

立体構造から見る補体因子 C3、その活性化と制御機構

武田 壮一¹⁾、宮田 敏行^{2), 3)}

¹⁾国立循環器病研究センター 先端医療技術開発部、²⁾脳血管内科部、³⁾大阪工業大学 生命工学科

Activation and regulation mechanisms of complement factor C3 based on
the three-dimensional structure

Soichi Takeda¹⁾ and Toshiyuki Miyata^{2), 3)}

¹⁾ Department of Advanced Medical Technologies, National Cerebral and Cardiovascular Center,

²⁾ Department of Cerebrovascular Medicine, National Cerebral and Cardiovascular Center,

³⁾ Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology

[抄録]

この約 20 年の間に、補体因子の活性化や阻害の機序は立体構造の観点から説明できるようになってきた。C3 に関しては、C3 およびその断片の単独の構造 (C3a、C3b、C3c、C3d) だけではなく、C3b-B 因子、C3b-Bb、C3b-B 因子-D 因子、C3b-Bb-プロペルジン、C3b-H 因子、C3b-H 因子-I 因子などの複合体の結晶構造も決定されている。これらの補体因子単独や複合体の立体構造の解析の結果、活性の発現やその制御に重要な意味を持つ劇的なコンフォメーションの変化や微細な構造の変化が観察されている。本稿では、ヒト C3 とその断片、およびそれらに関わる因子群の多彩な機能を立体構造の観点から眺めてみたい。

[Abstract]

Over the past two decades, the three-dimensional structures of complement factors have elucidated the mechanisms of activation and regulation of the complement system. Not only the structure of C3 and its fragments (C3a, C3b, C3c, and C3d) but also the structures of its complexes such as C3b-factor B, C3b-Bb, C3b-Bb-properdin, C3b-factor B-factor D, C3b-factor H, and C3b-factor H-factor I, have also been determined. The three-dimensional structures of these complement factors alone or in complex with regulatory proteins have revealed both the dramatic and subtle conformational changes that have important implications for the expression and regulation of their activity. In this paper, we review the diverse functions of human C3 and its related factors based on their three-dimensional structures.

[キーワード] C3、立体構造、コンフォメーション、セリンプロテアーゼ

[はじめに]

補体は細菌や微生物を死滅させる作用や抗原抗体複合体の機能を補う作用にとどまらず、極めて多彩な機能を有する。ヒトでは補体に関わる 48 種のタ

ンパク質の一覧表があるものの 60 種近いタンパク質が関わるとの記載もある^{1, 2)}。なかでも、C3 は血中の濃度が高く 1 mg/mL を超えており、補体系の中心となる分子である。C3 は 3 つの経路により

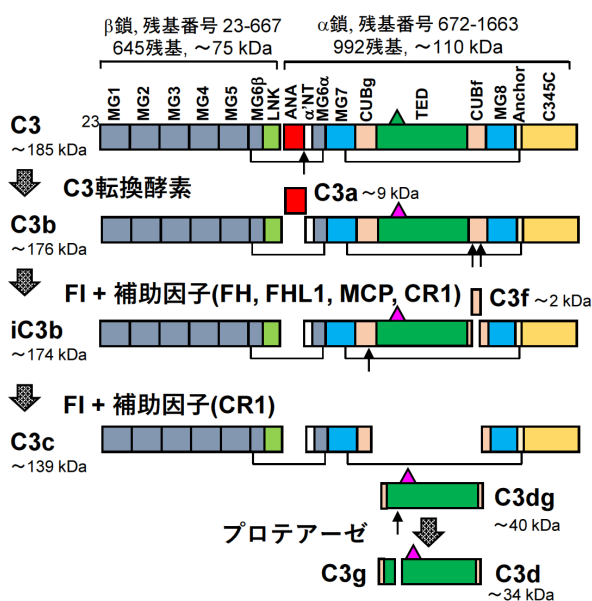


図1 補体 C3 およびその断片のドメイン構成

C3 はシグナル配列が切断除去され、かつ分子のほぼ中央の 4 残基の Arg が切断除去された血中に循環する 2 本鎖の成熟型を示している。ポリペプチド鎖は分子量が大きい方から順に α 鎖、 β 鎖と命名されている。ドメイン名の略称は以下の通り。MG: マクログロブリン様ドメイン、LNK: リンカードメイン、ANA: アナフィラトキシンドメイン、CUB: Complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1 ドメイン、TED: チオエステル含有ドメイン、C345C: C3、C4 および C5 に見られる C 末端ドメイン。C3b を切断するプロテアーゼ FI と切断に必要なとされる補助因子 (FH: H 因子、FHL1: Factor H-like 1、MCP: membrane cofactor protein および CR1: complement receptor 1) を示す。黒線は C3 の β 鎖と α 鎖を結合するジスルフィド結合を示す。TED ドメイン内の緑色の三角形はチオエステル結合を示し、マゼンタ色の三角形は加水分解されたチオエステル結合を示す。

活性化され、生じた C3a と C3b がさまざまな生物学的応答を生み出す。C3 に結合する血漿タンパク質は C3 転換酵素しか知られていないが、C3b には実に多くの因子が結合し、その結果多彩な機能を示すようになる。これは C3b への変換の際に生じる複数のドメインの位置の移動を伴う大きなコンフォメーション変化により説明される³⁷⁾。補体因子はいくつかのドメインから成り、それらの機能は立体構造の観点から理解できるものもある。補体因子である断片 Bb、D 因子 (FD)、I 因子 (FI) はセリンプロテアーゼであるが、これらのプロテアーゼ活性の発現機序はトリプシンやキモトリプシンとは異なることが立体構造から理解される。本論文でのタンパク質のアミノ酸残基の番号は翻訳開始 Met を 1 とし、ヒトの補体因子について述べる。

1. 補体 C3 およびその主要断片の構造的特徴

1-1. C3 の構造的特徴

C3 の生化学的性質を表 1 に、ドメイン構造を図 1 に示す。C3 は主に肝細胞で合成される。プレプロ C3 はシグナル配列が切断除去されプロ C3 になり、ゴルジ体で分子中央の 4 残基の Arg が切断除去され、N 末端側の β 鎖 (645 残基) と C 末端側の α 鎖 (992 残基) が 1 つのジスルフィド結合で結合した成熟型 C3 として血中に分泌される。 β 鎖は 5 つのマクログロブリン様 (MG) ドメイン (MG1-5)、MG6 ドメインの半分、リンカー領域 (LNK) を含み、 α 鎖はアナフィラトキシンドメイン (ANA) ドメイン、MG6 ドメインの残り半分、MG7 ドメイン、CUB ドメイン、チオエステル含有ドメイン (TED)、C 末端の C345C ドメインからなる (図 1)⁵⁷⁾。MG6 は β 鎖と α 鎖に分断されていて、LNK と ANA がその間に挿入されている。

ヒト C3 の立体構造を図 2A に示す⁸⁾。C3 の立体構造は β 鎖の 6 個の MG ドメインにより形成される MG リングが核になり、その上に α 鎖の 3 つの

表 1 C3 とそれに作用する因子の生化学的性質

	C3	B因子(FB)	D因子(FD)	プロペルジン(FP)	I因子(FI)
血中での存在様式	2本鎖糖タンパク質	1本鎖糖タンパク質	1本鎖単純タンパク質	2量体、3量体、4量体	2本鎖糖タンパク質
分子量	185kDa β鎖 約 75 kDa α鎖 約 110 kDa	93 kDa	25 kDa	53 kDa	88 kDa 重鎖 51 kDa 軽鎖 37 kDa
残基数	β鎖 645残基 α鎖 992残基	739残基	228残基	442残基	重鎖 317残基 軽鎖 244残基
血清濃度	700-1300 µg/mL (5.4 µM)	200 µg/mL (2.2 µM)	1-2 µg/mL (0.083 µM)	4-25 µg/mL (0.4 µM)	35 µg/mL (0.47 µM)
主な産生部位	肝臓	肝臓	脂肪細胞、 マクロファージ	好中球、単球、 樹状細胞	肝臓
機能	補体反応の中心分子	セリンプロテアーゼ前駆体	セリンプロテアーゼ	補体活性亢進、 パターン認識分子	セリンプロテアーゼ
特徴	C3転換酵素によりアナフィラトキシンC3aとオプソニンC3bを産生	C3bに結合したFBがFDにより切断されてC3転換酵素C3bBbを形成、Bbは基質C3の切断部位周辺が結合するとプロテアーゼ活性を発揮	FD自体はプロテアーゼ活性を示さないが、C3bBIに結合するとFB切断活性を発揮	C3転換酵素およびC5転換酵素の正の制御因子	FI自体はプロテアーゼ活性を示さないが、FHなどの制御因子が結合したC3bやC4bに切断活性を発揮

ドメイン MG7, MG8, C345C がのり、上横に α 鎖の CUB ドメインと TED ドメインが付いている (図 2A, B)。MG6 ドメインは β 鎖と α 鎖に分断されているが (図 1)、立体構造上は 1 個の MG ドメインを形成することにより β 鎖と α 鎖の相互作用に寄与している。CUB ドメインは TED ドメインにより CUBg と CUBf に分断されているが (図 1)、立体構造上は 1 個の CUB ドメインを形成している。

1-2. C3 のチオエステル結合

C3 は TED ドメインにチオエステルモチーフとよばれる Cys1010-Gly-Glu-Gln1013 配列をもち、この Cys と Gln の側鎖の間に非常に不安定なチオエステル結合 (β-cysteinyl-γ-glutamyl thioester bond) を形成している (図 3)。この結合は求核基である水酸基やアミノ基に高い反応性を有する。このチオエステル結合は特異性の広い血漿プロテアーゼインヒビターである α2-マクログロブリンに最初に見出された。α2-マクログロブリンと補体因子 C3、C4、C5 は類似性の高い共通したドメイン構造を持ち進化的に近いタンパク質群である。ただし、

C5 はチオエステルモチーフ配列を持たない。

TED ドメインは 12 個の α-ヘリックスを持つ (図 2A) 8)。C3 の結晶構造では、チオエステル結合は TED ドメインと MG8 ドメインの疎水性や芳香族をもつアミノ酸残基で形成されるポケットに入り、保護されていて露出していない 8)。また、C3 では His1126 がチオエステル結合から約 12 Å と大きく離れ、チオエステル結合の切断の際に生じる acyl-imidazole 中間体を安定化できない構造をとっている 8)。一方、チオエステルモチーフを露出した C3b や C3d (p.Cys1010Ala) 変異体では、His1126 はチオエステルモチーフの Gln1013 の近傍 (約 4Å) にあり、acyl-imidazole 中間体を安定化できる位置にあった 9)。このように、C3 は反応性の高いチオエステル結合を露出しない立体構造をとり、かつチオエステル結合の切断過程で形成される中間体が形成されない構造をとっている。

C3b のチオエステル結合はその半減期が約 60 μ秒と非常に短く 10)、素早く自発的に水解し液相 C3b に変換される (図 3a)。C3b のチオエステル結合の 30 ナノメートル程度より近傍に細菌や微生物

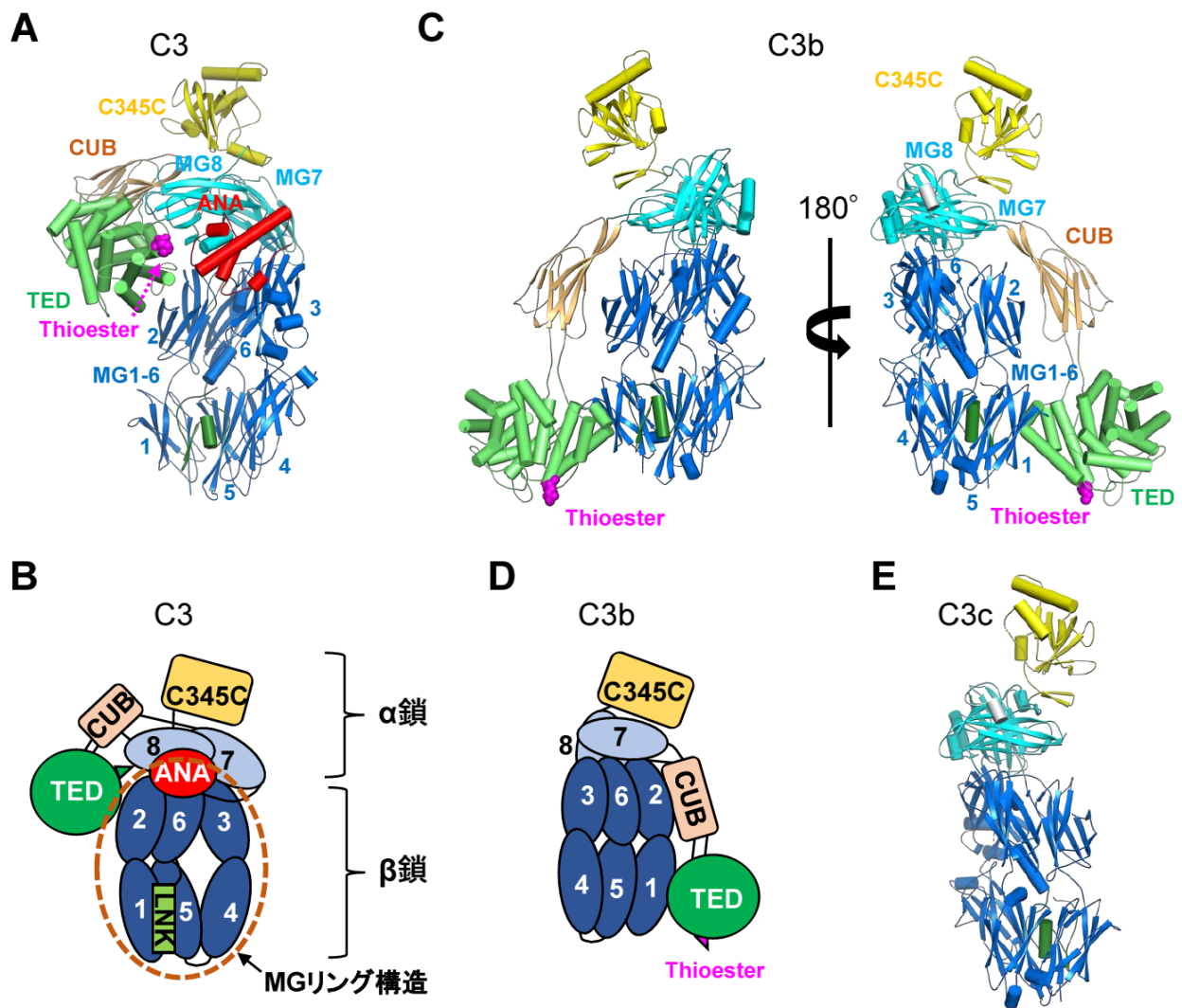


図2 C3 および断片 C3b の立体構造

(A) ヒト C3 の立体構造 (PDB ID 2A73)⁸⁾。個々のドメインの色は図1と同色にした。 α -ヘリックスは円柱、 β -ストランドは太線で表した。(B) C3 の模式図。C3 は β 鎖の 6 個の MG ドメインにより形成される MG リングが構造の核になっている。(C) ヒト C3b の立体構造 (PDB ID 2I07)¹⁵⁾。(D) C3b の模式図。(E) ヒト C3c の立体構造 (PDB ID 2A74)⁸⁾。

物の水酸基やアミノ基があると、これに反応して細菌や微生物に共有結合する (図 3b)¹⁰⁾。これを固相化とよぶ。固相化した C3b はオプソニンとして働き、好中球やマクロファージなどの貪食細胞が細菌や微生物を貪食する際の標識になる。微生物 1 匹に対して、2-3 分で 100 万個以上の C3b が結合し迅速にオプソニン化が進むといわれている²⁾。C3b の形成は新しい C3 転換酵素 (C3bBb 複合

体) の局所表面での形成につながり、これにより C3 がさらに切断され C3a と C3b が生じる。局所での C3bBb 複合体の濃度が十分高くなると、新しく形成された C3b は直接 C3bBb 複合体に結合して C5 転換酵素 (C3bBbC3b) を形成し、最終的に膜侵襲複合体 C5b-9 の形成につながる。

1-3. C3 のチックオーバーによる活性化

補体第二経路はチックオーバーとよばれる機序で活性化する (図 3c)。C3 のチオエステル結合は不安定で、液相中でゆっくり (C3 0.2%-0.4%/時) 自発的に水解し C3(H₂O)を形成する^{11, 12)}。これを C3 チックオーバーという。C3(H₂O)はコンフォメーション変化を起こし C3b 様の機能を獲得する。すなわち、C3(H₂O)は溶液中で FB を結合し FD により切断され、C3 転換酵素 C3(H₂O)Bb を形成する。この C3(H₂O)Bb が C3 の切断能を有する最も初期の酵素である。C3 は C3b に変換されるとチオエステル結合の反応性が極めて高くなる。C3b のほとんどは水と反応し液相 C3b となり、固相化される C3b は少ない。電子顕微鏡による単分子解析では、C3(H₂O)はチオエステル結合が水解してコンフォメーション変化を起こし、C3b 様の構造を取ることが示されている^{11, 13)}。C3(H₂O)の大きなコンフォメーション変化は定量的な架橋実験においても観察されている¹⁴⁾。C3(H₂O)の結晶構造解析は報告されていない。

1-4. C3 の切断で生じる断片 C3b の構造的特徴

C3 は C3 転換酵素により α 鎖内の Arg748-Ser749 結合が切断され、アナフィラトキシン (ANA) である C3a (分子量 約 9 kDa) が切り離される (図 1)。ANA が切り離された α 鎖を α' 鎖とよび、 β 鎖と α' 鎖からなる大きな断片が C3b (分子量 約 176 kDa) である。図 2C に 180° 異なる 2 つの向きから眺めた C3b の結晶構造を示す¹⁵⁻¹⁷⁾。図 2D は C3b をドメインの模式図で示す。

ANA が切り出された結果、C3b には残り 12 個のドメインの再配置を伴う大きなコンフォメーション変化が起こる。その中で重要な構造の変化は C3 では隠されていた TED ドメインのチオエステル結合の露出と、それに続く固相表面への結合もしくは水解である。C3b の構造変化は電子顕微鏡による単分子解析でも観察されている¹³⁾。電子顕微鏡による解析では、C3b の TED ドメインは MG リング

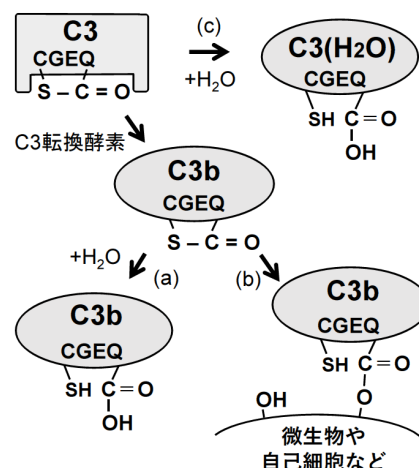


図 3 C3 と C3b のチオエステル結合に起こる反応

C3 は C3 転換酵素により C3b になり、(a) C3b のチオエステル結合は素早く自発的に水解し液相 C3b に変換される。もしくは、(b) ごく近傍の固相上の水酸基もしくはアミノ基と反応し固相化 C3b になる。(c) C3 のチオエステル結合はゆっくり自発的に水解し C3b 様の機能を有する C3(H₂O)を形成する。CGEQ:チオエステルモチーフ配列

に寄り添う構造に加え、MG リングから離れた像も観察され、MG8/CUB/TED ドメイン間の柔軟性が見られる^{13, 18)}。

C3b は補体制御因子 (FH、FHL1、MCP、CR1) の存在下でセリンプロテアーゼである FI により切断を受け、CUB ドメイン中から 17 残基の小ペプチド C3f が切り出され iC3b に変換される (図 1)。iC3b はオプソニン活性を有するが C3 転換酵素複合体の形成能を持たない。FI はさらに iC3b の CUB ドメイン中の Arg954-Glu955 結合を切断し、TED ドメインを含む C3dg (分子量 約 40 kDa) と TED ドメインを持たない C3c (分子量 約 139 kDa) (図 2E) を産生する。C3dg は好中球から分泌されるエラスターゼなどのプロテアーゼによりさらに 2 つの断片 (C3g, Glu955-Lys1001 残基、およびチオエステルモチーフを含む C3d, His1002-

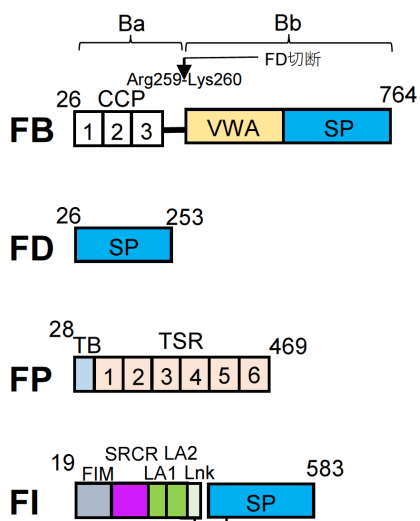


図4 血中を循環している成熟型 FB, FD, FP, FI のドメイン構造

FB はセリンプロテアーゼ FD により断片 Ba と Bb に切断される。Ba と Bb はジスルフィド結合で繋がっていないので両断片は離れる。Bb、FD、FI はセリンプロテアーゼドメインをもつが、単独では触媒活性が発揮できない前駆体様の構造をとる。FI は重鎖と軽鎖はジスルフィド結合（黒線）で繋がっている。ドメイン名の略称は以下の通り。CCP: complement control protein ドメイン、VWA: von Willebrand factor type-A ドメイン、SP: セリンプロテアーゼドメイン、TB: TGF β 結合ドメイン、TSR: thrombospondin type I repeat ドメイン、FIM: FI membrane-attack complex ドメイン、SRCR: scavenger receptor cysteine-rich ドメイン、LA: low-density lipoprotein receptor class A ドメイン。

Ser1303 残基) に切断される (図 1) ^{6, 19)}。現在、C3dg と C3d を区別できる市販の測定法はないので、最終産物として論文などに記載される C3d には C3dg を含む場合がある。

これらの一連の C3b の分解反応は α 鎖を切断し大きな構造変化をもたらす。一方、主に MG ドメインからなる β 鎖は切断されず無傷で保存される

(図 1)。C3b、iC3b、C3dg、C3d は TED ドメインを介して細菌や微生物に結合しておりオプソニン作用を示すが、C3c は TED ドメインを持たないのでオプソニン作用を示さない。

2. C3 転換酵素の形成と安定化に関する構造的特徴

第二経路の C3 転換酵素である C3bBb 複合体の形成過程とその安定化の機序は、FB、断片 Bb、コブラ毒因子 (CVF) -FB 複合体、C3bBb-黄色ブドウ球菌補体阻害タンパク質 (SCIN) 複合体、C3bBD 複合体、C3bBb-SCIN-FPc 複合体を対象にした結晶構造解析および電子顕微鏡を用いた単粒子解析より明らかになっている ^{20, 21)}。

2-1. FB の構造的特徴

FB の生化学的性質を表 1 に、ドメイン構造を図 4 に示した。FB は活性発現が厳密に制御されている 1 本鎖セリンプロテアーゼ前駆体である。FB の血中濃度は C3 の半分ほどで比較的多い。FB は C3b に結合するが、C3、iC3b、C3c には結合しない。FB が Mg^{2+} 依存性に固相上の C3b もしくは液相中の C3(H₂O) に結合すると、セリンプロテアーゼ FD が FB の Arg259-Lys260 結合を特異的に切断し、断片 Ba と断片 Bb を生成する (図 4)。FD は遊離の FB を切断しない。生成した Ba は C3b から解離し、Bb は C3 転換酵素である C3bBb 複合体を形成する。

C3bBb 複合体は不安定で崩壊 (解離) しやすい。C3bBb 複合体の崩壊による半減期は固相表面により異なり、プラスチックでは約 90 秒 ²²⁾、羊赤血球では約 4 分 ²³⁾、ヒト細胞外マトリクス成分を含む MaxGel では約 3.8 分 ²⁴⁾ と報告されている。すなわち、 Mg^{2+} 存在下で形成される C3bBb 複合体はいずれの表面上でも数分で崩壊するたいへん不安定な複合体である。後述のプロペルジン (FP) は C3bBb 複合体を安定化する能力を示す。また、

C3bBb 複合体から解離した Bb は C3b に再結合することはできない。

2-1-1. トリプシン型セリンプロテアーゼ前駆体の活性化機序

一般的なセリンプロテアーゼの活性化の機序を以下に説明する。セリンプロテアーゼでは触媒三残基と呼ばれる His57、Asp102 および Ser195 (キモトリプシン番号) の 3 つのアミノ酸残基の側鎖が連携して触媒基として働く。トリプシン型セリンプロテアーゼ前駆体の活性化では、ペプチド結合の切断により「活性化ペプチド」が放出されるとともに新たに生じる N 末端 (キモトリプシンでは Ile16) の α -アミノ基が活性中心残基 Ser195 の隣の Asp194 の側鎖とイオン結合する。これが駆動力となって活性型の触媒三残基の立体配置が誘導され、S1 ポケットとよばれる基質結合部位と反応中間体である四面体中間体を捉えるオキシアニオンホールが完成し、これらが機能することによりプロテアーゼ活性を発現する²⁵⁾。

2-1-2. 断片 Bb の構造的特徴

C3 転換酵素 C3bBb 複合体は Bb がプロテアーゼ活性を示す。この Bb は von Willebrand factor type-A (VWA) ドメインとセリンプロテアーゼ (SP) ドメインがつながっているため、「活性化ペプチド」が切り離されることがなく、プロテアーゼドメインの N 末端に新たな α -アミノ基が生じることはない (図 4)。したがって、Bb の活性化は前述の一般的なセリンプロテアーゼ前駆体の活性化機序では十分に説明できない。C3bBb 複合体の活性発現機序を説明するため、一連の立体構造の解析が行われた。

まず、Bb の VWA ドメイン内に 1 個のジスルフィド結合を人為的に導入した Bb*変異体の立体構造が決定された²⁶⁾。この Bb*変異体の SP ドメインの触媒三残基は機能連携が可能な立体配置をとって

いた。しかし、VWA ドメインと SP ドメインの間が切断されていないのでキモトリプシンの Ile16 に相当する α -アミノ基がない。その代わりに Arg730 の側鎖が内部の Asp の側鎖とイオン結合していたが、オキシアニオンホールの形成は不十分であった²⁶⁾。Bb*変異体の合成低分子基質の水解活性は Bb と同様にきわめて低く、この結果は Bb*変異体の活性中心が不活性なコンフォメーションをとるという知見とよく一致した。

2-1-3. FB の構造的特徴

次に、FB の結晶構造が決定された²⁷⁾。FB は 5 つのドメイン、complement control protein (CCP) ドメイン 1-3、VWA ドメイン、SP ドメインで構成される (図 4)。FB はリンカー配列中の Arg259-Lys260 結合が FD で切断されると、断片 Ba (CCP ドメイン 1-3) と断片 Bb (VWA ドメイン-SP ドメイン) になる。この切断は C3bBb 複合体では起こるが、遊離型 FB 単独では起こらない。その理由として、FB 単独の結晶構造では、切断される Arg259-Lys260 結合の Arg259 の側鎖は VWA ドメインの内側を向いており FD による切断から保護されていることがあげられる²⁷⁾。FB が C3b に結合すると FB のドメインが再配置され、切断されるペプチド結合が露出し FD で切断されると思われる。FB も Bb 単独の結晶構造と同様に SP ドメインの触媒部は露出して低分子化合物がアクセスできる環境にあったが、オキシアニオンホールの形成は不十分であった²⁷⁾。

2-1-4. C3bBb の構造的特徴

C3 転換酵素前駆体である C3bBb 複合体は電子顕微鏡での観察より、生理的なイオン濃度の Mg^{2+} の存在下で、closed 型 C3bBb(Mg^{2+}) (loading state) と open 型 C3bBb(Mg^{2+}) (activation state) のコンフォメーションを 35%と 65%の割合で取ると報告されている²¹⁾。C3bBb(Mg^{2+})複合体の closed 型コン

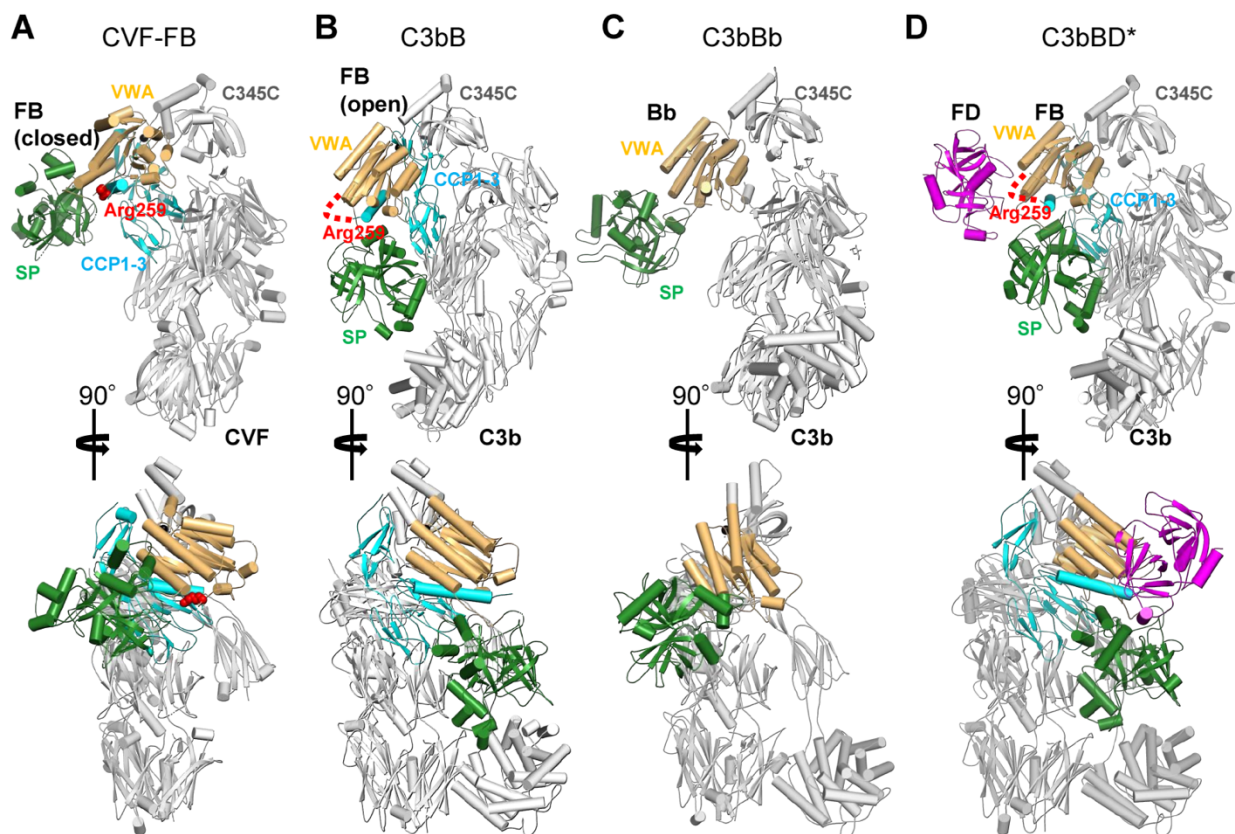


図5 第二経路のC3転換酵素：closed型CVF-FB、open型C3bB、C3bBb、C3BD*の立体構造

(A) コブラ毒因子 CVF と closed 型 FB との複合体 CVF-FB の結晶構造 (PDB ID 3HRZ)²⁹⁾。(B) open 型 FB 構造を持つ C3bB(Ni²⁺)複合体 (PDB ID 2XWJ)²⁰⁾。(C) C3bBb 複合体の結晶構造 (PDB ID 2WIN)³⁰⁾。(D) C3bBD*複合体の結晶構造 (PDB ID 2XWB)²⁰⁾。FD (マゼンタ色) は FB の Arg259 残基 (赤字) を切断し断片 Ba と Bb を生成する。FB の CCP1-3 ドメインを水色、VWA ドメインを薄茶、SP ドメインを緑色で示した。

フォメーションが C3b と FB の最初に行われる複合体であり、これを loading state とよぶ。その後、結合した FB のコンフォメーションが変化して open 型コンフォメーションの activation state になり、これを認識する FD によって FB が切断される。

インドコブラ毒に含まれるコブラ毒因子 (Cobra venom factor, CVF) は 3 本のポリペプチド鎖からなるタンパク質で、C3 と 49% のアミノ酸配列の同一性を示し C3b 様の活性をもつ。CVF は TED ドメインを含まないので固相化されることはなく、液相中で FB に結合して CVF-FB 複合体を形成し、

FD により CVF-Bb 複合体に活性化され、基質 C3 と C5 を切断し補体系を消費して毒性を発揮する²⁸⁾。

FB に CVF が結合した CVF-FB 複合体は極めて安定な構造をとる (半減期 約 7 時間)。その結晶構造が決定された (図 5A)²⁹⁾。CVF-FB 複合体では、FD で切断される FB の Arg259-Lys260 結合の Arg259 の側鎖は Glu232 と Glu471 の側鎖とイオン結合を形成し、埋もれていて切断されない状態の closed 型コンフォメーションであり²⁹⁾、遊離型 FB でみられた構造と同じであった²⁷⁾。closed 型の C3bB 複合体は、コンフォメーション変化により open 型の activation state になる。open 型 C3bB

複合体では VWA と SP ドメインの間に構造変化が起こり、FD で切断される Arg259-Lys260 結合を含むループが露出し、FD で切断されて C3bBb 複合体に変換される (図 5B) ²⁰⁾。

C3bB 複合体の立体構造が Ni²⁺存在下で決定された (図 5B) ²⁰⁾。Ni²⁺存在下の C3bB(Ni²⁺)複合体は安定でほとんど (98%) が open 型のコンフォメーションをとる。open 型の C3bB(Ni²⁺)複合体の FB は CCP1-3、VWA、SP のドメイン構造がコンパクトな形を取り、FB の VWA ドメインは主に C3b の C345C ドメイン、FB の SP ドメインは主に C3b の CUB ドメインに結合していた (図 5B)。FB の CCP1-3 は C3b の MG2、MG3、MG7、C345C ドメインと新生 α' 鎖の α' NT 領域への結合に関与していた (図 5B)。これら C3b 上の FB 結合部位は C3 の構造では露出していないので、FB が C3 には結合できないことをうまく説明した。FB の VWA ドメインは金属イオン依存性接着部位 (metal-ion-dependent adhesion site, MIDAS) を持つ。この部位は C3b の C345C との間に位置し、C3bBb 複合体の Mg²⁺依存性を担っている。これらの観察より、FB の断片 Ba (CCP ドメイン 1-3) は C3b と断片 Bb に挟まれ、FB の SP ドメインを open 型に配置する足場として機能することがわかる (図 5B)。

2-1-5. C3bBb の構造的特徴

C3 転換酵素 C3bBb 複合体は前述の様に、解離しやすく不安定な複合体である。複合体の解離を避けるため、黄色ブドウ球菌由来補体阻害タンパク質 (Staphylococcal complement inhibitor, SCIN) を共存させ安定化した C3bBb-SCIN 複合体の 2 量体の結晶構造が決定された ³⁰⁾。SCIN で安定化した C3bBb 複合体の Bb は VWA ドメインを介して C3b の先端にある C345C からぶら下がっているように配置していた (図 5C)。C3bBb-SCIN 複合体の Bb の SP ドメインでは、触媒三残基は機能連携できる立体配置をとっていたが、オキシアニオンホ

ールは FB と同じように歪んでいた。したがって、Bb は C3b に結合しても触媒活性を発揮する構造を持たないことが判明した ³⁰⁾。このことから、Bb の触媒部位は基質 C3 の切断部位周辺が結合することによる誘導適合 (induced-fit) によりはじめてプロテアーゼとしての機能構造を獲得すると考えられる。基質結合による誘導適合は酵素に基質選択性を付与するメカニズムの一つでもある ³¹⁾。

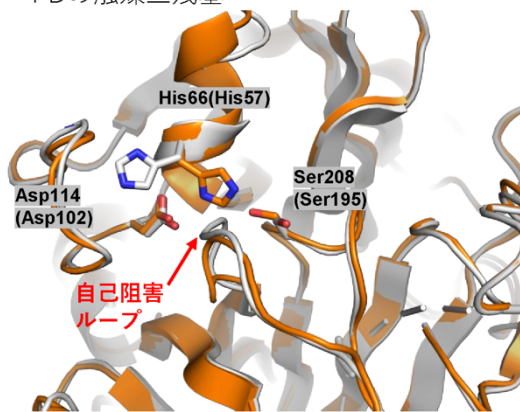
C3 転換酵素である C3bBb 複合体が基質 C3 に結合する際に、C3b の MG リング部が重要な働きをする可能性がある。2 量体化した C3bBb-SCIN 複合体の結晶構造では、2 量体の接触面は互いの C3b 分子の MG4-5 ドメインであった。MG4-5 は C3 から C3b への転換で大きな構造変化を生じない。このことは、C3 転換酵素中の C3b の MG4-5 と基質 C3 の MG4-5 とが会合体を形成すると仮定できる。これに基づいて酵素-基質複合体 C3bBb-C3 複合体のモデルが提案されている ³⁰⁾。このモデルでは C3 転換酵素 C3bBb の SP ドメインの触媒部位は基質 C3 の ANA ドメインの近くで対面し、Arg748-Ser749 結合の切断が可能な相対位置関係にあり、理に適った構造モデルと考えられた。

2-2. FD の構造的特徴

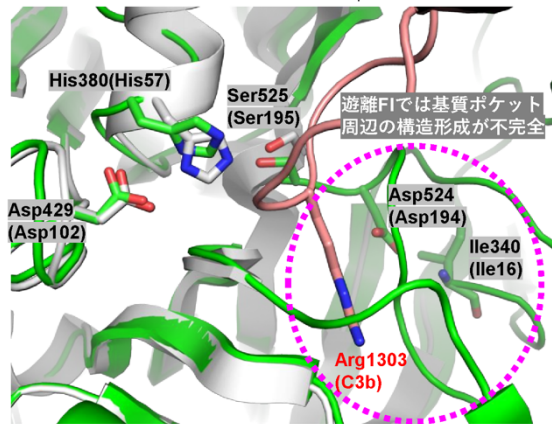
ヒトプレプロ FD は 1 本鎖の糖鎖を持たないセリンプロテアーゼ前駆体で、シグナル配列が切断除去されプロ FD になり、分泌されたプロ FD は MASP-3 により N 末端の 7 残基が切断除去され成熟型 FD (228 残基) となり、これが血中を循環している (表 1、図 4) ³²⁾。この切り出された 7 残基はトリプシン様セリンプロテアーゼの「活性化ペプチド」に相当するが、FD はこのペプチドが切り離されてもプロテアーゼ活性を示さない。FD の活性発現は次の様な特徴がある。

セリンプロテアーゼの活性発現には、先に述べたように触媒三残基の正しい立体配置とオキシアニオンホールおよび基質結合部位の形成が必要である。

A FDの触媒三残基



B FIの触媒三残基とIle340-Asp524間の塩橋形成



FDの単独の結晶構造では、活性中心のHis残基の側鎖は触媒活性を発揮する適切な場所に位置せず、かつ基質結合部位が自身のループ構造で妨害された構造をとっていた(図6A)^{20, 33)}。このため成熟型FDは単独では酵素活性を示さない。これまで、同じ様なプロテアーゼが知られている。外因系血液凝固の開始反応に関わる凝固第VII因子は血中の約1%が2本鎖活性型の構造で循環しているが、単独ではプロテアーゼ活性を示さず、組織因子に結合してはじめて凝固第X因子と凝固第IX因子の活性化能を示す²⁵⁾。外因系血液凝固反応は組織因子が発現する部位で起こるといふたいへん目的にかなった活性発現機序である。

FDがC3bB複合体のFBを特異的に切断する機序は、C3bBD*複合体の結晶構造より次の様に説明できる(図5D)。FD*は活性中心残基Ser183(キモトリプシンのSer195に相当)をAlaに置換した

図6 FDとFIの触媒三残基

(A) FD単独とC3bBD*複合体中のFD*の触媒三残基の周辺の構造。FD単独(PDB ID 1HFD)⁵⁵⁾を灰色で示す。FD単独では触媒三残基を構成するHis側鎖のイミダゾール環はAspとSerの側鎖から大きく離れ、触媒三残基の機能的連携がない。一方、茶色で示すC3bBD*複合体²⁰⁾(PDB ID 2XWB)中のFD*の触媒三残基は機能を発揮する立体配置を取る。(B)遊離型FIとC3b-miniFH-FI*複合体中のFI*の触媒三残基の周辺の構造。遊離型FI(PDB ID 2XRC)⁵²⁾を灰色、C3b-miniFH-FI*複合体(PDB ID 5O35)⁴⁴⁾中のFI*を緑色、FIで切断を受ける基質C3b Arg1303とその周辺のポリペプチド鎖を茶色で示す。C3b Arg1303の側鎖はFIのS1ポケットにはまっている。FD*およびFI*は活性中心SerをAlaに置換した不活性型変異体だが、ここではSer残基側鎖のあるべき位置に表示している。括弧内の残基番号は相当するキモトリプシン番号を示す。

不活性型変異体である。FD*はopen型C3bB複合体のFBのVWAドメインとSPドメインの境界面に結合し、これらのドメインにコンフォメーション変化を誘導する(図5D)²⁰⁾。また、FD*にもコンフォメーション変化が起こり、活性発現に適切な基質結合部位が形成され、触媒三残基が機能する立体配置を取る(図6A)²⁰⁾。このように、FDはC3bB複合体のFBに結合することによりコンフォメーション変化を起こしプロテアーゼ活性を発揮する。FDは基質FBを切断するとFBから離れるため、FDは酵素活性を示さない不活性型にもどる。

2-3. プロペルジン(FP)の構造的特徴

FPの生化学的性質を表1に示した。FPはC3b、C3bB、C3bBbに結合し、C3転換酵素およびC5転換酵素の正の活性制御因子であり、またパターン認識分子としても働く³⁴⁻³⁶⁾。FPはN末端のTGF

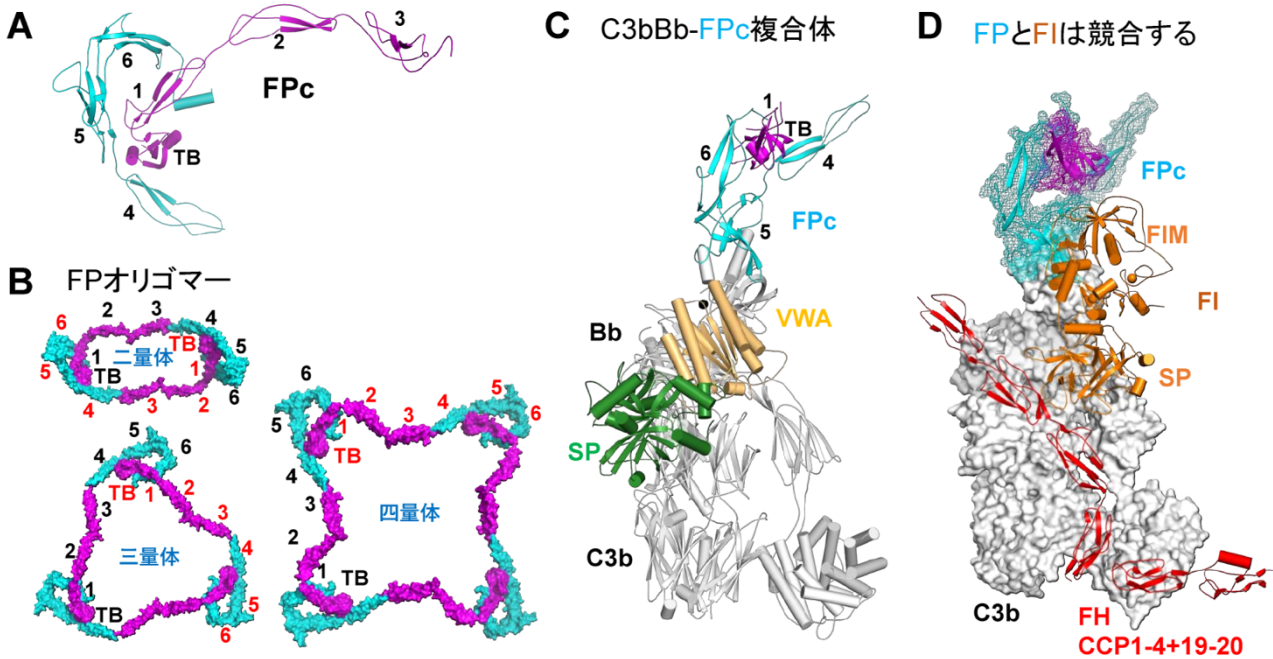


図7 FPの立体構造

(A) 二本鎖 FP 単量体 (FpC) の結晶構造 (PDB ID 6RUS)³⁸⁾、(B) FP オリゴマーの X 線溶液散乱 (SAXS) 実験から得られた構造モデル。FP 二量体 (SASBDB ID SASDK4)、FP 三量体 (SASBDB ID SASDKB4)、FP 四量体 (SASBDB ID SASDKC4)⁴²⁾、(C) C3bBb-FPc 複合体の結晶構造 (PDB ID 6RUR)³⁸⁾。(D) C3bBb-FPc 複合体 (PDB ID 6RUR) の C3b 部分を C3b-FI-FH(CCP1-4+19-20) (PDB ID 5O32)⁴⁴⁾ の C3b 部分に重ね合わせ、FPc 部分の表面を網掛けで示したモデル図。FPc の TSR5 と FI の FIM ドメインに衝突が見られることから、FP の C3b への結合は FI の結合を阻害することが分かる。しかし、FP の C3b への結合は FH の C3b への結合は妨げない。

β 結合 (TB) ドメインに続き 6 つのトロンボスポンジン I 型リピート (TSR1-6、それぞれ約 60 残基) からなる (図 4)。FP は等電点が 9.5 以上を示す塩基性糖タンパク質である。

転換酵素活性の亢進に関して、FP は i) FB の C3b への結合を高め、C3bBP 複合体の形成を促進し複合体の安定性を高め、ii) これが FD で切断され安定な C3bBbP 複合体を形成し、これにより C3 転換酵素の半減期を 5 倍から 10 倍増加させる。加えて、iii) FP は FI と競合し C3b の分解を抑える。羊赤血球上に C3bBb 複合体を形成させると、FP 存在下ではこれに FP が結合し C3bBbP 複合体になり安定性が 1.5 倍から 10 倍高くなる²³⁾。

X 染色体連鎖性疾患の遺伝性 FP 欠損症が知られ

ている³⁷⁾。本疾患は補体第二経路の活性が低下することにより病原菌に対する溶菌活性が損なわれる。その結果、遺伝性 FP 欠損症は髄膜炎菌感染による重症の髄膜炎や敗血症への感受性が高まることから、FP の生体内での重要性が理解される³⁷⁾。FP の立体構造に基づいて、遺伝性 FP 欠損症に同定された機能喪失ミスセンスバリエーションが報告されている³⁸⁾。

2-3-1. FP の WxxW モチーフによるパターン認識分子としての機能

FP は 1 つの N 結合型糖鎖と 4 つの O 結合型糖鎖を持つ。加えて、6 つの TSR 中の WxxW (W=Trp)モチーフ中の 14 個から 17 個の Trp 残基

にマンノースが結合しており、高度にマンノース化されている^{39, 40}。このモチーフには Trp 残基の芳香族側鎖が周期的に出現するので Trp ladder とよばれ、硫酸化糖鎖に相互作用する部位といわれている³⁹。FP は細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンに C3 非依存性に結合しており、この結合は TSR 中の Trp ladder を介していると考えられる。このように、FP はパターン認識分子として微生物表面や血管内皮細胞上のヘパラン硫酸などへの結合能が報告されている^{35, 36}。FP の血清濃度は 4-25 µg/mL と低い (表 1)。多くの補体因子が肝細胞で合成されるのとは異なり、FP は免疫細胞 (好中球、単球、樹状細胞) で産生され、かつ細菌や微生物で活性化された好中球では二次顆粒から放出されるので、炎症局所での FP 濃度は血漿中よりも高いと考えられる^{34, 38, 40}。

2-3-2. FP 単量体および FP オリゴマーの構造的特徴

FP はオリゴマーとして分泌され、血中では 2 量体が約 25%、3 量体が約 50%、4 量体が約 25% で循環している。先に述べたように、C3bBb は不安定な複合体である。FP はこの不安定な C3bBb 複合体に結合し構造を安定化させるが、その活性はオリゴマーが大きいほど強い。最近 FP の立体構造が解明され、詳細な機能と構造の研究が大きく進展した^{38, 40}。FP モノマーの結晶構造は決定されていないが、FP を N 末端領域の TB~TSR3 と C 末端領域の TSR4~TSR6 の 2 本鎖にした FP 単量体 (FPc とよぶ) の結晶構造が決定された (図 7A)³⁸。また、TB~TSR1 と TSR4~TSR6 および TB~TSR2 と TSR4~TSR6 の 2 本鎖にした FP の結晶構造も決定された⁴⁰。これらの 2 本鎖になった FP は、N 末端ドメイン (TB~TSR1) と C 末端ドメイン (TSR4~TSR6) が会合して環状の三角構造を作り、その 2 つの角 (頂点) から TSR4 の短い腕と TSR2~TSR3 の長い腕が伸び出した構造をと

っていた (図 7A)。電子顕微鏡像と X 線小角散乱 (Small angle X-ray scattering, SAXS) 法によると、FP オリゴマーは剛直で明確なコンフォメーションを取ることが示された⁴¹。溶液中では 2 量体は湾曲した分子構造、3 量体と 4 量体は三角もしくは四角の縁からできる平面的な分子構造を持つモデルが提示されている (図 7B)⁴¹。

2-3-3. C3bBb-FPc の構造的特徴

FP は C3bBb-SCIN-FPc 複合体および C3b の C345C と FP の TB~TSR1/TSR4~TSR6 の複合体で結晶構造が決定されている (図 7C)^{38, 40}。これらの構造より、FP の TSR5 が C3b の C345C 中の 2 つの α ヘリックスに主に相互作用し、TSR5 と TSR6 のループも結合に関与することが判明した。また、モデルによると C3b に FP が結合すると、FP の TSR5 が FI の FI membrane-attack complex (FIM) ドメインの C3b への結合を競合的に妨害すると予想され、これが FP は FI と競合し C3b の分解を抑える構造上の特性であると考えられた (図 7D)⁴⁰。一方、FP の C3b への結合部位は制御因子である H 因子 (FH)、membrane cofactor protein (MCP, CD46)、decay acceleration factor (DAF, CD55) の結合領域に重ならない (図 7D)⁴⁰。したがって、C3bBb-FP 複合体は安定なもので FH と DAF が結合しても複合体の崩壊に抵抗性を示すと考えられた。

結晶構造解析された C3bBb-SCIN-FPc 複合体 (図 7C) には、黄色ブドウ球菌由来の SCIN を複合体の安定化のために使ったので、その影響が懸念された³⁸。そこで FB の N 末端に 12 残基の BC2T ペプチド配列を挿入した BC2T-FB を調製し、BC2T と FPc に特異的に結合する低分子抗体 (ナノボディ) を連結した 2 価抗体 (BC2-hFPNb1) が作製された。この 2 価抗体を用いた C3 転換酵素前駆体複合体 C3bB-FPc-BC2-hFPNb1 の結晶構造が報告された⁴²。2 価抗体を使用しているものの、

表 2 CCP ドメインを持つ補体制御因子の性質

	FH	FHL1	MCP (CD46)	DAF (CD55)	CR1 (CD35)
膜結合性	血漿タンパク質、 膜結合性あり*	血漿タンパク質	1 回膜貫通型 タンパク質	GPI**アンカー型 膜タンパク質	1 回膜貫通型 タンパク質
CCPの個数	20	7	4	4	30-44
C3bBbの崩壊促進活性	+	+	-	+	+
FIの補酵素活性	+	+	+	-	+

H 因子: Factor H、FHL1: Factor H-like 1、MCP: membrane cofactor protein、DAF: decay acceleration factor、CR1: complement receptor 1、*FH は C 末端の CCP19-20 を介して自己細胞上のシアル酸やヘパラン硫酸に結合する、**GPI: グリコシルホスファチジルイノシトール

ここで得られた結晶構造は SCIN を用いて報告された C3bBb-SCIN-FPc 複合体の構造と本質的に同じであった。また、2 価抗体は弱い結合で形成される複合体の結晶構造解析に有用なツールになることが示された⁴²⁾。

3. C3b 機能の制御に関する構造的考察

C3 の活性化が自己の細胞上で起こると細胞に危害を与える。自己細胞に C3b が結合するのは避けられないが、自己細胞上には第二経路の補体活性化反応の進展を阻止するいくつかの機序が備わっている。すでに述べたように、C3bBb は不安定な複合体であり約 90 秒で崩壊する。C3bBb から Bb が解離すると、遊離 Bb は C3b に再度結合できない不可逆的な反応なので、補体活性化に抑制的に働く。また、Regulators of Complement Activation (RCA) と呼ばれる一群の補体制御因子が補体の活性化を負に制御している。

3-1. RCA タンパク質の補体経路の抑制機構

RCA タンパク質は約 60 アミノ酸残基からなるドメインを複数個持つ可溶性もしくは膜結合性のタンパク質の総称である。このドメイン構造は complement control protein (CCP) ドメイン、もしくは short consensus repeat (SCR) ドメイン、

Sushi ドメインという名称がついている。立体構造の論文では CCP という名称が使われることが多いので、本稿では CCP を使用する。CCP の基本構造を図 8A に示す。CCP ドメインは円筒型の構造をとり、ポリペプチド鎖はこれを 5 回上下する。N 末端と C 末端は分子の反対方向を向き、2 つのジスルフィド結合は N 末端と C 末端をドメインに繋ぎ止めている (図 8A)。

補体第二経路の活性化を制御する CCP ドメインをもつタンパク質として、FH、factor H-like 1 (FHL1)、MCP、DAF、complement receptor 1 (CR1、CD35) がある (表 2)。FH とその選択的スプライシングの産物 FHL1 は血漿タンパク質である。一方、MCP と CR1 は 1 回膜貫通領域をもつ膜タンパク質で細胞膜上に発現しており、DAF はグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型の膜タンパク質で細胞膜上に発現している。これらのうち、MCP および FH CCP1-4 が C3b へ結合した複合体の立体構造を示す (図 8B, C)。

これらのタンパク質の中で、FH、FHL1、DAF、CR1 は C3bBb 複合体の崩壊を促進する活性を示す (表 2)^{1, 43)}。FH は FB の C3b への結合と競合することにより C3bB 複合体の形成を抑制する活性 (転換酵素前駆体形成抑制活性) を示す。また、FH、FHL1、MCP、CR1 はセリンプロテアーゼ

FI による C3b の分解を促進する補酵素活性を持つ (表 2、図 1) ^{1, 43)}。こういった活性を通してこれらの RCA タンパク質は補体第二経路を抑制する。FI により C3b が 2 カ所切断を受けて iC3b に変換されると、iC3b はもはや C3 転換酵素を形成できないので、転換酵素の形成は抑制される。FI はさらに CR1 の存在下で iC3b の Arg954-Ser955 結合を切断し C3dg を産生する (図 1)。FH と MCP で

はこの切断が起こらない。その理由として、CR1 は C3b と iC3b の両方に比較的強く結合できるが、FH と MCP は C3b に結合するが iC3b には結合しないことで説明されている ⁴⁴⁾。

3-2. FH の構造的特徴

FH は 20 個の CCP ドメインをもつ分子量 115 kDa の血漿中に豊富 (116-562 $\mu\text{g/mL}$) に存在す

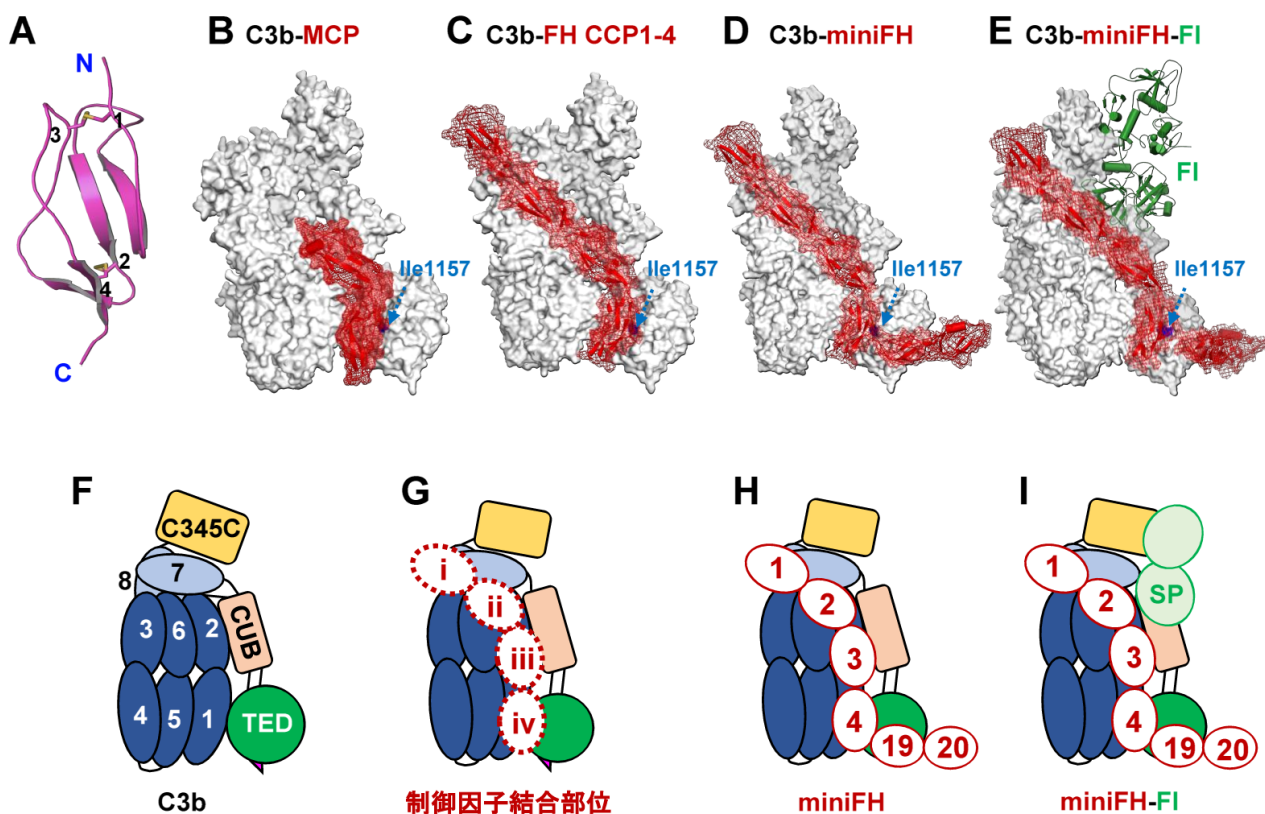


図 8 C3b-制御因子複合体の立体構造と C3b 上の補体制御因子の結合部位

(A) 単体の CCP ドメイン。ここでは典型例として FH の CCP2 の結晶構造 (PDB ID 2WII) を示す。2 つのジスルフィド結合 (数字は N 末端側からのシステイン残基の順) を示す。(B) C3b-MCP 複合体の結晶構造 (PDB ID 5FO8) ¹⁷⁾。(C) C3b-FH(CCP1-4)複合体の結晶構造 (PDB ID 2WII) ⁴⁸⁾。(D) C3b-miniFH 複合体の結晶構造 (PDB ID 5O32) ⁴⁴⁾。(E) C3b-miniFH-FI*複合体の結晶構造 (PDB ID 5O32) ⁴⁴⁾。(F) C3b の模式図。(G) C3b の 4 つの補体制御因子の結合部位、CCPi-CCPiv。(H) C3b-miniFH 複合体の模式図。(I) C3b-miniFH-FI 複合体の模式図。FI の SP ドメインが C3b の CUB ドメインのペプチド結合を切断することが理解できる。(B-E) 日本人 aHUS 患者にみられる C3 の TED ドメインの p.Ile1157Thr バリエント部位の表面を青色で示す ^{49, 50)}。このバリエントを持つ C3b は補体制御因子の親和性が低下し、その結果 FI による分解されにくくなり aHUS 発症につながると考えられる。

る補体抑制因子である。FH の N 末端の CCP1-4 ドメインは C3b の結合領域である (図 8C)。ここに機能喪失ミスセンスバリエントが生じると液相での補体活性化抑制能が低下し、加齢性黄斑変性症や C3 腎症の発症リスクが高くなる⁴⁵⁾。FH は C 末端の塩基性アミノ酸が豊富な CCP19-20 ドメインを介して、自己細胞上の糖鎖の末端にあるシアル酸やプロテオグリカン中のヘパラン硫酸といった多価陰イオンに結合し自己細胞上でも働く (図 8D)。血管内皮細胞にはヘパラン硫酸が結合する膜貫通タンパク質シンデカン 2 が多く発現する。FH はこういった多価陰イオンに結合し、チオエステル結合を介して自己細胞に結合する C3b を待ち構えている。細胞上の FH は、CCP1-4 ドメインを介して自己細胞に結合した C3b に結合し、第二経路の活性化を阻止する (表 2)。この様に FH は血管内皮細胞上で第二経路の補体活性化を抑制する際の最も重要な因子である。FH の重要性は、CCP19-20 ドメインに生じる機能喪失ミスセンスバリエントの保有者は内皮細胞上で C3b の機能が十分に抑制されず、補体介在性微小血管障害症である非典型溶血性尿毒症症候群 (atypical hemolytic uremic syndrome, aHUS) の発症リスクが高いことから理解される⁴⁵⁾。⁴⁶⁾ SARS-CoV-2 ウイルスは S タンパク質を介して細胞上のヘパラン硫酸に結合する。この結合は FH の細胞への結合と競合するので、SARS-CoV-2 ウイルス感染時には FH が細胞上から追い出されて C3b の不活化が進まず、細胞が補体の攻撃を受けやすくなると報告された⁴⁷⁾。

3-3. RCA タンパク質による補体活性化抑制の構造的な特色

C3b と RCA タンパク質との複合体として、C3bFH-CCP1-4、C3bMCP、C3bCR1-CCP15-17、C3bDAF、C3b-miniFH、C3b-miniFH-FI* の結晶構造が決定されている。そのうちの 4 つを図 8B-E に示す^{17, 44, 48)}。これらの複合体の立体構造より、

C3b への補体制御因子の結合の一般則が理解されるようになってきた。すなわち、C3b 上には補体制御因子の結合部位が 4 つ並んで存在する (図 8F、G)。これらを CCPi-CCPiv とよぶ¹⁷⁾。C3 から C3b への変換により、これらの結合部位は露出あるいは新たに形成され、補体制御因子の結合に関わる。4 つの結合部位はそれぞれ 2 つのドメインを跨いで形成されている。すなわち、CCPi は C3b の α' NT と MG7、CCPii は MG6 と MG7、CCPiii は MG2 と CUB、CCPiv は MG1 と TED で形成されている。結晶構造では、FH の CCP1-4 は C3b CCPi-iv に結合 (図 8C)、MCP の CCP3-4 は CCPiii-iv に結合 (図 8B)、DAF の CCP2-4 は CCPi-iii に結合、CR1 の CCP15-17 は CCPi-iii に結合していた^{17, 48)}。

これら 4 つの C3b 上の補体制御因子の結合部位は先に述べた補体第二経路を抑制する機序と関連する。すなわち、CCPi-ii は FH の CCP1-CCP2 や DAF の CCP2-CCP3 の結合部位で、かつ C3 転換酵素の C3b 上の Bb の相互作用部位なので、FH や DAF は競合により C3bBb から Bb を追い出し「崩壊促進活性」を示すと考えられる。また、CCPii-iii は FB の結合部位と重なるため、この部位への結合は「転換酵素前駆体形成抑制活性」を生む。CCPii-iv への結合は「補助因子活性」を与えると考えられる⁶⁾。

日本人 aHUS 患者 12 人に p.Ile1157Thr バリエントが同定された⁴⁹⁾。本変異を保有する患者は全員寛解し、11 人は腎機能が改善した。日本人には FH のバリエントが比較的少ない反面、C3 p.Ile1157Thr バリエントが多く (aHUS 患者 118 人中 23 人)、本バリエント保因者の多くは予後が良好であった⁵⁰⁾。本バリエントは C3 の TED ドメインにあり CCPiv 領域に位置する (図 8B-E)。in vitro の研究では、C3(H₂O) p.Ile1157Thr 変異体は FH への結合速度の低下、FH への親和性の低下、FH CCP19-20 への親和性の弱い低下が観察され、

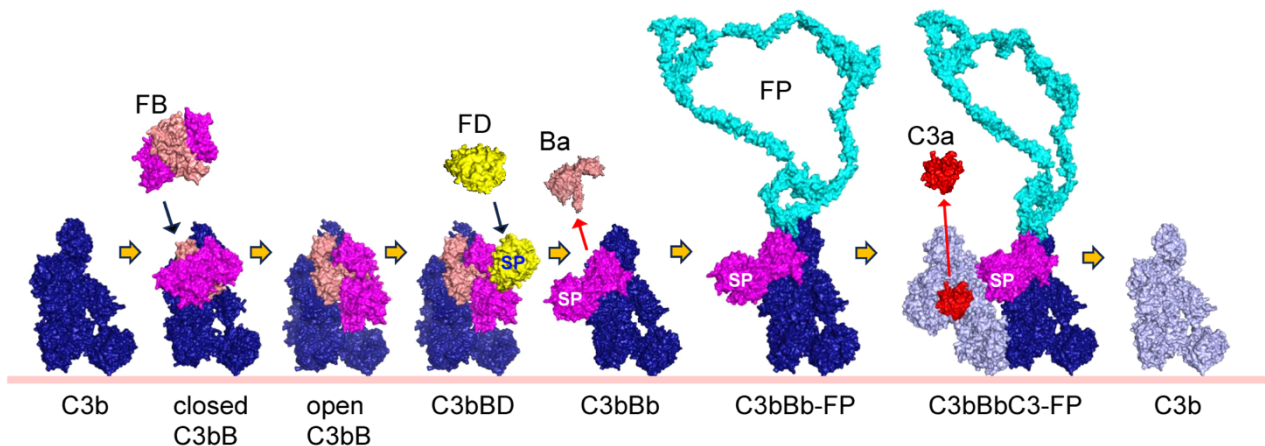


図9 C3 転換酵素 C3bBbP 複合体の多段階による形成と基質 C3 の切断

C3 転換酵素-基質複合体 C3bBbC3 の構造は C3bBb-SCIN 複合体の 2 量体構造より推定したモデル。セリンプロテアーゼ FD と Bb は、立体構造上適切な位置に結合し基質を正しく切断することが理解される。SP:セリンプロテアーゼドメイン、C3b:群青色、FB:ピンク色 (断片 Ba) とマゼンタ色 (断片 Bb)、FD:黄色、C3a:赤色、三量体プロペルジン(FP):水色、基質 C3 と新たに産生した C3b:灰色。

FI で分解されにくいことが示された⁵¹⁾。

3-4. FI による補体活性化抑制の構造的特徴

FI は N 末端領域の重鎖と C 末端領域の軽鎖がジスルフィド結合で結合した 2 本鎖構造で血中を循環している (図 4)。FI の軽鎖は SP ドメインのものであり、「活性化ペプチド」は結合していない。FI 単独の SP ドメインの結晶解析では、触媒三残基の側鎖の正しい立体配置やオキシアニオンホール形成に必要な複数のループ部分の電子密度が確認されず、これらが不安定で揺らいでいると考えられた (図 6B)⁵²⁾。すなわち、FI の SP ドメインは前駆体様の構造をとっており、そのためプロテアーゼ活性を発現しないことが明らかになった。

次いで、C3b-miniFH-FI*複合体の結晶構造が決定された (図 8D、E)⁴⁴⁾。miniFH は FH の C3b 結合ドメインである CCP1-4 と、細胞表面多価陰イオン結合ドメインである CCP19-20 を 12 残基の Gly リンカーでつないだ融合タンパク質である。ここで用いられた FI*は活性中心残基の Ser525 を Ala に置換した不活性型変異体である。複合体中の

FI*の SP ドメインは FH と C3b 双方と相互作用し、これにより SP ドメイン触媒部周辺を再配置するコンフォメーション変化が誘発されていた⁴⁴⁾。すなわち、N 末端 Ile340 (キモトリプシン番号では Ile16) の α -アミノ基は分子内部の Asp524 (キモトリプシン番号では Asp194) の側鎖カルボキシル基とイオン結合してオキシアニオンホールを形成するとともに、触媒三残基が連携して活性発現できる立体配置を形成していた (図 6B)。さらに、基質結合 S1 ポケットが形成され、切断される C3b の CUB ドメインの Arg1303 の側鎖が入り込んでいた (図 6B の茶色)。ただし、FI*は不活性型変異体なのでペプチド結合は切断されず複合体を形成している。このように、立体構造解析より FI が単独ではプロテアーゼ活性を示さず、複合体化してはじめてプロテアーゼ活性を獲得する機構が明らかになった。

補体制御因子 FH、FHL1、MCP、CR1 と複合体を形成した C3b は、FI により CUB ドメインの 2 箇所のペプチド結合 (Arg1303-Ser1304、Arg1320-Ser1321) が切断され iC3b へ変換される。C3bFH-CCP1-4 複合体の結晶構造では、FI で切断

される C3b の Arg1303-Ser1304 結合は露出しているが、Arg1320-Ser1321 結合は内部に埋もれていた⁴⁸⁾。したがって、FI はまず Arg1303-Ser1304 結合を切断し、次にそれにより惹起されるコンフォメーション変化によって露出する Arg1320-Ser1321 結合を切断すると考えられる。

4. おわりに

C3 とその断片の単独および制御因子との複合体の立体構造を紹介した。図 9 に補体第二経路の安定化した C3 転換酵素である C3bBb-FP 複合体の形成機序と C3bBb-FP 複合体による基質 C3 の切断モデルを示した。こういった多段階の反応を経て C3bBb-FP 安定複合体が形成され、その C3 転換酵素活性により C3 が活性化され反応が増幅する。一方、自己細胞上に結合した C3b は補体制御因子が結合することにより FI で切断され、転換酵素複合体形成能を失う。これらに関わる因子と複合体に関して、極めて多くの立体構造がすでに決定されており、ここに紹介できなかった構造も多い。こういった立体構造の情報は補体第二経路関連疾患の制圧に向けた新規補体抑制因子の開発に使うことができるであろう。

たとえば、紹介した miniFH は FH に基づき人工的に創成した 384 残基の補体抑制因子である⁵³⁾。miniFH は FH と同程度の C3b 結合能を有し、発作性夜間ヘモグロビン尿症様の赤血球の破壊を阻止する補体活性抑制能を示した。また、C3bBb 複合体の制御に関しては、DAF は FI による C3bBb 複合体切断の補酵素活性を持たず、MCP は C3bBb 複合体の崩壊促進活性を持たない (表 2)。そこで、DAF と MCP の CCP ドメインを入れ替えかつ変異を導入することにより、4つの CCP ドメインからなる強力な補体抑制活性を持つキメラタンパク質が報告された⁵⁴⁾。このように、機能と構造に基づいた新規の補体抑制因子の創成は既に始められていると見てよいだろう。今後も新規因子の開発に向け

て進んでいくものと思われる。

[利益相反]

筆者は、本論文内容に関連した開示すべき COI 関係にある企業等はありません。

[文献]

- 1) Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11(9):785-97.
- 2) Liszewski MK, Java A, Schramm EC, Atkinson JP. Complement dysregulation and disease: insights from contemporary genetics. *Annu Rev Pathol.* 2017;12:25-52.
- 3) Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I - Molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262.
- 4) Bajic G, Degen SE, Thiel S, Andersen GR. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J.* 2015;34(22):2735-57.
- 5) Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, Gros P, Lambris JD. Complement component C3 - The "Swiss Army Knife" of innate immunity and host defense. *Immunol Rev.* 2016;274(1):33-58.
- 6) Geisbrecht BV, Lambris JD, Gros P. Complement component C3: A structural perspective and potential therapeutic implications. *Semin Immunol.* 2022;59:101627.
- 7) Zarantonello A, Revel M, Grunewald A, Roumenina LT. C3-dependent effector functions of complement. *Immunol Rev.* 2023;313(1):120-38.

- 8) Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*. 2005;437(7058):505-11.
- 9) Nagar B, Jones RG, Diefenbach RJ, Isenman DE, Rini JM. X-ray crystal structure of C3d: a C3 fragment and ligand for complement receptor 2. *Science*. 1998;280(5367):1277-81.
- 10) Sim RB, Twose TM, Paterson DS, Sim E. The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem J*. 1981;193(1):115-27.
- 11) Pangburn MK. Initiation of the alternative pathway of complement and the history of "tickover". *Immunol Rev*. 2023;313(1):64-70.
- 12) Ekdahl KN, Mohlin C, Adler A, Aman A, Manivel VA, Sandholm K, et al. Is generation of C3(H₂O) necessary for activation of the alternative pathway in real life? *Mol Immunol*. 2019;114:353-61.
- 13) Nishida N, Walz T, Springer TA. Structural transitions of complement component C3 and its activation products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(52):19737-42.
- 14) Chen ZA, Pellarin R, Fischer L, Sali A, Nilges M, Barlow PN, et al. Structure of complement C3(H₂O) revealed by quantitative cross-linking/mass spectrometry and modeling. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(8):2730-43.
- 15) Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature*. 2006;444(7116):213-6.
- 16) Wiesmann C, Katschke KJ, Yin J, Helmy KY, Steffek M, Fairbrother WJ, et al. Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation. *Nature*. 2006;444(7116):217-20.
- 17) Forneris F, Wu J, Xue X, Ricklin D, Lin Z, Sfyroera G, et al. Regulators of complement activity mediate inhibitory mechanisms through a common C3b-binding mode. *EMBO J*. 2016;35(10):1133-49.
- 18) Alcorlo M, Lopez-Perrote A, Delgado S, Yebenes H, Subias M, Rodriguez-Gallego C, et al. Structural insights on complement activation. *FEBS J*. 2015;282(20):3883-91.
- 19) Carlo JR, Spitznagel JK, Studer EJ, Conrad DH, Ruddy S. Cleavage of membrane bound C3bi, an intermediate of the third component of complement, to C3c and C3d-like fragments by crude leucocyte lysosomal lysates and purified leucocyte elastase. *Immunology*. 1981;44(2):381-91.
- 20) Forneris F, Ricklin D, Wu J, Tzekou A, Wallace RS, Lambris JD, et al. Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. *Science*. 2010;330(6012):1816-20.
- 21) Torreira E, Tortajada A, Montes T, Rodriguez de Cordoba S, Llorca O. Coexistence of closed and open conformations of complement factor B in the alternative pathway C3bB(Mg²⁺) proconvertase. *J Immunol*. 2009;183(11):7347-51.
- 22) Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem J*. 1986;235(3):723-30.

- 23) Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med.* 1975;142(4):856-63.
- 24) Pisarenka S, Meyer NC, Xiao X, Goodfellow R, Nester CM, Zhang Y, et al. Modeling C3 glomerulopathies: C3 convertase regulation on an extracellular matrix surface. *Front Immunol.* 2022;13:1073802.
- 25) 東昌市. 血液凝固 VII 因子と組織因子の分子間相互作用 特に VIIa 因子触媒活性の増強機構について. *血栓止血誌.* 1999;10(1):12-21.
- 26) Ponnuraj K, Xu Y, Macon K, Moore D, Volanakis JE, Narayana SV. Structural analysis of engineered Bb fragment of complement factor B: insights into the activation mechanism of the alternative pathway C3-convertase. *Mol Cell.* 2004;14(1):17-28.
- 27) Milder FJ, Gomes L, Schouten A, Janssen BJ, Huizinga EG, Romijn RA, et al. Factor B structure provides insights into activation of the central protease of the complement system. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(3):224-8.
- 28) Vogel CW, Fritzing DC. Humanized cobra venom factor: experimental therapeutics for targeted complement activation and complement depletion. *Curr Pharm Des.* 2007;13(28):2916-26.
- 29) Janssen BJ, Gomes L, Koning RI, Svergun DI, Koster AJ, Fritzing DC, et al. Insights into complement convertase formation based on the structure of the factor B-cobra venom factor complex. *EMBO J.* 2009;28(16):2469-78.
- 30) Rooijackers SH, Wu J, Ruyken M, van Domselaar R, Planken KL, Tzekou A, et al. Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor. *Nat Immunol.* 2009;10(7):721-7.
- 31) Nakayama D, Ben Ammar Y, Miyata T, Takeda S. Structural basis of coagulation factor V recognition for cleavage by RVV-V. *FEBS Lett.* 2011;585(19):3020-5.
- 32) Sekine H, Machida T, Fujita T. Factor D. *Immunol Rev.* 2023;313(1):15-24.
- 33) Volanakis JE, Narayana SV. Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci.* 1996;5(4):553-64.
- 34) Pedersen DV, Lorentzen J, Andersen GR. Structural studies offer a framework for understanding the role of properdin in the alternative pathway and beyond. *Immunol Rev.* 2023;313(1):46-59.
- 35) Kemper C, Hourcade DE. Properdin: New roles in pattern recognition and target clearance. *Mol Immunol.* 2008;45(16):4048-56.
- 36) Harboe M, Johnson C, Nymo S, Ekholt K, Schjalm C, Lindstad JK, et al. Properdin binding to complement activating surfaces depends on initial C3b deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(4):E534-E9.
- 37) Skattum L, van Deuren M, van der Poll T, Truedsson L. Complement deficiency states and associated infections. *Mol Immunol.* 2011;48(14):1643-55.
- 38) Pedersen DV, Gadeberg TAF, Thomas C, Wang Y, Joram N, Jensen RK, et al. Structural basis for properdin oligomerization and convertase stimulation in the human complement system. *Front*

- Immunol. 2019;10:2007.
- 39) Olsen JG, Kragelund BB. Who climbs the tryptophan ladder? On the structure and function of the WSXWS motif in cytokine receptors and thrombospondin repeats. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(3):337-41.
 - 40) van den Bos RM, Pearce NM, Granneman J, Brondijk THC, Gros P. Insights into enhanced complement activation by structures of properdin and its complex with the C-terminal domain of C3b. *Front Immunol.* 2019;10:2097.
 - 41) Pedersen DV, Pedersen MN, Mazarakis SM, Wang Y, Lindorff-Larsen K, Arleth L, et al. Properdin oligomers adopt rigid extended conformations supporting function. *Elife.* 2021;10.
 - 42) Lorentzen J, Pedersen DV, Gadeberg TAF, Andersen GR. Structure determination of an unstable macromolecular complex enabled by nanobody-peptide bridging. *Protein Sci.* 2022;31(10):e4432.
 - 43) Lucientes-Continente L, Marquez-Tirado B, Goicoechea de Jorge E. The Factor H protein family: The switchers of the complement alternative pathway. *Immunol Rev.* 2023;313(1):25-45.
 - 44) Xue X, Wu J, Ricklin D, Forneris F, Di Crescenzo P, Schmidt CQ, et al. Regulator-dependent mechanisms of C3b processing by factor I allow differentiation of immune responses. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(8):643-51.
 - 45) Cantsilieris S, Nelson BJ, Huddleston J, Baker C, Harshman L, Penewit K, et al. Recurrent structural variation, clustered sites of selection, and disease risk for the complement factor H (CFH) gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(19):E4433-E42.
 - 46) Fan X, Yoshida Y, Honda S, Matsumoto M, Sawada Y, Hattori M, et al. Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol.* 2013;54(2):238-46.
 - 47) Yu J, Yuan X, Chen H, Chaturvedi S, Braunstein EM, Brodsky RA. Direct activation of the alternative complement pathway by SARS-CoV-2 spike proteins is blocked by factor D inhibition. *Blood.* 2020;136(18):2080-9.
 - 48) Wu J, Wu YQ, Ricklin D, Janssen BJ, Lambris JD, Gros P. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol.* 2009;10(7):728-33.
 - 49) Matsumoto T, Toyoda H, Amano K, Hirayama M, Ishikawa E, Fujimoto M, et al. Clinical manifestation of patients with atypical hemolytic uremic syndrome with the C3 p.I1157T variation in the Kinki region of Japan. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018;24(8):1301-7.
 - 50) Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, et al. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Nephrol.* 2018;22(5):1088-99.
 - 51) Schramm EC, Roumenina LT, Rybkine T, Chauvet S, Vieira-Martins P, Hue C, et al. Mapping interactions between complement

- C3 and regulators using mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2015;125(15):2359-69.
- 52) Roversi P, Johnson S, Caesar JJ, McLean F, Leath KJ, Tsiftoglou SA, et al. Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(31):12839-44.
- 53) Schmidt CQ, Bai H, Lin Z, Risitano AM, Barlow PN, Ricklin D, et al. Rational engineering of a minimized immune inhibitor with unique triple-targeting properties. *J Immunol*. 2013;190(11):5712-21.
- 54) Panwar HS, Ojha H, Ghosh P, Barage SH, Raut S, Sahu A. Molecular engineering of an efficient four-domain DAF-MCP chimera reveals the presence of functional modularity in RCA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(20):9953-8.
- 55) Jing H, Babu YS, Moore D, Kilpatrick JM, Liu XY, Volanakis JE, et al. Structures of native and complexed complement factor D: implications of the atypical His57 conformation and self-inhibitory loop in the regulation of specific serine protease activity. *J Mol Biol*. 1998;282(5):1061-8