

溶血性レクチン CEL-III の多量体化機構の X 線小角散乱測定による解明

Elucidation of the oligomerization mechanism of hemolytic lectin CEL-III by small-angle X-ray scattering

郷田秀一郎(長崎大・院工)

ナマコ的一种である海産無脊椎動物グミ(*Cucumaria echinata*)から見出されたレクチンの一つである CEL-III は、分子量 47500、Ca²⁺ 依存性、GalNAc 特異的であり、赤血球表面の糖鎖を認識・結合・多量体化により孔形成し溶血活性を示す。単量体の立体構造は、すでに明らかとなっており、糖結合ドメインであるドメイン1及び2と多量体化に関与すると考えられるドメイン3から成り立っている。しかしながら、溶血活性を示す会合体の構造・及びその形成機構は不明であり、その解明のために溶液中のタンパク質の構造情報が得られる X 線小角散乱測定(SAXS)を行った。

CEL-III は、グミ抽出液より3種の糖結合カラム及びゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製し、得られた単量体 CEL-III を実験に用いた。単量体の多量体化は、すでに見出されている人工的な溶液条件下(高塩濃度、高pH、カルシウム及び糖存在下)で行った。同条件下で多量体化させたところ、SDS-PAGE では 270 k 付近(6 量体)にバンドを示すものの、SAXS で測定を行うと、その分子量は約 1000 k(25 量体)とより高分子量な会合体として存在していた。膜貫通領域が高度に疎水性であることが原因と考えられたため、界面活性剤存在下で測定を行った。その結果、多量体の分子量は約 6 量体と求められた。他に溶血活性を示すタンパク質として知られている α -ヘモリジンは7量体を形成して活性を示すことが報告されている。これらの結果は、人工多量体は界面活性剤に対する耐性を持った溶血活性を示す最小のユニットである 6 量体が会合し、更なる多量体を形成していることを示唆していた。

多量体化における動的な構造変化を解明するためにストップドフロー X 線小角散乱測定(SF-SAXS)を行った。人工的な多量体化条件として高 pH、高塩濃度、カルシウム及び糖(ラクツロース)存在下で測定を行った。その結果、界面活性剤存在下・非存在下で 7.6sec 以内に多量体化は終了していた。界面活性剤存在下での散乱曲線と、界面活性剤非存在下での多量体化の中間の散乱曲線は極めてよく似ており、単量体から 6-7 量体を経て、約 20-25 量体を形成していることが示唆された。このことは、基本的な孔構造である 6-7 量体がさらに多量体化していると考えられた。