

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780077

研究課題名 (和文) 孔形成タンパク質の超分子構造解析

研究課題名 (英文) Supramolecular structural analysis of the pore forming protein

研究代表者

郷田 秀一郎 (GODA SHUICHIRO)

長崎大学・工学部・准教授

研究者番号：00346587

研究成果の概要 (和文)：海産無脊椎動物グミ由来溶血性レクチンの孔形成多量体構造の解明のため、X線小角散乱及び円偏光二色性測定を行った。人工的な溶液条件下で CEL-III は約 25 量体を形成していたが、界面活性剤を加えると 6 量体に解離し、それが孔形成時の最小単位であることが示唆された。多量体化に必要な条件のうち、糖もしくは Ca^{2+} 非存在下では Kratky プロットより CEL-III の立体構造は大きく変化していたものの、円偏光二色性スペクトルの遠紫外部では大きな違いは見られず、多量体化において二次構造には大きな変化がないことが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：To elucidate the pore forming oligomeric structure of the hemolytic lectin derived from sea invertebrate *Cucumaria echinata*, small-angle x-ray scattering and circular dichroism(CD) were carried out. CEL-III forms 25-mer in artificial oligomerization solution, but it dissociate into hexamer in the presence of detergent. This suggests that the hexamer is minimum unit of hemolytic activity. Kratky plot showed that the tertiary structure of CEL-III was destroyed and spectra were similar to that of the random coil structure in the absence of Ca^{2+} or lacturose or both. Whereas, CD spectra showed that the secondary structure was almost same as monomeric CEL-III under the same condition. These results suggest that the tertiary structure of CEL-III under the oligomerization was almost destroyed, but still contains same secondary structure as monomeric CEL-III.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：応用生物化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：タンパク質・構造変化・レクチン・溶血性・X線小角散乱

1. 研究開始当初の背景
孔形成タンパク質の毒性

これまでに孔を形成するタンパク質として黄色ブドウ球菌由来 α -ヘモリジン、ロイ

コシジン、なまこの一種である海産無脊椎動物グミ由来レクチン等、多くの種類が知られている。これらは単量体で体液中に存在しているものが、標的となる細胞の表面に存在する糖鎖を認識し結合する。さらに、膜上で同種のタンパク質（ロイコシジンにあっては2種類のタンパク質）が多量体化し、イオン透過性の孔を形成する。この孔の形成によって標的とする赤血球や白血球を破壊することが知られている。CEL-IIIはすでに単量体状態での立体構造がX線結晶構造解析によって明らかとなっている。その構造情報より、CEL-IIIは2つの糖結合ドメインと1つの孔形成サブユニットより構成されると考えられている。ドメイン1,2が赤血球表面上の糖を認識・結合する。その後、ドメイン間のコンフォメーション変化が起こり、多量体形成とともにイオン透過性の孔を形成する。

研究代表者の所属する研究室では、これまでCEL-IIIの単離・溶血活性測定・人工的な条件下での多量体化・X線結晶構造解析・大腸菌を宿主に用いた組換え型タンパク質生産系の確立を進めてきている。すでに単量体での立体構造は解析しているものの、その多量体(孔形成超分子)での立体構造や形成機構は不明である。孔形成タンパク質の中では唯一、 α -ヘモリジンが多量体を形成した状態での立体構造が解明されており、 β バレル構造を形成することによってイオン透過性の孔を形成しているが報告されている。しかしながら、膜貫通の孔形成超分子構造は、その疎水性領域が露出していること等が低い可溶性の原因となり結晶化が困難を極めている。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで立体構造が不明であった超好熱菌由来酵素のモデル構造をX線小角散乱法により構築し、それから得られる知見を報告している。X線小角散乱法ではタンパク質の立体構造に関する情報を溶液状態で得ることができ、結晶化が困難であるタンパク質でも測定可能である。また、溶液状態での測定はタンパク質の構造の経時変化を測定することを可能とし、多量体化におけるドメイン間のコンフォメーション変化に関する情報を得ることも可能である。そこで、本申請ではロイコシジン及びCEL-IIIの孔形成超分子構造の解析及び、その機構の解明を目的とした。また、あわせて申請者は孔形成超分子のX線結晶構造解析を行う。これまで結晶化に取り組んできたが良好な結晶は得られていない。そこで、界面活性剤存在下で

結晶化を行う。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の調製

ナマコ由来CEL-IIIは、ナマコの体液を破砕することによって粗タンパク質溶液を作成した。目的のタンパク質は複数の糖結合カラムクロマトグラフィー及びゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって単量体を単一のバンドを示すまでに調製した。ロイコシジンは大腸菌を宿主に用いた遺伝子組換えタンパク質として生産し、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー及びゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって精製した。

(2) 人工的溶液条件下での多量体化

CEL-IIIの人工的な環境での多量体化はすでに研究代表者の所属する研究室で見出している。そこで、高pH (pH10)、高塩濃度、カルシウム及び糖(ラクツロース)存在下で多量体化を行った。ロイコシジンに関しては、人工的な溶液条件下での多量体化が確認されていないので、その条件の探索から行った。

(3) X線小角散乱(SAXS)測定

SAXS測定は、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光実験施設 Photon Factory BL-10Cに設置された溶液用小角散乱実験装置(SAXES; 酵素回折計)及びSpring-8 BL45XUで行った。

Photon Factory BL-10Cは擬似点集光型の光学系を有する小角散乱測定専用ビームラインで、縦1次元方向のデータ収集が基本のビームラインである。X線検出器として1次元PSPC(位置敏感型係数比例管)を用いた測定を行った。

Spring-8、BL45XU-SAXSに設置された溶液散乱用実験ステーションは測定波長0.9 Å、カメラ長2.4 mで行い、光路長3 mm、窓材に石英を使用した溶液散乱測定用セルを用いた。X線検出器は、オンラインImaging Plateを利用した。

4. 研究成果

(1) CEL-III 多量体の立体構造解析

グミ抽出液より得られた単量体を人工的条件下で多量体化させたところ、SDS-PAGEでは270 k付近(6量体)にバンドを示すものの、SAXSで測定を行うと、その分子量は約1000 k(25量体)とより高分子量な会合体として存在していた。そこで、界面活性剤(TritonX-100)存在下で測定を行ったところ、

6 量体に解離していた。他の溶血活性を示すタンパク質である α -ヘモリジン⁷は7量体を形成して活性を示すことが知られている。これらの結果は、人工多量体は界面活性剤に対する耐性を持った溶血活性を示す最小のユニットである6量体が会合し、更なる多量体を形成していることを示唆していた。

SAXS 測定には、タンパク質に結合していない界面活性剤の影響が考えられることから、それ自体の散乱強度が低い界面活性剤の選択を行った。その結果、C12E8 が最も SAXS 測定に適していた。得られた散乱曲線からタンパク質の立体構造のボールモデリング構造を計算したが、有意な構造を得ることができなかった。これは、部分的に揺らいだ構造になっているか、界面活性剤の効果によって一部の CEL-III 多量体が、単量体にまで解離してしまった可能性が考えられた。

また、多量体化機構を解明するため人工的な多量体化条件の組合せを変え、中間状態の構造を SAXS 測定した。その結果、カルシウムもしくは糖非存在下では、クラツキープロットがランダムコイル状のタンパク質を測定した際に見られる曲線に良く似たものとなっており、立体構造が大きく崩壊していることが示唆された。同条件下で遠紫外部円偏光二色性測定を行ったところ、中間体と単量体で大きなスペクトルの違いが観察されなかったことから二次構造には大きな変化がなかったものと考えられる。以上の結果は、多量体化では二次構造の変化は大きく起こらないものの、立体構造の崩壊を伴って起こることが示唆された。

(2) CEL-III の多量体化における構造変化

多量体化における構造の経時変化を解明するために時分割SAXS測定を行った。すでに明らかとしている人工的な溶液条件下では多量体化が瞬時に起こるために、測定に適した条件の検討から行った。高 pH で溶血活性の上昇が見られることから pH 変化が活性に大きな影響を与えていると考え、異なる pH 条件下での SAXS 測定を行った。その結果、ギニエプロットを作成し、種々の pH での回転半径 (Rg) を求め、pH との相関関係を示すプロットを作成した。その結果、pH7、pH7.5、pH8.0 では Rg は単量体と同程度の値であり、pH8.5 以上では、多量体と同程度の値であった。そのため、pH8.5 以上では、瞬時に多量体化が進むと考えられた。そこで、pH7.5 における人工オリゴマー化条件を用いて X 線溶液散乱における時分割測定を行った。測定は20分間を2分刻みで測定した。各時間の散乱曲線からギニエ

プロットを作成し、Rg と時間変化との相関関係を求めた。その結果、時間変化とともに回転半径 Rg が上昇していくことが確認された。このことは、適切な多量体化条件を見出すことによって、構造の経時変化を測定できることを示していた。

(3) ロイコシジンの *in vitro* での多量体化条件の探索

黄色ブドウ球菌由来ロイコシジンは、大腸菌を宿主に用いた遺伝子組換えタンパク質として生産した。既知のロイコシジンには通常のロイコシジンと PV 型ロイコシジンが知られている。研究代表者は、ゲノム情報の検索により、それらに高い相同性を示す機能未知タンパク質 SAV2004 と SAV2005 を見出した。これら3種のロイコシジンを試料として多量体化条件の検討を行った。

大腸菌を宿主として用いて生産した結果、通常のロイコシジン及び PV 型は可溶性画分に、SAV2004 及び 2005 は封入体として得られた。封入体として得られた SAV2004 及び 2004 は、塩酸グアニジンを用いて可溶化し巻き戻しを行った。その際に、それぞれを単独で巻き戻したものと、可溶化した状態で混合し、巻き戻したものの二通りで巻き戻しを行った。それぞれを単独で巻き戻したものは、収量が非常に少なく、それは凝集体を形成することによって沈殿していた。SAV2004 と 2005 を混合した状態での巻き戻しを行い、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製を行ったところ3つのピークが得られた。分子量マーカーを用いて、それらの分子量を求めたところ、それぞれ、分子量が大きい順に、669 k, 130 k, 36 k であった。各ピークを SDS-PAGE に供したところ、単量体の位置にバンドが確認された。これは、多量体が SDS によって単量体に解離していることを意味していた。この3つのピークを試料として用い SAXS 測定を行った。その結果、Rg はゲルろ過での溶出順に 85.5, 84.7, 27.1 であった。また、散乱角 0 に内挿した散乱強度から分子量を求め、3 番目のピークが単量体であると考えられたため、会合数を求めると、1 番目のピークが 12 量体、2 番目が 16 量体と求められた。このため、再度、ゲルろ過を行うと 2 番目のピークは高分子側にシフトしており、非常に凝集しやすく、SAXS 測定時には、より多量体化していたものと考えられた。

CEL-III は人工的な溶液条件下では、これまで知られている孔形成タンパク質よりも、より高分子の多量体を形成し、界面活性剤存在下で、最小単位と思われる大きさまで解離

したことから、SAV2004/2005 も界面活性剤存在下で SAXS 測定を行った。その結果、クラツキープロットでは、界面活性剤非存在下で見られた単一のピークに加えて、その存在下では、より高角側にもショルダーが観察された。このことは、界面活性剤存在下で一部の多量体が解離することを示唆していた。また、界面活性存在下でゲルろ過を行うと、小さいながらも低分子側でピークが観察された。このことから、界面活性剤を加えることによって、多量体が一部解離されることが示唆された。しかしながら、部分的にしか解離が観察されず、その速度が遅いと考えられる。

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 5 件)

[1] 郷田秀一郎、櫻庭春彦、大島敏久、大腸菌で生産される超好熱菌由来の不活性型グルタミン酸脱水素酵素の活性化機構、生化学、査読有、81、2009、1049-1055

[2] Kawakami R., Sakuraba H., Goda S., Tsuge H., Ohshima T. Refolding, characterization and crystal structure of (S)-malate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読有, 1794, 2009, 1496-1504

[3] Hisamatsu K., Unno H., Goda S., Hatakeyama T., Effects of Ca^{2+} on Refolding of the Recombinant Hemolytic Lectin CEL-III, *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有、73,2009,1203-1205

[4] Roles of the Valine Clusters in Domain 3 of the Hemolytic Lectin CEL-III in Its Oligomerization and Hemolytic Abilities
Hisamatsu K., Unno H., Goda S., Hatakeyama T. *Protein and Peptide Letters* (2009) 16:411-414.

[5] 郷田秀一郎 大腸菌体内で不活性型遺伝子組換え酵素として生産される好熱菌由来のグルタミン酸脱水素酵素の活性化とそれに伴う構造変化 ビタミン 査読有 82 2008 337-343

[学会発表] (計 9 件)

[1] Shuichiro Goda, Hitoshi Sadakata, Keigo Hisamatsu, Yuzuru Hiragi, Tomomitsu Hatakeyama, Analysis of the oligomerization mechanism and structure of CEL-III by small-angle x-ray scattering 日本生物物理学会 平成 21 年 10 月 徳島市

[2] 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 日本蛋白質科学会年会 平成 21 年 5 月 熊本市

[3] 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 の自己会合ドメイン中のアミノ酸残基の役割、日本蛋白質

科学会年会 平成 21 年 5 月 熊本市

[4] 郷田秀一郎 溶血性レクチンの構造解析 第二回長崎プリオン研究会 長崎市 平成 21 年 4 月

[5] 郷田秀一郎 貞方仁 久松啓伍 柊弓絃 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 日本農芸化学会大会 平成 21 年 3 月 福岡市

[6] Shuichiro Goda, Hitoshi Sadakata, Keigo Hisamatsu, Yuzuru Hiragi, Tomomitsu Hatakeyama, ANALYSIS OF THE OLIGOMERIZATION MECHANISM AND STRUCTURE OF THE HEMOLYTIC LECTIN CEL-III DERIVED FROM SEA CUCUMBER BY SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING
Joint international open symposium: Molecular science of fluctuations toward biological functions and chemistry of biological processes created by water and biomolecules March 2009 OKAZAKI

[7] 貞方仁、久松啓伍、柊弓絃、畠山智充、郷田秀一郎 海鼠（グミ）由来溶血性レクチン CEL-III の多量化機構の X 線小角散乱による解析 日本生物物理学会 平成 20 年 12 月 福岡市

[8] 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 日本農芸化学会西日本支部大会 長崎市 平成 20 年 9 月

[9] 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 日本農芸化学会西日本支部大会 長崎市 平成 20 年 9 月

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郷田 秀一郎 (GODA SHUICHIRO)

長崎大学・工学部・准教授

研究者番号：00346587