合体(A; pH 7.4)・凝集体(B; pH 6.5)形成阻害実験⁷⁾

これまでの研究で単量体 FD1 変異体 (SS) は CRP との相互作用が極めて弱いことが明らかとなっていたため³⁾、今回確立した濁度解析法を用いて、SS と CRP の共凝集活性の有無を検証した。その結果、SS は CRP との共凝集活性を示さないことが分かった。これは、複合体形成だけでなく、凝集体形成においても、FD1 の三量体形成が不可欠であることを示している。また低温電子顕微鏡を用いた凝集体解析では、明確な複合体の観察は出来なかったが、凝集条件においても CRP の環状五量体の構造は維持されていたことから、FD1-CRP 複合体・凝集体は、三量体 FD1-五量体 CRP の複合体である可能性が極めて高くなった。現在までの情報を基に、GRAMM: Docking Web Server⁸⁾にて予想された FD1-CRP 複合体立体構造モデルを図 3 に示す。凝集活性は FD1 の濃度上昇で著しく高くなるが、CRP 濃度上昇では限定的な増加に留まることも明らかとなったが⁷⁾、その理由についてはこのモデルでは説明出来ないため、さらなる検証が必要である。

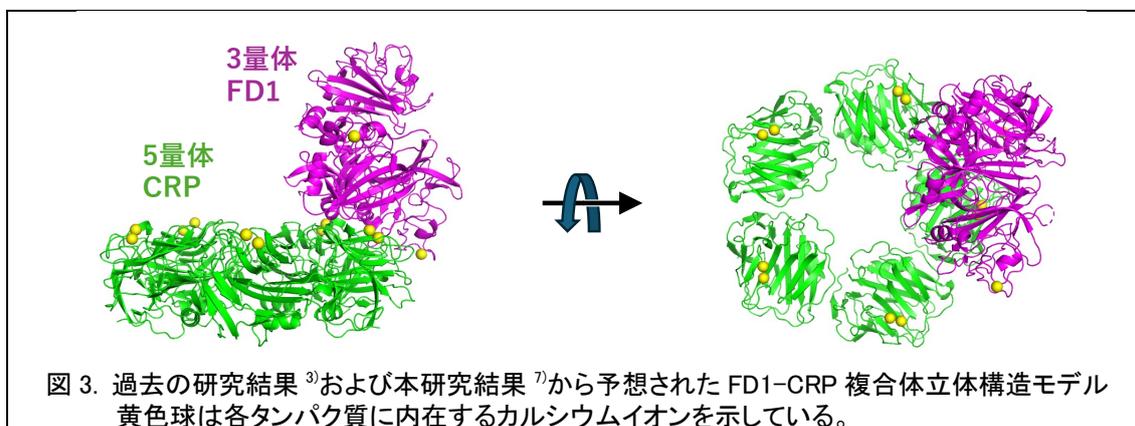


図 3. 過去の研究結果³⁾および本研究結果⁷⁾から予想された FD1-CRP 複合体立体構造モデル
黄色球は各タンパク質に内在するカルシウムイオンを示している。

またこのモデルでは、pH 依存で変化する FD1 の基質結合領域⁶⁾から CRP 結合部位が立体構造上離れているため、凝集体形成における pH 依存性についても説明が困難である。濁度解析により、

His 変異体 FD と CRP の凝集活性を調べたところ、6つの His 残基のうち、His251 および His297 の変異体で著しい共凝集活性の低下が見られ、His284 変異体でも有意な活性低下が見られた。一方、低塩濃度条件下では、全ての His 変異体 FD1 において pH 依存の共凝集活性が確認されたため、FD1 の基質結合部位は CRP との共凝集形成に間接的な関与であると予想された。そこで、野生型 FD1 (WT) と基質結合能欠失変異体 FD1 の H284A について、CRP との共凝集活性の GlcNAc による影響について解析を行った (図 4)。コントロール実験として、GlcNAc の代わりに類似分子のグルコース (Glc) を用いて同様の解析を行った。カルシウム添加により形成された凝集体に、GlcNAc を添加すると、WT では部分的に濁度低下が見られるのに対し、H284A では濁度変化が起こらなかった。一方、Glc の添加では、WT および H284A のいずれも濁度変化は観測されなかったため、WT における GlcNAc 添加による共凝集低下は、FD1 に GlcNAc が特異的結合することによって誘起されたことが明らかとなった。これは、GlcNAc が凝集形成を阻害する、即ち、凝集形成が GlcNAc 結合部位を介している可能性を示唆したが、低塩濃度条件下で同様の実験を実施したところ、WT および H284A のいずれも CRP との凝集活性が増加し、GlcNAc の依存性が低下した。これらの結果は、FD1 の基質結合部位は、CRP と FD1 の相互作用には関与せず、FD1-CRP 複合体の溶解度を制御している可能性を示唆する⁷⁾。

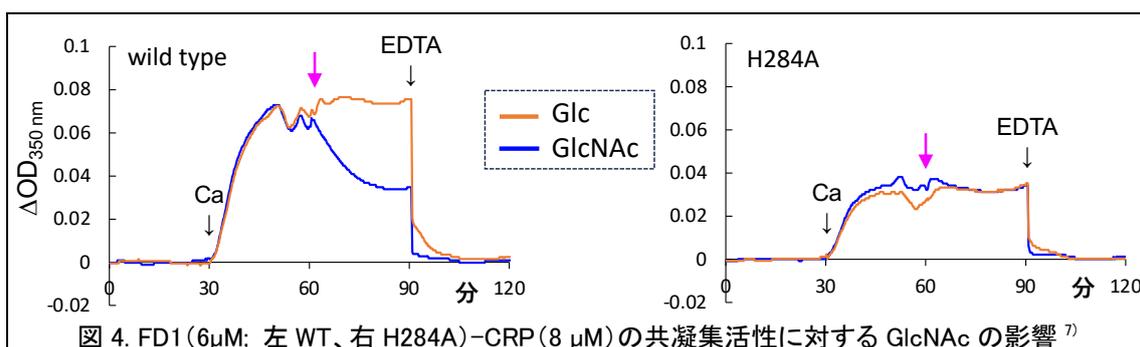


図 4. FD1 (6 μ M; 左 WT、右 H284A)-CRP (8 μ M) の共凝集活性に対する GlcNAc の影響⁷⁾

② 複合体・凝集体形成に関与するカルシウム数および結合部位の解明

図 2 より、FD1-CRP 複合体および凝集体は、PC 結合部位を介していることが明らかとなったことから、複合体および凝集体形成には、CRP の PC 結合部位に存在する 2 つのカルシウムが関与していることが明らかとなった。また過去の研究³⁾と図 4 より、FD1 の GlcNAc 結合部位は、複合体・凝集体形成に直接関与していないと考えられた。これより、複合体・凝集体形成に関与するカルシウムイオンは、CRP 基質結合部位にある 2 個/CRP 単量体と結論した。但し、複合体および凝集体中の FD1-CRP 比については、まだ結論が得られていないため、今後さらなる研究が必要である。

③ 高凝集活性条件の解明

①の結果より、CRP の基質結合部位は FD1 との相互作用に直接関与する一方、FD1 の基質結合部位は、FD1-CRP 複合体の溶解度を制御することが示唆された。そこで、FD1 の基質結合部位付近に変異導入を行うことで、高凝集活性を示す FD1 変異体の作成が可能であると考えられた。複数の FD1 変異体について CRP との共凝集活性を調べたところ、FD1 の基質結合部位近傍の Asp282 を Asn に変異した D282N 変異体が、WT に比べ 2 倍以上の共凝集活性を示すことが分かった (図 5)。これは、FD1 の基質結合部位の荷電状態が溶解度変化に寄与している可能性を示唆している。

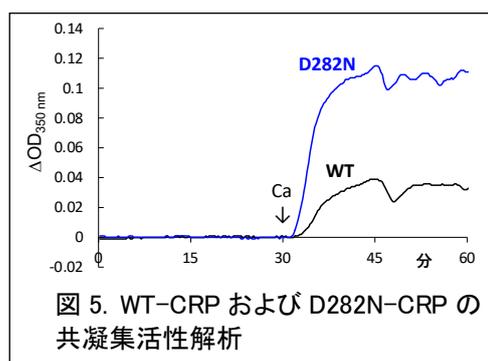


図 5. WT-CRP および D282N-CRP の共凝集活性解析

一方、ヒト血清共存下においても FD1-CRP 共凝集活性は観測されたが、CRP は血清中の超低密度リポタンパク質とも類似したカルシウム依存可逆の共凝集現象を起こすことが判明したため、FD1-CRP 共凝集活性を利用した新規 CRP 検出技術開発は困難と結論した。

<引用文献>

- 1) Sun *et al.*, *Am. J. Pathol.* 167, 1139-1148 (2005)
- 2) Fumagalli *et al.*, *Front. Immunol.* 8, Article 288 (2017)
- 3) Tanio *et al.*, *Mol. Immunol.* 47, 215-221 (2009)
- 4) Frankenberger *et al.*, *Mol. Immunol.* 45, 1424-1430 (2008)
- 5) Öörni *et al.*, *J. Lipid Res.* 56, 203-214 (2015)
- 6) Tanio *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282, 3889-3895 (2007)
- 7) Tanio, *Mol. Immunol.* 149, 157-164 (2022)
- 8) Singh, *et al.*, *Methods in Mol. Biol.*, 2714, 101-112 (2024)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Michikazu Tanio	4. 巻 149
2. 論文標題 Calcium-dependent reversible coaggregation activity of C-reactive protein and M-ficolin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 157 ~ 164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molimm.2022.07.001	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 谷生 道一
2. 発表標題 M-フィコリンとC反応性タンパク質の可逆的凝集活性
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------