

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12750

研究課題名(和文) レクチン 糖相互作用を利用した低分子化合物の直接構造決定

研究課題名(英文) A direct structure determination using lectin-carbohydrate complex

研究代表者

酒井 隆一 (Sakai, Ryuichi)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：20265721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず海綿レクチンCchGを精製、そしてリガンドとしてCchGとの親和性が高いラクトース(Lac)を原料として、アミノ酸と混合するだけで容易に結合するプローブ分子である1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン 5-(1-アミノラクトシド)(LacDNFB)を合成した。次に、ラクトース、LacDNFBおよびLacDNFBとアラニン相结合したLacDNFB-AlaとCchGの共結晶の作成を試みたところ、LacおよびLacDNFBとの共結晶が得られた。これらのX線構造解析を行ったところ、ラクトース-CchG複合体の構造が得られ、ラクトースの+1位に未知分子を導入する余地があることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Lectins, carbohydrate binding proteins, bind to sugars. We have isolated a galactose binding lectin CchG from the marine sponge *Cinachyrella* sp. that forms a rigid tetramer in the crystalline state. If the lectin-carbohydrate complex can be crystallized and its structure solved, the structure of the carbohydrate bind to the protein will be visualized. We extended this idea to determine the structure of glycosylated small molecules; that is, if a small molecule was glycosylated with the sugar that can bind to the lectin, the structure of the glycoside would be visualized directly by X-ray crystallography at the atomic level. We thus tested our concept by synthesizing 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene-5-(1-aminolactoside) (LacDNFB) which can readily couple with amino acids. In crystallization of CchG-lactose, CchG-LacDNFB, and CchG-LacDNFB-alanine complexes, and crystal structure for CchG-lactose showing that +1-end of the sugar had a space to hold molecule to be visualized, was solved.

研究分野：水産科学

キーワード：レクチン X-線構造解析 直接構造決定

1. 研究開始当初の背景

レクチンは特定の糖や糖鎖を、複数の結合部位で認識して結合するタンパク質である。これまでに我々のグループでは、海綿の抽出物より神経シナプス受容体の調節物質としてガラクトース結合性レクチン CchG を得、その X-線結晶構造解析から CchG はドーナツ型の安定な 4 量体 (50kD) を形成するこれまでにない構造を持つレクチンであることを明らかにした(図 1) [1]。これに加え CchG

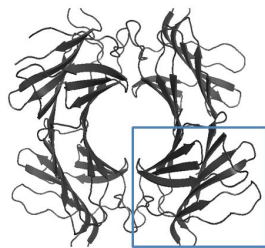


図1. 海綿レクチンCchG 4量体の構造. □は単量体

は 100 の熱処理を行っても活性を示すなど、例外的ともいえる高い安定性を有する特異なレクチンある。そこで、「CchG と高い親和性を持つガラクトース誘

導体に低分子化合物を簡易な手法で結合し、CchG との共結晶を作成、その X-線構造解析を行うことで、低分子化合物の直接的な構造決定が可能になるのではないかと本研究を着想した。しかしこれまでレクチンの糖結合性を応用し、未知化合物の直接的構造決定に利用するという研究は皆無であった。一方で近年、東京大学のグループが「結晶スポンジ」という新しい直接構造決定の手法を開発し、国際的に大きく注目されている[2]。これは人工の格子構造を形成する化合物(結晶スポンジ)に未知物質を取り込ませ、複合体の X-線構造解析を行うもので、原理は本提案と異なるが化合物の直接構造決定を可能にする点は共通している。しかし結晶スポンジ法も万能ではなく、取り込まれた分子の分解能、親水性分子や大きい分子(ステロイド程度)の格子内への取り込みが難しいといった欠点があるとされる。

参考文献

[1] Ueda *et al.* *Glycobiology* **2013**, 412-425. Freymann *et al.* *Acta Crystallogr. Sec. D*, **2012**, 1163-1174. [2] Inokuma *et al.* *Nature* **2013**, 496, 461-465

2. 研究の目的

本研究ではレクチン用い、適切な糖の誘導体(糖プローブ)を低分子化合物と結合させた配糖体を作成、その配糖体-レクチン複合体の X-線結晶構造解析を行うことで、取り込まれた未知化合物の構造を直接決定する、という申請者のアイデアを立証することを目

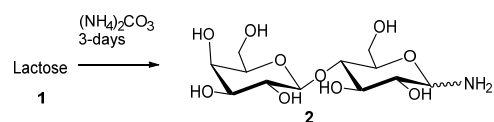
的とした。

3. 研究の方法

大腸菌に遺伝子を組み込むことで発現したリコンビナント CchG および、海綿より得られた天然物を大量に調整する。次にラクトースに簡単な反応で各種低分子化合物を結合させる反応を開発する。得られたラクトースと低分子化合物の配糖体をレクチンと混合し、結晶化を行い得られた共結晶の X-線構造解析を行う。

4. 研究成果

まず、CchG を大量に得るために海綿抽出物の精製を行うとともに、大腸菌を宿主とした発現系に CchG 遺伝子を組み込み、リコンビナントレクチンを得た。次にラクトースプローブを合成するため、lactose(1)の 1 位をアミノ化、1-deoxy-1-amino lactose (2)を得た(図 2)。



Likhoshershtov *et al.* *Carbohydrate Res*, **1986** C1-C5

図 2. 化合物 2 の合成

次に、2 と 1,5-difluoro-2,4,-dinitro benzene (3)を反応させ、4 を得た。さらにそれにアミノ酸(トリプトファン、アラニン)を結合し、配糖体 5-6 を合成した。この手法で、アミノ基を持つ化合物が容易にラクトースプローブに結合することが分かり、当初計画した「混ぜるだけ」でアミノ基の配糖化を行うことに成功した。ただし、塩基にピリジンを用いた際はピリジンが置換した生成物が、またリジンを用いた場合は 4 つの生成物が生じた。

これらの化合物と CchG の親和性を等温滴定熱量計を用いて測定したところ結合定数 (K) がラクトース、化合物 4、5 でそれぞれ 529、1050、1980 となりラクトースの 1 位が修飾されても相対的な結合性に大きな影響がないことが示された。

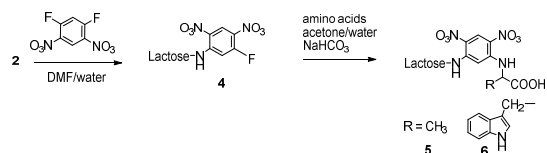


図 3. 化合物 5, 6 の合成

そこで、ラクトース、化合物 4 と 5 をそれぞれ

れ用い CchG との共結晶を作成した結果ラクトースおよび 4 をリガンドとした際に結晶を生じたが、複合体の結晶構造解析に成功したものはラクトースとの共結晶であった。これまで CchG の結晶はアポ体でしか得られておらず、どのように糖が結合しているのかは不明であったが、この結果から糖とレクチンの原子レベルでの結合モードが明らかとなった。

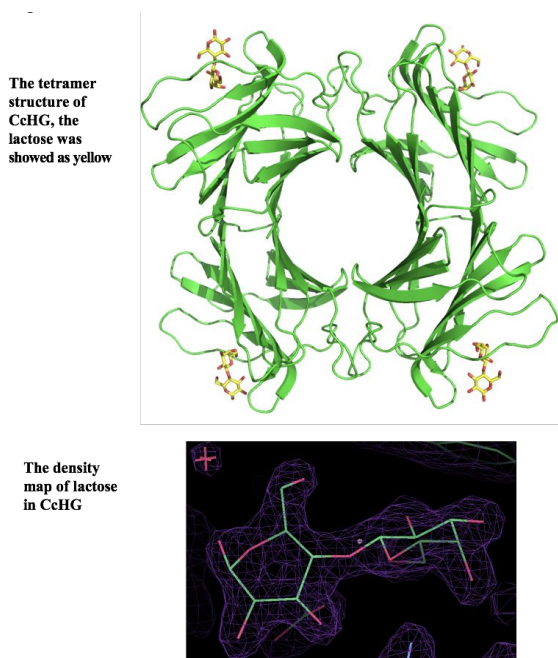


図 4. ラクトースと CChG 複合体の結晶構造

CchG-lactose 複合体の構造は、リガンドなしの CchG をサーチモデルに用いた分子置換法により決定した。Fo-Fc マップにて、ラクトースに由来する明瞭な電子密度が確認された(図 4)。ラクトース中の、-1 位, +1 位のグルコースは、いずれもイス型のコンフォメーションを形成していた(図 5)。

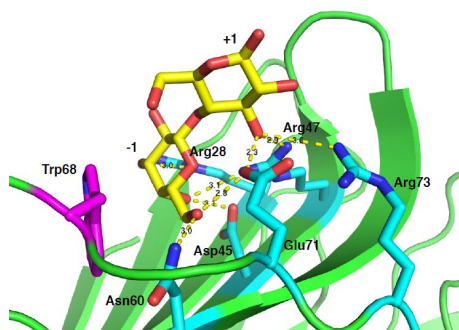


図 5. ラクトースと CChG 複合体の結合

図 5 に示した通り,ラクトースは塩橋ネットワークとファンデルワールス相互作用に

て CchG に認識されていた。Arg28, Asp45 及び Asn60 の側鎖は -1 位のグルコースを、また、Arg73 の側鎖は +1 位のグルコースを認識していた。Arg47 と Glu71 の側鎖は、-1 位および +1 位のグルコースと結合していた。Trp68 の側鎖は、-1 位のグルコースとスタッキングして相互作用していた。

現時点では、X-線構造解析に成功したのは残念ながらラクトースをリガンドとしたもののみであった。しかし、今回の成果から未知化合物を導入するラクトース 1 位は立体的に障害が無いことが分かり、計画の妥当性が示された。また複合体の結晶化や解析の条件が明らかになったので他の配糖体についても、結晶構造を得てゆく予定である。

本研究では最終的にいろいろな官能基を持つ化合物を簡易な反応で配糖化し、ラクトースプローブと結合させることを目指している。コンセプトとしては、無保護の反応系でラクトースと様々な官能基を持つ化合物を「混ぜるだけ」で反応させ、結晶構造解析に用いることができる糖プローブを作成することである。しかし、得られた糖プローブが構造解析可能な結晶を与えるかは予測ができないので、多様な糖プローブを用意する必要がある。そこで本研究では 2 を変換してチオイソシアネート基を導入する反応(図 6、Entry1、2)。

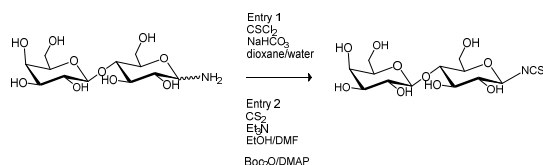


図 6. イソチアネート基の導入

Tanaka らの手法を参考に強力な縮合剤である DMC を用いた反応(図 7、Entry 3)の開発を試みたがいずれも難航しており「容易な配糖化」反応の開発には時間がかかる。

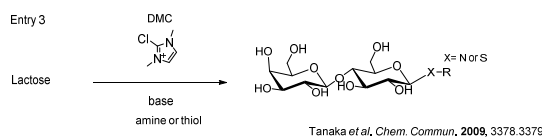


図 7. DMC を用いた置換反応

今後は既法の DMC を用いたアジド化反応で、アジド基を 1 位に導入したラクトースを用い、分析対象化合物にプロパギル基を導入することでクリック反応を行い、容易に配糖体を作製する手法を開発してゆく予定である。

5. 主な発表論文等

なし(CchG とラクトースの結晶構造解析は論文発表を予定)

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 隆一 (SAKAI Ryuichi)

北海道大学大学院・水産科学研究院・教授

研究者番号：20265721

(2)研究分担者

及川雅人 (OIKAWA Masato)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：70273571

(3)研究協力者

田中良和 (TANAKA Yoshikazu)

北海道大学大学院・先端生命科学研究院・准

教授 研究者番号：20374255