

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580470

研究課題名(和文) 分子モデルを基盤とした溶血性レクチンの機能改変と抗マラリア機能向上に関する研究

研究課題名(英文) Studies on improvement and change of function of hemolytic lectin based on molecular modeling

研究代表者

上妻 由章 (Kouzuma, Yoshiaki)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：10284556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：溶血活性を持つレクチンCEL-IIIについて、そのCa依存性の改変を目的にCEL-IIIと同じリシン型レクチンであるミミズレクチンとCEL-IIIの小孔形成ドメインとの融合蛋白質を作成した結果、Ca非依存的に赤血球を凝集する蛋白質を得た。一方、CEL-IIIの溶血活性の向上を目的にCEL-IIIに5カ所存在する糖結合部位内の糖とのスタッキングに関与するアミノ酸残基を変異したCEL-III変異体を作製した結果、野生型CEL-IIIより溶血活性が向上した5種のCEL-III変異体(H36F、Y134H、Y181F、Y181W、Y222F)を作成することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, mutants of hemolytic lectin CEL-III were constructed to improve the hemolytic activity and change the Ca-dependency. A fusion protein of earthworm lectin with pore-forming domain of CEL-III was constructed and showed hemagglutinating activity with no Ca-dependency. Furthermore, amino acid residues involved in stacking interaction with carbohydrate in five carbohydrate binding sites of CEL-III were replaced to other amino acids. Among the CEL-III mutants, five mutants (H36F, Y134H, Y181F, Y181W, Y222F) have a stronger hemolytic activity than wild type CEL-III.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：レクチン 溶血 マラリア

1. 研究開始当初の背景

CEL-III (分子量 47457、432 残基) はナマコの近縁種であるグミ (*Cucumaria echinata*) から見いだされた Ca^{2+} 依存性のガラクトース特異的レクチン (糖認識結合タンパク質) の 1 種である。このレクチンは動物由来レクチンとしては唯一「溶血活性」を保持しているという点で、既知のレクチンとは大きく性質が異なっている。CEL-III による溶血は、これまでの生化学的解析から赤血球膜上の糖鎖を介した膜への結合と、7 分子の CEL-III 同士の間による小孔形成の結果として起こると考えられ、決定された立体構造から、CEL-III は 3 つのサブドメイン (α 、 β 、 γ) からなる 2 つの糖認識ドメイン (CRD1 と CRD2) と、小孔形成ドメイン (PFD) から構成されていると示唆されている。このような CEL-III が示す溶血活性を利用して、マラリアを媒介するハマダラ蚊に CEL-III 遺伝子を導入し、マラリア伝播能がないトランスジェニック (TG) 蚊を構築する試みが進められた。そのコンセプトとしては、「マラリア原虫の受精は最適環境であるハマダラカの中腸内で行われるため、中腸内で CEL-III を発現させることによって吸血した赤血球を溶血して中腸内の環境を激変させ、受精を阻害する」というものである。そして CEL-III を中腸特異的に発現する TG 蚊の体内では吸い取ったラット赤血球の大部分が溶解し、中腸内のネズミマラリア原虫数が激減することが判明し、この方法の有効性が明らかになった。また、CEL-III はマラリア原虫自身にも結合していることが判明し、CEL-III が直接マラリア原虫に対して攻撃している可能性も明らかとなった。このように CEL-III の利用により、ある程度高いマラリア伝播阻止能を TG 蚊は示すことができたが、完全なる (100%) マラリア伝播阻止には不十分 (現時点での阻止能は 90.5%) である。そのため CEL-III の機能を向上させる必要性が生じていた。

2. 研究の目的

(1) CEL-III による溶血は赤血球表面上の糖鎖への結合によって開始する。そのため、CEL-III の機能を向上させるための方策としては、その糖結合能の向上が考えられる。CEL-III の糖認識ドメイン CRD1 は 3 つのサブドメイン $1\alpha \sim 1\gamma$ から構成されているがサブドメイン 1β のみ糖が結合できない。それは、 1β では糖認識 (結合) に関与するアミノ酸残基が置換されているからである。レクチンの糖や細胞への親和性の高さは、その糖結合部位の数 (価数) に依存することが一般的に知られており、もし 1β サブドメインに糖結合部位を導入した分子を構築できれば、その相対的な糖への親和性は高くなり、結果として CEL-III が発揮する溶血活性/抗マラリア活性の向上が期待できる。また、 1β 以外のサブドメインについても、その糖結合能を向上させることができれば、同様に機能の

向上が期待される。

(2) CEL-III は毒タンパク質リシン (ricin) B 鎖と相同性をしめす R 型レクチンの 1 種であるが、多くの R 型レクチンが Ca^{2+} 非依存的であるのに対し、 Ca^{2+} 依存的に糖結合能を発揮する。このことは、TG 蚊の中腸内の環境変化等により Ca^{2+} の存在状態が変化したり、濃度が低下すると、大きな活性の低下につながりかねない。そこで、既知の R 型レクチンのように Ca^{2+} 依存性を解消する (=非依存性を付与する) ことによって、金属イオンの影響をなくすことにより CEL-III 利用における制約を抑えることが期待できる。

(3) 以上のように、本研究は、完全なるマラリア伝播阻止を有する TG 蚊創成へのツールとして利用されうる高機能化 CEL-III の構築を目的に、次の研究を行った。

- ①糖結合部位の導入および部位特異的置換による高機能化 CEL-III 分子の構築
- ② Ca^{2+} 非依存性 CEL-III 分子の構築

3. 研究の方法

(1) 高機能化 CEL-III 分子の構築：

CEL-III の機能を高機能化 (=糖結合能向上=溶血活性向上=抗マラリア活性向上) するため以下の方法を用いた。

①サブドメイン 1β への糖結合部位の導入：

サブドメイン 1β には糖結合部位がないため、CEL-III 分子全体の糖結合能を高めるために、サブドメイン 1β へ新たに糖結合部位の導入を試みた。方法としては次の 2 つの方法を用いた。

①分子モデル解析 (Fig. 1) により、糖結合部位を形成するようにサブドメイン 1β 中のアミノ酸残基 Thr64、Pro65、Asp66、Ser76、Thr79、Ser87 をそれぞれ Asp、Val、Glu、Tyr、Asp、Asp 残基に変異した CEL-III- 1β 変異体 (T64D/P65V/D66E/S76Y/T79D/S87D) 及び CRD1- 1β 変異体を作製し、さらにそのサブドメイン 1α 、 1γ 中の Asp43、Asp141 を Ala に変異して同サブドメインの糖結合能を消失させた CRD1- 1β -D43A/D141A の糖への結合能について評価した。

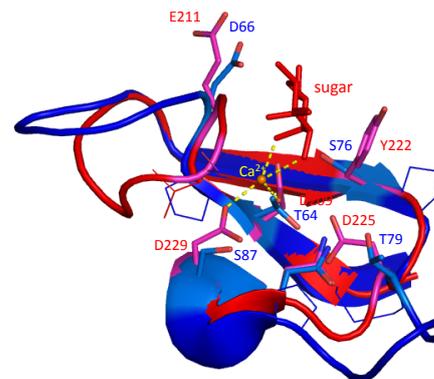


Fig. 1. Superimpose of subdomain 1β (blue) with subdomain 2β (red).

②サブドメイン 1β について、糖結合能を有

しているサブドメイン 1 α 全体を置換した変異体 CEL-III を作製し、その溶血活性について評価した。なお、変異体タンパク質の発現には、発現ベクターとして pET-32a (発現タンパク質は N 末端側にチオレドキシン(Trx) タグおよび His タグ融合)、宿主大腸菌として BL21(DE)Codonplus RIL 株を使用し、CEL-III 遺伝子を連結したプラスミド保持菌を LB 培地にて培養し、IPTG の添加によって、タンパク質を発現した。CRD1 変異体の場合は菌体を超音波破碎後、Ni キレートカラムにて精製し、Lactose-cellulofine カラム、または GalNAc-cellulofine カラムを用いて、糖結合能を測定した。CEL-III 変異体の場合は菌体を超音波破碎後、封入体を精製し、6 M 塩酸グアニジンでタンパク質を可溶化後、0.4 M アルギニン塩酸塩、および酸化型グルタチオン、還元型グルタチオンを含む Refolding 緩衝液中で 44 時間、タンパク質濃度 30 μ g/ml にて攪拌して巻き戻しを行った。次に Lactose-cellulofine とともに攪拌し、充填剤を回収後、lactose 添加により結合した CEL-III タンパク質を溶出して精製した。以降の他の実験についても基本的に上記と同様のタンパク質発現、精製法を用いた。

溶血活性測定にはウサギ赤血球を用い、0.53% 赤血球懸濁液を 50% 溶血するのに必要な CEL-III 濃度 (HC₅₀) を算出することにより評価した。

②サブドメイン中の糖結合部位の糖とのスタッキングに関わるアミノ酸残基の置換：

グミ中に存在する CEL-III イソレクチンの構造比較およびタンパク質発現研究から、糖とのスタッキングに関わるアミノ酸残基 (Fig. 2 における His36) を変異することによって、その溶血活性の強弱に影響を与えることが示唆された。そこで、CEL-III の溶血活性の向上を目的に CEL-III の糖結合能を有する 5 つのサブドメイン中の糖とのスタッキングに関わるアミノ酸残基 His36 (1 α)、Y134 (1 γ)、Y181 (2 α)、Y222 (2 β)、W269 (2 γ) について、それぞれ類似のアミノ酸残基 (His、Phe、Tyr、Trp) に置換した変異体を作製し、その溶血活性、および溶血速度を調べた。

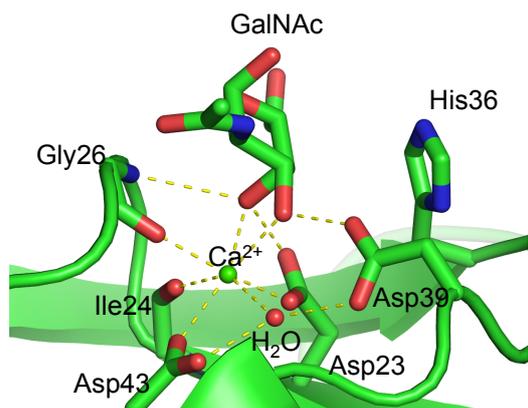


Fig. 2. Structure of carbohydrate binding site of CEL-III/GalNAc complex.

相対溶血活性については使用した赤血球の鮮度の影響を考慮して、野生型 CEL-III (Trx-CEL-III) の活性測定も同時に行って、以下の数式により算出した。

$$\text{相対溶血活性 (\%)} = \frac{\text{Trx-CEL-III の HC}_{50} \text{ 値} \times 100}{\text{変異体 CEL-III の HC}_{50} \text{ 値}}$$

(2) Ca²⁺非依存性 CEL-III 分子の構築：

Ca²⁺依存性である CEL-III を Ca²⁺非依存性に改変した小孔形成分子を構築するために以下の方法を用いた。

①部位特異的変異の導入による改変：

CEL-III に Ca²⁺非依存性を導入するため、CEL-III と高い相同性を持つ Ca²⁺非依存性 R 型レクチンであるリシン B 鎖の糖結合部位付近の構造を参考にして Ca²⁺非依存的な糖結合能に改変するようにモデル解析し、CRD1 をベースにした CRD1 変異体を発現し、その糖結合に関する Ca²⁺依存性について、GalNAc-cellulofine カラムを用いて検討した。

②R 型レクチンと CEL-III の小孔形成ドメイン (PFD) との融合タンパク質の作製：

溶血活性を有する Ca²⁺非依存的なレクチンを構築するため、R 型レクチンの 1 種である Earthworm (*Lumbricus terrestris*) レクチン (EWL) と CEL-III の小孔形成ドメイン (CEL3PFD) との融合タンパク質である Trx-EWLCEL3PFD を構築した。方法としては、まず、Earthworm RNA から RT-PCR より EWL cDNA をクローニングした。一方、CEL3PFD についても PCR にて調製し、NotI サイトを有するリンカープライマーを介して両遺伝子を連結し、pET-32a に導入して、発現プラスミドを構築した。タンパク質の発現、精製については CEL-III 変異体と同様の方法を用いた。精製されたタンパク質についてはその赤血球に対する活性を Ca²⁺存在下、EDTA 存在下で検討した。

4. 研究成果

(1) 高機能化 CEL-III 分子の構築：

①サブドメイン 1 β への部位特異的置換による糖結合能の導入：

CEL-III 分子全体の糖結合能を高めるために、サブドメイン 1 β へ新たに糖結合部位の導入を試みた。分子モデル解析より選抜された、CEL-III-1 β 変異体 (T64D/P65V/D66E/S76Y/T79D/S87D) についてそのタンパク質を発現、精製し、溶血活性を検討した結果、CEL-III-1 β 変異体は野生型 CEL-III (Trx-CEL-III) の 39.6% の活性しか示さないことが明らかになった。しかし、溶血活性は低下したものの、1 β に糖結合能が付与できたことが考えられたので、CRD1 だけからなる、CRD1-1 β および、サブドメイン 1 α 、1 γ の糖結合能を消失させた CRD1-1 β -D43A/D141A を作製し、Lactose-cellulofine への結合能に

について評価したところ、CRD1-1 β はカラムに結合するものの、CRD1-1 β -D43A/D141Aはカラムに結合せず、1 β へ糖結合能は導入されていないことが明らかになった。

②サブドメイン1 β へのサブドメイン置換による糖結合能の導入：

次に、糖結合能を有しているサブドメイン1 α を1 β の部分と置換した変異体を作製した。作製の際には、1 β (Asp51-Gly103)を1 α のLys17-Ile48と置換した変異体CEL-III-1 β /1 α Sと1 α のGln1-Gly50と置換した変異体CEL-III-1 β /1 α Lを作製し、その溶血活性を調査した。その結果、両変異体とも溶血活性が消失し、CEL-III-1 β /1 α Sにいたっては赤血球凝集活性についても消失することが判明した(Fig. 3)。これらの結果から、サブドメイン1 β については、糖結合部位がないものの、その構造を維持することがCEL-IIIの溶血活性の発揮のために重要であることが示唆された。

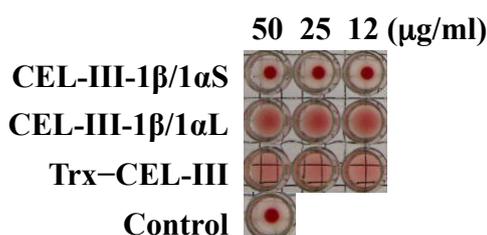


Fig. 3. Hemolytic assays of Trx-CEL-III and the mutants toward rabbit erythrocytes. Hemolysis: lines are shown. Hemagglutination: lines are not shown.

③サブドメイン中の糖結合部位の糖とのスタッキングに関わるアミノ酸残基の置換による溶血活性の向上：

サブドメイン1 β への糖結合部位導入による糖結合能向上および溶血活性向上が困難であったため、1 β 以外のサブドメインへの変異導入による溶血活性の向上を試みた。これまで、糖結合部位の糖とのスタッキングに関わるアミノ酸残基の置換により、溶血活性に影響を与えることが示唆されていたため、まずサブドメイン1 α のHis36をその他のスタッキング可能な芳香族アミノ酸Phe、Tyr、Trpに置換した変異体を作製し、その溶血活性を調査した。その結果、Fig. 4のようにH36Y変異体(HC_{50} : 0.367 μ g/ml)およびH36W変異体(同0.321 μ g/ml)はTrx-CEL-III(同0.174 μ g/ml)と比較して、 HC_{50} 値が約2倍ほど増加して、活性としては半分程度に低下していたものの、H36F変異体(同0.112 μ g/ml)に関しては HC_{50} 値が約2/3に減少して、活性としてTrx-CEL-IIIより1.55倍高くなっていることが明らかになった。また、溶血速度についても調査して、50%溶血に必要な時間を比較した所、Fig. 5のようにH36FはTrx-CEL-IIIよりも2.1倍速くなっていることが明らかになった。このことにより、サブドメイン中の糖結合部位の糖とのスタッキング

に関わるアミノ酸残基を適当なアミノ酸残基に置換することによって、CEL-IIIの溶血活性を向上させることができることが判明した。

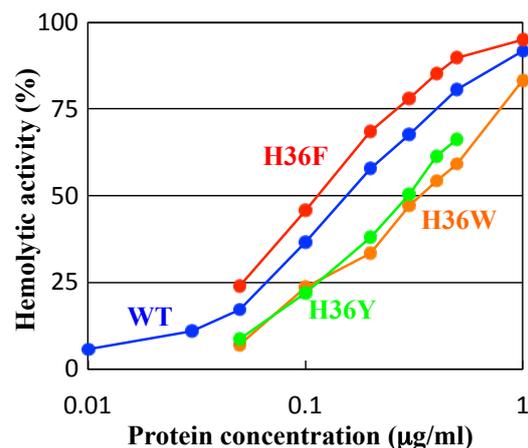


Fig. 4. Hemolytic activities of Trx-CEL-III and the mutants toward rabbit erythrocytes.

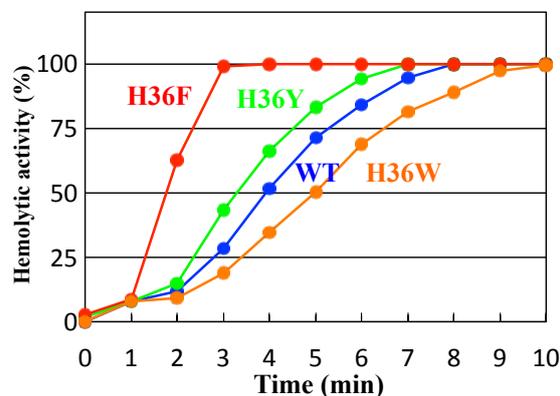


Fig. 5. Hemolysis rates of Trx-CEL-III and the mutants toward rabbit erythrocytes.

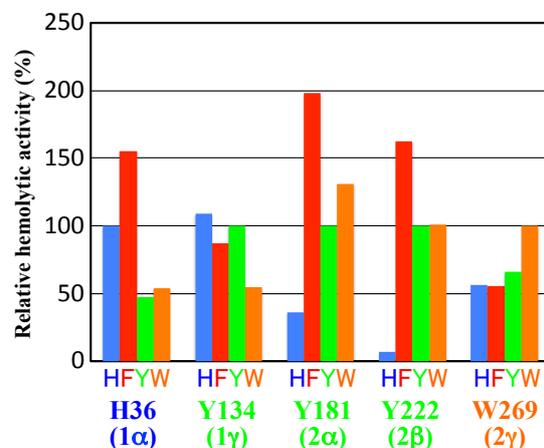


Fig. 6. Relative hemolytic activities of CEL-III mutants with Trx-CEL-III toward rabbit erythrocytes. The activity of wild-type CEL-III (Trx-CEL-III) was given as 100%.

そこで、他のサブドメインの相当アミノ酸残基 Y134 (1 γ)、Y181 (2 α)、Y222 (2 β)、W269 (2 γ) についても、同様な手法によって変異体を作製して、その溶血活性について調査した。その結果、Fig. 6 に示すように 2 γ 以外のサブドメインにおける 5 種の変異体 H36F、Y134H、Y181F、Y181W、Y222F が Trx-CEL-III よりも溶血活性が向上していることが明らかになった。

(2) Ca²⁺非依存性 CEL-III 分子の構築：

①部位特異的変異の導入による改変：

Ca²⁺非依存性 R 型レクチンであるリシン B 鎖の糖結合部位付近の構造を参考に、CEL-III を Ca²⁺非依存的にする変異体として Gly26、Ala34、Asp43 をそれぞれ Asp、Gln および Asn に置換した 4 種の CRD1 変異体 CRD1-G26D、CRD1-A34Q、CRD1-A34Q/D43N、CRD1-G26D/A34Q/D43N を作製した。精製した変異体について、GalNAc-cellulofine カラムに結合させ、EDTA→Lactose の順でカラムに供して、結合タンパク質を溶出させた。その結果、CRD1-G26D と CRD1-A34Q はカラムに結合したものの EDTA で溶出したため Ca²⁺依存性についての变化は生じていなかった。また、CRD1-A34Q/D43N および CRD1-G26D/A34Q/D43N についてはカラムへの結合能を示さなかった。

②R 型レクチンと CEL-III の小孔形成ドメイン (PFD) との融合タンパク質の作製：

カルシウム結合に関与するアミノ酸残基の置換は直接 CEL-III の糖結合能に影響を与えることが示唆されたため、溶血活性を有する Ca²⁺非依存的なレクチンを構築することを目的に、Ca²⁺非依存的 R 型レクチンの 1 種である Earthworm レクチン (EWL) と CEL-III の小孔形成ドメイン (CEL3PFD) との融合タンパク質である EWLCEL3PFD を構築することにした。EWL 遺伝子については cDNA クローニングして塩基配列を決定した結果、データベースの塩基配列とは数カ所異なっていたものの CEL-III との相同性 (Fig. 7) は維持していたのでそのまま使用した。そして、PCR 増幅した CEL3PFD を EWL に連結して作製した発現プラスミドを持つ大腸菌 BL21 (DE) Codonplus RIL 株を培養して、IPTG で発現を誘導した所、EWLCEL3PFD は封入体として蓄積することがわかった。そのため、可溶化、巻き戻しを行い、Lactose-cellulofine に供与した所、カラムへの結合能を示したため、Lactose 添加によりタンパク質の溶出を行い、EWLCEL3PFD を精製した (Fig. 8)。

次に、精製した EWLCEL3PFD について、赤血球に対する活性について調査した結果、Fig. 9 に示すように、EWLCEL3PFD は EDTA 存在下で、つまり Ca²⁺非依存的に赤血球を凝集したものの溶血活性については Trx-CEL-III と比較してほとんど示さない (100 μ g/ml で数%) ことも判明した。

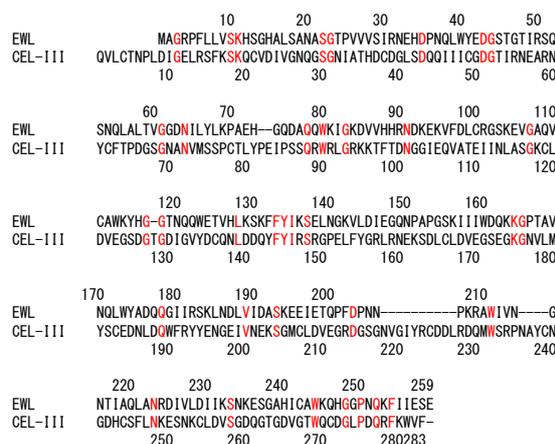


Fig. 7. Comparison of amino acid sequence of EWL with that of CEL-III CRD. The identical amino acid residues are shown by red.

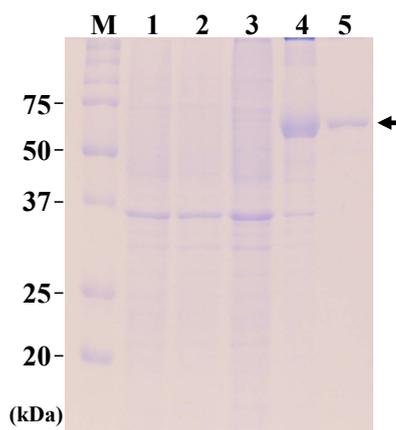


Fig. 8. Expression of EWLCEL3PFD in *E. coli* cells. Arrow indicates the position of expressed EWLCEL3PFD. M, molecular weight marker. Lane 1, total cell extract without induction; Lane 2, total cell extract with induction by IPTG; Lane 3, soluble fraction after sonication; Lane 4, insoluble fraction after sonication; Lane 5, purified EWLCEL3PFD.

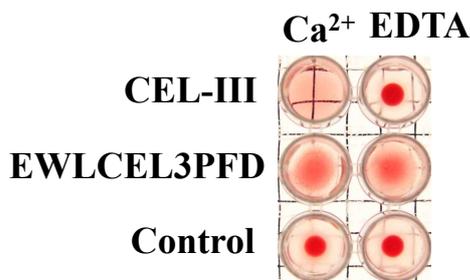


Fig. 9. Hemolytic assay of Trx-CEL-III and EWLCEL3PFD toward rabbit erythrocytes. Hemolytic assay was carried out in the presence of 10 mM CaCl₂ or 10 mM EDTA. Hemolysis: lines are shown. Hemagglutination: lines are not shown.

以上のように CEL-III の高機能化、つまり溶血活性の向上についてはサブドメイン中の糖結合部位の糖とのスタッキングに関わるアミノ酸残基を置換することによって5種の CEL-III 変異体において達成することができた。これらの変異を組み合わせることによって、さらなる溶血活性の向上が見込めるはずであるが、これまで作製した2重変異体においては相加的な効果が示されておらず、その組み合わせについての検討が要される。一方、最近、長崎大学のグループが CEL-III の小孔形成ドメインの部位特異的置換を行うことにより溶血活性が向上した CEL-III 変異体を作製することに成功している。これらの変異体のコンセプトは本研究の原理とは異なっているため、両変異を組み合わせることによって、さらに高機能な CEL-III を作製することが可能になると思われる。そして、そのことによって、完全なるマラリア伝播阻止能を有するトランスジェニックハマダラ蚊を作製するためのツールとしての利用が期待される。

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 Y. Shimizu, H. Yamazaki, S. Yoshida, M. Yonekura, and Y. Kouzuma, Molecular cloning, recombinant expression, and characterization of isolectin genes of hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 276-282 (2012).
査読有

[学会発表] (計4件)

① 上妻由章、山田麻由、劉佳、清水良樹、米倉政実、「溶血性レクチン CEL-III の溶血活性向上に向けた糖結合部位の変異体解析」、第14回日本蛋白質科学会年会、2014年6月25日、横浜産貿ホールマリネリア

② 上妻由章、清水良樹、米倉政実、「溶血性レクチン CEL-III の糖結合サブドメイン 2β への変異導入による溶血活性の向上」、日本農芸化学会大会、2013年3月25日、東北大学

③ 清水良樹、米倉政実、上妻由章、「糖結合サブドメインへの変異導入による溶血性レクチン CEL-III の機能向上」、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学

④ 清水良樹、米倉政実、上妻由章、「海産無脊椎動物グミ由来溶血性レクチン CEL-III の糖結合部位への変異導入による糖結合活性及び溶血活性に対する影響」、日本蛋白質化

学会年会、2011年6月7日、ホテル阪急エキスポパーク

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上妻 由章 (KOUZUMA YOSHIAKI)
茨城大学・農学部・准教授
研究者番号：10284556

(2) 研究分担者

角田 佳充 (KAKUTA YOSHIMITSU)
九州大学大学院・農学研究院・准教授
研究者番号：00314360

(3) 連携研究者

吉田 栄人 (YOSHIDA SHIGETO)
金沢大学・医薬保健研究域・教授
研究者番号：10296121

(4) 研究協力者

米倉 政実 (YONEKURA MASAMI)
茨城大学・農学部・教授
研究者番号：40134168