

溶血性レクチン CEL-III の膜孔形成部位への変異の導入による 孔形成機構の解析

Mutational analysis of the pore forming mechanism of hemolytic lectin CEL-III

郷田秀一郎, 山脇佑太, 福本佳右

長崎大学大学院工学研究科

〒852-8521 長崎市文教町 1 - 1 4

Shuichiro GODA*, Yuta YAMAWAKI and Keisuke FUKUMOTO

Graduate School of Engineering,

Nagasaki University,

1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki, 852-8521, Japan

1 はじめに

孔形成毒素(Pore forming toxin)の一つである、ナマコ的一种グミ(*Cucumaria echinata*)由来溶血性レクチン CEL-III はヒトやウサギの赤血球を破壊する溶血性をもつ。これまでに単量体¹⁾及び孔を形成している七量体²⁾の立体構造が報告されており、CEL-III は糖を認識し結合するドメイン 1 及び 2 と、膜孔を形成するドメイン 3 から成り立っている。ドメイン 3 は単量体では 2 本の α ヘリックスを含んでいるが、七量体化したものは、その 2 本の α ヘリックスが 2 本の β ストランドとなり、全体では 14 本の β ストランドから成る β バレルを形成し、それが膜中でイオン透過性の孔(Pore)となり細胞を破壊する。このような大きな二次構造変化を伴った孔形成は、これまで知られていない。そこで、この多量体化を伴った膜孔形成の機構を明らかにすることを目的とした。七量体の立体構造から、膜孔を形成する β バレル以外にも隣り合う分子のドメイン 1 及び 2 の間で相互作用していることが観察された。このことから、ドメイン 1 及び 2 も多量体化に寄与していることが示唆された。膜孔形成機構に関しては、細胞表面の糖鎖を認識して結合後に多量体化し、その後に膜孔を形成することが予想されており、膜孔を形成していない多量体をプレポア構造と呼んでいる。これらのことから、CEL-III のドメイン 3 を部分的に欠損させた変異体を作成し、孔を形成していない七量体が得られるか、また得られた場合その構造を解析し、プレポア構造を明らかにすることによって膜孔形成機構を解明することを目的とした。

2 実験

CEL-III のドメイン 3 は膜孔形成七量体の立体構造から、Stem, Wrapping, Scaffold, Terminal の 4 つの部位に分けて考えた(図 1)。膜孔を形成する Stem 部位を除いたもの、さらに、その周りに存在する Wrapping 部位を除いたものの 2 種を作成して、大腸菌を宿主に用いた生産を行った。得られたタンパク質は封入体であったため、塩酸グアニジンをを用いて可溶化

後、希釈することによって変性剤の濃度を低下させ巻き戻した。その後、ゲルろ過で精製し、SDS-PAGE で単一のバンドを示すまでに精製した。得られた変異体の四次構造は X 線小角散乱測定によって行い、ビーズモデルによる立体構造モデルの構築を行った³⁾。

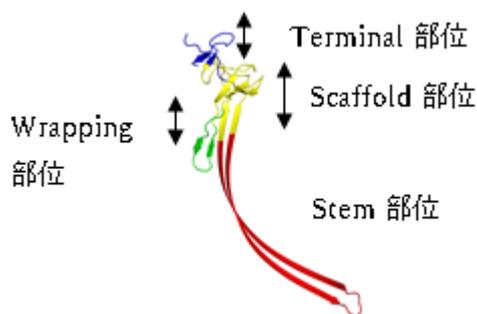


図 1 : CEL-III 膜孔形成七量体中の 1 分子のドメイン 3 部分の立体構造

3 結果および考察

得られた CEL-III 変異体を用いて X 線小角散乱測定によって分子のサイズの測定およびモデル構造の構築を行った。その結果、Stem 欠損変異体及び Stem と Wrapping 部位を欠損した変異体のギニエ半径(R_g)はギニエプロットから、それぞれ 101.5, 22.0 Å と求められた。野生型の R_g は 24.5 Å であることから、Stem 部位欠損では多量体化し、加えて Wrapping 部位も欠損すると単量体で存在することが示唆された。Stem 部位欠損変異体では多量体化が示唆されたことから、*in vitro* で多量体化を促進する溶液条件下での SAXS 測定を行った。その結果、1 M NaCl 存在下では 92.1 Å、さらに pH を 10.0 にすると 80.7 Å、さらに結合を示す糖であるラクツロースを加えると 69.9 Å となった。このことから、Stem 部位欠損変異体は多量体化した状態で得られ、塩濃度、pH 変化、糖の存在によって構造が変化することを示した。

得られた散乱曲線から溶液中でのモデル構造の構築を行った。作成方法はビーズを電子密度とし、モデル構造から散乱曲線を計算し実験値に近づけてい

く DAMMIN を用いて行った。その結果、Stem 部位を欠損した変異体は、膜孔形成七量体の立体構造から膜貫通部位を除いたものに極めて近い構造となった。一方、Wrapping 部位も除いたものは単量体での構造に近いモデル構造が得られた。

Stem 部位欠損変異体が多量体化していることから、リガンドであるとの相互作用が起こるのか、解析した。ラクトースを結合した樹脂に Stem 部位欠損変異体を通したところ結合し、ラクトースを含む溶液によって溶出された。このことから、Stem 部位を欠損したものでも糖認識は失われていないことが明らかとなった。

4 まとめ

このことより、膜貫通部位のうち Stem 部位が存在しなくても、CEL-III は七量体を形成することができると示唆された。すなわち、膜孔を形成することによって七量体化するのではなく、細胞膜表面で七量体を形成後に Stem 部位が立体構造を変化させて膜孔になることが示唆された。また、Wrapping 部位を欠損したものでは七量体化が見られなかったことから、同部位が、プロトマーのドメイン1, 2間での相互作用に影響し、多量体化に大きく寄与していることが示唆された。

参考文献

- [1] Uchida *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:37133-37141.
- [2] Unno *et al.*, (2014) *J. Biol. Chem.* **289**:12805-12812.
- [3] Svergun (1999) *Biophys J.* **76**:2879-2886.

* sgoda@nagasaki-u.ac.jp