

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580500

研究課題名(和文) 構造生物学的解析によるR型レクチンのシアル酸含有糖鎖結合能獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Structural biological studies on the sialic acid-binding mechanism of R-type lectin mutant

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・上席研究員

研究者番号：70353993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ガラクトースに特異的な糖結合活性を持つR型レクチン(EW29Ch)を分子進化工学的に改変させたシアル酸結合性レクチン(SRC)のシアル酸含有糖鎖結合能獲得メカニズムを核磁気共鳴法により解析した結果、SRCは6'-シアリルラクトース結合状態において、遊離状態やラクトース結合状態と異なる2つのコンフォメーションを取ることが示唆された。さらに、SRCのサブドメインのループ領域がEW29Chと比較してその分子内運動が著しく変化していることから、この変化がシアル酸との結合に重要であることも分かった。

研究成果の概要(英文)：We performed the nuclear magnetic resonance analysis of the sialic acid-binding mechanism of the novel sialic acid-binding lectin (SRC) produced from the C-terminal domain of the novel R-type lectin from the earthworm (EW29Ch) by natural evolution-mimicry. The results showed that in the 6'-sialyllactose-bound state SRC has two conformations different from both the conformation in the sugar-free state and that in the lactose-bound state. Further, the internal motion of the loop region in subdomain of SRC remarkably changed from that of the corresponding region in subdomain of the wild type lectin EW29Ch, indicating that the internal motion change is important in the sialic acid-binding mechanism of SRC.

研究分野：構造生物学

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が確認されているユニークなファミリーである。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(α、β、γ)からなる β -trefoil と呼ばれる構造を持つことである(図1)。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、 β -trefoil という特徴的な糖認識ドメ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、申請者は、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)法により行った結果、EW29Chの2つの糖結合部位(α、β)はX線結晶構造解析ではほとんど同じ糖結合様式を示したにも関わらず、溶液中では、糖結合部位が糖結合部位やXBDのキシラン結合部位の糖結合様式と大きく異なること、さらに、糖結合部位において特に、遅い分子内運動による構造の揺らぎが糖との結合活性に関与していることを発見した。また、R型レクチンファミリーの結合特異性が他のファミリーに比べ多岐化していることに着目し、糖鎖が生物進化上ガラクトース修飾を多様化したことに協調して、祖先型ガラクトース認識レクチンも結合多様性を獲得したのではという進化仮説を立て、その証明として、EW29Chを用いて分子進化工学的手法による改変によりシアル酸結合性レクチン(SRC: Sia-Recognition EW29Ch)の創製に世界で初めて成功した。そのX線結晶構造解析において、6'-シアルイルラクトース(シアル酸がラクトースへ-2,6で結合したシアル酸糖)が糖結合部位にのみ結合し、糖結合部位に結合しないこと、また、シアルイルラクトースのラクトースの部分では、EW29Chの糖結合部位の場合とほとんど同じ相互作用を示すとともに、シアル酸の部分とは新たに2つの水素結合が形成されることを示した(図1)。その新たに形成された2つの水素結合のうちの1つは、サブドメインβの糖結合能が消失したのと引き換えに、サブドメインγの1つのループ(K233-A240)がサブドメインβの糖結合部位付近へシフトすることにより可能に

なったシアル酸中の水酸基との水素結合である。しかしながら、新たに2つの水素結合が形成されるにも関わらず、SRCのシアルイルラクトースに対する解離定数が、EW29Chの糖結合部位におけるラクトースとの解離定数とほとんど同じ値を示すことや、シアル酸中の水酸基との水素結合形成において重要なサブドメインβの1つのループのシフトについての動的解析は、X線結晶構造解析ではできないことから、EW29Chの場合と同様に、SRCのシアル酸糖結合能獲得メカニズムについて、結晶構造解析だけでは十分な説明は出来ない。最近、アミヒラタケ由来のシアル酸結合レクチンとシアル酸の結晶構造解析による結合様式が、SRCの結合様式と酷似していることが報告され(Kadirvelraj et al. (2011) *Glycobiology* 21, 973-984)。このことから、SRCは単なる人工物ではなく、分子進化を模倣して獲得されたものであり、その結合様式の解析は分子進化による糖鎖結合能獲得メカニズムの解明において大変重要であると考えられる。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解明、さらには分子進化による多様な糖結合能獲得メカニズムの解明のため、NMRによる遊離状態及びシアル酸糖鎖結合状態でのSRCの動的構造の解析と現在解析を進めている野性体であるEW29Chとの動的構造との比較により、SRCのシアル酸糖結合能獲得メカニズムを原子レベルで解明する必要がある。

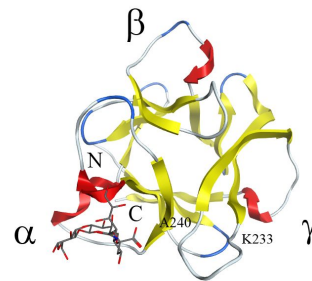


図1. SRC - 6' - シアルイルラクトース複合体のX線結晶構造(PDB: 2DS0)。SRCはリボンで、6'-シアルイルラクトースはスティックで表示している。

2. 研究の目的

これまで行ってきたガラクトースに特異的な糖結合活性を持つR型レクチンC末端ドメイン(EW29Ch)のNMRによる解析から、EW29Chの糖結合部位において遅い分子内運動による構造の揺らぎが糖結合活性に関係することを明らかにした。また、このレクチンを分子進化工学的に改変させてシアル酸結合性レクチン(SRC)を創製し、X線結晶構造解析を行った。しかしながら、その特異的な糖鎖結合能獲得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、特異的な糖結合能を持つ改変体レクチンの遊離状

態及び糖結合状態での溶液中の立体構造及び分子内運動の解析による糖結合に伴う動的構造の変化を解析するとともに、野生体レクチンである EW29Ch の動的構造との比較も行い、その糖鎖結合能獲得メカニズムを解明し、R 型レクチンファミリーの幅広い機能及び分子進化による多様な糖鎖結合能獲得メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) NMR 測定に安定な ^{13}C , ^{15}N ラベル体タンパク質調製法の確立

多核多次元 NMR 測定のためには、安定同位体である ^{13}C , ^{15}N でラベルしたタンパク質が必要である。EW29Ch については、すでに構築済の発現系を用いて、安定同位体ラベル用培地により発現・精製を行い、 ^{13}C , ^{15}N ラベル体 EW29Ch を調製した。SRC についてもすでに発現系は構築済であるが、予備実験で EW29Ch に比べ不安定であることが分かったので、タンパク質精製の過程でラクトースを含むバッファを用い、精製中での安定性を向上させ、精製後、脱塩・バッファ交換用カラムによりラクトースを除去し、遊離状態でも安定な ^{13}C , ^{15}N ラベル体 SRC を調製した。

(2) 遊離状態及び糖結合状態での SRC の NMR 測定とその解析

遊離状態と糖結合状態との SRC のケミカルシフト変化による構造の変化を調べるため、遊離状態、ラクトース結合状態及び 6'-シアリルラクトース結合状態中の ^{13}C , ^{15}N ラベル体 SRC を多核多次元 NMR 法で測定し、それぞれの NMR シグナルを帰属した。さらに、野生体である EW29Ch との構造比較のため、ラクトース結合状態で EW29Ch と SRC それぞれの双極子カップリング値を測定し、その値を比較した。

(3) 遊離状態及び糖結合状態での SRC の ^{15}N 緩和測定による分子内運動解析

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を解析するため、遊離状態、ラクトース結合状態及び 6'-シアリルラクトース結合状態中の ^{15}N ラベル体 SRC を ^{15}N 緩和法 (T_1 , T_2 , $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N 異種核間 NOE) により測定した。

(4) NMR による糖側からのタンパク質との相互作用部位の解析

溶液中での 6'-シアリルラクトースの SRC との相互作用部位を解析するため、非ラベル体 SRC に過剰量の 6'-シアリルラクトースを添加した NMR 試料を用いて、飽和移動差 (STD: Saturation Transfer difference) -NMR 法〔雑誌論文〕により測定した。また、溶液中でのラクトースの EW29Ch との相互作用部位解析については、 ^{13}C ラベル体ラクトースに非ラベル体 EW29Ch を添加する NMR-titration 法により測定した。

4. 研究成果

最初に、今回の改良法により調製した ^{13}C , ^{15}N ラベル体 SRC の安定性を経時的に調べた結果、遊離状態でも 15 での NMR の長期測定において十分安定であることを確認した。

次に、 ^{13}C , ^{15}N ラベル体 SRC を用いて、多核多次元 NMR 法により、遊離状態、ラクトース結合状態及び 6'-シアリルラクトース結合状態でのそれぞれの NMR シグナルを帰属し、主鎖については、糖結合状態では、95%以上帰属できたが、遊離状態では、91%程度の帰属であった。その理由として、野生体である EW29Ch と同様に、X 線結晶構造解析により糖との結合に参与することが推測されるサブドメイン 中の幾つかの残基の NMR シグナルが、遊離状態では観測されず、糖との結合により観測されるためであった。糖との結合様式については、SRC と EW29Ch のそれぞれのサブドメイン における遊離状態とラクトース結合状態とのシグナルの変化が類似していること、さらに、ラクトース結合状態での EW29Ch と SRC それぞれの双極子カップリング値による主鎖構造の比較から、X 線結晶構造解析での結果と同様、サブドメイン でのラクトースとの結合様式が、溶液中でも SRC と EW29Ch で類似していることが示唆された。一方、サブドメイン については、その双極子カップリング値による主鎖構造の比較から、X 線結晶構造解析の結果と同様に、SRC と EW29Ch では主鎖構造が異なっていることも分かった。また、6'-シアリルラクトース結合状態での SRC のシグナルでは、サブドメイン 及びサブドメイン 中の 6'-シアリルラクトースとの結合に参与する残基及び近傍の残基のケミカルシフト値がラクトース結合状態での SRC のシグナルと異なるとともに、同じ残基に対して同時に 2 つのシグナルを観測されることも分かった。その 2 つのシグナルのケミカルシフト値は、遊離状態での SRC のケミカルシフト値とも異なることから、6'-シアリルラクトース結合状態において、X 線結晶構造と異なり、溶液中では、遊離状態及びラクトース結合状態と異なる 2 つのコンフォメーションをとることが示唆された。また、ZZ 交換測定法による 2 つのコンフォメーション間の化学交換速度を測定した結果、数十~数百 ms オーダーであることが分かった。なお、2 つのコンフォメーションの違いを原子レベルで解析するため、現在、NMR により溶液中での立体構造解析を進めている。

^{15}N 緩和法による遊離状態及び糖結合状態での SRC の分子内運動解析では、遊離状態及びラクトース結合状態での EW29Ch の分子内運動解析の結果〔雑誌論文〕と遊離状態及びラクトース結合状態での SRC の分子内運動解析の結果の比較から、サブドメイン 中のループ領域 (K233 - A240) の分子内運動が著しく高いことが分かった。また、6'-シアリルラクトース結合状態でも、ラクトース結合状態と同様に、サブドメイン のル

ープ領域の分子内運動が著しく高かったが、ループ中の残基である A240 の分子内運動は抑制されており、S239 とシアル酸との水素結合形成によるものと思われる。以上の結果から、このループ領域の分子内運動の大きな変化が、シアル酸との結合に重要であることが分かった。

最後に、NMR による糖側からのタンパク質との相互作用部位の解析についてであるが、糖結合タンパク質 - 糖鎖間との相互作用解析において、タンパク質側だけでなく、糖側からのタンパク質との相互作用部位を解析することは重要であることから、本実験を行った。最初に、ラクトースの EW29Ch との相互作用部位を解析するため、市販されている ^{13}C ラベル体ラクトースに非ラベル体 EW29Ch を添加し、ケミカルシフト変化を調べた。その結果、ラクトースのガラクトース残基のみ変化が見られたことから、ラクトースは、EW29Ch とガラクトース残基のみで相互作用し、グルコース残基とは相互作用しないことが分かった。X 線結晶構造解析では、ラクトースのグルコース残基も EW29Ch の糖結合部位と相互作用していることが報告されているが、今回の結果から、その相互作用はアーティファクトと思われる。次に、6'-シアリルラクトースの SRC との相互作用部位を、非ラベル体 SRC に過剰量の 6'-シアリルラクトースを添加し STD-HSQC 法により解析した結果、ラクトース部分については、EW29Ch - ラクトース間と同様に、ラクトースのガラクトース残基のみ相互作用することが分かった。また、シアル酸については、SRC との水素結合を形成する部位以外でも相互作用することが示唆された。

以上の結果から、すでに SRC - 6'-シアリルラクトース複合体の X 線結晶構造解析により、その結合様式が報告されているが、今回の NMR による動的構造解析により、1) 6'-シアリルラクトースとの結合状態で SRC は 2 つの異なるコンフォメーションをとること、2) 進化工学的手法による改変により生じた SRC のサブドメイン 中のループ領域の分子内運動の著しい変化がシアル酸との結合に重要であること、3) 糖側のタンパク質との相互作用部位解析から、6'-シアリルラクトースのシアル酸は、SRC と水素結合を形成する部位以外でも相互作用することが、新たに判明した。特に、糖鎖結合状態でレクチンが 2 つのコンフォメーションをとる、という研究成果は、私の知りうる限り初めての発見であり、国際的国内的に大変重要な知見である。今後、さらに、2 つのコンフォメーションの立体構造解析や溶液中での糖鎖との複合体構造解析等を行い、シアル酸含有糖鎖結合能獲得メカニズムをより詳細に解明していく予定である。また、今回の研究成果より、R 型レクチンのシアル酸含有糖鎖結合能獲得メカニズムを原子レベルで解明する上で、X

線結晶構造解析だけでなく、NMR による動的構造解析が不可欠であることを改めて認識することができた。

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)

Hikaru Hemmi, NMR analysis of carbohydrate-binding interactions in solution: an approach using analysis of saturation transfer difference NMR spectroscopy, *Methods in Molecular Biology*, 1200, 501 - 509, 2014.
doi: 10.1007/978-1-4939-1292-6_41
査読無

Hikaru Hemmi, Atsushi Kuno, Jun Hirabayashi, NMR structure and dynamics of the C-terminal domain of R-type lectin from the earthworm *Lumbricus terrestris*, *FEBS Journal*, 280, 70 - 82, 2013.
doi: 10.1111/febs.12050、査読有

[学会発表](計 6 件)

逸見 光、久野 敦、海野幸子、平林 淳、遊離状態および糖結合状態におけるミミズ由来 R 型レクチン改変体のシアル酸糖結合メカニズムに関する NMR 解析、第 53 回 NMR 討論会、2014 年 11 月 6 日、大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)

逸見 光、久野 敦、平林 淳、NMR analysis of a sialic acid-binding mutant from an R-type lectin in the sugar-free state or in the sugar-bound states, 26th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2014 年 8 月 25 日、Dallas (アメリカ合衆国テキサス州)

逸見 光、久野 敦、海野幸子、平林 淳、分子進化工学的手法によるミミズ由来 R 型レクチン改変体のシアル酸結合メカニズムに関する NMR 解析、第 52 回 NMR 討論会、2013 年 11 月 14 日、石川県立音楽堂(石川県金沢市)

逸見 光、久野 敦、平林 淳、NMR studies on a novel sialic acid-binding mutant from the C-terminal domain of an R-type lectin from earthworm、5th Asia-Pacific NMR Symposium、2013 年 10 月 28 日、Brisbane (オーストラリア)

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
の異なったラクトース結合状態での NMR
解析、第 51 回 NMR 討論会、2012 年 11 月
10 日、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

逸見 光、久野 敦、平林 淳、NMR
studies on the complex of the
C-terminal domain of R-type lectin
from earthworm with lactose、25th
International Conference on Magnetic
Resonance in Biological Systems、
2012 年 8 月 21 日、Lyon (フランス)

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・
上席研究員
研究者番号：7 0 3 5 3 9 9 3

(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・糖鎖創
薬技術研究センター・上級主任研究員
研究者番号：5 0 3 0 2 2 8 7

平林 淳 (HIRABAYASHI Jun)
独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞
工学研究センター・首席研究員
研究者番号：4 0 1 5 6 6 9 1