

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510218
 研究課題名（和文）海藻レクチンの高分解能立体構造にもとづく新規な糖鎖センサーの基盤確立
 研究課題名（英文）Structural basis establishment of the sugar sensor based on the new lectin family of alga lectin
 研究代表者
 片柳 克夫（KATAYANAGI KATSUO）
 広島大学・大学院理学研究科・准教授
 研究者番号：20291479

研究成果の概要：本研究は今まで構造研究が着手されていなかった新しいレクチンファミリーに属する海藻レクチンに属するいくつかのレクチンに着目して構造学的研究を進めたものである。このレクチンは多くのレクチンと異なり単糖には結合せず高マンノースのみに結合する特異的な性質を持ち、また近年、強力な抗 HIV ウィルス作用を持つことがわかってきた。本研究ではその分子構造を X 線解析による詳細に解明し、この新規レクチンファミリーの構造的基盤を構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体高分子，糖鎖センサー，レクチン，結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

レクチンは赤血球凝集素として着目され、また今までにもマメ科や小麦胚、ジャガイモなどをはじめとする多くのレクチンが研究され、その立体構造も解明されてきているが凝集素としての機構はよくわかっていない。研究分担者の堀が世界でも先駆的に研究してきた海藻由来のレクチンは、まだやっとその存在が明らかにされてきたばかりと比べてよく、構造機能相関の研究はまだほとんどなされておらず、現在の研究情勢からは、新

しいレクチンカテゴリーとして着目されている。したがって本研究は世界で類を見ない研究が展開できる点で、極めて独創的である。海藻は植物界の中でもっとも原始的な部類に属するもので、また水界という特殊な環境に存在するものであり、高等植物のレクチンとは構造も機能もかなり異なる蛋白質である。高等植物のレクチンは貯蔵・生長・生体防御および共生などに関与しているという説が提唱されているが、これらはある特定の機能を持った祖先レクチン（海藻レクチン）分子が進化の過程で機能分化したことを

物語っていると考えられる。

その中でも特に着目しているのが紅藻由来のレクチン **ESA-2** であり、この蛋白質は 268 アミノ酸残基からなる単一ポリペプチド鎖で N 末端 67 残基が 4 回繰り返した配列を持っており（前ページ参照）、同一ポリペプチド鎖内に 4 つの糖鎖結合部位を持っている。種々の糖鎖との結合性を調べた結果、高マンノース型糖鎖とのみ結合し、また既知のレクチンには見られない厳密な糖鎖認識機構を持つことが判明している。また発癌性マウスに対して **ESA-2** を経口投与した動物実験から、極めて強い抗ガン作用を持つことも明らかになっている。

2. 研究の目的

したがって本研究では、「高マンノース特異的センサー」ともいえる、海藻由来の新規レクチンファミリーに研究対象とし、X 線構造解析により原子レベルでの詳細な立体構造を解明して、この新規レクチンファミリーの応用開発的基盤づくりを構築することを目的とした。なおこの新規レクチンファミリーは近年、抗 HIV 活性があることも判明し、抗マンノースセンサーの役割が医学的研究の端緒になることも期待されている。

なお、すでに多くの構造研究がなされているマメ科レクチンとの大きな特色の違いは、①1 次構造で繰り返し配列がありサブユニット構造ではなくドメイン構造であると予想される、②マメ科レクチンでは糖との結合に金属が必要だったがこの新規レクチンでは不要、③マメ科レクチンでは認識される糖鎖基質の特異性がほとんど無くブロードであるがこの新規レクチンでは高マンノース糖鎖のみに特異的に結合する、などが挙げられ分子立体構造の解明は極めて重要な意味をもつ。

3. 研究の方法

(1) 新規海藻レクチンファミリー **ESA2** の結晶構造解析

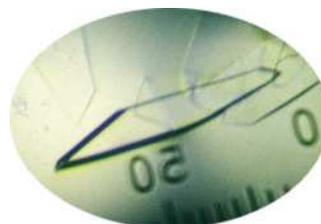
海藻由来新規レクチンファミリーのうち紅藻 (*Eucheuma Serra*) 由来のレクチン **ESA-2** は海藻から取れるレクチンでも最もその量が多く、まずこれを結晶構造解析の対象とした。

紅藻からクロマトグラフィーで分取・精製した **ESA-2** タンパク質は非常に高純度のものがとれ、これをハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。しかし得られた結晶は構造解析には好ましくない多結晶でありまた結晶ができるまで約 1 ヶ月かかる

などの不便な点があった。

そこで本研究では、最初に得た多結晶を単結晶としてマイクロシーディングを行いシッティングドロップ蒸気拡散法により面積が 0.2-3mm で暑さ 20 ミクロン程度の板状の単結晶を得ることに成功した(図 1)。

図 1
海藻レクチン **ESA-2** の単結晶



結晶はまず、理学 RAxis 7 で結晶性の評価や空間群を同定した。そして回折データの収集は SPring-8 や高エネルギー加速器研究機構の大型放射光施設に設けられた X 線回折装置を用いて行った。

新しいレクチンファミリーであり類似の立体構造を持つレクチンは無かったため、重原子同形置換法により初期位相を決定した。約 50 個に及ぶ重原子誘導体の X 線回折データ収集を上記の大型放射光施設に赴いて行った。画像回折データからの積分強度への数値化処理はプログラム HKL2000 を用いた。また構造決定は CCP4, SOLVE/RESOLVE プログラムを用いた。また結晶学的精密化計算は XPLOR と REFMAC プログラムを併用し、電子密度への構造モデルの適合は XtalView プログラムを用いた。

(2) この新規レクチンファミリーに属するその他の海藻レクチンの構造解析

ESA-2 に引き続き、同じファミリーに属する **ECA-1**, **EAA-2** について結晶化を行い、**ESA-2** と同様の板状結晶を得た (図 2)。**ESA-2** と同様の方法で X 線回折データの収集と結晶構造解析を行った。ただし、今回は我々の得ている **ESA-2** の立体構造があり、**ECA-1**, **EAA-2** ともに類似の分子構造を持つと予想されたため、重原子同形置換法ではなく分子置換法を用いて構造解析計算を進めた。

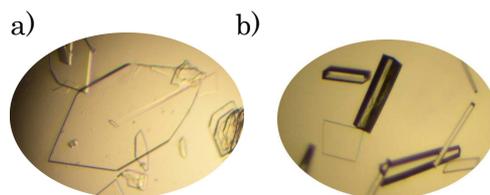


図 2 a)EAA-2, b)ECA-1 の単結晶

(3) 新規海藻レクチンと基質高マンノース糖鎖複合体の結晶化

ESA-2 単体の立体構造が得られたので、次に糖鎖結合様式を分子レベルで解明すべく ESA-2 と糖鎖との複合体の結晶を得ることに臨んだ。高マンノースにしか結合しないレクチンであるため、基質糖鎖として M5 糖鎖を用いることとした。結合性については、研究分担者に確認してもらっており、問題なかったが、非常に高価な糖鎖であったため (20 μg で 2 万円) これをそのまま ESA-2 タンパク質に結合させて結晶化のスクリーニングを行うことは量の点からほぼ不可能であった。

一方、(1)に述べた ESA-2 単体の単結晶は 20 μm のきわめて薄い結晶であることから、結晶の大きさを考えるとこの結晶に M5 糖鎖を結合させれば 20 μg の基質糖鎖の量は計算上は十分な量であることがわかったので、基質をタンパク結晶に結合させることを試みた。しかし、結合があまりにも強すぎて結晶を 1 時間もたたないうちに破壊してしまうことが判明した。これは ESA-2 だけでなく ECA-1、EAA-2 の場合も同様の結果であった。

(4) 新規レクチン OAA の結晶化

アオコから得られる OAA もこのレクチンファミリーに属するが、ペプチド鎖長は他のものに比べて半分の長さである。したがってこの結晶構造は他のファミリーのドメイン構造に有益な観点が見られることを期待して結晶化に臨んだ。しかしながら海藻から得られる量は ESA-2 などに比べてかなり少なく天然抽出タンパクでは結晶化条件を導くにはいたらなかった。

(5) 大腸菌組換えレクチンの構築

(4)のような問題を解決するためには、天然抽出レクチンでは限界がある。そこで、研究分担者によりまず OAA について大腸菌組換えタンパク質が構築された。

(6) 組換えレクチンを用いた糖鎖との共結晶化

組換えレクチン OAA について高マンノース糖鎖との複合体結晶化を試みている。

4. 研究成果

(1) 海藻レクチン ESA-2 の立体構造解明

重原子同形置換法により、新規に ESA-2 の立体構造を解明した。図 3 に示すように、2 つの β バレル構造によるドメインがつながった構造であることが判明した。

ESA-2 の 1 次構造は、発表論文 1 で公表した。この 1 次構造に基づき構造精密化計算を進めた。分解能はこの科研の最初のころは薄

板結晶であったため最大で 1.5 \AA であっても、データセット全体では 1.7 \AA であったが、結晶作成法の改善により 1.5 \AA 分解能まで改善できた。この高分解能データセットで $R=0.18$ ($R_{\text{free}}=0.21$) まで収束させることができた。

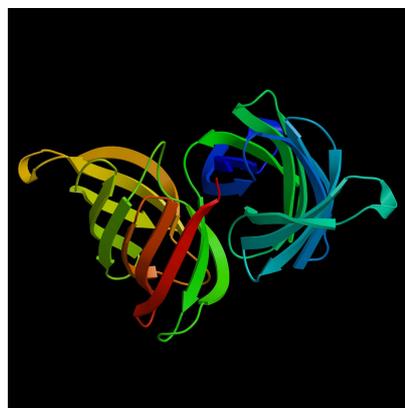


図 3 新規なレクチンファミリーに属する海藻レクチン ESA-2 の結晶構造

1 次構造から見出されていた 4 つの繰り返し配列のドメインを重ね合わせると驚く程よく一致していることがわかった (図 4)。

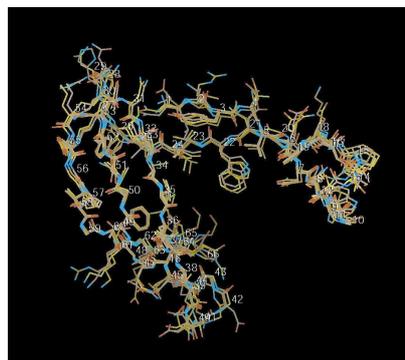


図 4 海藻レクチン ESA-2 の繰り返し配列を構成するドメインの重ね合わせ

また分解能の向上により、グリセロールや Mg^{2+} が結晶作成の段階で配位していることも判明した。なお、活性測定で ESA-2 活性には金属が不要であることがわかっている。

(2) 以外の海藻レクチンの構造解明

ESA-2 の立体構造をもとに、結晶が得られている EAA-2 と ECA-1 の構造解析に成功した。2 つとも ESA-2 とほぼ同一の構造であった (ただし ECA-1 はまだ 1 次構造が決定されていないため、側鎖を含めた構造解析は完了していない)。したがって高マンノース特異的な新規レクチンの立体構造モチーフは

ESA-2 に代表されることが判明した。

(3) ESA-2 の糖鎖認識部位の推定

高等植物レクチンで海藻レクチンに最も近いものとしてヒガンバナ由来レクチン GMA の糖鎖結合型構造が解明されている。そこで ESA-2 と GMA-糖鎖との立体構造を比較した。その結果、GMA で糖鎖と相互作用している Q26-D28-N30-V32-Y34 の β strand と ESA-2 の Y3-V5-N7-Q8 が 1 次構造と 3 次構造の点から酷似していることが判明した。したがってこの近辺が ESA-2 の糖鎖認識部位と考えられる。

(4) 新規海藻レクチンファミリーの高マンノース糖鎖複合体結晶の作成

基質糖鎖を M5 糖鎖にしたが、この糖鎖は高価なものであったため、ESA-2 結晶を M5 糖鎖溶液に浸漬させることで、ESA-2 と糖鎖との複合体結晶を得ようとした。しかしながらわずかに数分で結晶は X 線を回折しなくなり、崩壊してしまう。これは糖鎖とレクチンの結合が強すぎるため、結集を崩壊してしまうと考えられた。EAA-2 や ECA-1 の場合も同様であった。したがって、浸漬法では複合体結晶を得ることは困難であり、共結晶法を行うこととした。

幸い、研究期間中に M5 糖鎖がより安価に入手できる先が見つかり共結晶化ができる環境が整ったので現在組換え OAA と M5 糖鎖の共結晶化を行っている。

(5) 大腸菌組換えレクチンの発現—精製系の確立

海藻レクチンは、ESA-2 は海藻から取れる量が多いが少ない量しか取れないものが多く結晶解析を進める上で困難であった。特に OAA のような ESA-2 とはペプチド長の大きく異なるものについて大腸菌組換えレクチンが得られた（発表論文 2）ことは今後のレクチンの構造機能相関解析を行う上で非常に有益である。

以上、今までマメ科レクチンに比べほとんど構造学的基盤の無かった新規のレクチンファミリーである海藻レクチンの一連のタンパク質について高分解能の立体構造による構造的基盤を作ることができた。これらの海藻レクチンは抗 HIV ウィルス作用が強くこれらの構造的基盤が医学分野でも応用できることを期待する。

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 2 件）

1. Sato,Y., Okuyama,S., Hori,K. Primary structure and carbohydrate binding specificity of a potent anti-HIV lectin isolated from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* *J.Biol.Chem.* 査読有 **282**, (2007) 11021-11029

2. Sato,Y., Ito,K., Fujiwara,Y., Iwamoto,Y., Makino,H., Hori,K. Strict specificity for high mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Euclima serra* lectin *Glycobiology* 査読有 **17**, (2007) 467-478

〔学会発表〕（計 1 件）

1. Crystal structure of algae lectin ESA2, which belongs to a new lectin family Kamiya Y., Hori K., Gekko K., and Katayanagi K. (CBI conference 2007, Hiroshima, 2007.10.3-5)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片柳 克夫 (KATAYANAGI KATSUO)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20291479

(2) 研究分担者

堀 貫治 (HORI KANJI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：50116662

(3) 連携研究者