

平成22年4月12日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770088

研究課題名 (和文) 海産無脊椎動物グミ由来溶血性レクチンの膜孔形成複合体構造解析

研究課題名 (英文) Structural analysis of pore forming CEL-III complex.

研究代表者

海野 英昭 (UNNO HIDEAKI)

長崎大学・工学部・助教

研究者番号：10452872

研究成果の概要 (和文)：

海産無脊椎動物グミ (*Cucumaria echinata*) 由来溶血性レクチン CEL-III 膜孔形成複合体の構造解析を行うため、CEL-III 膜孔形成複合体の結晶化条件の検討を行い、板状結晶を得る事に成功した。放射光測定の結果、本結晶から分解能約 7 Å の回折データを得た。更なる分解能の向上を行うため、各種界面活性剤を用いた結晶化条件の検討の結果、新規の結晶化条件を得る事に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

For structural analysis of pore forming CEL-III complex, we tried to crystallize the complex and succeeded to make it plate-like crystal. Diffraction data from the complex crystal were collected by using synchrotron radiation in which the highest resolution leached to seven angstroms. Further trial of the crystallization using several kinds of detergent lead to obtain new crystals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：CEL-III, 結晶構造解析, PFT

1. 研究開始当初の背景

膜孔を形成する毒素 (PFT) は多くの病原菌が有し、PFT による膜孔形成はその病原性および毒性発現に極めて重要な役割を担っている。これまでに炭疽菌および黄色ブドウ

球菌をはじめ、多くの病原性微生物の膜孔形成蛋白質の構造・機能解析が進められ、いくつかの PFT については、膜孔形成前の状態である水溶性モノマー構造が X 線結晶構造解析により明らかとなっているが、PFT のモノ

マー構造から膜孔形成へと至るメカニズムの詳細は未だ不明であるのが現状である。

PFT の一種であるグミ由来溶血性レクチン CEL-III に関しては、我々のグループがモノマーおよび糖結合モノマー構造解析を報告している。これまでの我々による CEL-III に関する構造および機能解析の知見から、CEL-III が細胞膜表面の特定の糖鎖を認識、結合する事で6-7量体の膜孔形成複合体へと構造変化し溶血活性を発現するモデルを提唱している(図1)、その構造変化メカニズムの詳細は未だ明らかではない。

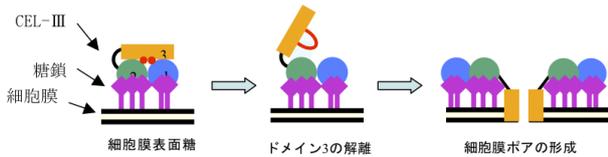


図1. CEL-IIIの膜孔形成モデル

2. 研究の目的

病原菌の多くはターゲットとする細胞膜に穴をあける、もしくは毒素を細胞内に送り込むための膜孔形成毒素(Pore-Forming Toxin:PFT)を有している。PFTによる膜孔形成メカニズムは病原菌の感染および毒性発現に決定的に重要であるが、未だ原子レベルでのメカニズムは明らかでない。本研究は、海産無脊椎動物グミ(*C. echinata*)由来PFTである溶血性レクチン CEL-IIIの膜孔形成複合体のX線結晶構造解析により、病原性および毒性発現に極めて重要なPFTの膜孔形成メカニズムを原子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は膜孔形成毒素(PFT)の膜孔形成メカニズム解明のため、海産無脊椎動物グミ由来溶血性レクチン CEL-IIIの膜孔形成複合体のX線結晶構造解析を行うものである。構造解析のためにグミ個体から蛋白抽出後、(1)アフィニティカラムクロマトグラフィーを用いた精製、(2)膜孔複合体化、(3)結晶化条件の検索・最適化、(4)X線回折データ処理、(5)結晶化に適した界面活性剤を用いた結晶化条件の検索・最適化、と進めた。以下に具体的内容を記す。

(1)アフィニティカラムクロマトグラフィーを用いた精製

①グミを破砕後、上清をRaffinoseカラムに通しスルー画分を回収する。②回収分

をLactosylカラムに通しCEL-IIIをカラムに結合させ、その後EDTA溶液を用い溶出させる。③その溶出画分を透析後、GalNAcカラムに通しCEL-IIIをカラムに結合させる。その後EDTA溶液を用いてCEL-IIIを溶出させる。④溶出画分をゲル濾過クロマトグラフィーにてモノマー画分を採取・濃縮し、精製度95%以上の水溶性CEL-IIIモノマーを得る。

(2) 膜孔複合体化

①界面活性剤を含んだ高塩濃度高pHバッファー溶液を用い、膜孔形成複合体構造を形成させる。②ゲル濾過精製を行い純度を向上させ、限外濾過により濃縮し5mg/ml濃度のCEL-III複合体蛋白質溶液を調製する。

(3) 結晶化条件の検索・最適化

得られたCEL-III複合体蛋白質溶液を用い、結晶化スクリーニングおよび結晶化条件の最適化を行う。

(4) X線回折データ処理

得られた結晶を用いて放射光測定を行い、X線回折データ収集およびデータ処理を行う。

(5) 結晶化に適した界面活性剤を用いた結晶化条件の検索・最適化

結晶化に適していると考えられる各種界面活性剤を用いてCEL-III複合体の調製・結晶化および結晶化条件の最適化を行い、(4)で得られた回折データから分解能の向上を目指す。

4. 研究成果

(1) 結晶化条件の検索・最適化

CEL-IIIの膜孔型複合体の形成後、各種条件での結晶化スクリーニングを試みた。その結果、複数の結晶化条件で針状の蛋白質結晶を確認する事に成功した。針状結晶の得られた結晶化条件をベースとして、沈殿剤濃度、結晶化温度、クライオプトテクタンの種類と濃度、および界面活性剤の種類の検討を行った結果、改良した結晶化条件において、より大きな板状結晶を得る事に成功した(図2)。



図2. CEL-III膜孔形成複合体結晶

(2) X線回折データ処理

得られた板状結晶を高エネルギー加速器研究機構にてX線回折測定を行い、分解能約7Åにてデータ収集に成功した(図3)。観測された回折点の最高分解能は4.5Åであった(図4)。空間群はC2, 格子定数はa:251.816, b:169.854, c:144.844, $\alpha = \gamma : 90.000$, $\beta : 117.042$ であった。溶媒含有率の計算から、非対称単位中にCEL-IIIオリゴマーが6-7量体として、一複合体が存在していると推測された。

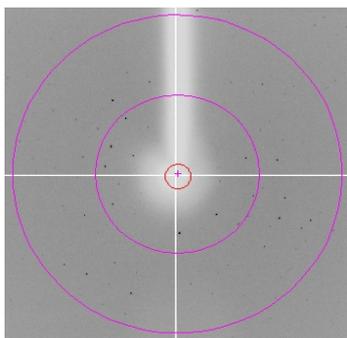


図3. X線回折像(低角部分)

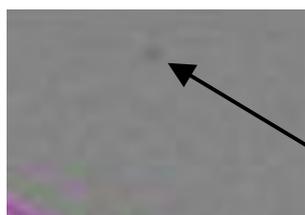


図4. 回折像の拡大図
回折点の最大分解能は4.5Å

(3) 結晶化に適した界面活性剤を用いた結晶化条件の検索・最適化

分解能の向上を行うため、各種界面活性剤を用いた結晶化を行った結果、結晶化に適した界面活性剤使用下での、新規の結晶化条件下での結晶を得る事に成功した。

膜蛋白質は一般的に大量発現および精製が難しく、本プロジェクトの2年間に結晶化および界面活性剤の検討に成功した事は特筆に値する事項である。報告例が非常に少ない膜蛋白質の結晶構造解析研究を進める上で、これは大きな前進であると考えている。

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8件)

①Shu Jie Li, Qing Zhao, Qiangjun Zhou,

Hideaki Unno, Yujia Zhai, Fei Sun, The role and structure of the carboxyl-terminal domain of the human voltage-gated proton channel Hv1. *J. Biol. Chem.*, (2010), *In press*, (査読有り)。

②Nori-hisa Yasui, Emiko Mihara, Maiko Nampo, Keiko Tamura-Kawakami, Hideaki Unno, Kyoichi Matsumoto, Junichi Takagi, Detection of endogenous LRP6 expressed on human cells by monoclonal antibodies specific for the native conformation, *Journal of Immunological Methods*, **352**, 153-160, (2010), (査読有り)。

③Tetsuo Yamashita, Yoshio Moria, Naoyuki Miyazaki, R. Holland Cheng, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Ryoichi Shima, Kohji Moriishi, Tomitake Tsukihara, Tian Cheng Li, Naokazu Takeda, Tatsuo Miyamura and Yoshiharu Matsuura, Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**(31), 12986-12991, (2009), (査読有り)。

④ Keigo Hisamatsu, Hideaki Unno, Shuichiro Goda and Tomomitsu Hatakeyama, Effects of Ca^{2+} on Refolding of the Recombinant Hemolytic Lectin CEL-III in its Oligomerization and Hemolytic Abilities., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**(5), 1203-1205, (2009), (査読有り)。

⑤Hideaki Unno, Satoshi Yamashita, Yosuke Ikeda, Shin-ya Sekiguchi, Norie Yoshida, Toru Yoshimura, Masami Kusunoki, Toru Nakayama, Tokuzo Nishino, and Hisashi Hemmi, New Role of Flavin as a General Acid-Base Catalyst with No Redox Function in Type 2 Isopentenyl Diphosphate Isomerase, *J. Biol. Chem.*, **284**(14), 9160-9167, (2009), (査読有り)。

⑥ 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 Pept. Lett.*, **16**(4) 411-414. (2009), (査読有り)。

⑦Hideaki Unno, Tetsuo Yamashita, Sayuri Ujita, Nobuaki Okumura, Hiroto Otani, Akiko Okumura, Katsuya Nagai, and Masami

Kusunoki, Structural basis for substrate recognition and hydrolysis by mouse carnosinase CN2., *J. Biol. Chem.*, **283**(40), 27289-27299, (2008), (査読有り).

⑧Tetsuo Yamashita, Hideaki Unno, Yoshio Mori, Hideki Tani, Kohji Moriishi, Akihisa Takamizawa, Masanobu Agoh, Tomitake Tsukihara and Yoshiharu Matsuura, Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å., *Virology*, **373**(2), 426-436, (2008), (査読有り).

[学会発表] (計10件)

①寺井 康了, 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, 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2009年9月10日~9月12日, 佐賀.

②久松啓伍, 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, 2009年5月20日~22日, 熊本.

③邊見 久, タイプ2イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの反応機構: 一般酸塩基触媒としてのフラビンの機能, 日本農芸化学会2009年度大会, 2009年3月29日, 福岡.

④佐知望美, 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, 2009年3月28日, 福岡.

⑤畠山智充, 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, 2008年9月19日~20日, 長崎.

⑥久松啓伍, 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20年度日本農芸化学会西日本支部大会, 2008年9月19日~20日, 長崎.

⑦松本尚樹, グミ由来 CEL-III膜貫通型複合体の X 線結晶構造解析, 平成20年度日本農芸化学会西日本支部大会, 2008年9月19日~20日, 長崎.

⑧畠山智充, α -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, 日本生化学会大会九州支部例会, 2008年5

月17日~18日, 福岡.

⑨Hideaki Unno, Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis., Americal Crystallographic Association Meeting, 2008年6月3日, アメリカ.

⑩海野英昭, アントシアニンマロニルトランスフェラーゼの X 線結晶構造解析, 日本生化学会九州支部例会, 2008年5月17日, 福岡.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
海野 英昭 (UNNO HIDEAKI)
研究者番号: 10452872

(2) 研究分担者 ()
研究者番号:

(3) 連携研究者 ()
研究者番号: