

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370054

研究課題名(和文) X線構造に基づくガレクチンと糖鎖プロセッシング酵素のヒト型分枝糖鎖認識機構の解明

研究課題名(英文) Carbohydrate recognition mechanisms of galectins and carbohydrate processing enzymes deduced from X-ray structures

研究代表者

神鳥 成弘 (KAMITORI, Shigehiro)

香川大学・総合生命科学研究センター・教授

研究者番号：00262246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖は、アレルギー反応やウイルス・細菌感染等に関与している。これらの糖鎖を認識しているのは糖鎖結合タンパク質である。本研究では、糖鎖結合タンパク質と糖鎖との複合体のX線結晶解析を行い、3次元構造情報に基づいて糖鎖結合タンパク質の糖鎖認識機構について解明することを目的とした。その結果、免疫応答に関与するガレクチン8、ボツリヌス毒素ヘマグルチニン成分、ウェルシュ菌細胞壁分解酵素について糖鎖認識機構に関する新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Cell surface oligosaccharides are involved in immune responses and bacterial/viral infections, and they are specifically recognized by carbohydrate-binding proteins. X-ray structures of the complexes of carbohydrate-binding proteins with the target oligosaccharides have been determined to elucidate the carbohydrate recognition mechanisms. The results of this research project give new insights into the carbohydrate recognition mechanisms of galectin-8, a hemagglutinin subcomponent of the botulinum neurotoxin, and an endolysin encoded by episomal phage of *Clostridium perfringens*.

研究分野：タンパク質X線結晶解析

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析 糖鎖 糖鎖結合タンパク質 ガレクチン ヘマグルチニン エンドライシン ウェルシュ菌 ボツリヌス菌

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、各種の単糖がグリコシド結合によりつながったもので、生体内において、構造体や栄養貯蔵体としてばかりでなく、情報提示・伝達といった重要な役割を担っており、糖鎖生物学の研究は年々重要性が増し盛んとなっている。真核生物の分泌および膜タンパク質には、AsnのアミドNにN-結合型糖鎖、Ser, Thrの水酸基にO-結合型糖鎖が付加されている。N-結合型糖鎖は、枝分かれ(分枝)を持つ複雑な構造であり、アレルギー反応やウイルス・細菌感染等に深く関与している(図1)。これらの糖鎖を認識しているのは糖鎖結合タンパク質である。糖鎖結合タンパク質の糖鎖認識機構を原子レベルで明らかにするためには、糖鎖結合タンパク質・糖鎖複合体のX線結晶解析が有力な手段となるが、結晶化に供するのに十分量の均一なヒト型糖鎖を入手するのは困難であった。近年、研究分担者の中北は、卵白から、ヒドラジン分解を用いることにより、天然型と同じ構造を持つN-結合型のヒト型糖鎖を、純度よく大量(10 mg以上)に調製する技術を開発した。このことにより、われわれの研究グループにおいても、糖鎖結合タンパク質の糖鎖認識機構について、構造生物学的(X線結晶解析)にアプローチすることが可能となった。

図1. N-結合型糖鎖の例。



2. 研究の目的

本研究の目的は、N-結合型のヒト型糖鎖を用い、糖鎖結合タンパク質の糖鎖認識機構をX線結晶解析により分子レベルで明らかにし、これらが担う生理活性や感染機構に関して新たな構造学的知見を得ることである。糖鎖結合タンパク質としては、免疫応答において様々な生理活性を有するガラクトース特異的動物レクチン(ガレクチン)、および食中毒・ガス壊疽の原因細菌であるウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)・ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)関連の糖鎖結合酵素を対象とした。本報告書では、(1)ガレクチン8、(2)ボツリヌス菌毒素ヘマグルチニン成分HA70、(3)ウェルシュ菌細胞壁分解酵素エンドライシンPsm、について報告する。これらは学術誌に発表することができた。

3. 研究の方法

糖鎖は、中北らにより調製されたもの、あるいは市販されているものを用いた。糖鎖結合タンパク質は、リコンビナントタンパク質として大腸菌による大量発現を行い、液体クロマトグラフィー精製により得た。結晶化は市販の結晶化スクリーニングキットを用い、結晶化条件の最適化はマニュアルで行った。糖鎖複合体の結晶作成は、糖鎖結合タンパク質と糖鎖とを予め混ぜ合わせて結晶化を行う共結晶法、および糖鎖結合タンパク質の結晶を糖鎖溶液に浸漬するソーキング法の双方を試した。X線データの収集は、RAXIS VII/RA-Micro7HF X-ray generator (Rigaku)、および放射光施設(Photon Factory, SPring-8)の共用ビームラインにて行った。構造決定・精密化はプログラムシステムCCP4およびCNSを用いた。その他の実験の詳細については、「5. 主な発表論文等」を参照のこと。本研究成果としてPDBに登録した構造を以下にあげる。

(1) ガレクチン8

プロテアーゼ耐性ガレクチン8変異体(G8Null)/ラクトース複合体(1分子)
PDB code: 4FQZ
G8Null/ラクトース複合体(2分子) PDB code: 3VKL
G8Null/ α 2-3-シアリルラクトース/ラクトース複合体 PDB code: 3VKM
ガレクチン8 N末側糖鎖結合ドメイン(G8N) PDB code: 3VKN
G8N/ α 2-3-シアリルラクトサミン複合体 PDB code: 3VKO

(2) ボツリヌス菌毒素ヘマグルチニン成分

HA70 (HA70C)
HA70C/ α 2-3-シアリルラクトース複合体 PDB code: 4EN6
HA70C/ α 2-6-シアリルラクトース複合体 PDB code: 4EN8
HA70C/ α 2-3-シアリルラクトサミン複合体 PDB code: 4EN7
HA70C/ α 2-6-シアリルラクトサミン複合体 PDB code: 4EN9

(3) ウェルシュ菌細胞壁分解酵素エンドライシンPsm

Psm PDB code: 4KRT
Psm 触媒ドメイン/N-アセチルグルコサミン複合体 PDB code: 4KRU

(4) その他

プロテアーゼ耐性ガレクチン9変異体/ラクトース複合体(2分子) PDB code: 3WV6
本構造は、最近、構造解析に成功したもので、2つの糖鎖結合ドメインを持つガレクチン9の初めての例である。現在、得られた構造の詳細について検討中である。

4. 研究成果

(1) ガレクチン 8 糖鎖複合体の X 線結晶解析

ガレクチン 8 (G8) は、生体内に広く発現しており、細胞マトリックス間相互作用や細胞 (好中球) 接着に関与していることが報告されている。G8 は、2 つの異なる糖鎖結合ドメイン (Carbohydrate Binding Domain, N-CRD と C-CRD) がリンカーでつながれたタンデムリピート型の構造を持っている。N-CRD は α 2-3-シアル化糖鎖に強い親和性を持つが、C-CRD は N-CRD より糖鎖親和性が低い。これまでに多くのガレクチンの X 線結晶解析が報告されているが、それらはすべて 1 つの CRD を対象としたもので、2 つの CRD を含む X 線構造はまだなかった。これは 2 つの CRD をつなぐリンカー部分のプロテアーゼ感受性が高いためである。本研究では、G8 の N-CRD 単独 (G8N), およびリンカー部分を短くすることにより調整したプロテアーゼ耐性ガレクチン 8 変異体 (G8Null) と糖鎖との複合体の X 線結晶解析に成功した。これは、2 つの CRD を持つガレクチンの最初の構造決定例であった。

G8N と α 2-3-シアルルクトサミンとの複合体 (G8N/SiaLacNAc) においては、2 つの G8N 分子が側面同士で接することによりプロペラ型の 2 量体を形成しており、糖鎖結合部位は同じ方向を向いていた (図 2A)。この構造は、1 つの CRD しか持たないガレクチン 1 が形成する 2 量体構造と極めてよく似ており、G8 も、N-CRD 同士が会合する可能性を示している。G8Null と糖鎖 (α 2-3-シアルルクトース, ラクトース) との複合体 (G8Null/SiaLac/Lac) においては、SiaLac は N-CRD に、Lac は C-CRD に結合していた (図 2B)。これは、それぞれの CRD の基質親和性が違うからであり、立体構造を詳細に検討した結果、親和性を決定しているアミノ酸残基は、Arg45, Gln47, Arg59, Lys71, Arg72 であることがわかった。N-CRD (青色) と C-CRD (緑色) の糖鎖結合部位は、ほぼ直交しており、上から見ると折れ曲がった構造をとっている。G8Null は、結晶中で C-CRD 背面同士で接して 2 量体を形成しており (図 3A)、さらに、この 2 量体が N-CRD の端同士で相互作用して (図 3B 中、赤点線内)、大きな格子構造を形成していた (図 3B)。以上のことから、G8 は、N-CRD 側面同士、および C-CRD 背面同士で結合することにより 2 量体を形成できる、いわゆる多重会合モードを持つ可能性が示唆される。

本研究発表後、これに関連する興味深い研究報告があった。G8 が細菌感染を検知しオートファジーに導く際、C-CRD 背面でアダプタータンパク質 NDP52 と相互作用することが示され (Thurston *et al.* (2012) *Nature* **482**, 14-418), G8・NDP52 由来ペプチド複合体の X 線構造が決定された。(Kim *et al.* (2013) *Nat. Commun.* **4**, 1613, PDB code: 4HAN)。われわれの研究、およびこれらの研究は、G8 の C-CRD

背面でのタンパク質の認識が、G8 の生理活性と密接に関係があることを示唆している。

図 2. G8Null の全体構造。 (A) G8N が側面同士で接するプロペラ型 2 量体の構造。(B) G8Null の折れ曲がり構造。N-CRD (青色) と C-CRD (緑色) の糖鎖結合部位軸は直交している。

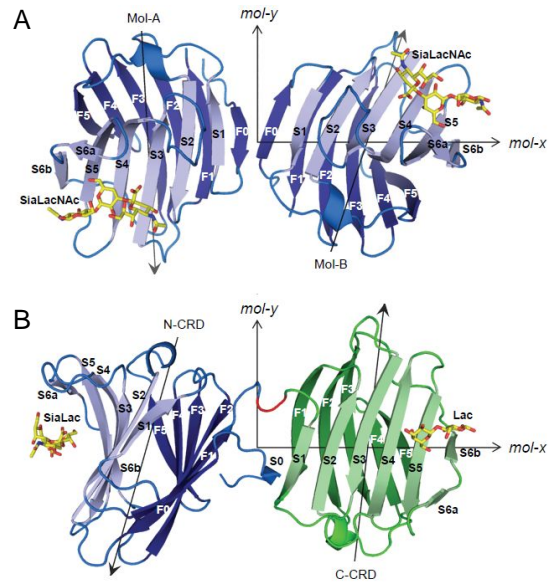
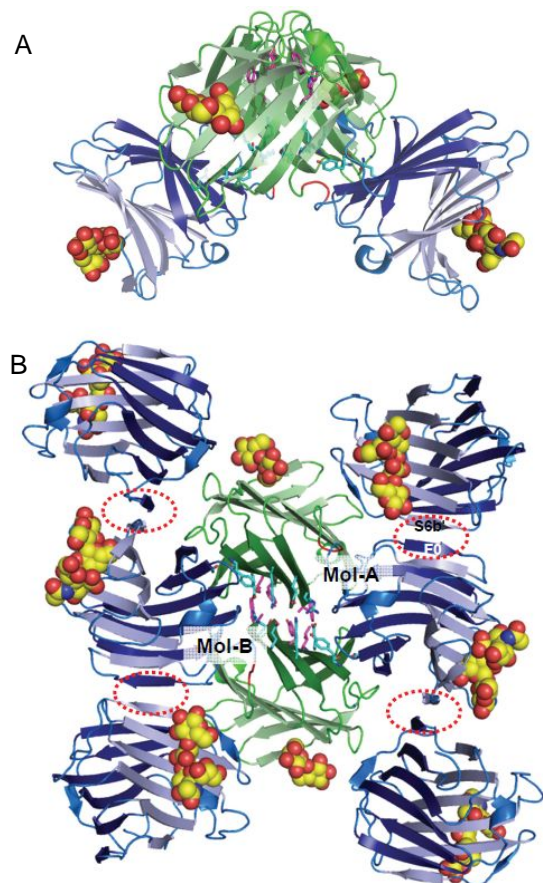


図 3. G8Null の多量体構造。 (A) G8Null は C-CRD 背面同士で接して 2 量体を形成する。(B) 2 量体が N-CRD の端同士で相互作用し、さらに大きな格子構造を形成する。



(2) ボツリヌス菌毒素ヘマグルチニン HA70の糖鎖認識機構

ボツリヌス菌が産生する神経毒素は、毒素成分と3つのヘマグルチニン成分(HA17, HA33, HA70)とがプロジェニター毒素複合体を形成している(図4A)。ヘマグルチニン成分は、上皮細胞上のシアル化された糖鎖に結合することにより毒素の侵入を容易にさせている。ヘマグルチニン成分の1つであるHA70の糖鎖認識機構について新たな知見を得るために、タイプC毒素のHA70(HA70/C)と、生体内にある2つのタイプのシアル化糖鎖である α 2-3-シアルラクトース(SiaLac)および α 2-6-シアルラクトース(6SiaLac)との複合体のX線結晶解析を行った(図4B)。

結晶解析の結果、HA70Cは、2つのフラグメント、HA22-23/CとHA55/Cに分解されていることがわかった。HA55/Cは、ドメインI, II, IIIからなり、これら3つのドメインの界面には糖鎖が結合するための溝が形成されていた。HA70Cは、3角形型の3量体を形成しており、糖鎖はそれぞれの頂点近くに結合していた(図5)。糖鎖結合部位の構造を詳細に見ると、SiaLac, 6SiaLacともに、シアル酸部分は、Asp513, Asn514, Thr524, Arg525により多くの水素結合で認識されていた。しかしながら、ガラクトース、グルコース部分の配向は大きく異なっており、SiaLacは伸長したコンフォメーションで、6SiaLacは折れ曲がったコンフォメーションで結合していた(図6)。SiaLac, 6SiaLacは、N-結合型糖鎖の先端部分にあたり、生体内では、いくつかの糖単位を経て糖タンパク質に結合している。SiaLacの伸長したコンフォメーションでは、糖タンパク質とHA70Cとの間で衝突を起こすことなく、HA70Cは糖鎖を認識できる。一方、6SiaLacで見られる折れ曲がったコンフォメーションでは、HA70Cと糖タンパク質との間で衝突が起こることが予想される。X線データによる構造精密化においても、6SiaLacの占有率は低く、得られた電子密度もSiaLacに比べると不確かさが残った。以上のことから、HA70Cの糖鎖結合親和性はSiaLacの方が6SiaLacよりも高いと予想された。このことを確かめるために、糖鎖マイクロアレイによる結合アッセイを行った。この際、より生体内での状態に近づくため、 α 2-3-シアルラクトサミン(SiaLacNAc)および α 2-6-シアルラクトサミン(6SiaLacNAc)をウシアルブミンに糖鎖修飾したサンプルを測定に用いた。その結果、HA70は、 α 2-3-, α 2-6-シアル化糖鎖の両方を認識し結合することができるが、その親和性は、 α 2-3-シアル化糖鎖の方が、 α 2-6-シアル化糖鎖よりも高いことがわかった。本研究により、ボツリヌス菌プロジェニター毒素複合体の糖鎖親和性について情報を得ることができた。現在、他のヘマグルチニン成分であるHA17について、同様のアプローチで研究を進めている。

図4. ボツリヌス菌毒素複合体とシアル糖鎖。

(A) 予想されているプロジェニター毒素複合体の模式図。14の分子からなると考えられている。(B) α 2-3-シアルラクトース(SiaLac), α 2-3-シアルラクトサミン(SiaLacNAc) α 2-6-シアルラクトース(6SiaLac) α 2-6-シアルラクトサミン(6SiaLacNAc)の化学構造式。

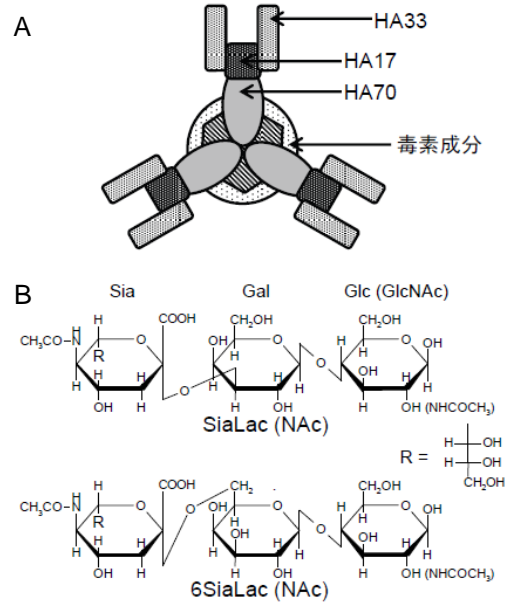


図5. HA70Cの全体構造。 結合しているSiaLac, 6SiaLacを空間充填モデルで描いている。

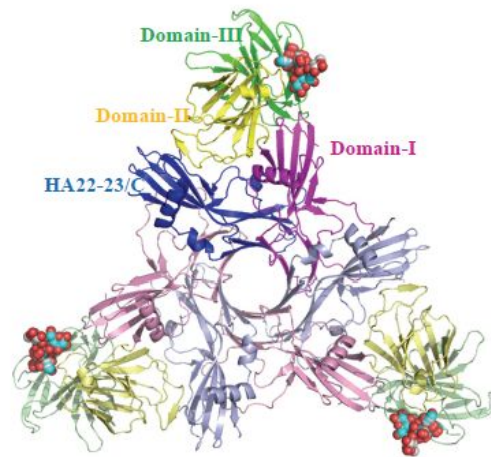
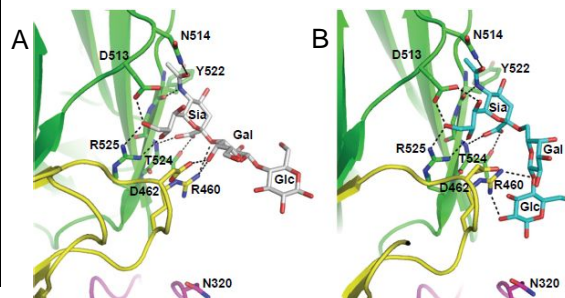


図6. 糖鎖結合部位の構造。 (A) 結合したSiaLacとHA70Cとの間の水素結合を点線で示す。SiaLacは伸長したコンフォメーションで結合している。(B) 6SiaLacは折れ曲がったコンフォメーションで結合している。



(3) ウェルシュ菌細胞壁分解酵素エンドライシン Psm の X 線結晶解析

ウェルシュ菌等のグラム陽性菌は、約 250Å の厚さの細胞壁を持ち、細胞の形態を保っている。細胞壁は、N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸が交互にβ-1-4-結合でつながった糖鎖（グリカン鎖）を 8~12 アミノ酸のペプチド鎖が架橋した網目構造の高分子ペプチドグリカンからなる。グリカン鎖の構造は共通であるが、ペプチド架橋の成分・構造は細菌により著しく異なる。エンドライシンは、ファージ由来遺伝子として宿主細胞に溶原化されており、発現すると細胞外へ分泌されペプチドグリカンを加水分解し溶菌化を導く。興味深いことに、エンドライシンは細菌の外側からも働き、細菌を死滅させることから、抗菌タンパク質製剤としての可能性が注目されている。エンドライシンの溶菌活性は宿主特異的であることから、ペプチド架橋部分が認識されていると考えられる。ウェルシュ菌ファージ由来エンドライシン Psm は、N 末側にグリカン鎖を加水分解する触媒ドメインと、C 末側に細胞壁結合ドメインを持ち、溶菌活性を持つためには双方のドメインが必須である。Psm の宿主特異的細胞壁認識・分解機構を解明するために Psm の X 線結晶解析を行った。

Psm は、触媒ドメインと、2 つの Src homology 3 (SH3) ドメインがタンデムリピートに配置された新規構造の細胞壁結合ドメインを持っていた（図 7A）。触媒ドメインは中央に大きな負電荷の孔を持ち、ここにグリカン鎖が結合して N-アセチルムラミン酸 1 位側を加水分解すると考えられた（図 7B）。細胞壁結合ドメインを構成する SH3 ドメインは、通常、ペプチド鎖を認識してこれに結合する。細胞壁の立体構造については、いくつかのモデルが提唱されている。その 1 つである NMR 構造に基づいた黄色ブドウ球菌（ウェルシュ菌と同じグラム陽性細菌）のペプチドグリカンモデルによると、グリカン鎖とペプチド架橋は直交して、全体として正六角形を単位とした蜂の巣構造をとっている（Meroueh *et al.* (2006) *PNAS*. **103**, 4404-4409）。このペプチドグリカンモデルに Psm を入れた場合、細胞壁結合ドメインがペプチドグリカンのペプチド架橋部分を認識すると仮定すると、触媒ドメインはグリカン鎖を加水分解するのに極めて都合のよい配向・位置にくる（図 8）。このモデル構造から、細胞壁結合ドメインがペプチドグリカン中の種固有のペプチド鎖を特異的に認識して、触媒ドメインがグリカン鎖を加水分解するのを助けているという機構が考えられる。現在、この機構を確かめるために、Psm とウェルシュ菌細胞壁成分糖ペプチド（ペプチドグリカンフラグメント）との複合体の X 線結晶解析を計画している。今後は、エンドライシンの細胞壁認識機構とともに、細胞壁の立体構造についても、あわせて解明していきたい。

図 7. Psm の全体構造。(A) Psm は触媒ドメインと 2 つの SH3 ドメイン (SH3N, SH3C) からなる。(B) Psm 触媒ドメインの基質結合モデルを表面電荷とともに示す。

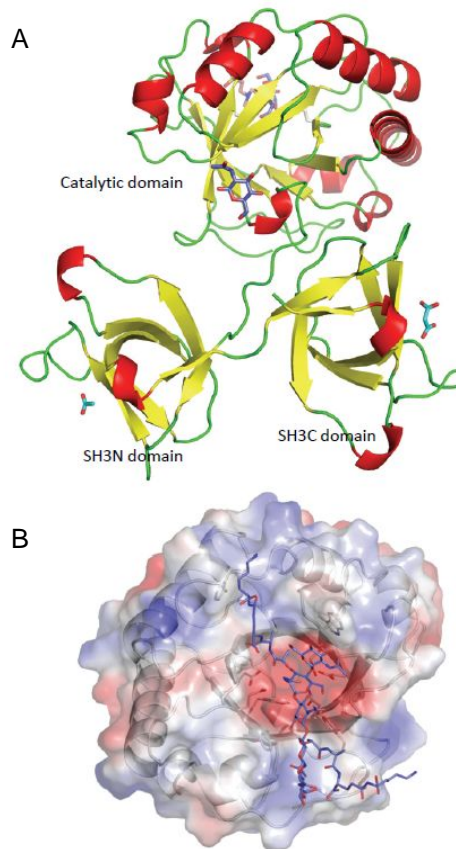
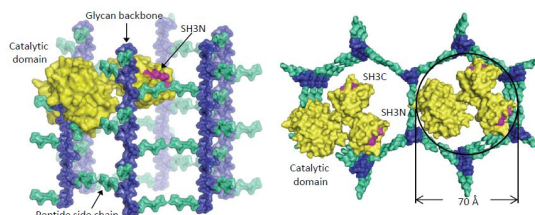


図 8. Psm 細胞壁認識モデル。予想される SH3N-SH3C ドメインのペプチド結合部位を赤紫色で示す。SH3N-SH3C ドメインは、グリカン鎖と直交したペプチド架橋を認識すると考えられる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Tamai, E., Yoshida, H., Sekiya, H., Nariya, H., Miyata, S., Okabe, A., Kuwahara, T., Maki, J. & Kamitori, S.* (2014). X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* **92**, 326-337. 査読有 doi: 10.1111/mmi.12559.

Asahina, Y., Kamitori, S., Takao, T., Nishi, N. & Hojo, H.* (2013). Chemoenzymatic synthesis of the immunoglobulin domain of Tim-3 carrying a complex-type N-glycan by using a one-pot ligation. *Angew. Chem. Int.*

Ed. Engl. **52**, 9733-9737. 査読有 doi: 10.1002/anie.201303073.

Nonaka, Y., Ogawa, T., Oomizu, S., Nakakita, S., Nishi, N., Kamitori, S., Hirashima, M. & Nakamura, T. (2013). Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. *J. Biochem.* **153**, 463-471. 査読有 doi: 10.1093/jb/mvt009. Yoshida, H., Yamashita, S., Teraoka, M., Itoh, A., Nakakita, S., Nishi, N. & Kamitori, S. (2012). X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-8 with two carbohydrate recognition domains. *FEBS J.* **279**, 3937-3951. 査読有 doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08753.x.

Yamashita, S., Yoshida, H., Uchiyama, N., Nakakita, Y., Nakakita, S., Tonozuka, T., Oguma, K., Nishikawa, A. & Kamitori, S. (2012). Carbohydrate recognition mechanism of HA70 from *Clostridium botulinum* deduced from X-ray structures in complexes with sialylated oligosaccharides. *FEBS Lett.* **586**, 2404-2410. 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.055.

[学会発表](計 11 件)

神鳥 成弘, 吉田 裕美, 玉井 栄治, 関谷 洋志, 牧 純 「ウェルシュ菌ファージ由来エンドライシン (Psm) の X 線結晶解析」平成 25 年度日本結晶学会年会, 2013 年 10 月, 熊本

寺岡美沙, 吉田裕美, 西 望, 中北慎一, 神鳥成弘 「ヒトガレクチン 9 変異体の X 線構造と糖鎖親和性の解析」第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月, 横浜

Yoshida, H., Nishi, N., Teraoka, M., Yamashita, S. & Kamitori, S. X-ray structure of a stable protease-resistant galectin-9 with short linker, 38th FEBS Congress, July 2013, St. Petersburg (Russia)

吉田裕美, 西 望, 寺岡美沙, 山下哲, 神鳥成弘 「安定型ヒト由来ガレクチン 9 変異体の X 線結晶構造解析」第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月, 鳥取
吉田裕美, 玉井栄治, 関谷洋志, 牧 純, 神鳥成弘 「ファージ由来ウェルシュ菌特異的溶菌酵素 Psm の触媒ドメインの結晶構造解析」2013 年度農芸化学会大会, 2013 年 3 月, 仙台

山下哲, 吉田裕美, 神鳥成弘 「サルモネラ菌の接着に關与する β 型外膜蛋白質 PagC および Rck の卷戻しと結晶化」第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 6 月, 名古屋

吉田裕美, 玉井栄治, 田所隼人, 成谷宏文, 関谷洋志, 岡部昭延, 牧 純, 神鳥成弘 「X-ray structure analysis of a phage endolysin showing specificity for *Clostridium perfringens*」第 12 回日本蛋白質

科学会年会, 2012 年 6 月, 名古屋
山下 哲, 吉田裕美, 殿塚隆史, 小熊惠二, 西河 淳, 神鳥成弘 「ボツリヌス菌 C 型神経毒素複合体におけるヘマグルチニン HA3・糖鎖複合体の X 線結晶解析」第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 (京都)

寺岡美沙, 吉田裕美, 山下 哲, 西 望, 神鳥成弘 「ヒトガレクチン 8N 末端糖鎖 認識 ドメインと 3'-sialyl-N-acetylglucosamine 複合体の X 線結晶解析」第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 (京都)

吉田裕美, 西 望, 寺岡美沙, 山下 哲, 中北慎一, 神鳥成弘 「プロテアーゼ耐性型ヒト由来ガレクチン 8/シアリルラクトース/ラクトース複合体の X 線結晶解析によるドメイン間の基質親和性の検討」第 11 回 日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 (大阪)

山下 哲, 吉田裕美, 殿塚隆史, 小熊惠二, 西川 淳, 神鳥成弘 「ボツリヌス菌 C 型神経毒素複合体におけるヘマグルチニンの糖鎖認識機構の構造研究」第 11 回 日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 (大阪)

[その他]

ホームページ:

<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~xraylab/report/kaken/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神鳥 成弘 (KAMITORI Shigehiro)
香川大学・総合生命科学研究センター・教授

研究者番号: 00262246

(2) 研究分担者

吉田 裕美 (YOSHIDA Hiromi)
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号: 10313305

(3) 研究分担者

西 望 (NISHI Nozumu)
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号: 10145047

(4) 研究分担者

中北 慎一 (NAKAKITA Shinichi)
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号: 40314356

(5) 連携研究者

宮田 茂 (MIYATA Shigeru)
中部大学・応用生物学部・准教授
研究者番号: 90314913

(6) 連携研究者

北條 裕信 (HOJO Hironobu)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号: 00209214