

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580100

研究課題名 (和文) 立体構造を基盤とした動物レクチン-糖鎖間相互作用の解明

研究課題名 (英文) Study on the interactions between animal lectins and carbohydrate chains based on their three-dimensional structures

研究代表者

畠山 智充 (HATAKEYAMA TOMOMITSU)

長崎大学・工学部・教授

研究者番号：50228467

研究成果の概要 (和文)：生体内で細胞間・分子間認識に重要な役割を果たしている糖結合タンパク質 (レクチン) と糖鎖との相互作用を、レクチンの立体構造情報をもとに解析を行った。その結果、同一の基本構造をもつレクチンの活性部位中のアミノ酸残基の配置を変化させることによってさまざまな糖結合性を発現されることが可能であることが明らかとなり、人工的な分子認識タンパク質の設計に有用な情報を得ることができた。さらに、糖との結合によってレクチン全体の立体構造が変化し、細胞に対する生理活性が発現するメカニズムなども明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Interactions between carbohydrate-binding proteins (lectins) and carbohydrate chains were analyzed based on their three-dimensional structures. The results demonstrated that various carbohydrate chains can be recognized by combinations of amino acid residues located in the binding sites of lectins, which provides useful information to design novel molecular-recognition proteins. In addition, it was also revealed that binding of carbohydrates to lectin may induce conformational changes, which lead further biological activities to cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：蛋白質科学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：レクチン, 糖鎖, X線結晶構造解析, 部位特異的変異, 分子認識

## 1. 研究開始当初の背景

レクチンは一般に特異的糖結合性を示すタンパク質の総称であり、多くの植物及び動物組織や体液中に見いだされている。これらは生体内における分子認識や細胞間認識に重要な働きをすることが知られているが、特に動物レクチンについては免疫、発生・分化、細胞内でのタンパク質輸送・フォールディング

グなど糖鎖を介して重要な役割を果たすことが示されている。筆者はこれまでに、さまざまな動植物からレクチンを単離し、その構造と機能を調べてきたが、その中でも特に無脊椎動物より興味ある新規  $\text{Ca}^{2+}$  依存性レクチンを見出してその構造と機能について調べてきた。なかでも棘皮動物グミ (*Cucumaria echinata*) から 4 種類の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性レクチン

CEL-I~CEL-IV を単離精製してその性質を検討したところ、CEL-I 及び CEL-IV はそれぞれ C 型糖結合ドメインの 2 量体及び 4 量体から成る C 型レクチンであることを見出した。このうち CEL-I は、培養細胞に対する比較的強い毒性や、マクロファージからの腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) 放出活性などの特異な生理活性を有する興味あるレクチンであるが、これは CEL-I が細胞表面の N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 含有糖複合糖質と結合し、細胞内へ何らかのシグナルが送られることによって引き起こされているものと考えられている。一方、CEL-III はヒトやウサギなどの赤血球に対する強い溶血活性や細胞毒性を示すレクチンであるが、これは CEL-III が細胞表面糖鎖に結合した後にコンフォメーション変化を生じて細胞膜に小孔を形成するためであることが明らかになっている。

これらのレクチンについてはすでに一次構造を決定するとともに、X 線結晶構造解析によって立体構造を明らかにした。また、大腸菌による組換えタンパク質の発現にも成功している。

そこで、このような研究成果をもとに、動物レクチンの構造と機能をさらに詳細に明らかにするために、X 線結晶構造解析で得られた立体構造情報を基礎として、種々のレクチンとその部位特異的変異体を組換え DNA 技術により微生物を用いて発現し、その機能を解析することによってレクチン糖鎖間相互作用とその生理活性との関係について詳細な検討を行うことを目指した。

## 2. 研究の目的

### (1) C 型レクチン CEL-I 及び CEL-IV の部位特異的変異体と糖鎖との相互作用解析

C 型レクチンは様々な糖特異性を示すものが存在することから、種々の結合特異性を有するタンパク質設計のための土台として有用であるものと考えられる。すでに立体構造解析に成功している C 型レクチン CEL-I 及び CEL-IV について、それらの糖結合部位に存在する糖鎖との相互作用に關与するアミノ酸残基を部位特異的変異により置換し、それらの糖結合能及び糖特異性発現への影響を検討する。これによって C 型レクチンの多彩な糖特異性の発現機構を明らかにするとともに、新規な糖特異性を有する新規なレクチンを人工的に作製するための有用な情報とする。

### (2) 溶血性レクチン CEL-III と糖鎖との結合に基づくコンフォメーション変化と細胞膜内会合・小孔形成機構解明

溶血性レクチン CEL-III は、2 つの糖結合ドメイン (ドメイン 1, ドメイン 2) と 1 つの膜結合 (会合) ドメイン (ドメイン 3) から成り、ヒト及びウサギなどの赤血球に対す

る強い溶血活性と培養細胞に対する細胞毒性を示す。CEL-III はドメイン 1 とドメイン 2 によって赤血球表面の特異的糖鎖と結合したのちに、ドメイン 3 のコンフォメーションを大きく変化させることによって細胞膜内でオリゴマー化し、その結果イオン透過性の小孔 (pore) を細胞膜に形成する (図 1)。このような作用機構は、多くの細菌毒素タンパク質とも共通するものであり、その糖鎖との結合に基づくタンパク質のコンフォメーション変化を明らかにすることは、レクチンのみならず、細菌毒素の作用機構解明にも大きく寄与するものと考えられる。すでに CEL-III の立体構造は解明されているが、その糖鎖との結合によるオリゴマー化については不明な点が多いことから、糖鎖との結合に基づくドメイン 3 の変化やオリゴマー化機構についての詳細な検討を行い CEL-III の膜内会合機構を明らかにする。

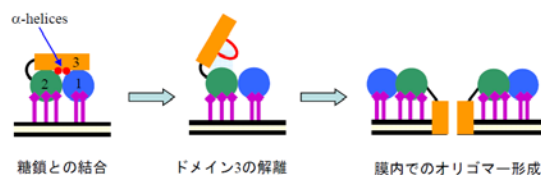


図 1 CEL-III の細胞膜内でのオリゴマー化

### (3) ゲノム情報を基にした新規動物レクチンの発現と構造機能解析

これまでに明らかにされているゲノム情報をもとに、新規レクチンの発現とその性質について検討を行う。特にヒトの免疫細胞である樹状細胞の表面レセプターである BDCA-2 及び、古くから遺伝学や発生学研究に用いられているショウジョウバエが持つ C 型レクチンの遺伝子をクローニングし、大腸菌による大量発現系を構築することによって、その立体構造や生体内での機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) CEL-I 及び CEL-IV の部位特異的変異体作製ならびに糖との複合体の X 線結晶構造解析

CEL-I の X 線結晶構造解析の結果から、GalNAc に対する高い特異性に關与すると考えられるアミノ酸残基を部位特異的変異によって他のアミノ酸に置き換えた変異体を作製し、その糖結合能を赤血球凝集活性、アフィニティークロマトグラフィー等で検討した。また、糖特異性を決定するのに重要であると考えられる糖結合部位中の QPD 配列モチーフを EPN に置換した変異体を作製し、糖特異性の変化を調べることによって、この配列モチーフの糖認識における役割について検討を行った。

CEL-IV については、その  $\alpha$ -ガラクトシド特異性の原因を明らかにするために  $\alpha$ -ガラクトシドとの複合体結晶を作製して X 線結晶解析を行った。X 線回折データ収集は、高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory において行い、構造解析は、CEL-I を初期構造モデルとして用いた分子置換法により行った。さらに、CEL-I と同様、糖特異性に重要な EPN 配列を QPD 配列に変換した部位特異的変異体を作製し、その糖結合特異性を検討した。

(2) 溶血性レクチン CEL-III の糖鎖との結合に基づく細胞膜内での自己会合メカニズムの解明

CEL-III は、そのドメイン 1 及び 2 に存在する 5 箇所糖結合部位に糖鎖が結合することによって大きなコンフォメーション変化を生じ、それに伴ってドメイン 3 が細胞膜内で自己会合するとともにイオン透過性ポアを形成するものと考えられるが、その際にドメイン 3 内の 2 つの  $\alpha$ -ヘリックスが  $\beta$ -シートに変化することが知られている (図 1)。そこで、この 2 つの  $\alpha$ -ヘリックスに様々な変異を導入することによってそのオリゴマー化への影響を検討した。また、ドメイン 3 が細胞膜リン脂質と相互作用することを想定して、ドメイン 3 内の塩基性アミノ酸を変異させた変異体の溶血活性についても検討した。

(3) 新規ショウジョウバエ C 型レクチンの発現とその性質の解明

CEL-I 及び CEL-IV 以外の C 型レクチンとして、新たにショウジョウバエの新規 C 型レクチンの発現を行い、その性質を検討した。このレクチンの C 末端領域には疎水性領域が存在しており、何らかの細胞膜レセプターとして機能している可能性が高く、そのためタンパク質の発現精製が困難である可能性があったため C 末端領域を除去した組換え体を作製し、大腸菌による発現を行った。

(4) 糖鎖付加 dendrimer を用いた新規レクチン活性測定法の開発

レクチンの活性を評価するにあたって、通常よく用いられている赤血球凝集活性は、比較的感度が低く定量性に乏しいこと、また種々の糖結合特異性を有するレクチンへの適応が難しいことなどから、人工的に糖鎖を付加した水溶性ポリマーとレクチンとの凝集反応を光散乱法を用いて測定する技術の開発を行った。水溶性ポリマーとしては特に末端にアミノ基を有するポリアミドアミン (PAMAM) dendrimer (図 2) が良好な結果を与えたことから、第 4 世代の PAMAM dendrimer (末端アミノ基数 64) に種々の糖を還元的アミノ化反応で結合させた糖鎖付

加 PAMAM dendrimer を用いてレクチンとの凝集反応を動的散乱法により測定した。

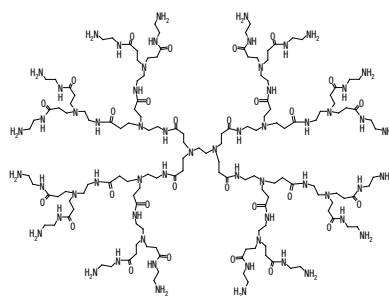


図 2 アミノ基含有 PAMAM dendrimer (第 2 世代)

4. 研究成果

CEL-I について種々の部位特異的変異体を作製し、その糖結合能を検討した結果、Arg115 による 2 つの水素結合ならびに Gln70 とのファンデルワールス相互作用がこのレクチンが示す GalNAc に対する非常に高い特異性の原因となっていることが明らかになった。さらに、糖特異性に重要な寄与をしていると考えられる糖結合部位の QPD (Gln-Pro-Asp) 配列モチーフを EPN (Glu-Pro-Asn) 配列に変換した CEL-I 変異体を作製し、その糖特異性を検討した結果、ガラクトース特異性が著しく低下し、そのかわりにマンノースに対する特異性が大きく上昇していることが明らかになった。このことから、CEL-I において QPD 配列はガラクトース特異性を規定する重要な配列であり、このような一部の配列を変更するだけで、糖特異性を大きく変換した人工レクチンを作製することが可能であることが明らかになった。

一方、CEL-IV は 4 つの糖認識サブユニットから成り、その糖結合部位には通常マンノース認識に用いられる EPN 配列モチーフを有するが、実際にはガラクトースを認識することから、その糖認識メカニズムについて検討を行った。CEL-IV 及びその糖 (メリビオース、ラフィノーズ) 複合体の結晶を作製し、X 線回折測定を行ったところ、CEL-IV の回折データが得られたことから、CEL-I の座標データを用いて分子置換法によりこれらの構造を解析したところ、最高で 1.8 Å の分解能で構造を決定することができた。

CEL-IV の 4 つのサブユニットは複数のジスルフィド結合で結ばれているが、その接触面は、通常の C 型レクチンにない挿入ペプチド配列が相互作用することによって四次構造が保たれていることがわかった。また、糖結合部位においては、他の C 型レクチンと 180°異なる配向で糖が結合しており、さらにこれをトリプトファン残基 (Trp79) が安定化することによって、EPN 配列をもちながらガ

ラクトースを認識していることが明らかになった(図3)。一方、このEPN配列を、ガラクトース認識モチーフであるQPD配列に変換した部位特異的変異体を作製し、その糖結合特異性を等温滴定熱量計を用いて検討したところ、この変異体はガラクトースに対する親和性が低下しており、それに代わって弱いながらマンノースに対する親和性を示すことが明らかになった。これらの結果から、CEL-IVにおいては、通常のC型レクチンと180°異なる配向で糖を認識しているために、EPNとQPD配列の影響が逆転していることが示唆された。

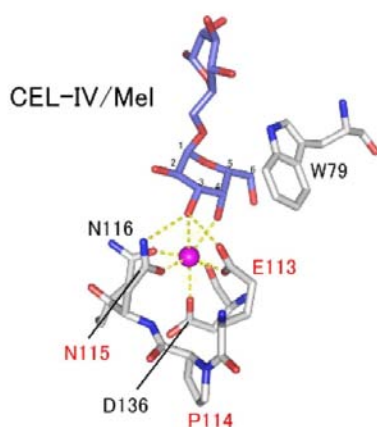


図3 CEL-IVとメリビオースとの結合様式

ゲノム情報をもとに、ヒトの免疫系細胞である樹状細胞表面レセプターBDCA-2の大腸菌による発現を行った結果、得られたタンパク質は非常に会合性が強く、そのままでは可溶性で得ることが困難だったが、C末端の疎水性領域を削除した変異体は可溶性がある程度上昇することがわかった。またショウジョウバエの新規C型レクチン(Dmel\_CG9976)についても、同様にC末端に疎水性領域が存在することからそれを削除して発現したところ、可溶性として得ることができ、さらにマンノースに対する結合特異性を示すことが明らかになった。

糖鎖付加 dendroimer を用いたレクチン活性測定法の開発においては、主に CEL-IV をモデルレクチンとして用い、メリビオースを付加した PAMAM dendroimer (Mel-PAMAM-dendrimer) との結合活性を動的散乱によって測定した。図4に示すように、CEL-IV は dendroimer と結合することにより凝集体を形成し、高感度に結合活性を測定することが可能であった。さらに種々の阻害糖を加えることにより、それぞれの特異性に応じた阻害が認められたことから、高感度にレクチンの糖結合性を測定することが可能であることが明らかになった。

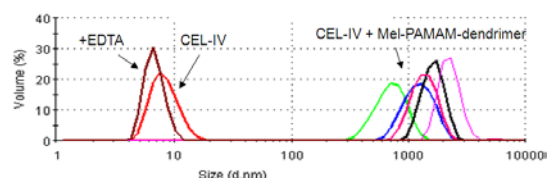


図4 動的散乱によって測定したCEL-IV/Melibiose-PAMAM dendroimerの凝集体形成

## 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9件)

- ① Tomomitsu Hatakeyama, Takuro Kamiya, Masami Kusunoki, Sachiko Nakamura-Tsuruta, Jun Hirabayashi, Shuichiro Goda, and Hideaki Unno, Galactose recognition by a tetrameric C-type lectin, CEL-IV, containing the EPN carbohydrate-recognition motif, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (12), 10305-10315, 2011, 査読有
- ② Zedong Jiang, Daekyung Kim, Yasuhiro Yamasaki, Tomohiro Yamanishi, Tomomitsu Hatakeyama, Kenichi Yamaguchi, and Tatsuya Oda, Mitogenic activity of CEL-I, an N-acetylgalactosamine (GalNAc)-specific C-type lectin, isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* (Holothuroidea), *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74 (8), 1613-1616, 2010, 査読有
- ③ Tomohiro Yamanishi, Tomomitsu Hatakeyama, Kenichi Yamaguchi, and Tatsuya Oda, CEL-I, an N-Acetylgalactosamine (GalNAc)-Specific C-Type Lectin, Induces nitric oxide production in RAW264.7 mouse macrophage cell line, *Journal of Biochemistry*, 146 (2), 209-217, 2009, 査読有
- ④ Keigo Hisamatsu, Hideaki Unno, Shuichiro Goda, and Tomomitsu Hatakeyama, Effects of  $Ca^{2+}$  on Refolding of the Recombinant Hemolytic Lectin CEL-III, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73 (5), 1203-1205, 2009, 査読有
- ⑤ Keigo Hisamatsu, Hideaki Unno, Shuichiro Goda and Tomomitsu Hatakeyama, Roles of the valine clusters in domain 3 of the hemolytic lectin CEL-III in its oligomerization and hemolytic abilities, *Protein and Peptide Letters*, 16 (4), 411-414, 2009, 査読有

- ⑥ Keigo Hisamatsu, Nobuaki Tsuda, Shuichiro Goda and Tomomitsu Hatakeyama, Characterization of the  $\alpha$ -helix region in domain 3 of the hemolytic lectin CEL-III: Implications for self-oligomerization and hemolytic processes, *Journal of Biochemistry*, 143 (1), 79-86, 2008, 査読有
- [学会発表] (計 22 件)
- ① 松原 悠太, 久松 啓伍, 海野 英昭, 畠山 智充, 郷田 秀一郎, 超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来 PH0233 産物の遺伝子組換え発現系の構築と可溶化条件の検討, *BMB2010* (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸市, 2010, 12.7-10
- ② 池田 光司, 福田 泰信, 真方山 慶佑, 海野 英昭, 畠山 智充, 郷田 秀一郎, 超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来 ST1670 産物の遺伝子組換え発現系の構築と可溶化条件の検討, *BMB2010* (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸市, 2010, 12.7-10
- ③ 栗浦 良, 海野 英昭, 畠山 智充, 郷田 秀一郎, 超好熱アーキア由来糖結合タンパク質の探索, *BMB2010* (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸市, 2010, 12.7-10
- ④ Zedong Jiang, 畠山 智充, 山口 健一, 小田 達也, 海洋性棘皮動物グミ由来 GalNAc 特異的レクチン, CEL-I のマイトジェニック活性, *BMB2010* (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸市, 2010, 12.7-10
- ⑤ 海野 英昭, 堅谷 勇樹, 郷田 秀一郎, 畠山 智充, *Cucumaria echinata* 由来溶血性レクチン CEL-III 膜孔形成複合体の結晶化, *BMB2010* (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸市, 2010, 12.7-10
- ⑥ 畠山智充, 神矢拓朗, 平林 淳, 郷田秀一郎, 海野英昭, C 型レクチン CEL-IV の糖結合部位 EPN 配列と糖鎖認識機構, 日本農芸化学会西日本支部大会, 熊本市, 2010, 9.18
- ⑦ 郷田 秀一郎, 長尾 知直, 貞方 仁, 久松 啓伍, 終 弓絃, 畠山 智充, 溶血性レクチンの多量体化における構造変化の X 線小角散乱による解析, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌市, 2010, 6.16-18
- ⑧ 久松啓伍, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, 海産無脊椎動物レクチン CEL-III の溶血活性発現に関するアミノ酸残基の同定, 第 10 回日本蛋白質科学会年会, 札幌市, 2010, 6.16-18
- ⑨ 狩野良太, 寺井康了, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, 種々の糖鎖を付加したデンドリマーとレクチンとの凝集体形成反応, 日本生化学会九州支部例会, 鹿児島市, 2010, 5.23
- ⑩ 本多麻美, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, C 型レクチン CEL-IV の部位特異的変異体と特異的糖との相互作用解析, 日本生化学会九州支部例会, 鹿児島市, 2010, 5.23
- ⑪ 馬場智大, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, 糖結合部位アミノ酸の置換による C 型レクチン CEL-I の糖結合特異性の変換, 日本生化学会九州支部例会, 鹿児島市, 2010, 5.23
- ⑫ 畠山智充, 寺井康了, 田中亜由美, 海野英昭, 郷田秀一郎, 志波公平, 糖鎖付加ポリマーを用いたレクチン-糖鎖間相互作用解析, 日本農芸化学会西日本支部合同大会およびシンポジウム, 2009, 10.30-31
- ⑬ 畠山智充, 寺井康了, 田中亜由美, 海野英昭, 郷田秀一郎, 志波公平, 糖鎖含有デンドリマーと動的光散乱法を用いたレクチン-糖鎖間相互作用解析, 第 82 回日本生化学会大会, 神戸市, 2009, 10.21-24
- ⑭ 寺井 康了, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, 光散乱法を用いたレクチン/糖含有ポリマー間相互作用の解析, 第 33 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, 唐津市, 2009, 9.10-12
- ⑮ 郷田秀一郎, 貞方 仁, 久松啓伍, 終 弓絃, 畠山智充, 海産無脊椎動物グミ由来溶血性レクチン CEL-III の X 線小角散乱による多量体構造及び形成機構の解析, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本市, 2009, 5.20-22
- ⑯ 久松啓伍, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充 (長崎大・工・応化), 溶血性レクチン CEL-III の自己会合ドメイン中のアミノ酸残基の役割, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本市, 2009, 5.20-22
- ⑰ 佐知望美, 林雅臣, 吉元みなみ, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, 樹状細胞表面受容体 BDCA-2 の C 型レクチンドメインの大腸菌による発現, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡市, 2009, 3.27-29
- ⑱ 郷田秀一郎, 貞方 仁, 久松啓伍, 終 弓絃, 畠山智充, 海産無脊椎動物グミ由来溶血性レクチン CEL-III 会合体の X 線小角散乱による構造解析, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 福岡市, 2009, 3.27-29
- ⑲ 畠山智充, 田中亜由美, 貞方 仁, 石丸 絵理, 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 志波 公平, 光散乱法によるレクチン-糖鎖間相互

作用解析, 平成 20 年度日本農芸化学会  
西日本支部大会, 長崎市, 2008, 9.20

- ⑩ 久松啓伍, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, 溶血性レクチン CEL-III 会合ドメインの部位特異的変異体作製とその性質, 平成 21 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 長崎市, 2008, 9.20
- ⑪ 松本尚樹, 貞方 仁, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, グミ由来 CEL-III 膜貫通型複合体の X 線結晶構造解析, 平成 22 年度日本農芸化学会西日本支部大会, 長崎市, 2008, 9.20
- ⑫ 畠山智充, 石井啓介, 神矢拓朗, 郷田秀一郎, 海野英昭,  $\alpha$ -ガラクトシド特異的 C 型レクチン CEL-IV と糖との相互作用解析, 日本生化学会九州支部例会, 福岡市, 2008, 5.18

[図書] (計 2 件)

- ① 畠山智充, はじめて学ぶ生命科学の基礎 (畠山智充, 小田達也編著), 195 ページ, 化学同人, 2010
- ② Tomomitsu Hatakeyama Hemolytic Lectin in Marine Invertebrates, Animal Lectins (G.R. Vasta and H. Ahmed, eds.), pp. 517-529, CRC Press, 2008

[その他]

ホームページ等

<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/>

<http://www.ch.nagasaki-u.ac.jp/bio/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

畠山 智充 (HATAKEYAMA TOMOMITSU)

長崎大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：50228467

### (2)研究分担者

海野 英昭 (UNNO HIDEAKI)

長崎大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10452872