

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770105

研究課題名（和文） C. echinata 由来 CEL-III の膜孔形成複合体構造解析

研究課題名（英文） Structural analysis of pore-forming CEL-III complex

研究代表者

海野 英昭（UNNO HIDEAKI）

長崎大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10452872

研究成果の概要（和文）：海産無脊椎動物グミ (Cucumaria. echinata) 由来溶血性レクチン CEL-III 膜孔形成複合体の構造解析を行うため、CEL-III 膜孔形成複合体の結晶化条件の検討、重原子誘導体結晶の作成、位相計算および位相改良の結果、モデル構築が可能な電子密度図を得る事に成功した。

研究成果の概要（英文）：

For structural analysis of pore forming CEL-III complex, enough quality of an electron density maps to build the complex model were made by phase calculation using X-ray diffraction data of native and heavy atom derivatives

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：CEL-III, 結晶構造解析, PFT

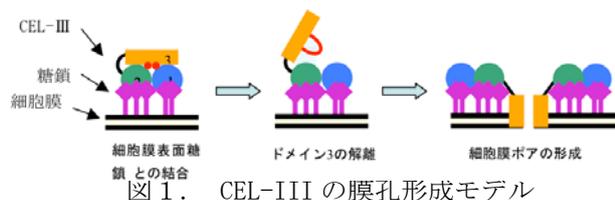
1. 研究開始当初の背景

膜孔を形成する毒素(PFT)は多くの病原菌が有し、PFT による膜孔形成はその病原性および毒性発現に極めて重要な役割を担っている。これまでに炭疽菌および黄色ブドウ球菌をはじめ、多くの病原性微生物の膜孔形成蛋白質の構造・機能解析が進められ、いくつかの PFT については、膜孔形成前

の状態である水溶性モノマー構造が X 線結晶構造解析により明らかとなっているが、PFT のモノマー構造から膜孔形成へと至るメカニズムの詳細は未だ不明であるのが現状である。

CEL-III に関しては、我々のグループがモノマーおよび糖結合モノマー構造解析を報告している。我々は、これまでの CEL-III に関する構造および機能解析の知見から、CEL-III は細胞膜表面の特定の糖鎖を認識、

結合する事で6~7量体の膜孔形成複合体へと構造変化し、溶血活性を発現するモデルを提唱しているが(図1)、その構造変化メカニズムの詳細は未だ明らかではない。



本研究を開始する段階において、それまでの結晶化条件の検討の結果、薄板状の結晶(図2.)を得る事が出来、またそのX線回折測定の結果、分解能7Åの回折データの収集に成功していた(図3.)が、



図2. CEL-III膜孔形成複合体結晶

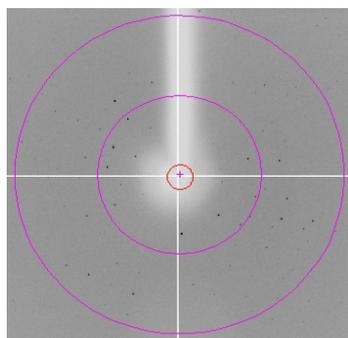


図3. X線回折像(低角部分)

原子分解能での構造決定および構造解析のためには、結晶化条件の改良による分解能の向上が必要であった。

2. 研究の目的

病原菌の多くはターゲットとする細胞膜に穴をあける、もしくは毒素を細胞内に送り込むための膜孔形成毒素(Pore-Forming Toxin:PFT)を有している。PFTによる膜孔形成メカニズムは病原菌の感染および毒性発現に決定的に重要であるが、未だメカニズムの詳細は明らかでない。本研究は、海産無脊椎動物グミ(*C. echinata*)由来PFTである溶

血性レクチンCEL-IIIの膜孔形成複合体のX線結晶構造解析により、病原性および毒性発現に極めて重要なPFTの膜孔形成メカニズムを原子レベルで明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は膜孔形成毒素(PFT)の膜孔形成メカニズム解明のため、海産無脊椎動物グミ由来溶血性レクチンCEL-IIIの膜孔形成複合体のX線結晶構造解析を行うものである。構造解析のためにグミ個体から蛋白抽出後、

(1)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およびゲル濾過クロマトグラフィーによるCEL-IIIの精製、(2)膜孔複合体化、(3)結晶化条件の検索・最適化、(4)重原子誘導体結晶の作成、(5)X線回折データ測定および位相計算と進めた。以下に具体的内容を記す。

(1)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およびゲル濾過クロマトグラフィーによる蛋白質精製

①まずCEL-IIIを有するグミ(図4)を入手するため、九州北部に位置する玄界灘海底から地元漁協の協力を得て底引き網漁を行いグミを採集した。得られたグミは洗浄後凍結保存し、使用する際には解凍し、ミキサーによる破碎を行った。得られた破碎液の遠心分離を行い、CEL-IIIの含まれる上清を以降の精製に用いた。



図4. *Cucumaria echinata* (グミ)

このグミ破碎液上清をLactose-cellufineカラムに通し、CEL-IIIをカラムに結合させた。Ca²⁺-TBSによるカラム洗浄後、EDTA-TBSを用いて溶出を行った。②その溶出画分をTBSにより透析後、GalNAc-cellufineカラムに通しCEL-IIIをカラムに結合させた。Ca²⁺-TBSによるカラム洗浄後Lactose-TBSを用いてCEL-IIIを溶出させた。③溶出画分を濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィーにてモノマー画分を採取・濃縮し、精製度95%以上の水溶性CEL-IIIモノマーを得た。

(2)膜孔複合体化

①界面活性剤を含んだ高塩濃度高pHバッ

ファー溶液を用い、膜孔形成複合体を調製した。②TBS を外液として透析を行い、その後限外濾過により濃縮し、12mg/ml 濃度の CEL-III 複合体蛋白質溶液を調製した。

(3) 結晶化条件の検索・最適化

得られた CEL-III 複合体蛋白質溶液を用い結晶化スクリーニングおよび結晶化条件の最適化を行った。スクリーニングには市販の結晶化スクリーニングキットを用い、スクリーニング、各種添加剤の検討およびその濃度最適化のため、合計約 2,000 条件の結晶化条件検討を行った。

(4) 重原子誘導体結晶の作成

得られた CEL-III 複合体結晶を用いて、各種重原子含有結晶化溶液に浸す事で重原子誘導体結晶を調製した。浸漬条件は、約 20 種類の重原子試薬をそれぞれ 2mM 濃度で調製した結晶化条件の溶液を用い、その溶液に結晶を約 12 時間浸漬後、液体窒素を用いて冷却し X 線回折実験へと進めた。

(5) X 線回折データ測定および位相計算
上記により得られた native および重原子誘導体結晶を用いて、放射光による X 線回折データ測定を行った。得られた回折データを用い、重原子同形置換法による位相計算および位相改良を行った。

4. 研究成果

(1) 結晶化条件の検索・最適化, および重原子誘導体結晶の調製

CEL-III の膜孔型複合体の形成後、各種条件での結晶化スクリーニングおよび結晶化条件の最適化を行った。その結果、再現性良く高品質の結晶が得られる結晶化条件を見つける事に成功した (図 5)。界面活性剤の検討としては、結晶構造解析に多く用いられ結晶化に有用と考えられる、DDM、DM、OG、NM、LDAO 等を用いて結晶化を試みた所、DDM を用いた結晶化の結果、最も X 線回折分解能が高いデータを得られる事がわかった。次に各種添加剤の添加による結晶の改良を試みた結果、Lactulose を終濃度 100mM で結晶化溶液中に加える事で、結晶のクオリティが大きく向上する事を見出した。この DDM および Lactulose 存在下におけるさらなる結晶化条件の検討及び最適化の結果、その結晶の放射光測定により分解能 2.9 Å の回折データを得る事に成功した (図 6)。この結晶化条件で得られた複数の結晶を用い、各種重原子溶液を含んだ結晶化溶液に浸ける事で、各種重原子誘導体結晶を調製した。

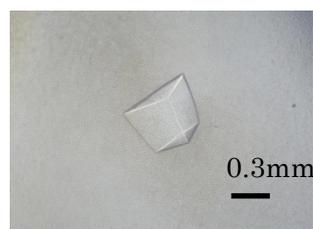


図 5. CEL-III 膜孔形成複合体結晶

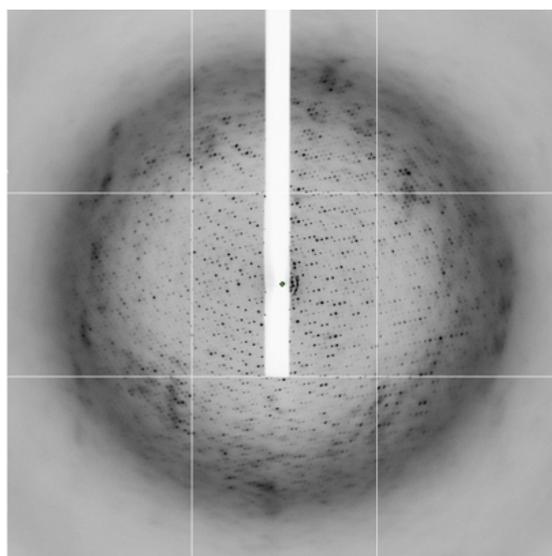


図 6. 分解能 2.9 Å の X 線回折像

(2) X 線回折データ処理

得られた各種 X 線回折データの統計処理を行った。2.9 Å 分解能の native 結晶については、空間群 C2, 格子定数は $a=219.8$ $b=228.7$, $c=133.0$ $\beta=127.1$ であった。各重原子誘導体結晶を用いた回折データについても native 結晶と同様に統計を行い、それらが native 結晶データと同一の空間群および同様の格子定数であることを確認した。次に native データおよび各種重原子誘導体データを用いた重原子同形置換法による位相の計算を試みた。良好な位相情報を得る為のデータの組み合わせおよび計算方法の検討を行った結果、3.3 Å 分解能の native 回折データおよび分解能 4.5 Å の Pt 誘導体回折データを用いた重原子同形置換法により、良好な位相情報の取得に成功した。位相計算にはプログラム Phenix を用いて計算を行う事で、白金原子が非対称単位中に 7 個存在する事を確認した (表 1)。

Data set	Native	Native	Pt
Space group	C2	C2	C2
Resolution (Å)	2.90	3.30	4.50
Unit cell dimension (Å)			
a (Å)	219.8	218.3	217.5
b (Å)	228.7	230.7	231.6
c (Å)	133.0	133.6	133.7
β(°)	127.1	126.9	126.8
I/σI	7.1	21.3	14.7
Redundancy	3.9	7.0	6.9
Completeness (%)	98.6	98.7	99.5
R _{merge} (%)	10.0	9.6	12.6
Number of HA sites			7
Figure of merit			0.38

表 1. native および Pt 誘導体結晶を用いた X 線回折データの統計値

位相計算に引き続き非対称単位内の平均化 (NCS averaging) を含む位相改良の結果、複合体のモデル構築が可能となる良好な電子密度図を得る事に成功した。この電子密度図からわかる CEL-III の膜孔形成複合体構造は、7 量体により複合体を構成し、中心部は β シートからなる β バレル構造を有している事が示唆された。

このモデル構築可能な電子密度図を得る事に成功した事は、CEL-III の膜孔形成複合体構造の構造決定およびその解析がほぼ確実なものとなった事を意味しており、それによる膜孔形成メカニズムの解明が強く期待できる成果であると言える。

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 1 件)

- ① T Nagai, H Unno, MW Janczak, T Yoshimura, CD Poulter, H Hemmi. Covalent modification of reduced flavin mononucleotide in type-2 isopentenyl diphosphate isomerase by active-site-directed inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(51), 20461-20466 (2011), 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 眞方山慶佑, 海野英昭, 畠山智充, 郷田秀一郎 超好熱アーキア由来膜タンパク質の緑色蛍光タンパク質融合体としての生産 日本農芸化学会西日本支部大会 2011年9月17日

- ② 狩野良太, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充 糖鎖付加デンドリマーを用いたレクチン活性測定法の開発 日本農芸化学会西日本支部大会 2011年9月17日

- ③ 本多麻美, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充 糖結合部位に変異を導入した C 型レクチン CEL - I V の糖結合特異性と立体構造の解明 日本農芸化学会西日本支部大会 2011年9月17日

- ④ 馬場智大, 海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充 C 型レクチン CEL - I の糖結合部位アミノ酸置換による結合特異性の変化 日本農芸化学会西日本支部大会 2011年9月17日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野 英昭 (UNNO HIDEAKI)

長崎大学部・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 10452872

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: