

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06977

研究課題名(和文) 海産無脊椎動物由来新規レクチンの構造・機能解析とその応用

研究課題名(英文) structural and functional analyses of novel lectins from marine invertebrates, and its application.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Crassostrea gigas(マガキ)由来マンノース特異的レクチンCGL1、Gyactis japonica(イシワケイソギンチャク)由来ガラクトース特異的レクチンGJL-1、Saxidomus purpurata(ウチムラサキ)由来GlcNAc特異的レクチンSPL-a/bの3種の新規レクチンについて、その構造解析および機能解析を実施した。CGL1の結晶構造解析により、既知のレクチンファミリーには見られないユニークな立体構造および糖との結合様式を明らかにした。GJL-1およびSPL-a/bについても各種解析の結果、既知のレクチンには見られないユニークな特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Structural and functional analyses of novel lectins, CGL1 from Crassostrea gigas, GJL-1 from Gyactis japonica, and SPL-a/b from Saxidomus purpurata, were enforced. Structural analysis of CGL1 revealed its unique fold and binding pattern that have not been confirmed in known lectin families. GJL-1 and SPL-a/b also show unique characteristics as a result of the analyses.

研究分野：X線結晶構造解析

キーワード：X線結晶構造解析 レクチン Crassostrea gigas Gyactis japonica Saxidomus purpurata 糖鎖マ
イクロアレイ 等温滴定型熱量測定

1. 研究開始当初の背景

無脊椎動物における免疫機構は、獲得免疫を持たず自然免疫のみで機能している。その自然免疫において侵入微生物の認識には、侵入微生物の細胞表面に多数存在する微生物特異的糖鎖構造を主にレクチン(糖結合性蛋白質)によって構造特異的に認識されることから、レクチンが微生物認識において極めて重要な役割を担っている事が知られている。このレクチンによる微生物の糖鎖構造認識は、厳密に糖鎖の構造を認識し、かつ生物種の違いにより多様な認識様式が存在し、それ故多様なレクチンファミリーがこれまでに報告されている。海産無脊椎動物の多様性を考慮すると、未発見のレクチンファミリーがまだ多数存在する可能性が高い事が伺える。また、侵入微生物のレクチン認識以降の微生物殺滅までのメカニズムについても、多種多様な無脊椎動物がそれぞれ有している機構は多くが詳細不明であり、その生物固有の機構について非常に興味深い。

以上の事から私は海産無脊椎動物から新規レクチンの探索を進め、その結果3種類の新規レクチン〔*Crassostrea gigas* (マガキ)由来マンノース特異的レクチン CGL1, *Gyralctis japonica* (イシワケイソギンチャク)由来ガラクトース特異的レクチン GJL-1, および *Saxidomus purpurata* (ウチムラサキ)由来 N-アセチルグルコサミン特異的レクチン SPL-a/b) を発見した。

2. 研究の目的

海産無脊椎動物の自然免疫機構は哺乳類における機構とは多くの点で異なり、その独自の機構により侵入微生物等の認識および殺滅を行っているとは推定されるが、その詳細は不明な点が多い。本研究は、自然免疫機構に参与すると考えられる海産無脊椎動物由来の新規レクチンである CGL1, GJL-1, および SPL-a/b の構造・機能解析を行い、それらの生物の各種レクチンによるユニークかつ高度な糖鎖認識機構を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は海産無脊椎動物由来新規レクチン CGL1, GJL-1, および SPL-a/b の構造・機能

解析を行うものである。構造・機能解析のために各種生物から蛋白質(レクチン)を精製後、そのアミノ酸配列決定および結晶構造解析を行った。加えて、各種物理化学的手法による糖特異性解析を行う事で、各レクチンの糖特異性に関する機能を明らかにした。以下に行った実験の詳細について述べる

(1) 各種レクチンの精製 (CGL1, GJL-1, SPL-a/b)

研究材料となる海産生物 (*Crassostrea gigas* (マガキ), *Gyralctis japonica* (イシワケイソギンチャク), および *Saxidomus purpurata* (ウチムラサキ)) をミキサーで破碎後、遠心分離を行う事で上清を得た。得られた上清は、各レクチンに特異的な糖を固定化させた糖固定化カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより、各種レクチンを精製した。固定化する糖および溶出には、目的とするレクチンに特異的な糖を用いる必要がある。CGL1 の固定化糖とその溶出には mannose を用い、同様に GJL-1 および SPL-a/b の精製には、Lactose および N-アセチルグルコサミンをそれぞれ用いた。得られた各レクチンは、さらにゲル濾過クロマトグラフィーによる精製、およびその後の透析・濃縮の後、以降の実験に用いた。

(2) 一次構造の決定 (GJL-1, SPL-a/b)

得られた精製レクチンを用いて、臭化シアンもしくは各種特異的ペプチダーゼによる断片化を行った。このペプチド断片は高速液体クロマトグラフィーによる精製の後、プロテインシークエンサーを用いて部分一次構造の決定を行った。得られた配列情報を元に、縮重プライマーを設計し、各生物個体由来の cDNA ライブラリーをテンプレートとして目的遺伝子のクローニング、および目的 cDNA の全塩基配列を決定した。

(3) 結晶構造の決定 (CGL1, GJL-1, SPL-a)

得られた精製レクチンを 10mg/ml まで濃縮の後、結晶化条件のスクリーニング、結晶化条件の最適化、放射光測定、各種手法による位相決定、モデル構築、構造精密化処理を進め、その結晶構造を決定した。

(4) 質量分析による修飾構造の決定 (CGL1)

CGL1 は結晶構造を決定した結果、N 末端残基が何らかの修飾を受けている事が推測された。この修飾構造を決定するため、CGL1 の

ペプチド断片化、および得られたペプチド断片の精密質量分析によりN末端修飾構造を決定した。

(5) 糖特異性の解析 (CGL1, GJL-1, SPL-a)

精製レクチンの糖特異性に関して調べるため、各種動物由来赤血球を用いた赤血球凝集活性測定、および各種糖を用いた凝集阻害測定を行った。凝集阻害活性測定により、特異的に結合する糖が推定されたものについては、等温滴定型熱量測定(ITC)により、糖との結合力を求めた。多様な複合糖鎖構造に対する特異性を明らかにするため、糖鎖マイクロアレイ解析およびフロンタルアフィニティクロマトグラフィーを用いた解析を行った。

4. 研究成果

(1) 一次構造決定 (GJL-1, SPL-a/b)

GJL-1の全一次構造を決定した。このGJL1のアミノ酸配列は、既知のレクチンとは全く相同性を有しないことから、新規のレクチンファミリーに属するユニークなレクチンである事が明らかとなった。またこのGJL1遺伝子のDNA配列は、イソギンチャク類で現在までに唯一ゲノム情報が明らかになっている *Nematostella vectensis* に存在する機能未知遺伝子のみと相同性を示すことから、このGJL1のレクチンファミリーは、イソギンチャク類のみに存在するユニークなレクチンファミリーであることが示された。

SPL-a/bの全一次構造を決定した結果、SPL-aはA鎖およびB鎖からなるヘテロダイマー、またSPL-bはB鎖のみからなるホモダイマーであることがわかった。A鎖、B鎖は共にC型レクチンとの相同性を有する一方、C型レクチンに特徴的な糖鎖結合モチーフが存在しないことがわかった。

(2) free タイプ結晶構造の決定 (CGL1, GJL-1, SPL-a/b)

CGL1, GJL-1, SPL-a/bのそれぞれについて結晶化を実施した。得られた結晶を用いてCGL1およびGJL-1については硫黄原子の単波長異常分散(S-SAD)法により位相決定を行い、SPL-a/bについては鉛原子誘導体結晶を用いた単波長異常分散(Pb-SAD)法により位相決定を行い、結晶構造を決定した(図. 1~3)。

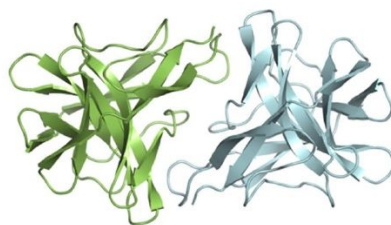


図1. CGL1の結晶構造

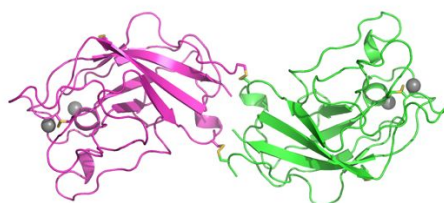


図2. GJL-1の結晶構造

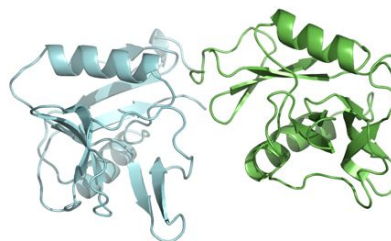


図3. SPL-aの結晶構造

得られたCGL1およびGJL-1の立体構造は、一次構造から予見された通り、既知のレクチン構造とは全く異なる立体構造を有していることがわかった。SPL-aはA/B鎖のヘテロダイマー、SPL-bはB鎖のホモダイマーを形成しており、各鎖の構造はいずれもC型レクチン構造と類似していた。

(3) 糖複合体結晶構造の決定 (CGL1)

CGL1をマンノースと結合させた糖複合体を調製し、それを用いて結晶化を実施した。得られた結晶について、放射光測定およびその回折データ処理により、CGL1-マンノース複合体の結晶構造を決定した(図. 4)。

得られた複合体構造から、CGL1がマンノースおよび複合糖鎖中の末端マンノース残基を特異的に認識し、結合する様式が明らかとなった。

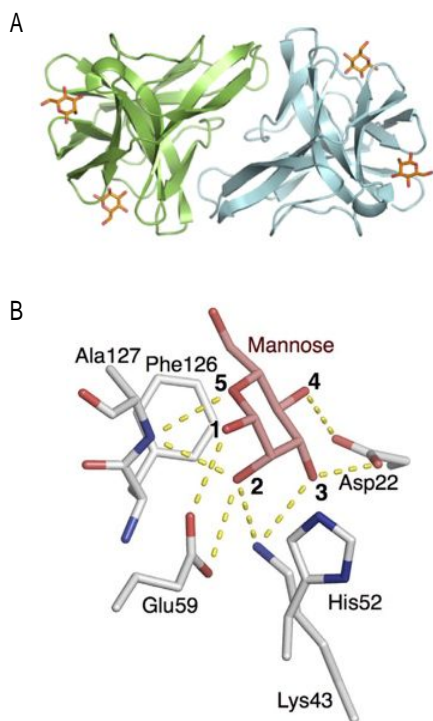


図4. CGL1-マンノース複合体の結晶構造
A. 全体構造, B. マンノース結合部位の構造

(4) 糖特異性解析 (CGL1, GJL-1, SPL-a/b)
CGL1 については、糖鎖マイクロアレイ解析、フロントアルフィニティクロマトグラフィー解析および ITC 測定により、GJL1 がマンノースモノマーおよび複合糖鎖中の末端マンノース残基を特異的に認識する事が明らかとなった。

GJL1 に関しては、糖鎖マイクロアレイ解析の結果、ガラクトースモノマーおよび複合糖鎖中の末端ガラクトース残基のみに特異的に結合する事が明らかとなった。

SPL-a/b に関しては、ITC 測定により N-アセチルグルコサミンに特異的に結合する事を確認した。またその SPL-a/b による結合はカルシウムイオン非存在下でも確認された事から、SPL-a/b はカルシウム非依存性を有する C 型レクチンである事がわかった。

(5) 論文発表等

CGL1 に関する以上の研究成果は、論文報告を行った (Unno H et. al, *Scientific Reports*, **6**, 29135, (2016))。加えて、本研究により CGL1 が糖鎖解析のツールとして有用である事が明らかとなり、試薬メーカー (コスモバイオ (株)) を通して CGL1 の販売を開始した。

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)

(1) Carbohydrate recognition by the rhamnose-binding lectin SUL-I with a novel three-domain structure isolated from the venom of globiferous pedicellariae of the flower sea urchin *Toxopneustes pileolus*. Hatakeyama T, Ichise A, Unno H, Goda S, Oda T, Tateno H, Hirabayashi J, Sakai H, Nakagawa H., *Protein Science*, **26**(8), 1574-1583, (2017)
査読有り
doi: 10.1002/pro.3185.

(2) Identification, Characterization, and X-ray Crystallographic Analysis of a Novel Type of Mannose-Specific Lectin CGL1 from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Unno H, Matsuyama K, Tsuji Y, Goda S, Hiemori K, Tateno H, Hirabayashi J, Hatakeyama T. *Scientific Reports*, **6**, 29135, (2016)
査読有り
doi: 10.1038/srep29135.

〔学会発表〕(計14件)

(1) 樋口周平, 板倉周平, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, C 型レクチン SPL の立体構造と Ca^{2+} 非依存的糖結合特異性 2017 年12月6日~9日 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸)

(2) 畠山智充, 板倉周平, 郷田秀一郎, 海野英昭, 二枚貝ウチムラサキレクチン SPL の立体構造と糖認識機構 第17回日本蛋白質科学会年会 2017年6月20日~22日 仙台国際センター (宮城・仙台)

(3) 中村梓, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, イシワケイソギンチャク由来 Ca^{2+} 依存性レクチン GJL-1 の構造と糖認識能 2016年9月15日~16日 日本農芸化学会 2016年度西日本支部大会 長崎大学文教キャンパス (長崎・長崎)

(4) 板倉周平, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, Ca^{2+} 非依存性 C 型レクチン SPL の糖認識機構 2016年9月15日~16日 日本農芸化学会 2016年度西日本支部大会 長崎大学文教キャンパス (長崎・長崎)

(5) 板倉周平, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, ヘテロ二量体からなる新規二枚貝由来 C 型レクチン SPL の構造と糖結合特性 第89回日本生化学会大会 2016年9月25日~27日 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス (宮城・仙台)

(6) 宮崎秀土, イシワケイソギンチャクレクチン GJL2 の機能構造解析 第40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 2016年8月26日～28日 指宿ペイテラス(鹿児島・指宿)

(7)板倉周平, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, ウチムラサキ由来C型レクチン SPL のcDNAクローニング及びX線結晶構造 平成28年度日本生化学会九州支部例会 2016年5月14日～15日 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島・鹿児島)

(8)中村梓, 及川大翔, 森 紳伍, 舘野浩章, 平林 淳, 山口健一, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, イシワケイソギンチャク由来新規Ca²⁺依存性レクチンGJL-1の立体構造と糖認識機構 平成28年度日本生化学会九州支部例会 2016年5月14日～15日 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島・鹿児島)

(9)中村梓, 及川大翔, 森伸伍, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, イシワケイソギンチャク由来Ca²⁺依存的ガラクトース特異性レクチンGJL-1の糖結合特異性と立体構造 第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日～4日 ポートアイランド(兵庫・神戸)

(10)板倉周平, 細田耕平, 須川穰二, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, ウチムラサキ由来レクチン SPL のcDNAクローニング及び構造機能解析 日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同大会 2015年9月17日～18日 愛媛大学樽味キャンパス(愛媛・松山)

(11)中村梓, 及川大翔, 森紳伍, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充, イシワケイソギンチャク由来新規Ca²⁺依存性レクチン GJL-1の構造解析と糖認識 日本農芸化学会 2015年度中四国・西日本支部合同大会 2015年9月17日～18日 愛媛大学樽味キャンパス (愛媛・松山)

(12)海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, マガキ由来レクチン CGL-1 の構造・機能解析 第15回日本蛋白質科学会年会 2015年6月24日～26日 あわぎんホール(徳島・徳島)

(13)海野英昭, 辻慶輝, 伊東利樹, 郷田秀一郎, 畠山智充, マガキ由来レクチン CGL-1 の構造・機能解析 平成27年度日本生化学会九州支部例会 2015年5月16日～17日 九州大学(福岡・福岡)

(14)中村梓, 及川大翔, 森紳伍, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充, ガラクトース特異的Ca²⁺依存性レクチンGJL-1のcDNAクローニングとX線結晶構造解析 平成27年度日本生化学会九州支部例会 2015年5月16日～17日 九州大学(福岡・福岡)

[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