

WFA レクチンによるがん性糖鎖認識の構造学的解析 Structural basis of WFA lectin for binding-specificity toward cancer-specific sugar chains

久保田智巳^{1*}、清水明²、佐藤隆³、舘野浩章³、千葉靖典²、成松久³

¹産総研・バイオメディカル研究部門、〒305-8566 つくば市東 1-1 中央第 6

²産総研・創薬基盤研究部門、〒305-8566 つくば市東 1-1 中央第 6

³産総研・創薬基盤研究部門、〒305-8568 つくば市梅園 1-1 中央第 2

Tomomi Kubota^{1*}, Akira Shimizu², Takashi Sato³, Hiroaki Tateno³, Yasunori Chiba²
and Hisashi Narimatsu³

¹BMD, AIST, Central6, 1-1 Higashi, Tsukuba, 305-8566, Japan

²BRD, AIST, Central6, 1-1 Higashi, Tsukuba, 305-8566, Japan

³BRD, AIST, Central2, 1-1 Umezono, Tsukuba, 305-8568, Japan

1 はじめに

疾病の進行を正しく評価するバイオマーカーは創薬に不可欠である。これには疾患の進行に伴う糖鎖変化を追跡することが有効であるという科学的な背景に立ち、産総研糖鎖センターでは糖鎖バイオマーカーの開発、疾患特異的な糖鎖変化をもつ特定のタンパク質の発見とその検出系の確立を行ってきた。血清マーカーの臨床応用のためには、多様な糖タンパク質が混在する血清から微量のマーカー分子だけを特異的に検出する必要がある、その可否は、物理的な検出感度ではなく、特定タンパク質上の疾患に特徴的な糖鎖だけを認識できるプローブ分子の性能に支配される。言い換えれば、適切なプローブがない限り、糖鎖バイオマーカーは実用的には機能しないのである。その典型例がノダフジレクチン(WFA)である。WFA は非還元末端の GalNAc を認識するレクチンのひとつとして知られている。このレクチンは、糖鎖バイオマーカー開発の過程において、肝線維化、肝内胆管がん、肝臓がん、卵巣がんなどで健常人と患者を見分けるプローブとして有効であることが明らかとなっている (PCT/JP10/001203、PCT/JP10/061891、PCT/JP10/061791、PCT/JP12/067797)。現時点では、マーカー検出においては市販 WFA を用いているが、糖鎖認識特異性が広く、結合力が弱いなどの問題があるため、いくつかのマーカーで血清から直接かつ簡便な測定系の構築には至っていない。この技術課題を克服すべく、最近我々はこのレクチン遺伝子の単離と野生型および特異性の異なる変異型レクチンの生産に成功し、特許出願を完了した(特願 2012-280092)。これにより遺伝子工学的手法により、特異性改変や結合力増強などレクチンの高機能化が可能となっている。例えば、このタンパク質は C 末端付近に唯一ある Cys272 残基により分子間架橋された二量体構造を取っていて、この Cys を Ala に置換することと、1 箇

所ある N-glycan サイトを破壊(N146Q)することにより、糖鎖結合プロファイルを LacdiNAc (LDN) 特異的に改変することに成功している。以上の背景をふまえて本提案では、抗糖鎖プローブである WFA の実用化を目的とした高機能化のために、立体構造の解明とがん性糖鎖の認識機構を明らかにする。特に LDN 特異的な結合プロファイルを示す C272A 変異体の糖鎖結合の様式を解明する。

2 実験

植物由来野生型 WFA 及び LDN 糖鎖を導入した C272A 変異型 WFA の X 線回折データの収集は PF-AR-NW12A ビームラインに設置されたタンパク質結晶用 X 線回折データ測定装置により行った。前者は振動角 0.5°、露光時間 12 s、後者は振動角 0.5°、露光時間 5 s の条件で 360 枚の振動写真を測定、合計 180°分の回折データを収集した。データセットの分解能はそれぞれ 2.35Å 及び 1.9Å、トータル R-Merge は 0.068 及び 0.078 であった。野生型 WFA の構造解析はマメ科レクチン SBA をモデルとした分子置換法で決定した。変異型は野生型をモデルとした。最終モデルの R/R-free は 0.194/0.269 及び 0.204/0.243 であった。

3 結果および考察

市販の植物由来野生型 WFA(Vector Lab.)の 2.35Å 分解能での結晶構造解析の結果、このタンパク質には 1 カ所、M3FX 型糖鎖が付加されていること、この糖鎖が結晶のパッキングに影響しているため、LDN の導入が困難であることがわかった。LDN 導入を目的に C272A/N149Q 二重変異型 WFA をメタノール資化性酵母 *O. minuta* で発現した。変異体の結晶は野生型とは異なる条件で得られ、結晶系も全く異なっていた。変異型の分解能は 1.9Å であった。結晶構造から野生型は四量体であるのに対し変異型

は二量体であることが予想された。四次構造の違いが糖鎖との弱い結合特異性に影響を及ぼす可能性、すなわち四量体と比較して二量体では糖鎖プロファイルにおいて弱い結合を減衰させる効果が予想され、C272A 変異体は四量体構造をとりにくいことが LDN 特異的な結合特異性を示す要因の一つであることが示唆された。一方、変異型 WFA でも保持されている基本構造と考えられる二量体構造や糖鎖結合部位の構造には、野生型/変異型間で大きな違いはなかった。LDN 結合部位は他の GalNAc 認識レクチンである VVA などと同様に Ca と Mn イオンの近傍に位置し、GalNAc 認識に関わるアミノ酸残基の立体的な配置も保存していた。また LDN の還元末端側の GlcNAc との間に直接の相互作用は認められなかった。しかしながら、VVA や WBA では GlcNAc 近傍のループの構造が異なっていて、このループと GlcNAc の間接的な相互作用が特異性の差異を生み出していると考えられた。

* tom.kubota@aist.go.jp