

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07760

研究課題名(和文)海産無脊椎動物レクチンの構造多様性に基づく新規機能解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of novel functions of marine invertebrate lectins based on their structural diversity and its application

研究代表者

畠山 智充 (HATAKEYAMA, Tomomitsu)

長崎大学・工学研究科・教授

研究者番号：50228467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：レクチンは糖との特異的な結合を介して、生体内において細胞間及び分子間相互作用に重要な働きをしている。これまでレクチンは主に陸上動物から単離されたものが多かったが、今回、多様な生物種を含む海産無脊椎動物より様々なレクチンを単離し、その構造と機能の解析を行った結果、これまでに知られていない構造を持つレクチンが多数見出され、その新たな糖認識機構が明らかになった。さらに、次世代シーケンサーを用いたRNAの網羅的配列解析を用いることによって、レクチンを含む多くの新奇生理活性タンパク質の発見とその遺伝子クローニングにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞間の接着やコミュニケーションには、細胞表面糖鎖とともにレクチンが重要な役割を果たしている。海産無脊椎動物には多様な生物種が存在しており、陸上動物とは構造や特徴が大きく異なるレクチンが多く存在することが予想される。本研究はこのようなことを踏まえて、海産無脊椎動物レクチンの多様性とその活性発現機構を明らかにすることを目的として、その構造と機能を詳細に研究し、多くの新奇レクチンの立体構造や糖認識機構を明らかにした。これらの結果は、今後、海産無脊椎動物の生体防御機構に重要な知見を与えるとともに、生物の分子進化に関する有用な基礎的情報をもたらすものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lectins play important roles in cell-cell and molecule-cell interactions in organisms through specific binding to carbohydrate chains. Many lectins have been mainly isolated from land animals. However, in this study, various lectins were isolated from marine invertebrates, and their novel structures and carbohydrate recognition mechanisms were elucidated. Furthermore, various novel bioactive proteins were also discovered, including lectins, by comprehensive sequence analysis of RNA using a next-generation sequencer.

研究分野：生化学

キーワード：レクチン 糖鎖 海産無脊椎動物 立体構造 毒素 タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖結合タンパク質であるレクチンは、生体内で細胞や分子表面の糖鎖構造を認識することにより、多くの生物学的過程を仲介する重要な役割を担っている。動物由来のレクチンには様々な異なる構造を有するファミリーが見出されているが、なかでも糖鎖との結合に Ca^{2+} を必要とする C 型レクチンファミリーやガラクトース特異性を示すガレクチンファミリーがよく知られており、広い生物種に見出されている。動物レクチンの多くは脊椎動物を中心に解析が進められてきたが、近年では、無脊椎動物からも多くのレクチンが単離されてきており、自然免疫における異物認識分子として生体防御における重要な因子であることが明らかになってきた。特に海産無脊椎動物においては、その生物種の多様性のために、レクチン分子にもきわめて大きな多様性が存在すると考えられ、まだ知られていない新奇な構造や機能を有するレクチンの存在が予想される。研究代表者らはこれまでに、海産無脊椎動物から様々なレクチンを単離し、その構造と機能の解析を行ってきた。そのなかでも棘皮動物ナマコ類に属するグミ (*Cucumaria echinata*) から単離された Ca^{2+} 依存性溶血性レクチン CEL-III (47.5 kDa) を始めとして異なる構造と糖結合性を有するレクチンを単離しその構造と機能について解析を行ってきた。CEL-III に代表されるように、レクチンは細胞表面の糖鎖と結合することによって直接細胞膜への変化をもたらすだけでなく、糖鎖同士を架橋することによってホルモンなどと同様な細胞内情報伝達を行い、細胞分裂やアポトーシスなど様々な応答を引き起こす。また、細胞表面糖鎖は多くの病原体の細胞内侵入のための足掛かりともなっており、糖結合タンパク質であるレクチンはそのような糖鎖の役割を解明する上でも重要なツールとして用いられている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに見出されていない新奇レクチンを様々な海産無脊椎動物から単離しその構造や生物活性発現機構について明らかにするとともに、遺伝子工学的改変を通じて応用に結びつけるための基礎的情報を得ることを目的とした。海産無脊椎動物レクチンは自然免疫系における異物認識分子としても重要であり、これらのレクチンの構造及び糖鎖認識機構を明らかにすることは、海産無脊椎動物の生体防御機構の解明にも重要である。研究代表者らはこれまでに、グミを始めとする様々な海産無脊椎動物からレクチンを単離し、その構造・機能解析を行ってきた。海産無脊椎動物レクチンは、特徴的な構造や糖認識機構を示すものが多く、今後もこれまでに知られていない新奇レクチンが多数見出されるものと考えられる。そこで本研究では、より多くの海産無脊椎動物レクチンを探索するとともに、それらの立体構造や詳細な糖認識機構を解明することを当初の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 新奇レクチンの探索と構造決定

海産無脊椎動物からタンパク質画分を抽出した後に、それらを各種クロマトグラフィーを用いることによって、異なる糖結合特異性を示すレクチンを精製する。得られたタンパク質は、赤血球凝集活性や、等温滴定カロリーメトリー、グリカンアレイ等を用いることによって、細胞表面糖鎖との結合性や、単糖・オリゴ糖鎖との結合特異性・結合定数等を決定する。また、様々な条件下で結晶化条件を探索し、良質な単結晶が得られたものについては、放射光を用いた X 線結晶構造解析を行う。

(2) 組換えレクチンの作製とその活性測定

レクチンのアミノ酸配列については、まず天然タンパク質を特異的プロテアーゼまたは化学的断片化により部分的に切断した後、生成したペプチドを HPLC で分離・精製した後に、プロテインシークエンサーで部分配列を決定する。その後、得られた部分配列情報をもとに設計したオリゴヌクレオチドを用いた PCR によって遺伝子及びタンパク質のアミノ酸配列決定を行う。また、より多くのレクチンとその関連タンパク質を探索する目的で、組織より得られた RNA の網羅的配列解析を次世代シークエンサーを用いて行う。このようにして得られた配列情報をもとに組換えタンパク質を大腸菌を用いて発現させ、得られたタンパク質は天然型活性を示すようにリフォールディング操作を行った後に、各種クロマトグラフィーを用いて精製する。これらの組換え体についても、天然型レクチンと同様、活性測定と X 線結晶構造解析を行い、天然型レクチンとの比較を行う。特に異なるサブユニット組成から成る SPL-1, SPL-2 などについては、両サブユニットを発現させた後に、それらの組み合わせによって、四次構造や糖結合性にどのような影響が及ぶのかについて解析を行う。

4. 研究成果

(1) ラッパウニ (*Toxopneustes pileolus*) ラムノース結合レクチン SUL-I の構造と糖認識機構

SUL-I の cDNA をクローニングし、そのアミノ酸配列を推定した結果、魚卵中に多く見出されているラムノース結合レクチンとの相同性を有することを見出したことから、組換え SUL-I を大腸菌を用いて作製した。その結果、赤血球凝集活性や、ラムノース及びガラクトースに対する結合活性を示す SUL-I を得ることができた。組換え SUL-I はマウス脾臓細胞に対するマイトジェン活性や Vero 細胞に対する毒性を示したことから、SUL-I が細胞表面の何らかの糖鎖と結合することにより、これらの活性を示したものと考えられた。そこで SUL-I をポリエチレン

グリコールを沈澱剤として結晶化したところ、良質な結晶が得られたことから X 線回折測定を行った結果、1.8Å 分解能の回折データが得られ、サケ卵由来のラムノース結合レクチン CSL3 の立体構造をサーチモデルとした分子置換法により SUL-I の立体構造を決定することができた。SUL-I の立体構造は 3 つの類似したドメインからなり、それぞれの末端には 1 か所ずつ糖結合部位が存在することが明らかになった。それぞれの結合部位においては、Asp, Asn, Glu 残基がラムノースの 2, 3, 4 位のヒドロキシ基と水素結合することによって糖を認識していた。3 つのドメインは分子の片側の面に向かって位置しており、この面で細胞表面糖鎖と結合することによりマイトジェン活性などの生物活性を発現することが推定された。一方、糖鎖マイクロアレイを用いて SUL-I のオリゴ糖鎖結合特異性を調べた結果、非還元末端にガラクトースを持つ複数の糖鎖に対する親和性が見られたことから (図 1)、細胞に対する活性はこのようなガラクトース含有糖鎖への結合が引き金を引いて生じていることが推察された。

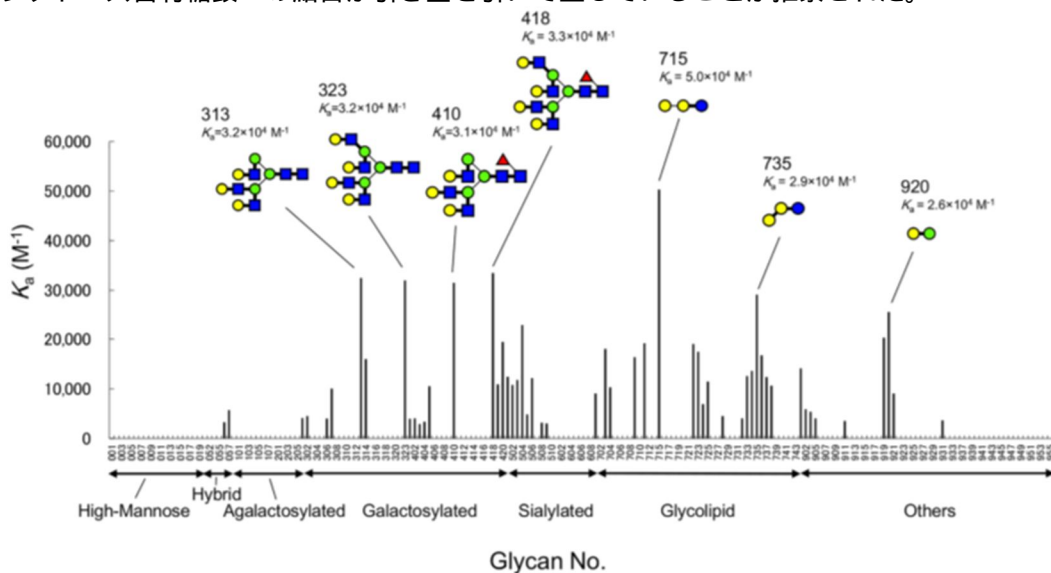


図 1. グリカンアレイを用いた SUL-I の糖鎖特異性解析

(2) イシワケイソギンチャク由来 Ca^{2+} 依存性レクチン AJLec の構造と糖認識機構

AJLec (18.5 kDa) はイシワケイソギンチャク (*Gyactric japonica*) から得られた Ca^{2+} 依存性ガラクトース特異的レクチンであるが、その遺伝子クローニングを行うために、精製したタンパク質を断片化し、得られたペプチドの部分アミノ酸配列を決定した。このようにして得られたアミノ酸配列情報をもとに、オリゴヌクレオチドを設計し、PCR を用いて cDNA クローニングを行った結果、22 残基のシグナル配列を持つ全長 186 残基の全配列が決定された。一方、N-末端アミノ酸はグルタミンであることが cDNA 配列から予想されていたが、エドマン分解及び X 線解析からは N-末端アミノ酸は見出されなかった。天然試料から得られたタンパク質の X 線結晶構造解析を行った結果、N-末端のグルタミンがピログルタミン酸に変換されていることが判明した。結晶構造からは、糖鎖との相互作用も明らかになり、ガラクトースの 2 位と 3 位のヒドロキシ基を Ca^{2+} との配位結合によって認識していることが明らかになった。これは、通常の C 型レクチンが 3 位と 4 位のヒドロキシ基を認識するのとは異なっており、 Ca^{2+} を用いた新規な依存性糖認識機構であることが明らかになった (図 2)。また、オリゴ糖鎖に対する AJLec の結合特異性を、糖鎖マイクロアレイを用いて調べた結果、非還元末端にガラクトースを有する種々のオリゴ糖鎖に親和性を示すことが明らかになった。

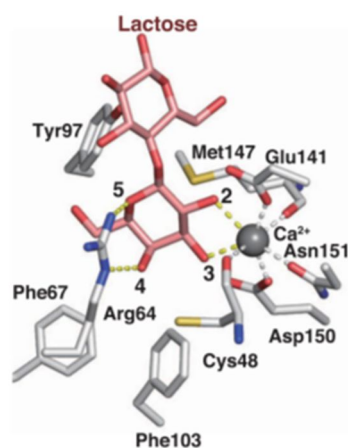


図 2. AJLec の糖結合部位構造

(3) ウチムラサキ (*Saxidomus purpurata*) レクチン SPL の構造と糖結合特異性

SPL (32 kDa) には SPL-1 と SPL-2 の 2 種類の類似したレクチンが存在するが、cDNA クローニングの結果、それぞれ A-鎖/B-鎖のヘテロダイマー、B-鎖のホモダイマー構造であることがわかった。さらに、両者の糖結合親和性を等温滴定熱量計で測定したところ、 Ca^{2+} 非存在下でも N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) や N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) と結合する能力があるが、 Ca^{2+} 存在下では結合定数が上昇することが明らかになった。一方、SPL-2/GalNAc 複合体と SPL-1/GlcNAc 複合体の X 線結晶構造解析の結果から (図 3)、両者は立体構造上、C 型レクチンと非常に類似した構造を持つが、通常の C 型レクチンとは異なり、 Ca^{2+} を介した配位結合で糖を認識しているのではなく、糖のアセトアミド基をファンデルワールス相互作用ならびに水素結合で認識していることがわかった。しかしながら、 Ca^{2+} 存在下では糖結合部位に弱いながらも Ca^{2+} が結合することによって、 Ca^{2+} に配位した水分子が糖のヒドロキシ基と水素結合を形成することにより、親和性が上昇することが明らかになった。これらの結果は、SPL-1 及び SPL-2 が C 型レクチンに属していながら、糖結合部位構造のみを変化させることによって C 型レクチンとは異なる糖認識機構を獲得したことを示唆している。また、A-鎖と B-鎖の組換え体を用いて、そのサブユニット構成と SPL-1, 2 の四次構造や糖結合性によどのような影響があるのかについても検討した結果、B-鎖の二量体 (SPL-2) 及び A-鎖と B-鎖のヘテロ二量体は安定な形成が行われるが、A-鎖のホモダイマーは不安定で多量体を形成してしまうことから、このようなサブユニットの構造特性が SPL-1 と SPL-2 のみが存在し、A-鎖のホモ二量体から成るレクチンが存在しない理由であるものと考えられた。

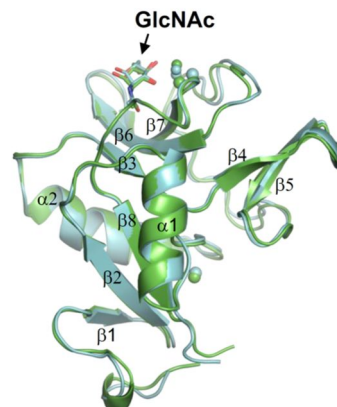


図 3. GlcNAc を結合した SPL A-鎖と B-鎖の重ね合わせ

(4) 次世代シーケンサーを用いたレクチン関連タンパク質の探索と発現

近年急速に発達してきた次世代シーケンサーを用いることによって、これまでの個別の cDNA クローニングを行うことなく、目的タンパク質の遺伝子配列を推定することが可能になってきた。そこで、ラッパウニ、イシワケイソギンチャク、ウチムラサキについてそれらの RNA 配列解析を行ったところ、これまでに得られていなかった C 型レクチンを始めとする新しいレクチンの遺伝子配列が見出された。特に、ラッパウニについてはタンパク質のみ得られていた SUL-III の配列が決定され、このレクチンは新しいファミリーに属するレクチンであることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Unno Hideaki, Nakamura Azusa, Mori Shingo, Goda Shuichiro, Yamaguchi Kenichi, Hiemori Keiko, Tateno Hiroaki, Hatakeyama Tomomitsu	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification, Characterization, and X-ray Crystallographic Analysis of a Novel Type of Lectin AJLec from the Sea Anemone Anthopleura japonica	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29498-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Unno Hideaki, Itakura Shuhei, Higuchi Shuhei, Goda Shuichiro, Yamaguchi Kenichi, Hatakeyama Tomomitsu	4. 巻 28
2. 論文標題 Novel Ca ²⁺ -independent carbohydrate recognition of the C-type lectins, SPL-1 and SPL-2, from the bivalve Saxidomus purpuratus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 766-778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Tomomitsu, Ichise Ayaka, Unno Hideaki, Goda Shuichiro, Oda Tatsuya, Tateno Hiroaki, Hirabayashi Jun, Sakai Hitomi, Nakagawa Hideyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Carbohydrate recognition by the rhamnose-binding lectin SUL-1 with a novel three-domain structure isolated from the venom of globiferous pedicellariae of the flower sea urchin Toxopneustes pileolus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1574 ~ 1583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 外山諒、北旬、工藤彰洋、牛島佑樹、海野英昭、畠山智充、郷田秀一郎
2. 発表標題 サンゴ由来レクチン様タンパク質の赤血球凝集活性の解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉野光、加藤健太郎、橘裕司、郷田秀一郎、海野英昭、畠山智充
2. 発表標題 赤痢アメーバ由来レクチンIglの組換え体の発現とその特性
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋口周平、郷田秀一郎、海野英昭、畠山智充
2. 発表標題 組換え型Ca ²⁺ -非依存性C型レクチンSPLの二量体形成機構と糖結合特異性
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本武宗、樋口周平、郷田秀一郎、海野英昭、畠山智充
2. 発表標題 二枚貝由来C型レクチンSPLのCa ²⁺ -非依存性糖結合活性と二量体形成特性
3. 学会等名 第42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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山脇佑太、海野英昭、畠山智充、郷田秀一郎
2. 発表標題 溶血性レクチンCEL-III膜貫通部位の多量体化に与える影響の解明
3. 学会等名 第42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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内彩佳、竹内雅也、海野英昭、畠山智充、郷田秀一郎
2. 発表標題 組換え型RegIVの発現と糖結合活性
3. 学会等名 第42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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuheji Higuchi, Hideaki Unno, Shuichiro Goda, Tomomitsu Hatakeyama
2. 発表標題 Ca ²⁺ -Independent Carbohydrate-Recognition of the C-type Lectins, SPL-1 and SPL-2, from the Bivalve Saxidomus purpuratus and their Dimerization Properties
3. 学会等名 The 32nd Annual Symposium of The Protein Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山智充, 板倉周平, 郷田秀一郎, 海野英昭
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八木悖平, 山口博哉, 本多克也, 海野英昭, 畠山智充, 郷田秀一郎
2. 発表標題 超好熱アーキア由来リコンビナント酵素の活性に対するシャペロンの影響の解析
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 外山諒, 北旬, 工藤彰洋, 牛島佑樹, 海野英昭, 畠山智充, 郷田秀一郎
2. 発表標題 サンゴ由来レクチン様タンパク質の大腸菌を宿主に用いた発現系の構築
3. 学会等名 第41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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大森敬之, 眞方山慶佑, 海野英昭, 畠山智充, 郷田秀一郎
2. 発表標題 超好熱アーキア由来トランスポーターの大腸菌を用いた生産系の確立
3. 学会等名 第41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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山脇佑太, 海野英昭, 畠山智充, 郷田秀一郎
2. 発表標題 溶血性レクチンCEL-III膜貫通部位欠損変異体の多量体化に関する研究
3. 学会等名 第41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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八木惇平, 山口博哉, 本多克也, 海野英昭, 畠山智充, 郷田秀一郎
2. 発表標題 超好熱アーキア <i>Pyrobaculum islandicum</i> 由来リコンビナントグルタミン酸脱水素酵素の活性に対するプロリンの異性化の影響の解明
3. 学会等名 第41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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 郷田秀一郎, 八木惇平, 海野英昭, 畠山智充
2. 発表標題 大腸菌で生産されるPyrobaculum islandicum由来グルタミン酸脱水素酵素の活性に対するFK506結合タンパク質の影響
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 畠山智充, 樋口周平, 板倉周平, 郷田秀一郎, 海野英昭
2. 発表標題 Ca ²⁺ 非依存性C型レクチンSPLの糖結合能と組換え体発現
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・西日本支部2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樋口周平, 板倉周平, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 優介, 永野 結花, 海野 英昭, 畠山 智充, 河原林 裕, 郷田 秀一郎
2. 発表標題 超好熱アーキア Sulfolobus tokodaii由来糖トランスポーター関連タンパク質に関する研究
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八木 惇平, 山口 博哉, 海野 英昭, 畠山 智充, 郷田 秀一郎
2. 発表標題 超好熱アーキアPyrobaculum islandicum由来リコンビナントグルタミン酸脱水素酵素の活性に対するプロリン異性化の影響の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中竹基晶, 郷田秀一郎, 畠山智充, 海野英昭
2. 発表標題 重金属トランスポーターTerCホモログの結晶化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 酒井 志碩, 郷田秀一郎, 畠山智充, 海野英昭
2. 発表標題 枯草菌由来 DME family ホモログの結晶化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 郷田秀一郎, 山脇佑太, 海野英昭, 畠山智充
2. 発表標題 溶血性レクチンCEL-IIIのドメイン3変異体を用いた多量体化機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生体分子化学研究室
<http://www.cms.nagasaki-u.ac.jp/lab/seitai/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	海野 英昭 (UNNO Hideaki) (10452872)	長崎大学・工学研究科・助教 (17301)	