

乳酸菌由来菌体表層グリセルアルデヒド-3-リン酸  
脱水素酵素の A 型血液型抗原結合メカニズムの解明  
Interaction between cell surface GAPDH from *Lactiplantibacillus plantarum* and  
A-type blood group antigen

米田一成<sup>1,\*</sup>, 竹下晃音<sup>1</sup>, 木下英樹<sup>1</sup>, 櫻庭春彦<sup>2</sup>, 大島敏久<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東海大学農学部バイオサイエンス学科, 〒862-8652 熊本県熊本市東区鹿渡 9-1-1

<sup>2</sup>香川大学農学部応用生物科学科, 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

<sup>3</sup>大阪工業大学工学部生命工学科, 〒535-8585 大阪市旭区大宮 5 丁目 16-1

Kazunari Yoneda<sup>\*1</sup>, Akine Takeshita<sup>1</sup>, Hideki Kinoshita<sup>1</sup>, Haruhiko Sakuraba<sup>2</sup>, Toshihisa Ohshima<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan

<sup>2</sup>Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa761-0795, Japan

<sup>3</sup>Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

## 1 はじめに

解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) は代表的なムーンライティングプロテインとして知られている。以前の研究で、GAPDH が腸ムチンやその糖鎖末端に発現している ABO 式血液型抗原の A 型抗原と結合することを明らかにしているが、糖鎖がどのように結合するのかは不明なままであった。近年、我々は乳酸菌由来 GAPDH の A 型血液型抗原部位を予測すると共に、Quartz Crystal Microbalance (QCM) ; 水晶振動子マイクロバランス法を用いることで、A 型血液型抗原との分子間相互作用を測定している。その結果、乳酸菌由来 GAPDH の Lys175 が、A 型血液型抗原の認識に重要な役割を担っていることを明らかにした [1]。本研究では、乳酸菌が腸管内に付着し、増殖する機構を明らかにする目的で、乳酸菌 GAPDH の A 型血液型抗原結合メカニズムを分子レベルで明らかにした。

## 2 実験

*L. plantarum* GAPDH の発現と精製は以前報告した方法に従って行った [1]。結晶化スクリーニングには市販のスクリーニングキットを使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行った。表 1 の条件で得られた結晶に対して、1 mM の A 型血液型抗原をソーキングすることで GAPDH-A 型血液型抗原複合体結晶の作成を行った。クライオプロテクトANT (抗凍結剤) には 30% v/v のエチレングリコールを選択し実験に用いた。X 線の波長は 1.00 Å、振動角度は 1 イメージにつき 1°、X 線の照射時間は 1 イメージ当たり 1 秒、結晶から検出器までの距離は 475.00 mm に設定にした。分子ドッキングシミュレーションには AutoDock Vina を用いた。

## 3 結果および考察

精製酵素を濃縮した後、結晶化を行ったところ、ポリエチレングリコール 3350 を沈殿剤とした条件で解析に適した結晶が得られた (図 1)。本結晶に 1 mM A 型血液型抗原を 20°C、2 時間ソーキングすることで GAPDH-A 型血液型抗原複合体結晶を作製し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、分解能 2.38 Å のデータ測定が可能であったが、ソーキングにより結晶にヒビが入ってしまい、良い回折像が得られなかった (図 2)。そこで、分子ドッキングシミュレーションを用いることによって、A 型血液型抗原結合部位の詳細な構造を推定した (図 3) [2]。

表 1 : GAPDH の結晶化条件

酵素濃度	4.1 mg/ml
補酵素濃度	0.5 mM NAD <sup>+</sup>
沈殿剤濃度	25% PEG3350
塩	0.2 M ギ酸 Na
結晶化温度	20°C

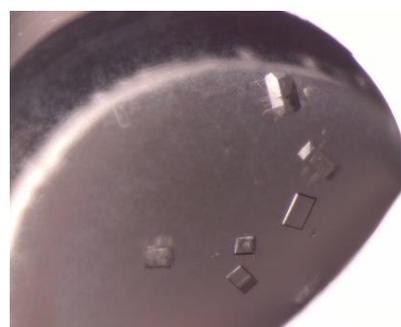


図 1 : GAPDH の結晶 (空間群  $P2_12_12_1$ )

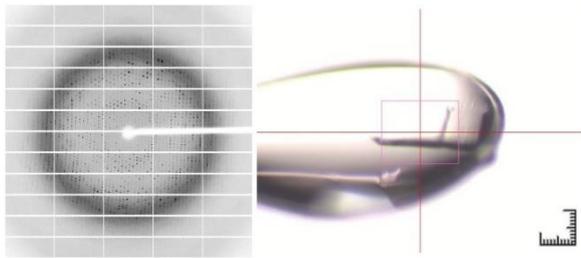


図2：GAPDH-A型血液型抗原複合体結晶とX線回折像

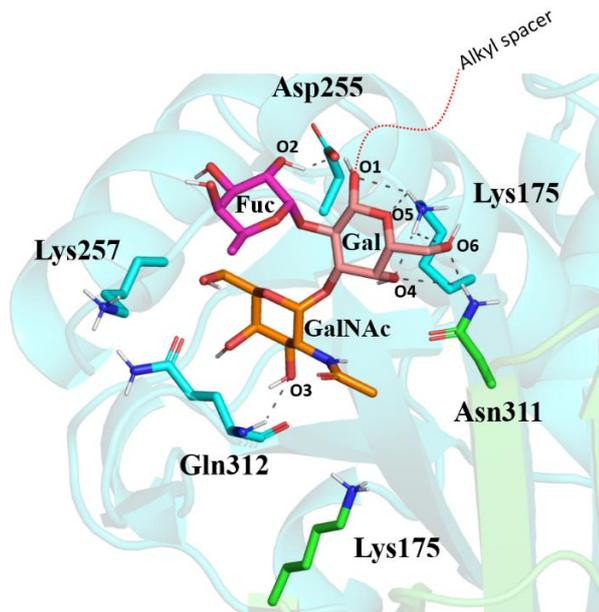


図3：AutoDock Vinaによる *L. plantarum* 由来 GAPDH と A 型血液型抗原のドッキングシミュレーションモデル。GAPDH のサブユニット間に結合している A 型血液型抗原および、結合に関わるアミノ酸残基をスティックモデルで表示した[2]。

#### 謝辞

X線回折実験を行うにあたり、Photon Factory のビームラインスタッフの皆様には大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。本研究は、東海大学総合研究機構の研究奨励補助、東海大学総合農学研究所プロジェクト研究の支援を受けて行われました。

#### 参考文献

- [1] K. Yoneda, M. Ogata, K. Nishiyama, K. Fukuda, S. Yasuda, K. Igoshi, and H. Kinoshita., Crystal Structure of Cell Surface Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum*: Insight into the Mercury Binding Mechanism. *Milk science*. (2019) **68**, 3-11.
- [2] K. Yoneda, A. Takeshita, M. Ogata, S. Yasuda, K. Igoshi, and H. Kinoshita., The interaction between cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Lactiplantibacillus plantarum* and A-type blood group antigen. *Milk science*. (2021) **70**, 53-62.