

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780107

研究課題名（和文） 孔形成タンパク質の多量体化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the oligomerization mechanism of pore forming protein

研究代表者

郷田 秀一郎 (GODA SHUICHIRO)

長崎大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00346587

研究成果の概要（和文）：

孔形成タンパク質は細胞表面で多量体化することによって膜孔を形成し、細胞を破壊する。本研究では、X線小角散乱、X線結晶構造解析法によって、膜孔形成多量体の多量体化における構造変化及び多量体の構造を明らかとした。X線小角散乱測定より海産無脊椎動物グミ由来溶血性レクチンは、まず初めに最小単位である7量体を形成し、その後、さらに7量体が3分子会合することによって21量体を形成すること、また、界面活性剤によって7量体に解離することを見出した。これらのことから界面活性剤存在下での結晶化を試み、良好な回折点を生じる結晶を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Pore forming proteins form oligomer on the surface of the cell. Then, they form an ion permeable pore to disrupt the cells. In this research, structural changes in oligomerization and oligomeric structure of the pore forming proteins were measured by small-angle X-ray scattering (SAXS) and crystal X-ray diffraction. A hemolytic lectin from marine invertebrate *Cucumaria echinata* (CEL-III) forms heptamer at first then three heptamers form 21-mer and 21-mer dissociated to heptamer in the presence of detergent by the results of SAXS measurements. CEL-III oligomer was crystallized and X-ray diffraction data were collected. Crystals diffracted X-rays to 3.3 and 4.2 Å resolution using synchrotron radiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

“タンパク質の立体構造は、そのアミノ酸配列から一義的に決定される”とのアンフィンゼン・ルールは、あまりにも有名で基本的なルールである。しかしながら、しばしばタンパク質は正しい立体構造を形成できずに不溶性の凝集体（多量体）を形成する。それら多量体形成の中にはアルツハイマー病をはじめとするアミロイド線維形成や大腸菌

体内での異種生物由来タンパク質生産の際に見られる封入体形成がある。それらの現象は多くのタンパク質で見られるが、原因となるタンパク質間でアミノ酸配列に相同性が見られず、その機構を知ることは学術的・社会的にも重要である。なかでも研究代表者は本研究で多量体を形成することによって毒性を示す孔形成タンパク質(Pore Forming Protein)に着目し、その多量体構造及びその

形成機構の解明を目的とする。

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 (*Cucumaria echinata*) 由来レクチン (Lectin); CEL-III 等、多くの種類が知られている。これらは単量体で存在しているものが標的となる細胞表面を認識し、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二種類のタンパク質) 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。研究代表者の所属する研究室によって CEL-III はすでに単量体での立体構造が X 線結晶構造解析で明らかとなっている。その構造情報より、CEL-III は二つの糖結合ドメインと一つの孔形成ドメインより構成されると考えられる。ドメイン 1, 2 が細胞表面上の糖を認識・結合し、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と考えている。これまで CEL-III の赤血球に対する溶血活性測定・人工的な条件下での多量体化・単量体での X 線結晶構造解析を行っているが、多量体構造やその形成機構は不明である。

あわせて試料には二成分が多量体を形成する黄色ブドウ球菌由来ロイコシジンを用いる。同タンパク質は F 型と S 型のアミノ酸配列の相同性が高い二種のタンパク質が孔を形成する。これまで、二種のタンパク質が 4 : 3 もしくは 3 : 4 で多量体を形成することが報告されているが、どのような機構で多量体化が起こり、その比率を決めているかは不明である。また、白血球を用いた多量体化は観察されているが、人工的な溶液条件下での多量体化方法は確立されいないため、その多量体化溶液条件の探索を行い、多量体構造及びその形成機構の解明を行う。

多量体化の生体内での役割解明のために、サンゴ由来 CEL-III 相同タンパク質 (*Acropora millepora* Lectin; AML) を試料として用いる。AML は、マイクロアレイを用いた遺伝子発現レベルの変化の研究から、変態が起こる時期に発現の上昇が見られることから見出されている。CEL-III 同様、それらが生体内でどのような役割を果たしているかは不明である。そこで、大腸菌 (*Escherichia coli*) を宿主に用いた組換えタンパク質として生産し、それらの多量体の形成の可能性、もし形成するのであれば多量体構造及びその形成機構の解明を行う。

いくつか孔形成タンパク質の多量体形成状態の立体構造が報告されており、 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。しかしながら、膜貫通の多量体構造は、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。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できる。そこで、本研究では孔形成タンパク質の多量体化機構の解明を SAXS 測定及び X 線結晶構造解析によって行った。

2. 研究の目的

研究代表者はすでにグミからの CEL-III 単量体の精製・人工的な溶液条件下での多量体化に成功しており、試料の調製に問題ない。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発現系の構築に成功している。サンゴ由来 CEL-III 相同タンパク質 (AML) に関しては、大腸菌を宿主に用いた発現系の構築を行っている。これらの試料を用いて以下の測定を行った。

(1) X 線小角散乱法 (SAXS) による多量体化によるドメイン間コンフォメーション変化の測定

すでにわかっている人工的な多量体化条件下でのストップドフロー SAXS 測定を行い、ドメイン間のコンフォメーション変化の状態を数十 msec オーダーで解明する。

(2) SAXS による孔形成超分子構造モデルの構築

人工的な溶液条件下で得られる多量体は約 21 量体を形成している。これまでの研究代表者の研究により、界面活性剤を加えることによって孔形成の最小単位と考えられる約六量体に解離することが明らかとなっている。そこで、同条件下で SAXS 測定を行い、孔形成状態のモデル構造を構築する。すでに解析されている単量体の構造より、会合に寄与するドメインを同定する。

(3) 界面活性剤存在下での結晶化及び X 線結晶構造解析

一般に膜タンパク質の結晶化は困難とされているが、界面活性剤を用いた結晶化条件を検索する。得られた結晶を用いて結晶構造解析を行い、孔形成多量体の構造を明らかとする。

3. 研究の方法

本研究では、試料にナマコ由来 CEL-III、黄色ブドウ球菌由来ロイコシジン、サンゴ由来 AML を用い、その孔形成多量体構造及びその形成機構の解明を行う。多量体形成時の立

体構造変化はストップドフローSAXS、多量体構造解析はSAXSを用いたモデル構造構築とX線結晶構造解析を行う。ストップドフローSAXSより、多量体化における分子量の変化、多量体形成速度、中間体の有無を調べる。SAXS測定で得られるモデル構造及び単量体の立体構造を用いて、糖結合ドメイン及び孔形成ドメインの位置を決定する。X線結晶構造解析は種々の界面活性剤存在下での結晶化を行い、構造解析に適した結晶を得て、測定を行う。ロイコシジン及びサンゴ由来CEL-III相同体は多量体化条件を検討する必要があるため、人工的な溶液条件下での多量体化条件の検討を行う。

研究代表者はすでにCEL-III単量体及び人工的な溶液条件下で得られた多量体のSAXS測定を行っている。その結果から、人工的に作成した多量体は約24量体を形成しているが、界面活性剤を加えることによって孔形成の最小単位と考えられる約6量体に解離する。黄色ブドウ球菌由来ロイコシジンは*E. coli*を宿主に用いた発現系の構築が出来ており、人工的な多量体化溶液条件の検討を行う。サンゴ由来AMLは大腸菌を宿主に用いた発現系の構築及び人工的な多量体化溶液条件の検討を行う。

(1) X線小角散乱法(SAXS)による多量体化によるドメイン間コンフォメーション変化の測定

SAXS測定は茨城県つくば市の高エネルギー加速研究機構BL-10C及び兵庫県佐用郡佐用町SPring-8にて行う。同法の利点の一つに溶液中での測定が可能であるため、タンパク質の立体構造の経時変化を追うことができることがあげられる。そこで、孔を形成する人工的な多量体化条件下での構造変化を測定する。研究代表者はこれまでにアミロイド線維を形成するヒトリゾチーム変異体の線維形成機構の解明を行っており、溶液状態でのタンパク質の立体構造情報を得ることに習熟している。これまでに孔形成タンパク質の多量体化機構に関する報告は皆無であり、極めて高い新規性を有している。研究代表者の所属する研究室では、すでに人工的な多量体形成溶液条件、すなわち、高pH、高塩濃度、糖及びカルシウム存在下を見出している。申請者はすでに、この溶液条件の組合せ、すなわち高pH、高塩濃度での、糖もしくはカルシウムを加えた際の静的なSAXS測定を行い、糖もしくはカルシウム存在下では、CEL-IIIは立体構造が崩壊しているものの二次構造を有する構造となっていることを見出した。そこで、多量体化による動的な立体構造変化を観察するためにストップドフローSAXS測定を行う。SAXSで得られる情報の第一に分子量の変化が挙げられる。散乱曲線を散乱角 0

に外挿した値は分子量に比例する。このことより多量体が何量体であるか、多量体の形成速度、中間体の有無を調べる。

(2) SAXSによる孔形成多量体構造モデルの構築

多量体の立体構造解析はSAXS及び結晶構造解析によって行う。研究代表者はすでにSAXS法による*ab initio*モデル構造構築を超好熱菌由来酵素で成功し、報告している。SAXS法はX線結晶構造解析法とは異なりタンパク質が溶液状態であっても測定が可能であり、結晶化が困難なタンパク質も測定可能である。すでに界面活性剤存在下で約6量体に解離することを見出し、SAXS測定後モデリングを試みているが有意な構造は得られていない。そこで、界面活性剤非存在下での構造モデリングをあわせて行う。

4. 研究成果

(1) ストップドフローSAXS測定による多量体化における構造変化の解明

すでに研究代表者の所属する研究室で明らかとしている*in vitro*での多量体化溶液条件下での多量体化における構造の経時変化をストップドフローSAXSによって行った。高輝度であるSPring-8、BL-45XUを使用することによって、1フレーム76 msecでトータル100フレーム、すなわち7.6 sec測定を行った。測定は、界面活性剤存在下及び非存在下で行った。

両条件とも7.6 sec以内に多量体化による構造変化は終了し、極めて早い速度で多量体化が進むことが示された。

界面活性剤非存在下では、 Q が0.6付近に単一のピークを持つ典型的な単量体の曲線から、 Q が0.01付近の多量体のピークを持つ曲線に変化し、その間では Q が0.025付近に肩を持つ曲線となっていた(図1(A))。界面活性剤存在下では、非存在下での中間体で見られた曲線に似た曲線を示した(図1(B))。このことは、界面活性剤非存在下で見られた21量体は、界面活性剤存在下で見られる7量体がさらに会合して形成していると示された。すなわち、膜孔形成の最小単位は7量体であり、膜孔貫通のために β パレルを有した構造となり、その膜貫通部位が高度に疎水性を示すために、界面活性剤非存在下ではさらなる多量体化し、21量体になったものと考えられた。

図2には多量体化における分子量の変化をプロットしたものを示した。界面活性剤存在下では3 sec以内に分子量の増加が終わり、一定の値を示している。それに対して、界面活性剤非存在下では、さらなる多量体化によって分子量の増大が続いている。このことから、7量体が膜孔形成の最小単位であることが示された。

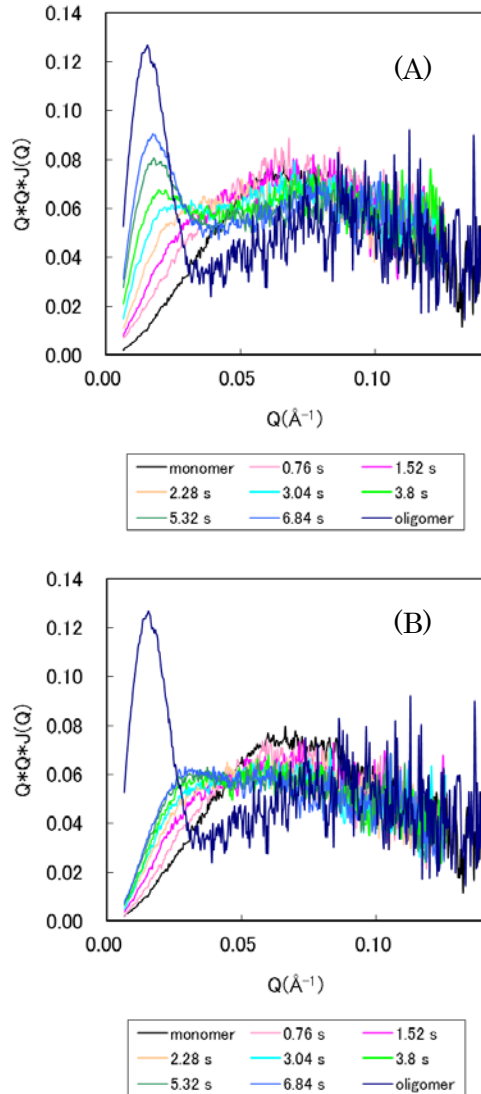


図1 界面活性剤非存在下(A)及び存在下(B)でのストップフローSAXS測定クラックキーププロット

(2) CEL-III 多量体の立体構造解析

in vitro 溶液条件で得られる多量体が最小単位の膜孔形成多量体がさらに多量体化したものであり、界面活性剤存在下で解離することを見出したため、界面活性剤存在下での結晶化を試みた。SAXS 測定結果より DDM が界面活性剤として適していると考えられたため、その存在下での結晶化を試みたところ結晶を得ることができた。X 線を照射したところ、良好な回折点を得られたことから、結晶構造解析を進めている。

(3) SAXS を用いた構造モデリング

界面活性剤を加えることによって結晶が得られ、構造解析が進んでいることから、静

的な条件下での SAXS 散乱曲線から、多量体がさらに多量体化した 21 量体の構造モデリングを行った。*in vitro*での多量体化条件下で測定した散乱曲線から球を電子密度として用いるビーズモデル構造を構築した。その結果、7 量体がさらに 3 回対称で多量体化したモデル構造を構築することに成功した。このことから、21 量体は 3 回対称を持つと考えられた。

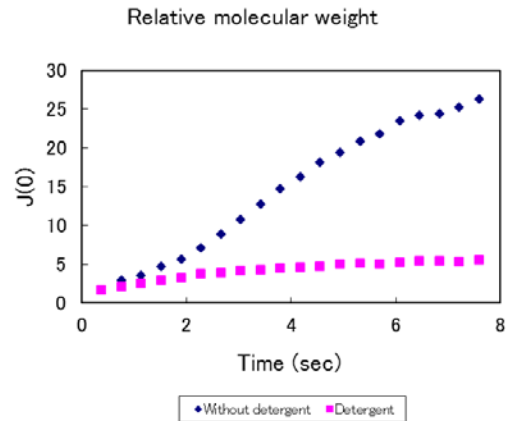


図2 SAXS から得られた分子量に比例する散乱角 0 での散乱強度 J(0) の経時変化

(4) ロイコシジンの多量体化

二成分毒素であるロイコシジンの多量体構造及び多量体化における構造変化の解明のために、*in vitro*での多量体化条件の探索を行った。性質がロイコシジンと似ている一成分毒素である α -ヘモリジンが結晶化に用いる沈殿剤の一つである 2-methyl 2,4-pentandiol(MPD)存在下で多量体化するとの報告があったため、MPD 存在下でロイコシジンも多量体化するのではないかと考え、MPD 存在下での SAXS 測定を行った。その結果、MPD 存在下で多量体化することを確認した。また、より生体に近い環境下での多量体化条件を検討した。そこで、ウサギ血から赤血球を調製し、実際に赤血球を溶血させ、その赤血球膜からの界面活性剤を用いた可溶化及び精製を検討した。大腸菌を宿主に用いて生産させた組換えタンパク質であるロイコシジンを赤血球に加えたところ溶血活性を確認することができた。赤血球膜からの回収は界面活性剤を用いた可溶化を行った。回収における可溶化効率は比較的高かったものの、可溶化後の精製で、His-tag を用いたカラムに吸着せず、単一に精製することが困難であった。今後、精製条件を検討する必要がある。

(5) サンゴ由来 AML の糖特異性の解明

CEL-III にアミノ酸配列相同性を示すサン

ゴ由来レクチン(AML)の性質の解明のために、大腸菌を宿主に用いたリコンビナントタンパク質の生産を試みた。しかしながら、生産されたタンパク質は非常に凝集しやすく、単量体として精製することは困難であった。そこで、CEL-III で多量体化に寄与していると考えられている部分を除いた、糖結合ドメインのみの生産を行い、糖特異性の解明を行った。糖結合ドメインのみを生産させたところ、単量体して調製することに成功した。得られたタンパク質を用いて、糖特異性の解明を行ったところ、糖特異性は CEL-III とほとんど違いが見られなかった。今後、他のタンパク質の融合体として生産することによって、AML 全長の単量体としての生産を試み、多量体化機構の解明を行う。

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 7 件)

(1) Alteration of the Carbohydrate-Binding Specificity of a C-type Lectin CEL-I Mutant with an EPN Carbohydrate-Binding Motif
Tomomitsu Hatakeyama, Tomohiro Ishimine, Tomohiro Baba, Masanari Kimura, Hideaki Unno, and Shuichiro Goda
Protein and Peptide Letters in press. 査読有

(2) Crystallization and preliminary crystallographic study of oligomers of the hemolytic lectin CEL-III from a sea cucumber *Cucumaria echinata*
Hideaki Unno, Keigo Hisamatsu, Tomonao Nagao, Yuki Tateya, Naoki Matsumoto, Shuichiro Goda and Tomomitsu Hatakeyama
Acta Crystallographica Section F (2013) 69:416-420. 査読有
DOI: 10.1107/S1744309113004065

(3) Effects of detergents on the oligomeric structures of the hemolytic lectin CEL-III as determined by small-angle X-ray scattering
Shuichiro Goda, Hitoshi Sadakata, Hideaki Unno, Tomomitsu Hatakeyama
Biosci Biotechnol Biochem (2013) 77:679-681. 査読有
DOI: 10.1271/bbb.120981

(4) An assay for Carbohydrate-Binding Activity of Lectins using Polyamidoamine Dendrimer Conjugated with Carbohydrates
Tomomitsu HATAKEYAMA, Ryota KARINO,

Yasuaki TERAII, Masanari KIMURA, Hideaki UNNO, Shuichiro GODA
Biosci Biotechnol Biochem (2012) 76:1999-2001. 査読有
DOI: 10.1271/bbb.120520

(5) Structural and thermodynamic characterization of the self-adhesive properties of the self-adhesive properties of human P-cadherin
Shota Kudo, Jose M. M. Caaveiro, Takamitsu Miyafusa, Shuichiro Goda, Keisuke Ishii, Tadashi Matsuura, Yukio Sudou, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo and Tsumoto Kouhei
Molecular Biosyst. (2012) 8:2050-2053. 査読有
DOI: 10.1039/c2mb25161b

(6) Substrate-induced change in the quaternary structure of type 2 isopentenyl diphosphate isomerase from *Sulfolobus shibatae*
Hitomi Nakatani, Shuichiro Goda, Hideaki Unno, Takuya Nagai, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi
Journal of Bacteriology (2012) 194:3216-3224. 査読有
DOI: 10.1128/JB.00068-12

(7) Structural modeling of RNase P RNA of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3
Christian Zwieb, Yuji Nakao, Takashi Nakashima, Hisanori Takagi, Shuichiro Goda, Ebbe S Andersen, Yoshimitsu Kakuta, Makoto Kimura
Biochem. Biophys. Res. Commun. (2011) 414:517-522. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.098

[学会発表] (計 8 件)

(1) 畠山智充
棘皮動物グミ由来溶血性レクチン CEL-III の細胞膜貫通オリゴマー構造
日本農芸化学会 2013 年度大会
2013 3/24-27
東北大学川内北キャンパス

(2) 畠山 智充
溶血性レクチン CEL-III オリゴマーの結晶構造解析
第 85 回日本生化学会大会
2012 12/14-19
福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

(3) 工藤 彰洋
サンゴ由来溶血性レクチン相同性タンパク質の糖認識の解明

第 85 回日本生化学会大会
2012 12/14-17
福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

(4) Shuichiro Goda

Analysis of the structural change of the pore forming toxin by stopped-flow small-angle X-ray scattering
3rd International Workshop on Expression, Structure and Function of Membrane Proteins
2012 9/23-27
University of Florence Florence イタリア

(5) Tomonao Nagao

Crystallization of the pore forming toxin CEL-III from marine invertebrate, Cucumaria echinata
3rd International Workshop on Expression, Structure and Function of Membrane Proteins
2012 9/23-27
University of Florence Florence イタリア

(6) 海野英昭

溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成複合体結晶構造解析
第 36 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
2012 9/6-8
フェニックスシーガイアリゾート
サンホテルフェニックス

(7) 工藤彰洋

サンゴ由来レクチン相同性タンパク質の糖特異性の解明
第 36 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
2012 9/6-8
フェニックスシーガイアリゾート
サンホテルフェニックス

(8) 郷田秀一郎

溶血性レクチン CEL-III の多量体化機構の X 線小角散乱測定による解明
第 29 回 PF シンポジウム
2012 3/15-16
つくば国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郷田 秀一郎 (GODA SHUICHIRO)
長崎大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：00346587