

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450133

研究課題名(和文)孔形成毒素のプレポア構造の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the prepoire struture of the pore forming toxins

研究代表者

郷田 秀一郎(GODA, Shuichiro)

長崎大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00346587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナマコ由来溶血性レクチンCEL-IIIは孔形成毒素であり、多量体化することにより溶血活性をもつ。CEL-III変異体を作成し、変異による溶血活性に対する影響を明らかにした。CEL-IIIにアミノ酸配列相同性を示すサンゴ由来AML36, AML49の大腸菌を宿主に用いた生産系の確立を行ったが凝集体を形成しやすいことから単量体を活性を有する形で得ることができなかった。このことは、両タンパク質のアミノ酸配列の違いが溶血活性に大きく影響していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hemolytic lectin CEL-III derived from sea cucumber is a pore forming toxin which have hemolytic activity by forming oligomer. To elucidate the mechanism of oligomerization, mutants of CEL-III were made by site directed mutagenesis. The effect of the mutation on the hemolytic activity was elucidated. Production of AML36 and AML49 derived from coral was carried out by using Escherichia coli. However recombinant proteins formed aggregates and difficult to obtain monomeric form which exhibit hemolytic activity. This indicates that the difference of the amino acid sequence between CEL-III and AML36, AML49 affect the hemolytic activity.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：蛋白質

1. 研究開始当初の背景

孔形成毒素 (Pore forming toxin) と呼ばれる一群のタンパク質は、細胞の表面を認識すると結合し、その細胞表面で多量体を形成することによって細胞膜に孔 (Pore) を形成する。その孔の形成によって生じるイオン透過性は細胞の破壊を引き起こしている。これら孔形成毒素の一群には、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が生産する α -ヘモリジンやロイコシジン、イソギンチャク (*Actinia fragacea*) が生産する FraC、ナマコの一種である海産無脊椎動物グミ (*Cucumaria echinata*) が生産する溶血性レクチン CEL-III などが含まれる。これらのタンパク質は、細胞の認識に脂質や細胞表面の糖鎖を利用していることや、標的として認識し、破壊する細胞が赤血球であるか、白血球であるかの違いはあるものの、その破壊のメカニズムは共通している。細胞表面で多量体を形成し膜孔をつくることは以前より知られており、孔を形成していない状態での単量体の構造は多く報告されている。また、孔形成後の多量体の立体構造は、1996年に α -ヘモリジンの七量体構造が報告され¹⁾、近年、ロイコシジンの八量体構造も報告されている²⁾。申請者の所属する研究室でもナマコの一種であるグミ由来溶血性レクチン CEL-III の単量体構造はすでに報告し、多量体構造の解析を進めている³⁾。これら多くの多量体構造の解明の報告がなされてきていることから、現在、孔形成毒素の研究は単量体から多量体を形成する構造変化の解明に焦点が移ってきている。

2. 研究の目的

これまでの研究結果から多量体形成における構造変化のモデルは以下の2通りを推定することができる。まず1つ目 (図1(A)) は、孔形成毒素が細胞膜表面を認識し結合する。細胞膜表面でタンパク質同士が会合した多量体プレポア (pre-pore) 構造を形成する。プレポア構造から大きな構造変化が起こり、膜を貫通する部位が膜内に突き刺さるように構造形成し、孔が完成する。もう一つ (図1(B)) は、⁴⁾ は同じであるものの、単量体が構造変化を起こし、膜貫通部位が膜内に入り込んだ単量体プレポア構造を作る。その後、貫通部位同士が多量体を形成し、孔構造を完成させるものである。両者の違いは、先に多量体化した後に孔形成部位が膜に入るのか、膜上で単量体が構造変化し、貫通部位を形成した後に多量体化するか、である。本研究では、どちらのケースの場合も中間体構造のことをプレポア構造と呼ぶことにする。本研究では、孔形成の重要なステップであるプレポア構造を解明するために、安定したプレポア構造を形成する変異体を探索することを目的とした。

試料としては、孔形成毒素のなかでも膜貫通部位が バレルで構成されるタンパク質

を用いる。用いる孔形成毒素は細胞表面の糖鎖を認識するナマコの一種であるグミ由来溶血性レクチンの CEL-III 及びそれに高いアミノ酸配列相同性を示すサンゴ由来タンパク質 AML36, AML49 である。CEL-III の単量体の立体構造はすでに明らかとなっている。そこで、孔形成メカニズムを明らかにするために、安定したプレポア構造を形成する各種変異体の作成を検討した。また、相同性が高いタンパク質である AML36, AML49 の生産系の確立を行った。

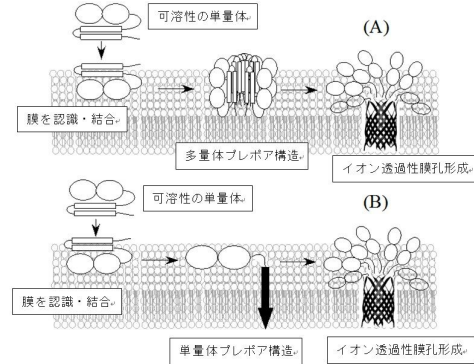


図1 孔形成毒素の多量体化機構のモデル。プレポア構造が多量体 (A) もしくは単量体 (B)。

3. 研究の方法

孔形成毒素として、ナマコの一種であるグミ由来溶血性レクチン CEL-III 及びサンゴ由来タンパク質 AML36, AML49 を用いる。CEL-III は単量体の立体構造、*in vitro*での溶液中での多量体形成条件が明らかとなっている。立体構造情報から、多量体化の引き金になると推定される残基が明らかとなっていることから、部位特異的変異体の作成を行い、プレポア構造を安定してとる変異体の探索を行う。

4. 研究成果

(1) CEL-III 変異体の溶血活性に対する影響

膜孔形成毒素 (Pore forming toxin) の一つであるナマコ由来溶血性レクチン CEL-III は、赤血球表面の糖鎖を認識し、膜孔を形成することによって溶血活性を示す。膜孔形成はダイナミックな構造変化を伴う多量体化によって引き起こされるが、その構造変化については知られていない。研究代表者らは CEL-III の溶液状態での単量体の立体構造と膜孔形成時の多量体構造を X 線結晶構造解析によって明らかとしている。単量体の立体構造解析から CEL-III には糖を認識するドメイン 1, 2 及び多量体化に関与するドメイン 3 があることが明らかとなっている。また、多量体化には、まず細胞表面を認識した後にプレポア構造と呼ばれる、膜孔形成中間体が存在することが示唆されている。

そこで、CEL-III の多量体化に寄与するアミノ酸残基に変異を導入することによって、その変異の溶血活性に与える影響について解析した。

まず始めにドメイン内の相互作用が溶血活性に与える影響を解明するため、同部位への変異導入の影響を解析した。変異の導入はプライマーを用いたPCRによって行い、変異体の作成に成功した。変異体は大腸菌を宿主に用いた組換えタンパク質として生産した。

標的とするアミノ酸は、ドメイン3に位置するD371及びK405とした。D371とK405は単量体構造でイオン結合することによって安定化に寄与している。すでにK405はAに置換することによって360倍溶血活性が上昇することを報告している。そこで以下の変異体(K405A, K405S, K405E, K405R, K405L)を作成し、溶血活性を測定した。そのうち、Lへ変異を導入したものは、精製中に凝集体を形成したため、溶血活性を測定することができなかった。その他の変異体は溶血活性の結果、K405A及びK405SはWTに対して高い溶血活性を示した。一方、K405EとK405Rでは溶血活性の低下が見られた。また、D371の変異体では、D371A及びD371Rで活性の低下がみられ、D371Kでは溶血活性はほとんど観察できなかった。これらのことから、このイオン結合が単量体の安定化に寄与しており、多量体化に影響していることが明らかになった。K405は残基の高さを減少させることによって活性の上昇が見られたことから、イオン結合が単量体の安定性の低下をまねき、多量体化を促進していることが明らかになった。一方、D371は多量体化を促進することが見られなかったため、多量体中でのD371の他の相互作用に影響したことが考えられた。

(2) サンゴ由来 CEL-III 相同タンパク質 AML36, AML49 のリコンビナントタンパク質としての生産系の確立

サンゴの発生段階で発現レベルが上昇する遺伝子として AML36, AML49 が報告されている。そのアミノ酸配列が CEL-III に相同性を示していることから、溶血活性を示すことが推定されている。そこで、孔形成毒素の孔形成メカニズムの解明のため、同タンパク質のリコンビナントタンパク質としての生産系の確立を行った。CEL-III は大腸菌を宿主に用いて生産されると不溶性の凝集体(封入体)として得られ、変性剤による可溶化後、希釈することによって変性剤濃度を低下させて巻き戻しを行っている。AML36, 49 も封入体として得られたが、希釈して巻き戻す段階で凝集してしまい可溶性で得ることはできていない。そこで、CEL-III でドメイン1,2に相当する部分のみを生産し、糖特異性の解明を行った。その結果、AML36, AML49 とともに CEL-III と同様の糖特異性を示すことが明らかとなった。そこで、AML36, AML49 の全長タンパク質の可溶性を高めるために融合タンパク質として生産させることを試みた。融合させるタンパク質には、大阪大学高木教授より恵与された FATT タグ及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼを用いた。しかしながら、

そのどちらのタンパク質を融合させたものでも封入体から可溶性に巻き戻すことはできなかった。AML36, AML49 のアミノ酸配列を CEL-III と比較すると、特に多量体を形成した時の膜貫通部位に特徴的な違いが見られた。膜貫通部位のアミノ酸配列は疎水性残基と親水性残基が交互に現れる特徴を持っているが、サンゴ由来のものは疎水性残基と交互に現れるアミノ酸のほとんどがセリンであった。このことが多量体化形成に大きく寄与しており、安定して単量体を得ることができなかったのではないかと考えられた。これらのことから、このセリン残基に変異を導入することが多量体化の制御に重要ではないかと推察された。

<引用文献>

Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE., Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* (1996) 274:1859-1866.

Yamashita K, Kawai Y, Tanaka Y, Hirano N, Kaneko J, Tomita N, Ohta M, Kamio Y, Yao M, Tanaka I, Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal gamma-hemolysin reveals the beta-barrel pore formation mechanism by two components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011) 108:17314-17319.

Hatakeyama T, Unno H, Kouzuma Y, Uchida T, Eto S, Hidemura H, Kato N, Yonekura M, Kusunoki M, C-type lectin-like carbohydrate recognition of the hemolytic lectin CEL-III containing ricin-type -trefoil fold, *J. Biol. Chem.* (2007) 282:37826-37835.

Hisamatsu K, Nagao T, Unno H, Goda S, Hatakeyama T. Identification of the amino acid residues involved in the hemolytic activity of the *Cucumaria echinata* lectin CEL-III, *Biochim. Biophys. Acta* (2013) 1830:4211-4217.

Grasso LC, Maindonald J, Rudd S, Hayward DC, Saint R, Miller DJ, Ball EE. Microarray analysis identifies candidate genes for key roles in coral development, *BMC Genomics.*, (2008) 9:540-558.

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8件)

In vivo formation of the protein disulfide bond that enhances the thermostability of diphosphomevalonate decarboxylase, an intracellular enzyme

from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*
Ai Hattori, Hideaki Unno, Shuichiro Goda,
Kento Motoyama, Tooru Yoshimura, and
Hisashi Hemmi
Journal of Bacteriology, 査読有、(2015)
197:3463-3471.
DOI: 10.1128/JB.00352-15

Mannose-recognition mutant of the
galactose/N-acetylgalactosamine-specific
C-type lectin CEL-I engineered by
site-directed mutagenesis
Hiromi Moriuchi, Hideaki Unno, Shuichiro
Goda, Hiroaki Tateno, Jun Hirabayashi,
Tomomitsu Hatakeyama
Biochim Biophys Acta, 査読有、(2015)
1850:1457-1465.
DOI: 10.1016/j.bbagen

cDNA cloning and characterization of a
rhamnose-binding lectin SUL-I from the
toxopneustid sea urchin *Toxopneustes
pileolus* venom
Tomomitsu Hatakeyama, Ayaka Ichise,
Tomokazu Yonekura, Hideaki Unno,
Shuichiro Goda, and Hideyuki Nakagawa
Toxicon, 査読有、(2015) **94**:8-15.
DOI:10.1016/j.toxicon.2014.11.236

Manno-oligosaccharide-binding ability
of mouse RegIV/GST-fusion protein
evaluated by complex formation with the
carbohydrate-containing polyamidoamine
dendrimer
Yuta KATO, Kazunori KOCHI, Hideaki UNNO,
Shuichiro GODA, Tomomitsu HATAKEYAMA
Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有、
(2014), **78**:1906-1909.
DOI:10.1080/09168451.2014.940834

Hemolytic Lectin CEL-III Heptamerizes
via a Large Structural Transition from
 α -Helices to a β -Barrel during the
Transmembrane Pore-Formation Process
Hideaki Unno, Shuichiro Goda, Tomomitsu
Hatakeyama
J. Biol. Chem., 査読有、(2014)
289:12805-12812.
DOI:10.1074/jbc.M113.541896

Identification and characterization of
the X-dimer of human P-cadherin:
Implications for homophilic cell adhesion
Shota Kudo, Jose M. M. Caaveiro, Shuichiro
Goda, Satoru Nagatoishi, Keisuke Ishii,
Tadashi Matsuura, Yukio Sudou, Tatsuhiko
Kodama, Takao Hamakubo, and Kouhei Tsumoto
Biochemistry, 査読有、(2014)
53:1742-1752.

DOI:10.1021/bi401341g

Identification of the amino acid
residues involved in the hemolytic
activity of the *Cucumaria echinata* lectin
CEL-III
Keigo Hisamatsu, Tomonao Nagao, Hideaki
Unno, Shuichiro Goda, Tomomitsu
Hatakeyama
Biochim. Biophys. Acta, 査読有、(2013)
1830:4211-4217.
DOI:10.1016/j.bbagen.2013.04.010

Alteration of the Carbohydrate-Binding
Specificity of a C-type Lectin CEL-I Mutant
with an EPN Carbohydrate-Binding Motif
Tomomitsu Hatakeyama, Tomohiro Ishimine,
Tomohiro Baba, Masanari Kimura, Hideaki
Unno, and Shuichiro Goda
Protein and Peptide Letters, 査読有、
(2013) **20**:796-801.
DOI:10.2174/0929866511320070009

〔学会発表〕(計13件)

長尾知直, 真崎理沙, 郷田秀一郎, 海野
英昭, 畠山智充

溶血性レクチン CEL-III の細胞膜ポア形
成ドメイン内におけるアミノ酸残基の機
能解析

BMB2015、平成27年12月2日

神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市

長尾知直, 真崎理沙, 郷田秀一郎, 海野
英昭, 畠山智充

ポア形成レクチン CEL-III の溶血活性に
関与するアミノ酸残基の機能解析

日本農芸化学会2015年度中四国・西日本
支部合同大会

平成27年9月18日

愛媛大学樽味キャンパス(農学部)、愛媛
県松山市

北句 工藤彰洋 牛島佑樹 海野英昭
畠山智充 郷田秀一郎

サンゴ由来レクチンの糖結合ドメインの
機能解析

第39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

平成27年9月10日

別府豊泉荘、大分県別府市

真崎理沙, 長尾知直, 郷田秀一郎, 海野
英昭, 畠山智充

溶血性レクチン CEL-III のオリゴマー構
造解析と溶血活性に関与するアミノ酸残
基の検索

日本分子生物学会年会

平成26年11月27日

パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

海野英昭, 郷田秀一郎, 畠山智充

溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成機構

第14回日本蛋白質科学会年会

平成26年6月25日

ワークピア横浜・横浜産貿ホールマリネ
リア、神奈川県横浜市
海野英昭、郷田秀一郎、畠山智充
溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成機構
日本生化学会九州支部例会
平成 26 年 5 月 17 日
九州大学病院キャンパス、福岡県福岡市
工藤彰洋、牛島佑樹、海野英昭、畠山智
充、郷田秀一郎
サンゴ由来レクチン相同性タンパク質の
糖特異性の解明
第 37 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
平成 25 年 9 月 26 日
雲仙新湯ホテル、長崎県雲仙市
真崎理沙、長尾知直、市瀬彩香、久松啓
伍、海野英昭、郷田秀一郎、畠山智充
溶血性レクチン CEL-III の膜結合ドメイ
ン内アミノ酸変異体の性質
第 37 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
平成 25 年 9 月 26 日
雲仙新湯ホテル、長崎県雲仙市
長尾知直、貞方仁、海野英昭、郷田秀一
郎、畠山智充
溶血性レクチン CEL-III の多量体化にお
ける構造変化の解明
第 37 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
平成 25 年 9 月 26 日
雲仙新湯ホテル、長崎県雲仙市
長尾知直、貞方仁、海野英昭、郷田秀一
郎、畠山智充
溶血性レクチンの多量体化における構造
変化の解明
第 13 回日本蛋白質科学会年会
平成 25 年 6 月 13 日
とりぎん文化会館、鳥取県鳥取市
郷田秀一郎、工藤彰洋、牛島佑樹、海野
英昭、畠山智充
サンゴ由来レクチン相同性タンパク質の
糖認識機構の解明
第 13 回日本蛋白質科学会年会
平成 25 年 6 月 12 日
とりぎん文化会館、鳥取県鳥取市
海野英昭、郷田秀一郎、畠山智充
溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成複合
体結晶構造解析
第 13 回日本蛋白質科学会年会
平成 25 年 6 月 12 日
とりぎん文化会館、鳥取県鳥取市
市瀬彩香、長尾知直、真崎理沙、久松啓
伍、海野英昭、郷田秀一郎、畠山智充
溶血性レクチン CEL-III の膜結合ドメイ
ン内アミノ酸変異体の性質
平成 25 年度日本生化学会九州支部例会
平成 25 年 5 月 19 日
佐賀大学農学部、佐賀県佐賀市

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.cms.nagasaki-u.ac.jp/lab/seitai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郷田 秀一郎 (GODA, Shuichiro)

長崎大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00346587