

海産無脊椎動物由来溶血性・凝集性レクチンの溶液中の構造解析 Structural analysis of the haemolytic and haemagglutinating lectin from the marine invertebrate in solution

高橋優希, 郷田秀一郎*

創価大学大学院理工学研究科生命理学専攻, 〒192-8577 東京都八王子市丹木町1-236

Yuki TAKAHASHI and Shuichiro GODA*

Department of Biosciences, Graduate School of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 195-8577, Japan

1 はじめに

サンゴやナマコなど海産無脊椎動物はウサギ赤血球に対して、それを凝集して沈殿させる赤血球凝集活性や、赤血球を破壊してヘモグロビンを溶出させる赤血球溶血活性を示すレクチンをもつことが知られている[1]。我々は、サンゴの一種であるハイマツミドリイシ(*Acropora millepora*)が、凝集活性を示すレクチン AML-I をもち、ナマコ由来溶血性レクチン CEL-III では保存されていない C 末端 19 残基を遺伝子工学的に切除すると(AML-IΔC)溶血活性を示すことを明らかとし、C 末端をプロテアーゼで切除することによって二つの機能を制御できる分子を創製した[2]。AML-I はガラクトース・N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)に糖特異性を示し、細胞表面に存在する糖鎖を認識して結合、多量体化することによって細胞膜中にイオン透過性の膜孔を形成し、細胞を破壊すると考えられている[3]。これまでに、いくつかの膜孔を形成するタンパク質の単量体及び膜孔を形成した多量体の立体構造が報告されている[3]。また、膜孔形成は、多量体化をしているものの膜孔は形成していないプレポア構造という中間体構造を経て起きることが提案されている[4]。AML-I は、その単量体、多量体および中間体構造が解明されておらず、*in vitro* の溶液中での人工的な多量体化条件もわかつていない。そこで、本課題では、AML-IΔC の単量体、多量体、中間体構造の解明を目指し、*in vitro* での膜孔形成条件の探索及び散乱曲線からのモデル構造の構築を行なった。

2 実験

実験で用いる AML-IΔC は大腸菌を宿主に用いた生産及びヒト HEK293F 細胞を用いた生産によって得た。大腸菌で生産された AML-IΔC は封入体を形成していたため、変性剤を用いた可溶化及び、巻き戻しを行った。*in vitro* での多量体化条件の検討は種々の溶液条件を検討し、その分子量はサイズ排除クロマトグラフィー・多角度光散乱法(SEC-MALS)によって行った。SEC-MALS 法によって検討した条件で SEC-X 線小角散乱(SEC-SAXS)測定を行い、得られた散乱曲線からビーズモデル構造の構築を DAMMIN によって行った[5]。

3 結果および考察

大腸菌及びヒト細胞によって生産された AML-IΔC は凝集性が高かったため、凝集体形成を阻害する条件の検討を行った。凝集を阻害する効果が知られているアルギニン、ジスルフィド結合形成を防ぐ還元剤、疎水性相互作用を防ぐための界面活性の添加を検討したところ、アルギニンが最も高い凝集体形成阻害を示した。その他の物質の添加では分子量に大きな変化は見られず、凝集体を形成し、解離は見られなかった。そこで、0.8 M アルギニン存在下で SEC-MALS 測定を行ったところ、AML-IΔC は、単量体として存在していることが、光散乱測定で得られた分子量から明らかとなった(図 1)。

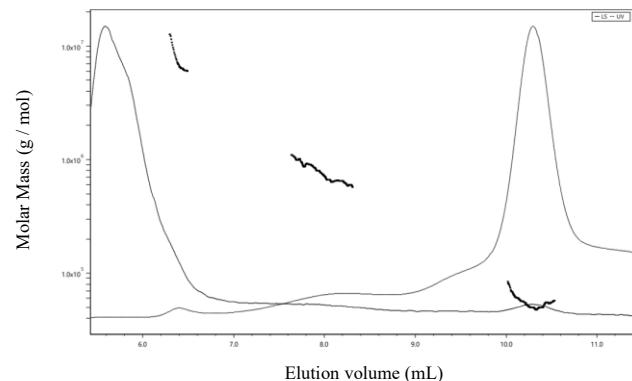


図 1 AML-IΔC の 0.8 M アルギニン存在下での SEC-MALS 測定結果

そこで、人工的な溶液条件下での多量体化形成を試みた。溶液条件は、これまでにナマコ由来溶血性レクチン CEL-III で報告されている高塩濃度、高 pH、カルシウム及び糖存在下で行った。さらに条件検討を行った結果、AML-IΔC は、CEL-III とは異なり pH 8.0 で多量体化していると考えられた。単量体と同様にアルギニン存在下で SEC-MALS 測定を行ったところ、七量体の分子量に相当する位置にピークが観察された(図 2)。

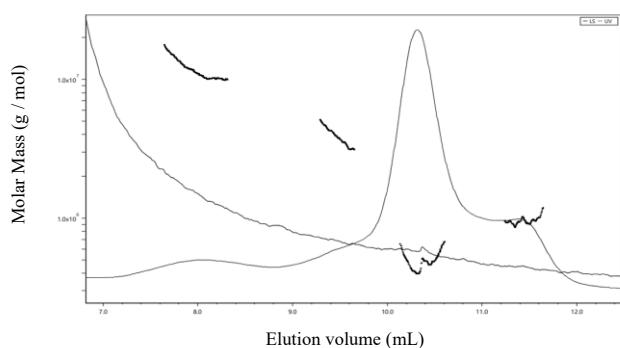


図2 多量体化した AML-IΔC の 0.8 M アルギニン存在下での SEC-MALS 測定結果

次に、AML-IΔC を SEC-MALS 測定によって検討した溶液条件下で SEC-SAXS 測定を行い、得られた散乱曲線からモデル構造の構築を行なった。

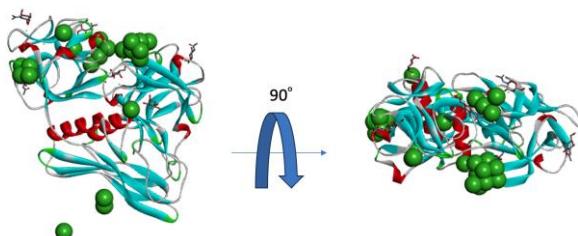


図3 AML-IΔC の 0.8 M アルギニン存在下での散乱曲線から作成したビーズモデル構造と CEL-III 単量体の結晶構造

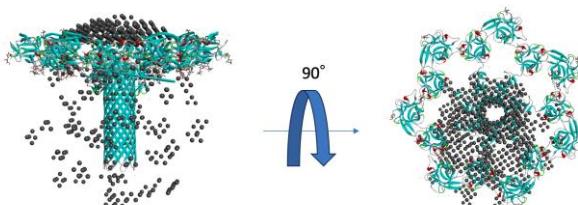


図4 AML-IΔC の多量体化したもの 0.4 M アルギニン存在下での散乱曲線から作成したビーズモデル構造と CEL-III 膜孔形成多量体の結晶構造

図3に AML-IΔC の単量体の散乱曲線から作成されたビーズモデル構造を示した。得られた電子密度に相当するビーズは、AML-IΔCにアミノ酸配列相同性を示すナマコ由来レクチン CEL-III の単量体の X 線結晶構造解析の立体構造と近しい電子密度となっていた。一方、人工的な溶液中で多量体化した AML-IΔC のビーズモデル構造は膜孔のようなものが観察され、膜孔を含む多量体を形成していると思われた（図4）。電子密度を、これまでに報告されている CEL-III の多量体構造と比較すると、より小さ

な分子量の分子として存在していることが示され、膜孔形成時の四次構造が AML-IΔC と CEL-III では異なることが示唆された。

4 まとめ

赤血球に対して凝集活性・溶血活性を示すサンゴ由来溶血性レクチン AML-IΔC の単量体・多量体・中間体構造の解析のために、大腸菌及びヒト HEK293F 細胞を用いたタンパク質の生産を行った。得られたタンパク質の多量体化を人工的な溶液中で行い、SEC-MALS 測定によって、分子量を解析し、その条件を決定した。得られた条件下での SEC-SAXS 測定結果から得られた散乱曲線を用いて、ビーズモデル構造を構築した。単量体の立体構造は、ナマコ由来レクチン CEL-III と類似した構造であった。人工的な多量体化溶液中の AML-IΔC 分子の構造は、膜孔の存在が確認され、人工的な溶液中での多量体化に成功したと考えられた。

参考文献

- [1] T. Hatakeyama and H. Unno, *Cells* **12**, 1814 (2023).
- [2] Y. Takahashi *et al.*, *J. Biochem.* **177**, 375 (2025).
- [3] H. Unno *et al.*, *J. Biol. Chem.* **289**, 12805 (2014).
- [4] K. van Pee *et al.*, *Elife*. **6**, e23644 (2017).
- [5] D. I. Svergun. *Biophys J.* **76**, 2879 (1999).

* goda@soka.ac.jp