

令和元年6月18日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07695

研究課題名(和文) 溶血性レクチンの膜孔形成におけるダイナミックな構造変化の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the dynamic structural change of hemolytic lectin in pore forming

研究代表者

郷田 秀一郎 (GODA, Shuichiro)

長崎大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00346587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：溶血性レクチンCEL-IIIの膜孔形成機構の解明の研究を行った。立体構造から解明されている膜孔形成部位のStem部位及びそれに加えてWrapping部位を欠損させた変異体を作成し、その四次構造を解析した。その結果、Stem部位を欠損しても七量体を形成し、Wrapping部位も欠損することによって多量体化しないことが明らかとなった。この結果から、CEL-IIIは膜貫通部位がなくても多量体化が可能であり、Wrapping部位が七量体化に必要なことが明らかとなった。これらのことは、膜孔形成において、初めに七量体化が起こり、その後に膜孔を形成する機構で進行することを示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜孔形成毒素はタンパク質を原因とする疾病を引き起こし、タンパク質が四次構造変化、すなわち多量体化するとともに立体構造が変化して孔を形成することによって起こる。このことはタンパク質が一つの安定した構造で存在するのではなく環境に応じて立体構造を変化させる好例であり、立体構造形成の研究の観点からも注目されている。本研究は、その多量体化機構の解明につながるものであり、多量体化の後に孔形成が行われる機序を明らかとしたことは四次構造変化を含む立体構造形成に与える学術的意義が大きい。これらタンパク質の立体構造変化による疾病は他にも広く知られており、その機構の解明は社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of the pore forming mechanism of hemolytic lectin CEL-III was done. Tertiary structure of the pore forming CEL-III showed that the pore region is consist of stem, wrapping and bundle region. Deletion mutants that lost stem region, stem and wrapping region were made and quaternary structures were analyzed by small-angle x-ray scattering. The results showed that the stem deleted mutant formed heptameric form and stem and wrapping region deleted mutant exist as monomer. This result indicates that the oligomerization is not depend on the stem region, and wrapping region affect the oligomerization. This suggests that the CEL-III forms heptamer at first on the surface of the cell membrane, and then forms pore in the cell membrane.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：溶血性レクチン 孔形成毒素 X線小角散乱

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

孔形成毒素(Pore forming toxin; PFT)は、タンパク質が細胞膜表面を認識し、結合、多量体化することによって細胞膜を破壊する。研究代表者は、PFT の一つである海産無脊椎動物ナマコ的一种グミ(*Cucumaria echinata*)由来溶血性レクチンCEL-III の研究を遂行している。CEL-III は、グミの体液中に存在し、ヒトなどの赤血球を溶血させる。CEL-III は、まず赤血球表面の糖鎖を認識して結合し、その後、多量体化することによって細胞膜にイオン透過性の孔(pore)を形成して赤血球を破壊する。2004 年にはCEL-III 単量体の立体構造、2014 年には孔形成時の七量体構造が報告されている。その結果、CEL-III 単量体は糖を結合するドメイン1、2及び多量体化に関与すると考えられるドメイン3からなることが明らかとなっている。多量体構造から、CEL-III は孔形成時に七量体を形成しており、単量体では二本のヘリックスであった部位が、二本のストランドとなり、七量体を形成することによって十四本のストランドからなるバレルを形成し、膜孔となっている。これまで報告されているPFT の中には黄色ブドウ球菌由来-ヘモリジンやロイコシジンが知られているが、それらはもともと単量体でもストランドであった部位がバレルを形成している。すなわち、CEL-III でのバレル形成は多量体化と共にヘリックスからストランドへの大きな二次構造変化を伴って起きるといふ特徴を有している。これらの結果から、単量体と膜孔形成多量体の立体構造を比較し、どのような構造変化が起きているのか解明されている。しかしながら、多量体化を伴う大きな二次構造変化の過程、すなわち膜孔形成多量体化の機序は不明となっている。

タンパク質の立体構造形成は、アンフィゼンルールに則って、そのタンパク質のアミノ酸配列によって、エネルギー的に安定な構造に一義的に形成されることが広く知られている。しかしながら、近年、タンパク質は溶液条件やタンパク質濃度によって多量体化するなど、タンパク質の動的な構造変化に関しても広く知られるようになり、それらが疾病に強く関係することなどが注目されている。

2. 研究の目的

本研究は、CEL-III の膜孔形成多量体化における構造変化の機序を解明することを目的としている。これまでに、黄色ブドウ球菌由来ロイコシジンでは、多量体化の中間体構造としてプレポア構造と呼ばれる膜孔を貫通する部分が約半分だけ形成しているものが報告されている。しかしながら、その後、どのようにして残り半分が形成されるかは、不明である。CEL-III に関しては、単量体及び膜孔形成多量体の立体構造は解明されているが、単量体から多量体への構造変化は不明である。そこでCEL-III の膜孔形成機序を多量体化と膜貫通バレル形成に分け、変異体を作成することによって多量体化に関与する部位の特定、及び構造変化の機序を解明する。これらの知見は、疾病の発症機序の解明と共に、タンパク質の立体構造形成及びその変化の解明という学術的に重要な意義を持っている。

3. 研究の方法

溶血性レクチンCEL-III の膜孔形成多量体の形成機序を、多量体化と膜貫通バレル形成に分けて、変異体を作成することによって解明する。まず、立体構造情報から糖結合に寄与していると思われるドメイン1,2 のみや、膜孔を形成しているドメイン3 の一部を欠損した変異体を作成し、多量体化に寄与している部位を同定した。ドメイン3は立体構造解析の結果から、Stem, Wrapping, Scaffold, Terminalに分けることができる(図1)。本研究では、Stem部位および、Stem部位に加えてWrappingを切除した変異体を作成し、四次構造を解析した。得られた変異体の多量体化はX線小角散乱測定によって行い、分子量の変化、モデル構造の構築を行った。X線小角散乱測定(SAXS)は茨城県つくば市の高エネルギー加速器研究機構BL-6A, 10Cにて行った。溶液中での構造変化はX線小角散乱法によって、*in vitro*での多量体化溶液条件下での測定を行った。

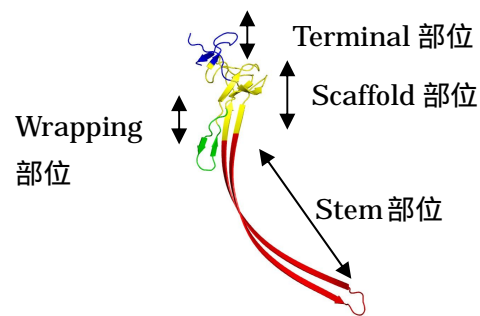


図1 CEL-III 膜孔形成七量体中の1分子のドメイン3部分の立体構造

4. 研究成果

CEL-III のドメイン3の一部欠損変異体は、それ以外の部分を野生型のCEL-III 発現ベクターを鋳型に用いてPCRで増幅することによって作成した。目的のタンパク質の生産は大腸菌を宿主に用いて行った。野生型CEL-IIIを生産した際にも大腸菌体内では封入体として得られ、変異体に関しても封入体に生産が見られた。そこで、変性剤である塩酸グアニジンを用いて封入体を可溶化し、希釈することによって立体構造の巻き戻しを行った。精製はゲルろ過によって行い、SDS-PAGEで単一のバンドを示すまでに精製したものを以後の実験に用いた。

得られたCEL-III変異体を用いてX線小角散乱測定によって分子のサイズの測定およびモデ

ル構造の構築を行った。その結果、Stem 欠損変異体及び Stem と Wrapping 部位を欠損した変異体のギニエ半径(R_g)はギニエプロットから、それぞれ 101.5, 22.0 Å と求められた(図 2(A))。野生型の R_g は 24.5 Å であることから、Stem 部位欠損では多量体化し、加えて Wrapping 部位も欠損すると単量体で存在することが示唆された。Stem 部位欠損変異体では多量体化が示唆されたことから、*in vitro* で多量体化を促進する溶液条件下での SAXS 測定を行った。その結果、1 M NaCl 存在下では 92.1 Å、さらに pH を 10.0 にすると 80.7 Å、さらに結合を示す糖であるラクツロースを加えると 69.9 Å となった(図 2(B))。このことから、Stem 部位欠損変異体は多量体化した状態で得られ、塩濃度、pH 変化、糖の存在によって構造が変化することを示した。

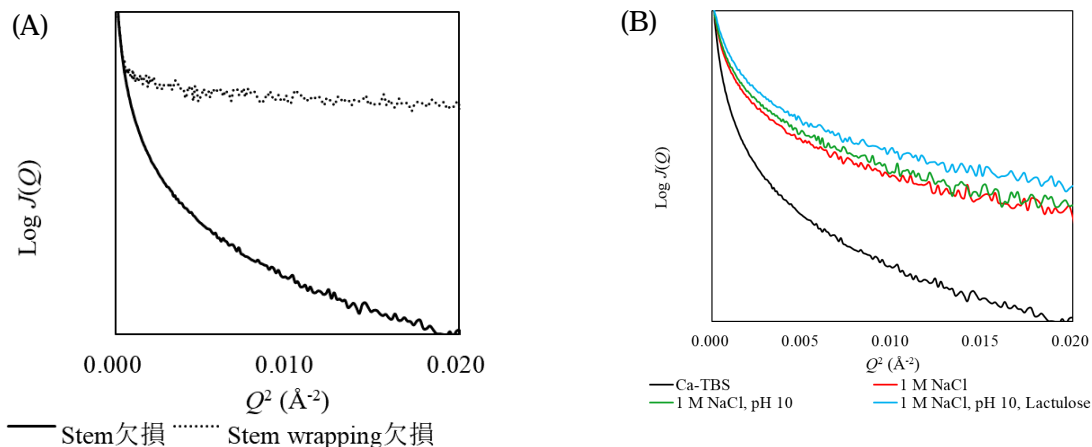


図 2 CEL-III 変異体のギニエプロット(A)10 mM Ca^{2+} を含むトリス緩衝液中 (B)Stem 欠損変異体の多量体化溶液条件下

得られた散乱曲線から溶液中でのモデル構造の構築を行った。作成方法はビーズを電子密度とし、モデル構造から散乱曲線を計算し実験値に近づけていく DAMMIN を用いて行った。その結果、Stem 部位を欠損した変異体は、膜孔形成七量体の立体構造から膜貫通部位を除いたものに極めて近い構造となった(図 3)。一方、Wrapping 部位も除いたものは単量体での構造に近いモデル構造が得られた(図 4)。

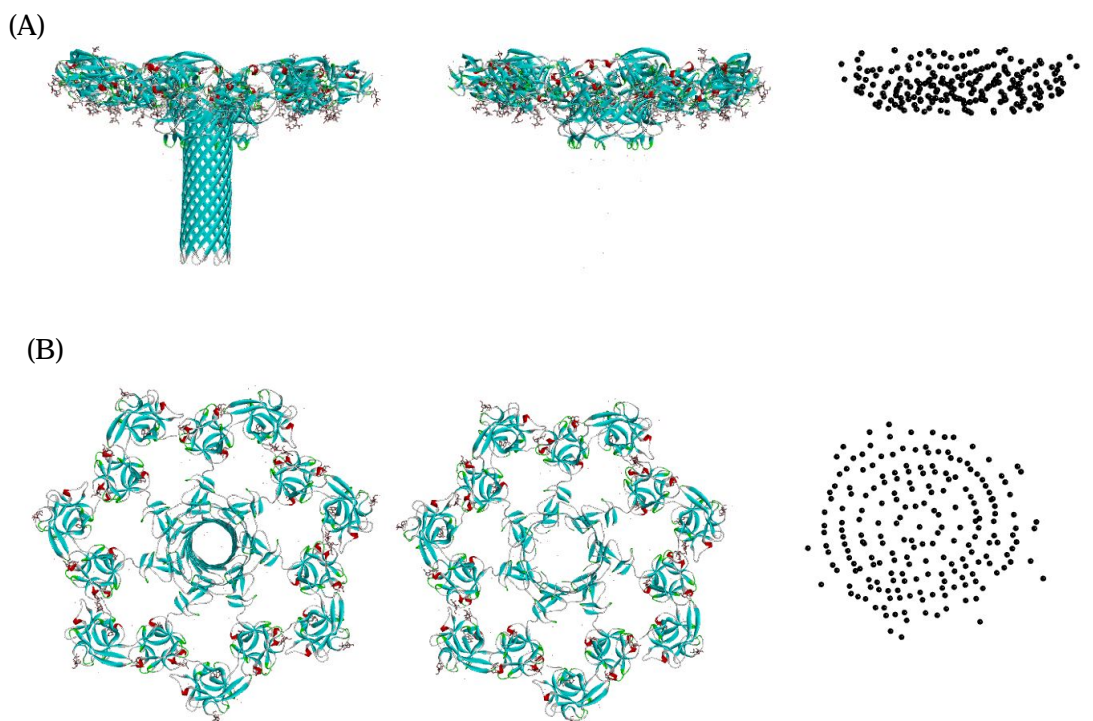


図 3 CEL-III 膜孔形成七量体の立体構造(左) 立体構造から膜貫通部位を除いたもの(中) Stem 部位を欠損したものの SAXS によるモデル構造。(A)膜貫通部位を横から見たもの、(B)膜貫通部位を下から見たもの

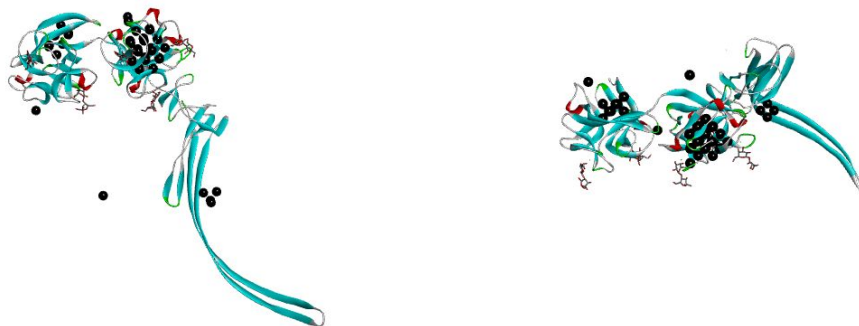


図4 Stem及びWrapping部位を欠損したもののSAXSによるモデル構造と膜孔形成七量体立体構造の重ね合わせ図。モデル構造は球で示した。左右の図は角度をかえたもの。

このことより、膜貫通部位のうちStem部位が存在しなくても、CEL-IIIは七量体を形成することができること示唆された。すなわち、膜孔を形成することによって七量体化するのではなく、細胞膜表面で七量体を形成後にStem部位が立体構造を変化させて膜孔になることが示唆された。また、Wrapping部位を欠損したものでは七量体化が見られなかったことから、同部位が、プロトマーのドメイン1,2間での相互作用に影響し、多量体化に大きく寄与していることが示唆された。

Stem部位欠損変異体が多量体化していることから、リガンドである糖との相互作用が起こるのか、解析した。ラクトースを結合した樹脂にStem部位欠損変異体を通したところ結合し、ラクトースを含む溶液によって溶出された。このことから、Stem部位を欠損したものでも糖認識は失われていないことが明らかとなった。

<引用文献>

Uchida *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:37133-37141.

Unno *et al.*, (2014) *J. Biol. Chem.* **289**:12805-12812.

Svergun (1999) *Biophys J.* **76**:2879-2886.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

H. Unno, S. Itakura, S. Higuchi, S. Goda, K. Yamaguchi, T. Hatakeyama "Novel Ca²⁺-independent carbohydrate recognition of the C-type lectins, SPL-1 and SPL-2, from the bivalve *Saxidomus purpuratus*" *Protein Science*, 査読有 (2019) **28**:766-778.

DOI: 10.1002/pro.3592

S. Goda, T. Koga, K. Yamashita, R. Kuriura, T. Ueda "A novel carbohydrate-binding surface layer protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*" *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有 (2018) **82**:1327-1334.

DOI: 10.1080/09168451.2018.1460571

H. Unno, A. Nakamura, S. Mori, S. Goda, K. Yamaguchi, K. Hiemori, H. Tateno, T. Hatakeyama "Identification, Characterization, and X-ray Crystallographic Analysis of a Novel Type of Lectin AJLec from the Sea Anemone *Anthopleura japonica*" *Sci. Rep.*, 査読有 (2018) **8**:11516.

DOI: 10.1038/s41598-018-29498-0

T. Hatakeyama, A. Ichise, H. Unno, S. Goda, T. Oda, H. Tateno, J. Hirabayashi, H. Sakai, H. Nakagawa "Carbohydrate recognition by the rhamnose-binding lectin SUL-1 with a novel three-domain structure isolated from the venom of globiferous pedicellariae of the flower sea urchin *Toxopneustes pileolus*" *Protein Science*, 査読有 (2017) **26**:1574-1583.

DOI: 10.1002/pro.3185

T. Nagao, R. Masaki, H. Unno, S. Goda, T. Hatakeyama "Effects of amino acid mutations in the pore-forming domain of the hemolytic lectin CEL-III" *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有 (2016) **80**:1966-1969.

DOI: 10.1080/09168451.2016.1176520

H. Unno, K. Matsuyama, Y. Tsuji, S. Goda, K. Hiemori, H. Tateno, J. Hirabayashi, T. Hatakeyama "Identification, characterization, and X-ray crystallographic analysis

of a novel type of mannose-specific lectin CGL1 from the pacific oyster *Crassostrea gigas*" *Sci. Rep.*、査読有 (2016) 6:29135.

DOI: 10.1038/srep29135

T. Hatakeyama, S. Goda, H. Unno "Mechanism of Action of the Pore-Forming Lectins Mediated by Binding to Cell Surface Carbohydrate Chains" *Trends Glycosci. Glycotechnol.*、査読有 (2016) 28:E55-E60.

DOI: 10.4052/tigg.1427.1E

〔学会発表〕(計6件)

山脇佑太、海野英昭、畠山智充、郷田秀一郎 溶血性レクチン CEL-III 膜貫通部位の多量体化に与える影響の解明 第 42 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2018 年

外山諒、北旬、工藤彰洋、牛島佑樹、海野英昭、畠山智充、郷田秀一郎 サンゴ由来レクチン様タンパク質の赤血球凝集活性の解析 第 18 回日本蛋白質科学会年会 2018 年

郷田秀一郎、山脇佑太、海野英昭、畠山智充 溶血性レクチン CEL-III のドメイン 3 変異体を用いた多量体化機構の解明 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年

山脇佑太、海野英昭、畠山智充、郷田秀一郎 溶血性レクチン CEL-III 膜貫通部位欠損変異体の多量体化に関する研究 第 41 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2017 年

外山諒、北旬、工藤彰洋、牛島佑樹、海野英昭、畠山智充、郷田秀一郎 サンゴ由来レクチン様タンパク質の大腸菌を宿主に用いた発現系の構築 第 41 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2017 年

北旬、工藤彰洋、牛島佑樹、海野英昭、畠山智充、郷田秀一郎 サンゴ由来レクチン様タンパク質のチオレドキシニン融合体としての生産 第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 2016 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cms.nagasaki-u.ac.jp/lab/seitai/>

6 . 研究組織

なし