

機関番号：82111  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20580373  
 研究課題名(和文) 特異的な糖結合活性を持つR型レクチンの糖鎖結合メカニズムの構造生物学的解析  
 研究課題名(英文) Structural biological studies on the sugar-binding mechanism of R-type lectin having a specific sugar-binding activity  
 研究代表者  
 逸見 光 (HEMMI HIKARU)  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所  
 食品分析研究領域・主任研究員  
 研究者番号：70353993

研究成果の概要(和文)：特異的な糖結合活性を持つミミズ由来R型レクチンC末端ドメイン(EW29Ch)の糖鎖結合メカニズムを核磁気共鳴法により解析した結果、EW29Chの分子内に存在する2つの糖結合部位( $\alpha$ 及び $\gamma$ 結合部位)において、 $\alpha$ 結合部位の糖結合活性が $\gamma$ 結合部位に比べ約100倍高いこと、さらに、溶液中での立体構造及び分子内運動性の解析結果より、遅い分子内運動性(マイクロ秒～ミリ秒)の違いが、その糖結合活性の違いに関係していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the sugar-binding mechanism of the C-terminal domain of R-type lectin from earthworm (EW29Ch) having a specific sugar-binding activity by nuclear magnetic resonance (NMR) methods. The results showed that the sugar-binding activity of the  $\alpha$  binding site in EW29Ch was about 100-fold higher than that of the  $\gamma$  binding site in EW29Ch. Further, the NMR structure analysis and relaxation experiments for EW29Ch suggested that the difference of the sugar-binding activity between the two sugar-binding sites in EW29Ch may be related with the difference of the slow internal motion between those two sugar-binding sites in EW29Ch.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究代表者の専門分野：構造生物学

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：蛋白質、糖鎖、NMR、レクチン、糖認識ドメイン

#### 1. 研究開始当初の背景

レクチン(糖結合タンパク質)及びレクチン様タンパク質は、糖認識ドメインと呼ばれるドメイン構造を持つことが知られている。この糖認識ドメインの構造を基にした分類において、ricin-like またはR型レクチンファミリーと呼ばれるグループがあり、バクテ

リアから真核生物(ヒト)までの幅広い生物種で存在する唯一のファミリーである。このグループの糖認識ドメインの構造の特徴は、3つのサブドメインからなる $\beta$ -trefoilと呼ばれる構造を持つことである。しかしながら、このグループに含まれる糖結合タンパク質は $\beta$ -trefoilという特徴的な糖認識ド

インを共通で持つにもかかわらず、そのリガンド結合特性は様々であり、しかもその機能は多岐に渡ることが知られている。それらのメカニズムについては、未だ詳細に解明されていない。その解明の一環として、機能の異なる2種類のR型レクチンファミリーに属するタンパク質、*Streptomyces olivaceoviridis* E-86 より得られた family 10 に属するキシラナーゼ中のキシラン結合ドメイン (XBD) とミミズ (*Lumbricus terrestris*) から得られた血球凝集能を持つレクチンのC末端ドメイン (EW29Ch)、の糖鎖結合メカニズムの解析を核磁気共鳴 (NMR) 法により行ってきた。その結果、EW29Ch の2つの糖結合部位 ( $\alpha$ 、 $\gamma$ ) のうち、 $\alpha$  結合部位が糖に対して強い結合活性を持ち、 $\gamma$  結合部位や XBD のキシラン結合部位と比較して糖との結合様式が大きく異なること示唆された。従って、R型レクチンファミリーの幅広い生物種における多岐の機能の解明のため、この特異的な糖結合活性を持つ EW29Ch の  $\alpha$  結合部位の糖鎖結合メカニズムを、NMR を用いた糖鎖-タンパク質複合体の立体構造解析等により原子レベルで解析する必要がある。

## 2. 研究の目的

これまで行ってきた2つの機能の異なるR型レクチンのNMR法による糖結合活性測定の結果から、血球凝集能を持つミミズ由来レクチンのC末端ドメイン (EW29Ch) 中に存在する2つの糖結合部位の内の1つが他のR型レクチンの糖結合部位と比較して特異的な糖結合活性をもつことが明らかになった。しかしながら、その特異的な糖鎖結合メカニズムについては十分な情報を得ることができていない。そこで、本研究では、NMRを用いて、特異的な糖結合活性を持つR型レクチンEW29Chの糖結合状態及び遊離状態での溶液中での立体構造解析及びその構造比較、さらに、リガンド結合において重要な分子内運動性の解析を行うことにより、その糖鎖結合メカニズムを解析し、R型レクチンファミリーの幅広い機能を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

過去の各種糖とEW29Ch及びXBDのNMR滴定実験から、EW29Ch内の $\gamma$ 糖結合部位及びXBD内の3つの糖結合部位について速い化学交換を持つが、EW29Ch内の $\alpha$ 結合部位においては遅い化学交換を示したことから、通常のNMR滴定実験法を改良して、速い交換速度を示す糖に対する結合能 ( $K_d$ ) だけでなく、遅い化学交換を示す糖に対する  $K_d$  を同時に算出した。

次に、ラクトースとEW29Chの複合体結

晶構造についてはすでに報告されているが、遊離状態でのEW29Chの立体構造はまだ報告されていないこと、また、2つの糖結合部位において糖結合能に違いが見られるにも関わらず、その結晶構造において $\alpha$ 糖結合部位と $\gamma$ 糖結合部位それぞれのラクトースとの相互作用についてほとんど違いが見られないことから、本研究において、NMRを用いて、遊離状態及び糖結合状態それぞれの状態における溶液中での立体構造の解析を行った。 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  または、 $^{15}\text{N}$  のみでラベルしたEW29Chを、多核多次元NMR法で測定し、常法によりNMRシグナルを帰属し、構造計算プログラムであるCNSを用いて溶液中での立体構造を決定した。さらに、より精密な構造を決定するため、残余双極子カップリングの情報も用いて最終構造を決定した。また、リガンドとの結合において重要であるタンパク質の分子内運動性について、 $^{15}\text{N}$  緩和測定法 ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  異種核間NOE) により解析した。

## 4. 研究成果

R型レクチンファミリーの糖鎖認識メカニズム解明のために、EW29Ch中に存在する2つの糖結合部位それぞれの糖結合活性をNMR滴定実験法により測定した。その結果、EW29Ch中の2つの糖結合部位 ( $\alpha$ 糖結合部位と $\gamma$ 糖結合部位) は、それぞれラクトースとの結合において異なる化学交換速度 ( $\alpha$ 糖結合部位は遅い交換、 $\gamma$ 糖結合部位は速い交換) を持つことがわかった (図1)。

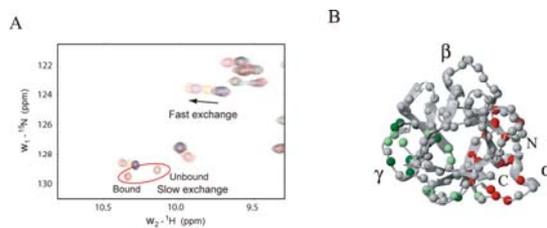


図1 (A) EW29Chにラクトースを添加した時のNMR滴定実験におけるHSQCスペクトルの変化。(B)すでに報告されているEW29Chの結晶構造 (PDB:2ZQN) に、今回NMR滴定実験でシグナルが変化した残基をマッピングした構造の図。赤は、遅い交換、緑は速い交換が見られた残基を示す。

結晶構造解析では、糖との相互作用において2つの糖結合部位でほとんど差が見られなかったが、今回のNMR滴定実験では2つの糖結合部位において化学交換速度に大きな違いが認められた。速い化学交換を示す $\gamma$ 糖結合部位の糖結合活性については、通常のNMR滴定実験法により解離定数 ( $= 1 / \text{結合定数}$ ) を求めた。一方、遅い化学交換を示す $\alpha$

糖結合部位については通常の NMR 滴定実験法では糖結合活性を算出することは難しかった。そこで、タンパク質濃度を常法に比べ非常に低くして測定を行ったが、低濃度でのシグナル強度低下によって解離定数を求める式へのフィッティングが良くなかったことから、その式から得られる解離定数の理論曲線を用いることにより  $\alpha$  糖結合部位の解離定数を算出した(図2)。その結果、2つの糖結合部位においてラクトースに対する糖結合活性が約 100 倍違うことがわかった(表1)。(雑誌論文②にて報告)

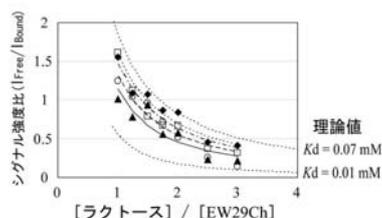


図2 今回改良した NMR 滴定実験法による EW29Ch の  $\alpha$  糖結合部位とラクトースとの  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC スペクトル解析の結果。ラクトース添加に伴う  $\alpha$  糖結合部位中の各残基の遊離状態と結合状態との NMR シグナル強度比の変化と  $K_d = 0.01\text{mM}$  または  $K_d = 0.07\text{mM}$  とした場合の解離定数を求める式から得られた理論曲線。

表1 NMR 滴定実験法により算出した  $\alpha$  糖結合部位及び  $\gamma$  糖結合部位の各種糖に対する解離定数 ( $K_d$ )。

糖	$K_d$ (mM)	
	$\alpha$ 糖結合部位	$\gamma$ 糖結合部位
ラクトース	0.01-0.07	$2.66 \pm 0.30$
ガラクトース	$\sim 10^{-1}$	$3.89 \pm 0.37$
メチル $\beta$ -D-ガラクトピラノシド	0.02-0.08	$2.88 \pm 0.21$

次に、多核多次元 NMR 法及び構造計算プログラムにより、遊離状態における EW29Ch の立体構造を決定した。その結果、R 型レクチンファミリーの構造的特徴である 3つのサブドメインからなる  $\beta$ -trefoil 構造の形成を認めたが、ラクトースとの複合体である EW29Ch の X 線結晶構造との比較で、一部のループ領域や糖結合に関係する残基において遊離状態と結合状態では構造に違いが見られた。この結果を受け、現在ラクトースと EW29Ch の溶液中での複合体立体構造を、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ラベル体 EW29Ch と非ラベル体ラクトースとの混合サンプル及び非ラベル体 EW29Ch と  $^{13}\text{C}$  ラベル体ラクトースとの混合サ

ンプルを用いて多核多次元 NMR 法により測定を行い、溶液中での EW29Ch-ラクトース複合体の立体構造を解析している。これまで、糖との結合活性の高い  $\alpha$  糖結合部位については、ほぼ複合体の立体構造が決定されたが、糖との結合活性が低い  $\gamma$  糖結合部位については、ラクトース間の NOE シグナルが十分に観測されておらず、現在最適な測定条件を確立中である。

遊離状態及びラクトース結合状態におけるそれぞれの分子内運動性を解析するために、 $^{15}\text{N}$  核の緩和測定を行った。その結果、 $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  異種核間 NOE 及び  $T_1$  のデータにおいて、遊離状態及びラクトース結合状態で大きな違いが見られなかった。また、RCI (Random Coil Index) (Berjanskii and Wishart (2005) JACS, 127, 14970-14971) から予測されたオーダーパラメーターの比較においても大きな違いが見られなかった。一方、 $T_2$  においては、結合部位、特に  $\alpha$  結合部位において、違いが見られた。これらの結果より、遊離状態とラクトース結合状態間での分子内運動性の違いは、 $R_{ex}$  (化学交換の速度定数) によるものと推測される。以上の結果は、R 型レクチンの糖結合メカニズムに関しては初めての知見であり、現在論文作成中である。

以上、同じファミリーに属し機能の異なる糖結合タンパク質について、各糖鎖結合部位についての糖鎖結合メカニズムの違いを系統的に行った研究は、本グループ以外にもカナダの British Columbia のグループやイギリスの Newcastle のグループ等、複数の研究グループが精力的に行っているが、本研究で扱うような同じ分子内で大きく結合様式の異なる糖結合タンパク質の糖鎖結合メカニズムに関する研究はほとんど皆無である。従って、今回の我々の研究結果は、国際的国内的に大変重要な知見である。今後、さらに、溶液中での糖との複合体構造解析や遅い運動性についての NMR による定量的解析を進め、R 型レクチンファミリーの幅広い機能の解明について今後とも研究を進める予定である。

## 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 逸見 光, 核磁気共鳴 (NMR) 法を用いた立体構造解析及び分子間相互作用解析による有用タンパク質の機能解明、食糧、査読無、49 巻、2011、67-84
- ② Hikaru Hemmi, Atsushi Kuno, Shigeyasu Ito, Ryuichiro Suzuki, Tsunemi Hasegawa, Jun Hirabayashi, NMR studies

on the interaction of sugars with C-terminal domain of an R-type lectin from the earthworm *Lumbricus terrestris*, FEBS Journal、査読有、Vol. 276、2009、2095-2105

[学会発表] (計6件)

- ① 逸見 光、久野 敦、海野幸子、平林 淳、NMR structure and dynamics of C-terminal domain of R-type lectin from earthworm in the lactose-binding state、24<sup>th</sup> International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems、2010年8月25日、Cairns Convention Centre (オーストラリア)
- ② 逸見 光、久野 敦、海野幸子、平林 淳、ミミズ由来R型レクチンC末端ドメインのラクトースとの結合状態でのNMR構造、第49回NMR討論会、2010年11月17日、タワーホール船堀 (東京)
- ③ 逸見 光、久野 敦、海野幸子、平林 淳、NMR studies for the binding of lactose with C-terminal domain of an R-type lectin from the earthworm、The 3<sup>rd</sup> Asia-Pacific NMR Symposium、2009年10月26日、Ramada Plaza Jeju Hotel (韓国)
- ④ 逸見 光、久野 敦、海野幸子、平林 淳、ミミズ由来R型レクチンC末端ドメインと糖との結合様式に関するNMR解析、第48回NMR討論会、2009年11月10日、九州大学馬出病院キャンパス医学部百年講堂 (福岡)
- ⑤ 逸見 光、久野 敦、伊藤茂泰、鈴木龍一郎、長谷川典巳、平林 淳、NMR structure of C-terminal domain of R-type lectin from earthworm in the sugar-free state and its interaction with sugars、23<sup>rd</sup> International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems、2008年8月25日、Sheraton San Diego Hotel & Marina (アメリカ合衆国)
- ⑥ 逸見 光、久野 敦、海野幸子、平林 淳、NMRによるミミズ由来R型レクチンC末端ドメインの特異的な糖結合活性に関する研究、第47回NMR討論会、2008年11月14日、筑波大学 大学会館講堂

[その他]

逸見 光、NMRによるR型レクチンC末端ドメイン糖結合部位の結合活性測定、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所平成21年度食品試験研究成果情報

(<http://nfri.naro.affrc.go.jp/research/seika/seika21/index.html>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

逸見 光 (HEMMI HIKARU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所食品分析研究領域・主任研究員

研究者番号：70353993

### (2) 研究分担者

久野 敦 (KUNO ATSUSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医学研究センター・主任研究員

研究者番号：50302287