

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570135

研究課題名(和文) 溶血性レクチンCEL-IIIの膜孔形成糖鎖複合体構造解析

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・工学研究科・助教

研究者番号：10452872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：海産無脊椎動物グミ(*C. echinata*)由来溶血性レクチンCEL-IIIは、膜孔形成毒素(Pore-Forming Toxin: PFT)として機能する。CEL-IIIによる膜孔形成メカニズムの解明を目的として、CEL-III膜孔形成複合体のX線結晶構造解析を行った。膜孔形成複合体の結晶構造は2.9オングストロームの分解能で決定し、本構造解析によりCEL-III膜孔形成メカニズムの詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CEL-III is a hemolytic lectin from *C. echinata* and performs as a pore-forming toxin. Structural analysis of pore-forming CEL-III complex was carried out to elucidate its pore-formation mechanism. A crystal structure of the CEL-III complex was determined at 2.9 angstrom resolution. A detail of pore-forming mechanism of the CEL-III was clarified by the structural analysis.

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析 膜孔形成毒素 CEL-III 膜孔形成複合体 *Cucumaria. echinata* 溶血性レクチン
レクチン

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成分の研究が進められてはいるが、膜孔形成状態であるPFT膜貫通型複合体のX線結晶構造解析の報告は数例のみであり、PFTがモノマー構造から細胞膜表面のターゲットを認識し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。

我々の研究グループでは各種動植物からレクチン(糖結合蛋白質)を単離し、その構造および機能解析研究を進めている。その研究の中で海産無脊椎動物グミ (*Cucumaria echinata*) (図1) から極めて珍しい溶血活性を示すレクチン CEL-III を発見し、そのCEL-IIIの溶血活性は赤血球細胞表面糖鎖に結合した後コンフォメーション変化を生じて細胞膜にイオン透過性の小孔(PFT)を形成するためであることを明らかにした¹。さらに、複合体形成前の水溶性モノマー構造について構造解析を進め、2004年にCEL-IIIの水溶性モノマー構造解析²、2007年にはCEL-III水溶性モノマー-糖複合体の構造解析³を報告した(図2)。この構造解析により、リガンドである糖との結合により、小孔を形成すると考えられるdomain 3ヘリックス部分の微小な構造変化が観測された。このわずかな構造変化は膜孔形成にむけた構造変化を誘導する始めの変化と考えられ、膜孔形成メカニズムを解明する上で非常に興味深い知見であった。今後は膜孔形成複合体の結晶構造の決定により、膜孔形成メカニズムの全貌解明が期待された。

膜孔形成メカニズムについては、膜孔形成複合体の結晶構造解析の報告が非常に少ないことから原子レベルでの理解は進んでいない。本構造解析により膜孔形成メカニズムの理解が大きく進む事が期待され、また、真核生物由来蛋白質の膜孔形成複合体の結晶構造解析の報告として前例が無く、非常に独創的な研究であると言える。加えて、糖鎖をターゲットとしたPFTは報告例が非常に少ない事、モノマーの立体構造が他のPFTと全く異なる事、膜孔形成の際に膜貫通領域部分の二次構造変換により α ヘリックスから β シートへと構造が変換し7量体を形成する事が予想される点、などは他の病原菌由来PFTには無い非常にユニークな特徴であり、その特性の構造解析による原子レベルでのメカニズム解明は構造生物学上非常に興味深い。

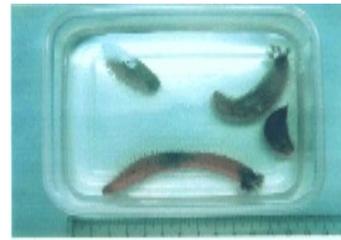


図1 *Cucumaria echinata* (グミ)

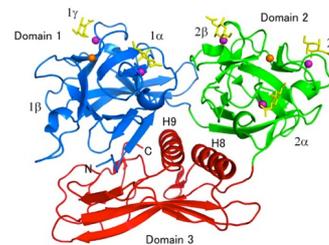


図2. CEL-III水溶性モノマーの構造³

(引用文献)

1. Hatakeyama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 16915-16920 (1996)
2. T. Uchida, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 37133-37141 (2004)
3. T. Hatakeyama, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **282**, 37826-37835 (2007)

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事を目的とした。

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CEL-IIIの精製、(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・位相決定・構造決定を行い、(5)得られた複合体構造

と水溶性モノマー構造との比較から膜孔形成メカニズムの解明と進めた。さらに、(6) 変異体解析および高速 AFM を用いた膜孔形成中間体構造の観察から、膜孔形成メカニズムのより詳細な解析を行った。以下にそれら各項目の具体的内容を記述する。

(1) アフィニティカラムクロマトグラフィーを用いた CEL-III の精製

グミ個体は福岡県糸島漁協の協力により、九州北部筑前海沿岸の海底から採取し、実験に用いた。グミ個体をミキサー等で破碎後遠心分離し、得られた破碎液上清を用いて、糖固定化カラム (Lactose-cellufine, GalNAc-cellufine) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより CEL-III を精製し、さらにゲル濾過クロマトグラフィーを行う事で、高純度の精製 CEL-III を得た。

(2) 膜孔複合体化

得られた精製 CEL-III を用いて、既知の膜孔形成条件 [1 M NaCl, 100 mM glycine-NaOH buffer (pH 10), 10 mM CaCl₂, and 100 mM lactulose] の終濃度溶液下にて膜孔形成複合体化を行った。その後、TBS を用いて透析の後、界面活性剤の存在下にて 10mg/ml 程度まで濃縮の後、本溶液を用いて結晶化を行った。

(3) 結晶化条件の検索・最適化

結晶化を行うにあたり、各種結晶化条件の探索に加え、各種界面活性剤の検討も同様に行った。得られた結晶は放射光を用いて回折分解能の確認を行い、その分解能の向上を指標として、結晶化条件の探索およびその最適化を行った。

(4) X 線回折データ処理・位相決定・構造決定

構造決定を行うに十分な分解能が得られた結晶について、放射光を用いた回折データ測定を行うとともに、各種重原子を用いた重原子誘導体結晶を調製し、同様に放射光測定を行った。得られたそれらの回折データを用いて重原子同形置換 (SIR) 法により位相の決定、位相改良、モデル構築、構造精密化と進め、CEL-III 膜孔形成複合体の結晶構造を決定した。

(5) 得られた複合体構造と水溶性モノマー構造との比較から膜孔形成メカニズムの解明

水溶性モノマー構造は既に報告されており、その構造と本研究成果である膜孔形成複合体を比較し、またこれまでの変異体解析および構造解析の知見から、水溶性モノマーから膜孔形成複合体へと至る構造変化の過程を推定した。

(6) 変異体解析および高速 AFM を用いた膜孔形成中間体構造の観察

(5) により得られた知見を裏付けるため、各種変異体解析を行い、また高速 AFM を用いて膜孔形成中間体構造の直接観察を試みた。

4. 研究成果

(1) 結晶化条件の検索・最適化

X 線回折分解能の向上を指標とする結晶化条件の検索、使用する界面活性剤の検討、および結晶化条件最適化の結果、構造決定可能な分解能の回折が得られる結晶が再現性良く生成される結晶化条件 [100 mM sodium acetate (pH 4.2), 100 mM CdCl₂, and 30% PEG400] を見出した。この条件にて得られる結晶を用いて、分解能が最高で 2.9 Å の回折データを収集する事に成功した。この結晶化条件で得られる結晶を用いて、次に各種重原子溶液に浸漬させる事で重原子誘導体結晶を作成し、X 線回折データを収集した。

(2) 結晶構造決定

native 結晶および各種重原子誘導体結晶を用いて、重原子同形置換法による位相決定を試みた結果、白金誘導体との重原子同形置換 (SIR) 法により、モデル構築可能な位相を得る事に成功した。その後、非結晶学的対称性を利用した電子密度平均化を含む位相改良、モデル構築、および構造精密化を進め、分解能 2.9 Å での CEL-III 膜孔形成複合体の結晶構造を決定した (図 3)。

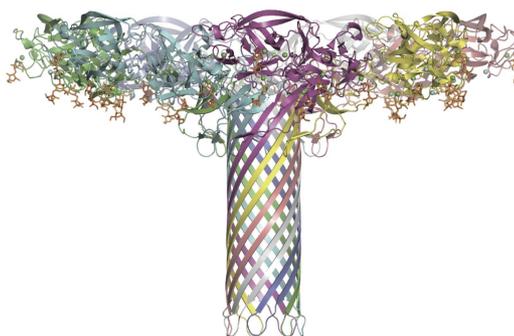


図 3 CEL-III の膜孔形成複合体構造

得られた構造は、「画鋸」形の特異な 7 量体構造を形成しており、膜貫通領域は 14 本の β シートから成る β バレル構造を形成している事が分かった。複合体構造中の糖結合部位 (モノマーあたり 5 カ所、7 量体構造中に計 35 カ所) には結晶化時に添加した Lactulose がカルシウムを介して結合しており、その糖結合部位は全て複合体構造において膜表面に接する同一平面上に位置して

いた。これは、CEL-III によるターゲットへの膜結合および膜貫通において、細胞膜表面上の糖鎖を認識・結合し、その表面糖鎖を足場として膜孔形成が行われ、またそれにより複合体が膜中で強く固定される事が示唆された。

(3) 構造変化メカニズムの解析

以前に構造決定された CEL-III の水溶性モノマー構造と本複合体中のプロトマー構造を比較すると、糖結合ドメインであるドメイン1および2に有意な構造変化は見られないものの、膜孔形成ドメインであるドメイン3については、そのドメインの移動に加えてドメイン内の大きな2次構造変化が確認された。その中でも特に構造変化の大きな領域は2本の α ヘリックスとそれらを繋ぐループ構造からなり、それらが膜孔形成構造中では β バレルを形成する2本の長い β シートへと構造が変化していた。これらの構造変化の知見および変異体解析の結果を統合し、CEL-III による以下の膜孔形成メカニズムを推定した(図4)。

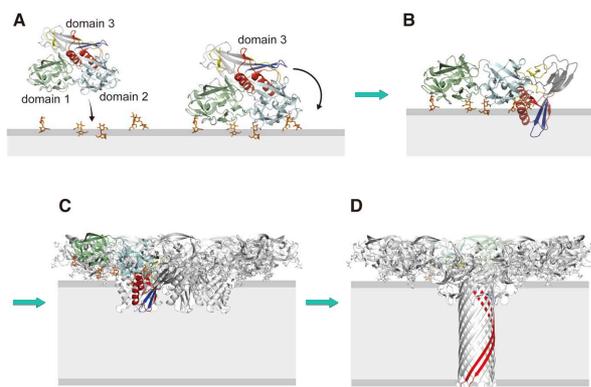


図4 CEL-III による推定膜孔形成メカニズム (A) CEL-III の水溶性モノマー構造(左)およびその細胞膜表面糖鎖への結合(右)。 (B) ドメイン1および2への糖鎖の結合が引き金となり、ドメイン3の移動が生じる。 (C) ドメイン3の移動により現れた表面を介して互いに会合し、ドーナツ型の中間体7量体構造(プレポア構造)が形成される。 (D) プレポア構造から α ヘリックス \rightarrow β シートへの二次構造変換を伴う β バレルの形成により、膜孔形成複合体構造が完成する。

この二次構造変換と膜貫通へと至る自発的な構造変化には何らかのエネルギーが必要であると思われるが、上記領域の水素結合数は構造変化に伴いモノマーあたり24個増加することになるため、この水素結合数の増加がドライビングフォースとして構造変化が進行することが推測された。

CEL-III の膜孔形成反応に伴うこの α ヘリックスから β シートへの大規模な二次構造変換は、PFT としては最も報告例が多いコレ

ステロール依存性サイトリシン(CDC)ファミリー、および哺乳類の自然免疫機構にかかわり侵入微生物の細胞膜に膜孔を形成するMACPファミリーにおいて推定されているメカニズム^{4,5}と共通している事が明らかとなった。

(4) 変異体解析および高速AFMを用いた膜孔形成中間体構造の観察

上記により得られた CEL-III による膜孔形成メカニズムに関する知見から、更に詳細な構造変化メカニズムの解明を目的として、中間体構造で停止する事が推測される変異体の作成、および高速AFMによる膜孔形成過程の直接観察を行った。それにより中間体構造の存在を示す知見が得られ、それは今後のより詳細な構造変化メカニズム解明が強く期待できる成果であった。今後はそれらの中間体構造解析を進め、それらの知見を統合して膜孔形成メカニズムのより詳細な解析を目指し、研究を進展させる予定である。

これらの研究成果は、CEL-III の膜孔形成構造変化メカニズムの解明のみならず、PFTが関与する病原菌による病原性発現機構の解明、PFTによる毒性発現の予防、およびその治療薬開発につながる事が期待される。

〈引用文献〉

4. S. J. Tilley, et al, *Cell*, **121**(2), 247-256 (2005).
5. R. H. P. Law, et al, *Nature*, **468**(7322), 447-451 (2010).

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- (1) 無脊椎動物由来溶血性レクチンの細胞膜孔形成機構 CEL-IIIによる膜孔形成メカニズム, 海野 英昭, 化学と生物, **53**(2), 74-75, (2015) 査読有り
<https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=326>
- (2) Hemolytic Lectin CEL-III Heptamerizes via a Large Structural Transition from α -Helices to a β -Barrel during the Transmembrane Pore-Formation Process. Unno H, Goda S, and Hatakeyama T. *J. Biol. Chem.* **289**(18), 12805-12812, (2014) 査読有り
DOI: 10.1074/jbc.M113.541896
- (3) Identification of the amino acid residues involved in the hemolytic activity of the *Cucumaria echinata* lectin CEL-III. Hisamatsu K, Nagao T, Unno H, Goda S, and Hatakeyama T.

Biochim Biophys Acta. 1830(8), 4211-4217,
(2013) 査読有り
DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.04.010

(4) Crystallization and preliminary
crystallographic study of oligomers of the
haemolytic lectin CEL-III from the sea cucumber
Cucumaria echinata. Unno H, Hisamatsu K,
Nagao T, Tateya Y, Matsumoto N, Goda S, and
Hatakeyama T. *Acta Crystallogr Sect F Struct
Biol Cryst Commun.* 69(4), 416-420, (2013)
査読有り
DOI: 10.1107/S1744309113004065

(5) Effects of Detergents on the Oligomeric
Structures of Hemolytic Lectin CEL-III as
Determined by Small-Angle X-Ray Scattering.
Goda S, Sadakata H, Unno H, and Hatakeyama T.
Biosci Biotechnol Biochem. 77(3), 679-681,
(2013) 査読有り
DOI: 10.1271/bbb.120981

[学会発表] (計 12 件)

(1) 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 畠山 智充,
溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成複合体結
晶構造解析 2014 年 11 月 1 日~3 日 日本結
晶学会年会 東京大学農学部 (東京・文京区)

(2) Hideaki Unno, Shuichiro Goda, and
Tomomitsu Hatakeyama, Structural analysis of
Pore-Forming CEL-III 2014 年 8 月 5 日~12 日
Twenty-Third Congress and General Assembly
of the International Union of Crystallography,
Montreal (Canada).

(3) 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 畠山 智充,
溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成機構
2014 年 6 月 25 日~27 日 第 14 回日本蛋白
質学会年会 ワークピア横浜/横浜産貿ホ
ール マリネリア (神奈川・横浜)

(4) 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 畠山 智充,
溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成機構
2014 年 5 月 17 日~18 日 平成 26 年度生
化学会九州支部例会 九州大学病院キャン
パス (福岡・福岡)

(5) 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 畠山 智
充, 溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成複
合体結晶構造解析 2014 年 3 月 27 日~31 日
平成 26 年度日本水産学会春季大会 北海道大
学函館キャンパス (北海道・函館)

(6) 長尾 知直, 郷田 秀一郎, 海野 英昭, 畠
山 智充, 海産無脊椎動物由来溶血性レクチ
ン CEL-III の結晶化 第 51 回日本生物物理
学会年会 2013 年 10 月 28 日~30 日 国立京
都国際会館 (京都・京都)

(7) 海野 英昭, 溶血性レクチン CEL-III の膜
孔形成複合体 第 37 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 2013 年
9 月 26 日~28 日 ゆやど雲仙新湯 (長崎・雲
仙)

(8) 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 畠山 智充, 溶
血性レクチン CEL-III の膜孔形成複合体結
晶構造解析 2013 年 6 月 12 日~14 日 第 1
3 回 日本蛋白質科学会年会 とりぎん文化
会館 (鳥取・鳥取)

(9) 長尾 知直, 貞方 仁, 海野 英昭, 郷田
秀一郎, 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解明 第 13 回 日
本蛋白質科学会年会 2013 年 6 月 12 日~14
日 とりぎん文化会館 (鳥取・鳥取)

(10) 畠山 智充, 郷田 秀一郎, 海野 英昭, 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 年 3 月 24 日~28 日
東北大学 川内北キャンパス (宮城・仙台)

(11) 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 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 年 12
月 14 日~16 日 福岡国際会議場・マリメ
ッセ福岡 (福岡・福岡)

(12) 海野 英昭, 郷田 秀一郎, 畠山 智充,
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 年 9 月
7 日 サンホテルフェニックス (宮崎・宮崎)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野 英昭 (UNNO, Hideaki)
長崎大学・工学研究科・助教
研究者番号: 10452872