

溶血性レクチン CEL-III の切除変異体解析による溶血オリゴマー中のプロトマー間の相互作用の解明

Truncated mutants of the hemolytic lectin CEL-III revealed the interaction between protomer in hemolytic oligomer

郷田秀一郎^{1,2}, 福本佳右², 山脇佑太², 海野英昭², 畠山智充²

¹創価大学 糖鎖生命システム融合研究所

〒192-8577 東京都八王子市丹木町 1-236

²長崎大学大学院工学研究科総合工学専攻, 〒852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14

Shuichiro Goda^{1,2,*}, Keisuke Fukumoto², Yuta Yamawaki², Hideaki Unno² and Tomomitsu Hatakeyama²

¹GaLSIC, Soka University,

1-236 Tangicho, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan

²Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

1 はじめに

海産無脊椎動物であるグミ (*Cucumaria echinata*) から得られるレクチン CEL-III は分子質量 47.5 kDa, Ca²⁺依存性のレクチンである[1]。溶血活性は CEL-III が細胞表面の糖鎖と結合した後にオリゴマー化し、イオン透過性の孔 (ポア) を形成することによって起こる。CEL-III 単量体の立体構造解析から、CEL-III は糖結合ドメインであるドメイン 1 及び 2 と孔形成に寄与するドメイン 3 から成ることが明らかとなっている[2]。また、孔を形成した七量体の立体構造から、ドメイン 3 中の二つの α -ヘリックスを含む部分が β ストランドとなり、七量体化によってできる 14 本の β ストランドが β バレルを形成する[3]。この β バレルを形成する領域を Stem 領域と呼ぶ。しかしながら、七量体化における構造変化、すなわち単量体から七量体への四次構造変化と、膜孔形成に伴う α -ヘリックスから β シートへの二次構造変化の過程は不明である。すなわち、膜表面の糖鎖を認識し、結合後、先に七量体を形成し、その後膜孔を形成するのか、それとも、先に二次構造変化が起こった後に七量体化するのか中間状態は不明である。それを明らかにするために Stem 領域を欠損した変異体を作成し、多量体化するかどうか解析する。一方、七量体の立体構造から七量体形成時のプロトマー間の相互作用は、ドメイン 3 の β バレル形成のみならず、異なるプロトマーのドメイン 1 とドメイン 2 にもみられる。これらのことから、ドメイン 1 及び 2 は細胞表面の認識のみならず多量体化にも貢献していることが考えられた。そこで、さらに CEL-III のドメイン 3 全体を欠損した変異体を作製し、そのオリゴマー形成能の検討を行い、オリゴマー形成機構に重要な部位を明らかにする。オリゴマー形成能に関しては X 線溶液散乱測定及び Size-exclusion chromatography Multi angle light scattering (SEC-MALS) 測定によって行った。

2 実験

X 線溶液散乱測定は、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所射光実験施設 Photon Factory BL-6A に設置された溶液用小角散乱実験装置で行った。BL-6A は波長 1.5 Å の小角散乱測定専用ビームラインで、カメラ長は 1 m とした。X 線検出器として PILATUS3 1M を用いた測定を行った。測定サンプルとして、精製した CEL-III Stem 領域、およびドメイン 3 欠損変異体の測定を行った。溶液散乱用のセルは光路長 1mm、窓材としてマイカ (雲母) のものを使用した。散乱角、カメラ長校正用サンプルとして、ベヘン酸銀の回折を測定し、正確な散乱角とカメラ長を算出した。散乱データの解析には、Sangler[4]、PRIMUS[5]、GNOM[6] のプログラムを利用した。

人工的な溶液中でのオリゴマー化は、以下の溶液条件で起こることが明らかとなっている。その条件は、1M NaCl, pH 10.0、カルシウム、糖存在下である。その条件の組み合わせで測定することによるモノマーの構造変化の有無とオリゴマー化における構造変化に関する情報を得る為に X 線溶液散乱測定を行った。

また、溶液中のタンパク質の四次構造解析は、Size-exclusion chromatography Multi angle light scattering (SEC-MALS) 測定によっても行うことができる。同法は、サイズ排除カラムクロマトグラフィーを通してタンパク質を分離し、分離された各分子を、多角度光散乱法によって絶対分子量を求めるものである。それぞれの欠損変異体の分子量を SEC-MALS を用いて測定し、得られた変異体が単量体か多量体どちらで存在しているのかを確認した。サイズ排除カラムクロマトグラフィーは島津製作所製 HPLC システムを用いて行った。HPLC システムは、制御は CBM-20A、ポンプには LC-20AD、オートサンプラーには SIL-20A HT、カラムオープンに

CTO-20A、吸光度の検出には SPD-20A を用いた。デガッサーには Shodex 社製 ERC-3215 α を用いた。カラムには Shodex 社製 PROTEIN KW-803 を用いた。KW-803 は理論段数 21,000 TP/本、粒径 5 μm 、サイズ 8.0×300 (内径 \times 長さ、mm) である。溶離液には 10 mM Ca-TBS を用いた。本来、このカラムは添加する塩として塩素イオンを使用することはカラムによくはないが、これまでの測定で使用していることから、Ca-TBS を溶離液として用いた。流速は 1.0 mL/min、カラムオープンの温度を 27°C で溶出を行った。検出器には多角度光散乱検出器として SHOKO SCIENCE 社製 miniDAWN 及び示差屈折率検出器として Shodex 製 RI-501 を用いた。miniDAWN は検出器を 3 角度に設置している。

3 結果および考察

SAXS 測定の結果、Stem 領域欠損変異体は、ギニエ半径 R_g が 101.5 \AA となり、糖非存在下、中性 pH でも多量体化していた。また、測定によって得られたクラツキープロットと七量体の立体構造から計算された散乱曲線は高い類似性を示した。このことから、糖非存在下、中性 pH において七量体を形成していることが示唆された。この結果から、CEL-III Stem 部位欠損モノマーの *ab initio* 法による立体構造のモデリングを行ったところ、モデル構造は膜孔形成七量体から Stem 領域を除いた七量体に酷似しており、Stem 領域が無くても七量体化が可能であることが示唆された。また、CEL-III ドメイン 3 欠損モノマーのギニエ半径 (R_g) は、30.0 \AA であり、ドメイン 3 を欠損したものは、糖非存在下、中性 pH でも単量体として存在していた。高塩濃度、高 pH、糖存在下においては、凝集が確認され、有意な結果は得られなかった。

同様に多量体化の解析を SEC-MALS によっても行った。CEL-III Stem 部位欠損変異体の測定結果、A280nm のピークでは、絶対分子量が 200,000 近くを示しており、七量体程度の分子量となっていた。SAXS の結果と合わせて、Stem 部位欠損変異体は七量体で存在しているのではないかと考えられた。CEL-III ドメイン 3 欠損変異体の SEC-MALS 測定の結果 A280nm のピークでは、絶対分子量が 50,000 近くを示しており、モノマーもしくは二量体程度の分子量となっている。SAXS の結果と合わせて、ドメイン 3 欠損変異体は単量体で存在しているのではないかと考えられた。

赤血球に対する活性測定の結果からは、Stem 部位欠損変異体で凝集活性が見られた。ドメイン 3 をすべて欠損した変異体では凝集活性も溶血活性も観察されなかった。

4 まとめ

これらの結果から、膜孔形成に重要な役割を果たしていると思われるドメイン 3 である、Stem 領域を

欠損しても七量体構造を形成することが SAXS 測定、SEC-MALS 測定からも明らかとなった。Stem 領域を失ったことから溶血活性を示さなかったが、凝集活性を示したことは七量体化によるものと思われた。一方、ドメイン 3 全てを失うと単量体であり、溶血活性も凝集活性も示さない。これらのことから、Stem 領域以外のドメイン 3 も多量体化に貢献しており、それを明らかにしていきたいと思っている。

参考文献

- [1] T. Hatakeyama *et al.*, *J. Biochem.* **116**, 209 (1994).
- [2] T. Hatakeyama *et al.*, *J. Biol. Chem.* **282**, 37826 (2007).
- [3] H. Unno *et al.*, *J. Biol. Chem.* **289**, 12805 (2014).
- [4] N. Shimizu *et al.*, *AIP Conf. Proc.* **1741**, 050017 (2016).
- [5] P.V. Konarev *et al.*, *J. Appl. Cryst.* **36**, 1277 (2003).
- [6] D.I. Svergun *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495 (1992).

* goda@soka.ac.jp