

平成21年6月1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780248
 研究課題名 (和文) 溶血性レクチンの機能的発現と高機能化に関する研究
 研究課題名 (英文) Studies on the functional expression and high-functionalization of a hemolytic lectin
 研究代表者
 上妻 由章 (KOUZUMA YOSHIKI)
 茨城大学・農学部・准教授
 研究者番号：10284556

研究成果の概要：

溶血活性を有するレクチン CEL-III について、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を利用して可溶性状態での機能的発現に成功した。次に、CEL-III の5つの糖結合部位のうち、それぞれ1つに変異を導入することによってその部位の糖結合能が消失した5種の CEL-III 変異体を作製し、それらの溶血活性測定と糖結合における速度論的解析を行って、CEL-III の溶血活性発現に強く関与する領域を推定する事が出来た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	300,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：タンパク質・糖鎖工学、レクチン

1. 研究開始当初の背景

溶血性レクチン CEL-III (*Cucumaria echinata* lectin-III: 分子量 47457、432 残基) はナマコの近縁種であるグミ (*C. echinata*) から見いだされた Ca^{2+} 依存性のガラクトース特異的レクチンの1種である。このレクチンは一般のレクチンが持たない「溶

血活性」を保持している点で、既知のレクチンとは大きく性質が異なっている。CEL-III による溶血は、これまでの生化学的解析から赤血球膜上の糖鎖を介した膜への結合と、6～7 分子の CEL-III 同士の会合による小孔形成の結果として起こると考えられ、CEL-III の C 末端領域欠損変異体を用いた実験、およ

び最近決定された立体構造から、1-283 残基目までが糖結合ドメイン（2つの糖結合ドメイン（CRD1 と CRD2）からなり、CRD1 には2箇所（1 α と 1 γ ）、CRD2 には3箇所（2 α 、2 β 、2 γ ）の糖結合部位を有している）として機能し、残りの領域が会合体形成・膜貫入ドメインであると推察されている。以上のように、CEL-III の C 末端領域欠損変異体については、大腸菌による発現系が構築され、糖結合能に関しての変異体解析は可能であるが、全長の CEL-III タンパク質については、大腸菌で不溶性の封入体として発現するものの、CEL-III による溶血の分子機構を解明するために必要な機能的発現系の構築には至っていない。

一方で、CEL-III が持つ溶血活性を利用して、マラリアを媒介するハマダラカに CEL-III 遺伝子を組み込み、マラリア伝播能がないトランスジェニック（TG）蚊を構築する試みが進んでいる。マラリアの原因となるマラリア原虫はハマダラカに吸血されることにより受精を開始するが、その受精は最適な環境であるハマダラカの中腸内で行われる。そこで、中腸内で CEL-III を発現させ、吸血した赤血球を溶血させる。その結果、中腸内の環境を激変させ、受精を起こしにくくしてマラリア原虫のライフサイクルを断ち切ることが期待されている。既に、自治医科大との共同研究により、CEL-III を中腸特異的に発現する TG 蚊が構築されており、この TG 蚊の体内ではネズミマラリア原虫数が激減することが明らかにされている。このように CEL-III はマラリア伝播阻止のための有効な機能性タンパク質であり、ヒトマラリア原虫への有効性についても検証が進められている。しかし、CEL-III の溶血活性は、動物種によってかなり感受性が異なり、例えばラット赤血球は容易に溶血するのに対し、マウス赤血球は全く溶血しない。またヒト赤血球に対しては $O=B \gg A$ という感受性の違いを示し、これは各赤血球膜上の糖鎖への結合能の違いによるものと考えられる。CEL-III を上記目的で応用する場合、血液型による感受性

の違いは、今後、CEL-III を上記目的で利用する場合に大きな問題になる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、動物由来レクチンで唯一溶血活性を示すことが知られている CEL-III について、以下に示す目的で研究を行った。

(1) 溶血性レクチン CEL-III の機能的発現系の構築：CEL-III による溶血の分子機構を解明するために必要不可欠な組換え型 CEL-III の機能的発現系を構築する事を目的に、バキュロウイルス-昆虫細胞による発現系を用いて溶血活性を保持した組換え型 CEL-III タンパク質の機能的発現系を構築する。

(2) CEL-III の溶血活性に関与する領域の同定：CEL-III による溶血メカニズムの全体像を明らかにすることを目的に、溶血ステップに直接関与する領域を CEL-III の変異体解析により同定する。

(3) マラリア伝播阻止を目的としたトランスジェニック蚊創製のための CEL-III 高機能化：マラリア伝播阻止を目指したトランスジェニック蚊の創製に有効な、特定の型の赤血球に対して強力な溶血活性を示す高機能 CEL-III 分子を作製することを目的に、ファージディスプレイ法を利用して高機能 CEL-III 分子を選抜・作製する。

3. 研究の方法

(1) 溶血性レクチン CEL-III の機能的発現系の構築：CEL-III タンパク質の機能的発現のためにバキュロウイルス-昆虫細胞による発現系を使用した。まず、CEL-III 遺伝子をバキュロウイルストランスファーベクター（pBAC-gus 系）にクローニングし、組換えトランスファープラスミドを構築した。その際に、培地中への分泌発現を試みるためにメリチンのシグナル配列を N 末端に付加し、更に、C 末端に His-Tag を付加したのもの（melCEL-III-H）および付加していないもの（melCEL-III）を作成した。構築したプラスミドとバキュロウイルスゲノム DNA を *Spodoptera frugiperda* 9(Sf9)細胞にコトラ

ンスフェクトし、相同組換えによって組換えバキュロウイルスを得、つづいて、プラークアッセイを行って、組換えウイルスを純化し、高力価ウイルス株を調製した。このウイルス感染細胞を用いて CEL-III タンパク質発現をウエスタン解析によりチェックし、発現最適時間を決定した後に、大規模培養を行なって、組換え型 CEL-III タンパク質を培地上清中に生産した。組換え型 CEL-III タンパク質の精製は、培地を直接、ラクトースセルロフアインカラムに供するアフィニティークロマトグラフィーにより行い、精製された組換え型 CEL-III について、その溶血活性、糖結合活性、オリゴマー形成能を調査し、グミ由来 CEL-III (authentic CEL-III) と比較した。

(2) CEL-III の溶血活性に関与する領域の同定：CEL-III による溶血は、①赤血球膜上糖鎖への結合、②糖結合による構造変化と膜への貫入、③CEL-III 同士の会合（オリゴマー化）による小孔形成、④浸透圧バランスの攪乱による膜の破壊、というステップを経て進行すると考えられる。ステップ①は、CEL-III の N 末端領域（1-283）が関与することが明らかになっている。そこで、ステップ②-③に関わる領域の同定を試みた。具体的には CEL-III の 5 箇所の糖結合部位中の Ca^{2+} 配位に関与するアミノ酸残基（Asp43 (1 α)、Asp141 (1 γ)、Asp188 (2 α)、Asp229 (2 β)、Asp276 (2 γ)）を Ala に置換することによって、各糖結合部位の糖結合能を消失させた 5 つの変異体（D43A、D141A、D188A、D229A、D276A）を作製し、その溶血活性、糖結合活性を評価した。糖結合活性については表面プラズモン共鳴を原理とする Biacore を用いたリアルタイム結合解析（アシアロフェツインの糖鎖への結合）を行い、結合および解離速度定数、解離定数を算出し、溶血活性との相関性について調査した。

(3) マラリア伝播阻止を目的としたトランスジェニック蚊創製のための CEL-III 高機能化：赤血球に対する溶血活性を増強した高機

能化 CEL-III の構築のためには、赤血球膜上糖鎖に対してより高い親和性（結合能）を持つ CEL-III 分子を作製することが必要である。CEL-III には 2 つの糖結合ドメイン CRD1 と CRD2 があり、それぞれに 2 個および 3 個の糖結合部位が存在する。これまで、部位特異的変異体解析により、CRD1 の 1 α では Asp23、His36、Asp43、Gln44 が、CRD2 の 2 γ では Asp256、Trp269、Asp276 が糖結合活性に必須なアミノ酸残基であることが明らかになっている。よってその周辺のアミノ酸残基をランダムに変異した CEL-III または糖結合ドメイン変異体ライブラリーを作製して、ウサギおよび各種動物赤血球に対して結合親和性の上昇した CEL-III 分子等を探索し、この方法の有効性について調査を行う。具体的には、特定アミノ酸残基にランダムに変異が導入されるように設計したロングプライマーを用いて PCR により遺伝子を増幅し、これをファージディスプレイ用プラスミドに連結して、大腸菌に導入した。これにヘルパーファージを感染させ、変異 CEL-III 分子または糖結合ドメインが表面に発現された組換えファージライブラリーを作製した。ファージと各赤血球を混ぜて結合させ、特異糖（ラクトース等）で洗浄して、溶出してくるファージを回収し、再び感染、結合、溶出を行い、この操作（パニング）を数回繰り返した。この選択によって得られた CEL-III 変異体等のアミノ酸配列を調査して、その特徴について解析した

4. 研究成果

(1) 溶血性レクチン CEL-III の機能的発現系の構築：組換え型 CEL-III タンパク質の機能的発現のためにバキュロウイルス-昆虫細胞による発現系の構築を試みた。組換えバキュロウイルスを作製し、Sf9 細胞に感染させ、細胞培養した結果、me1CEL-III-H および me1CEL-III 共に培養液中での可溶性タンパク質の発現がウエスタン解析により確認できた。発現最適時間は培養後約 6 日目であったので、大量培養を行って培養液を直接、ア

フィニティーカラムであるラクトースセルロフラインカラムに供し、ラクトースで溶出する事によって、組換え型 CEL-III (rCEL-III) の精製法が確立できた (Fig. 1)。

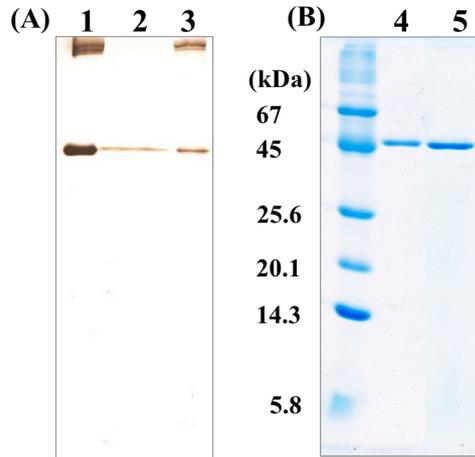


Fig. 1. Western blotting (A) and SDS-PAGE (B) of recombinant melCEL-III. Lane 1, authentic CEL-III; lane 2, culture medium, lane 3, Sf9 cells; lane 4, authentic CEL-III; lane 5, purified rCEL-III.

melCEL-III-H と melCEL-III の N 末端アミノ酸配列を調べた所、メリチンシグナル配列は除去されていた。また、溶血活性について調べた所、50%溶血濃度は melCEL-III が 20 ~ 29 $\mu\text{g/ml}$ 、melCEL-III-H については 60 $\mu\text{g/ml}$ 以上であり、グミ由来 CEL-III (authentic CEL-III) と比べるとかなり低下している事が明らかになった。この溶血活性の低下は、赤血球膜上で検出される CEL-III オリゴマーの量が極少量であることから①オリゴマー形成能の低下によること (Fig. 2)、そして Biacore を用いた糖鎖との結合における速度論的解析において結合速度定数が低下、および解離速度定数が上昇して、結果的に解離定数 K_d が 2.6 倍になっていることから、②糖結合能の低下によることが主な原因である事が示唆された。しかし、可溶性状態で CEL-III タンパク質を初めて発現し、精製することが可能になった事より、CEL-III の溶血機構解析のための変異体作成を melCEL-III 発現系を用いて行う事とした。

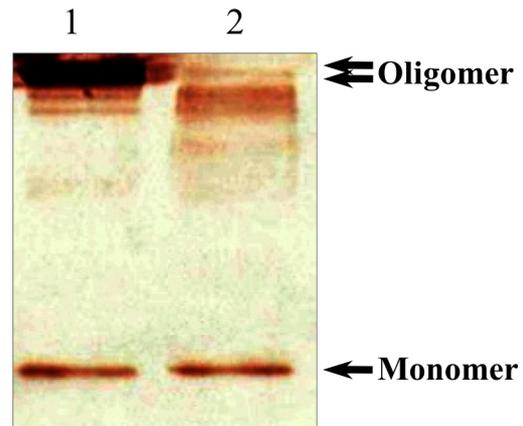


Fig. 2. Western blotting of erythrocyte membranes treated with authentic CEL-III (lane 1) and melCEL-III (lane 2).

(2) CEL-III の溶血活性に関与する領域の同定: CEL-III の 5 箇所の糖結合部位 (1α 、 1γ 、 2α 、 2β 、 2γ) のうち 1 箇所の糖結合能を消失させた 5 種の変異体 (D43A、D141A、D188A、D229A、D276A) を作製し、その溶血活性を検討した。その結果、各変異体はいずれも溶血活性が低下し、なかでも D43A と D229A に関しては溶血活性が消失していることが明らかになった (Fig. 3)。

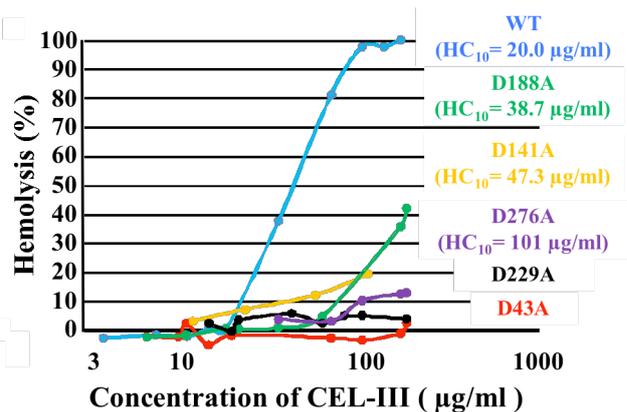


Fig. 3. Hemolytic activities of rCEL-III and their mutants. HC_{10} means the concentrations of rCEL-III or its mutants that induce 10% hemolysis.

つづいて、各変異体の糖結合能について Biacore を用いて解析したところ、糖鎖結合に関する解離定数はいずれも低下していたが、溶血活性が消失している D43A と D229A は他の変異体と同程度か、それらより強い糖

結合能（解離定数が約 $3 \times 10^{-11} \text{M}$ ）を保持していたことから、糖結合の強さが溶血活性の低下・消失とは直接関連しないことが明らかになった (Fig. 4 および Table 1)。

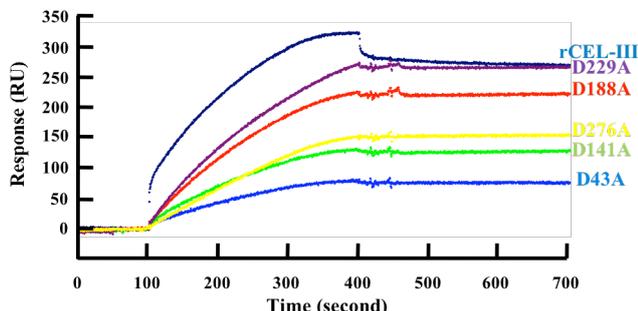


Fig. 4. Sensorgrams obtained on real time analysis with Biacore of interaction of rCEL-III and its mutants with asialofetuin.

Table 1. Kinetic constants of rCEL-III and its mutants

Name	R_{max} (RU)	k_{on} ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{off} (10^{-7} s^{-1})	K_D (10^{-11} M)
rCEL-III	253	6.47	0.476	0.735
D43A	103	4.85	1.57	3.23
D141A	171	4.84	1.50	3.10
D188A	302	4.66	4.27	9.17
D229A	384	4.14	1.28	3.10
D276A	284	2.74	1.49	5.44

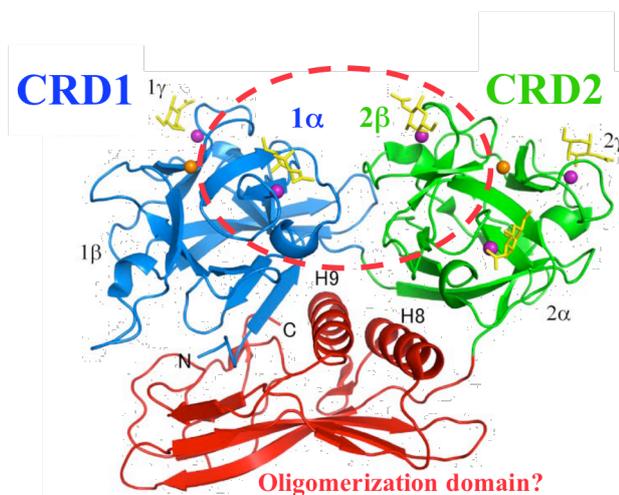


Fig.5. Overall structure of CEL-III. Bound GalNAc molecules are indicated by yellow stick models. Ca^{2+} and Mg^{2+} ions are shown as purple and orange balls, respectively.

以上のことから、CEL-III 中の 5 つの糖結合部位のうち Asp43 と Asp229 が位置する 1α 、 2β サブドメイン (Fig. 5) への糖結合が CEL-III が溶血活性を発揮する際の高次構造変化をおこすためのトリガーとなることが示唆された。

(3) マラリア伝播阻止を目的としたトランスジェニック蚊創製のための CEL-III 高機能化：CEL-III 高機能化：赤血球膜上糖鎖に対してより高い親和性（結合能）を持つ CEL-III 分子を作製するため、CEL-III タンパク質全体のファージ提示を試みた。しかし、その効率が低かったため、次に CEL-III の 2 つの糖結合ドメインのうち CRD1 のみからなるタンパク質の提示とランダム変異体作成を試みた。CRD1 の 1α 中の糖結合に関与する Asp23、His36、Asp43、Gln44 含めた 13 アミノ酸残基を 6–20 種のアミノ酸にランダムに変異したファージ提示ライブラリーを作成し、ウサギ赤血球等に対して結合するファージの選抜を行った。その結果、それらの配列が特定の アミノ酸残基に収束する傾向になることが明らかになり、強い糖結合活性を示す糖結合部位を構築するために必要なアミノ酸配列を確認することが出来た。

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 2 件)

① S. Yoshida, Y. Shimada, D. Kondoh, Y. Kouzuma, A. K. Ghosh, M. Jacobs-Lorena, and R. E. Sinden, Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development: *PLoS Pathog.*, **3**, 1962–1970 (2007). 査読有

② T. Hatakeyama, H. Unno, Y. Kouzuma, T. Uchida, S. Eto, H. Hidemura, N. Kato, M.

Yonekura, and M. Kusunoki, C-type lectin-like carbohydrate-recognition of the hemolytic lectin CEL-III containing ricin-type beta-trefoil folds: *J. Biol. Chem.*, **282**, 37826-37835 (2007). 査読有

[学会発表] (計8件)

①清水良樹、吉田栄人、米倉政実、上妻由章、
「溶血性レクチン CEL-III の糖認識部位の変異導入に対する溶血活性への影響とその速度論的解析」日本農芸化学会大会、2009年3月28日、マリンメッセ福岡

②山崎寛司、米倉政実、上妻由章、「溶血性レクチン CEL-III のイソレクチン遺伝子の cDNA クローニングと大腸菌内での発現」日本農芸化学会大会、2009年3月28日、マリンメッセ福岡

③清水良樹、吉田栄人、上妻由章、米倉政実、
「バキュロウイルス発現系を用いた溶血性レクチン CEL-III の発現およびその特徴」日本農芸化学会大会、2008年3月28日、名城大学

④海野英昭、衛藤誠一郎、秀村晴樹、上妻由章、米倉政実、内田達也、楠木正巳、畠山智充、「溶血性レクチン CEL-III の糖複合体結晶構造解析」日本結晶学会 2007 年会、2007年12月1日、東京工業大学

⑤久松啓伍、海野英昭、郷田秀一郎、上妻由章、畠山智充、「溶血性レクチン CEL-III の部位特異的変異体の発現とその自己会合性」日本蛋白質科学会年会、2007年5月24日、仙台国際センター

⑥ H. Hidemura, Y. Kouzuma, and T. Hatakeyama, “Expression and X-ray crystallographic analysis of the recombinant hemolytic lectin CEL-III” 20th IUBMB International Congress of

Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006 Jun, Kyoto International Conference Hall

⑦上妻由章、大原浩司、米倉政実、「カルシウム依存性リシン様レクチン CEL-III の糖認識部位に関する研究」日本蛋白質科学会年会、2006年4月25日、京都国際会議場

⑧嶋田 陽平、近藤 大介、上妻由章、吉田 栄人、「ナマコのレクチン CEL-III を導入した遺伝子操作蚊によるマラリア伝搬阻止」日本衛生動物学会大会、2006年4月8日、長崎大学

[その他]

ホームページ等

<http://info.ibaraki.ac.jp/scripts/websearch/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上妻 由章 (KOUZUMA YOSHIKI)
茨城大学農学部・准教授
研究者番号：10284556