

X線小角散乱法による孔形成タンパク質の溶液構造解析 Structural analysis of pore forming toxin in solution by small-angle X-ray scattering

郷田秀一郎*、長尾知直、海野英昭、畠山智充

長崎大学大学院工学研究科, 〒852-8521 長崎市文教町 1-14

Shuichiro Goda*, Tomonao Nagao, Hideaki Unno, Tomomitsu Hatakeyama

¹Graduate 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)は、タンパク質が細胞表面を認識して結合、膜を貫通する孔を多量体化することによって形成し、細胞を破壊する。黄色ブドウ球菌の α -ヘモリジンやロイコシジンなどは、これらの働きによって赤血球や白血球細胞を破壊する。これまで黄色ブドウ球菌由来 α -ヘモリジン[1]や γ -ヘモリジン[2]の孔形成多量体の X 線結晶構造解析による立体構造が報告されている。 α -ヘモリジンは単一の構成成分の七量体、 γ -ヘモリジンは二成分が四分子ずつ会合し八量体を形成することが報告されている。他の孔形成毒素では、孔を形成していない可溶性の単量体構造が報告されているものがあるものの、多量体構造の報告例は少ない。そこで、X 線小角散乱法による溶液中での孔形成多量体のモデル構造の構築を行うこととした。測定する試料にはナマコ的一种であるグミ由来溶血性レクチン CEL-III を用いた。

2 実験

測定は高エネルギー加速器研究機構 BL-10C にて行った。測定条件は、カメラ長は ~ 80 cm、検出器には PILATUS3-300KW を用いた。測定した散乱曲線は $0.014 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0.32 \text{ \AA}^{-1}$ 、 $19.6 \text{ \AA} < dB < 449 \text{ \AA}$ の範囲を用いた。試料にはグミから調製した CEL-III を用い、すでに報告している人工的な多量体化条件である、高塩濃度、高 pH、糖、カルシウム存在下で多量体化したものをを用いた。すでに、多量体は界面活性剤存在下で七量体に解離することを見出しており[3]、界面活性剤存在下で測定を行った。得られた散乱曲線は Svergun が開発した DAMMIN[4]を用いてモデル構造の構築を行った。

3 結果および考察

これまでの研究によって、CEL-III 膜孔形成多量体は最小の構造単位として七量体を形成することが明らかとなっている。そこで、モデル構造の構築は構成するモノマーの点群対称性を七回対称とする P7 と対称性をもたない P1 で行った (図 1)。X 線小角散乱法と並行して行っていた X 線結晶構造解析による構造が明らかとなっているので(c)に図示する[5]。X 線結晶構造解析での構造と比較すると、X 線小角

散乱から構築されたモデル構造は、対称性を指定せずに P1 で計算したものでは明確な構造は得られず、P7 を指定することで比較的良好なモデル構造を得ることができた。七回対称を持つことは、X 線結晶構造解析の結果から明らかとなっており、対称性の情報を加えることで結晶構造と類似したモデル構造を得ることができた。このことから、CEL-III の膜孔形成多量体は溶液中でも結晶構造と同様の構造を形成しており、また、界面活性剤存在下でも X 線小角散乱測定から優位なモデル構造構築ができると考えられた。

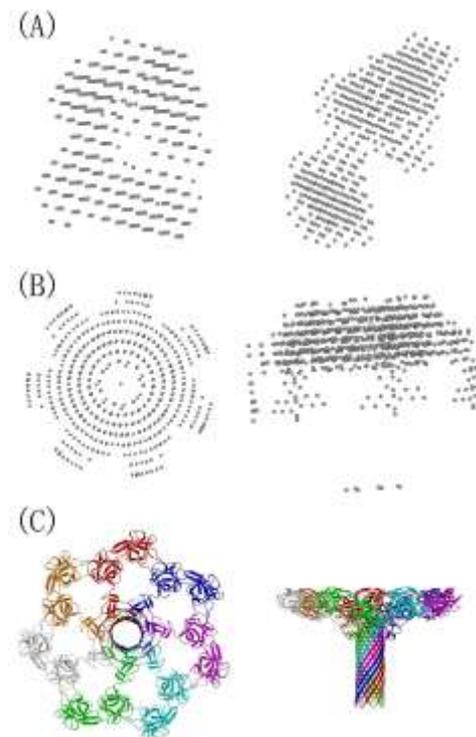


図 1 : X 線小角散乱法によって構築したモデル構造 (A),(B)および X 線結晶構造(C)。 (A)対称性 P1,(B)対称性 P7 で計算したもの。 (A), (B), (C)左側 : 七回対称軸を中心に示した。右側 : 七回対称軸を縦にして示した。

参考文献

[1] L. Song *et al.*, *Science* **274**, 1859 (1996).

- [2] K. Yamashita *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 17314 (2011).
- [3] S. Goda *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 679 (2013)
- [4] D. I. Svergun *Biophys. J.* **77**, 2879 (1999)
- [5] H. Unno *et al.*, *J. Biol. Chem.* **289**, 12805 (2014)

* sgoda@nagasaki-u.ac.jp