

論文名

溶血性レクチン CEL-III の細胞膜孔形成機構に関する研究

長崎大学大学院生産科学研究科

久松 啓伍

CEL-III は海産無脊椎動物から単離された分子質量 47.5 kDa、 Ca^{2+} 依存性、ガラクトース/N-アセチルガラクトサミン特異的な溶血性レクチン (糖結合タンパク質) である。CEL-III は、ヒト及びウサギ赤血球に対する強い溶血活性を有し、また、培養細胞に対して細胞毒性を示す。X線結晶構造解析より、CEL-III は糖結合ドメイン (ドメイン 1 及び 2) と会合性ドメイン (ドメイン 3) から成ることが明らかとなった。CEL-III は細胞膜表面の糖鎖を特異的に認識して結合後、細胞膜に 6 量体のオリゴマーから成るイオン透過性の膜孔を形成する。また、CEL-III の限定加水分解より得られたドメイン 3 フラグメントは自己会合することで β -シート含有量が増加する。このような CEL-III の高次構造変化による自己会合性は、細菌由来膜孔 (ポア) 形成毒素及びコンフォメーション病に関わるタンパク質などにも類似する特徴であることから、CEL-III の自己会合機構の解明はそれらに重要な知見を与えるものと考えられる。本論文は、CEL-III の細胞膜孔形成に基づく溶血活性発現機構を明らかにすることを目的として、ペプチド合成、遺伝子組み換え技術、X線結晶構造解析等の手法を用いて、CEL-III の特にドメイン 3 の構造と機能について検討したものである。

第 1 章では、 α -ヘリックス領域に対応する 3 種類のペプチド (HLH、HL、LH) を合成し、それらの性質について検討を行った。その結果、HLH は抗菌活性や菌体内膜透過性を示し、水溶液中及び脂質膜上では β -シート構造を形成することが明らかになった。この結果より、CEL-III のドメイン 3 の α -ヘリックス領域はペプチド単独では水溶液中で β -シート構造を形成しやすく、細菌細胞膜と相互作用し、膜中で β -シート構造を形成することで膜透過性を高め、抗菌活性を発現しているものと考えられた。

第 2 章では、HLH ペプチド及びドメイン 3 全体を、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質 (GST-HLH 及び GST-D3) として合成した。その結果、両融合タンパク質は共に非常にオリゴマー化しやすい性質を示したことから、ドメイン 3、特に α -ヘリックス領域が細胞膜内での CEL-III の自己会合に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、 α -ヘリックス領域内には Val 残基クラスターが 2 か所存在しており、その Val 残基クラスターが GST-HLH のオリゴマー形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

第 3 章では、大腸菌を用いて組換え型 CEL-III (WT-rCEL-III) を作製し、その性質について検討した。その結果、WT-rCEL-III は、グミ体液から調製した天然型 CEL-III (nCEL-III) と同様の二次構造を形成していたが、溶血活性は約 1/100 に低下していることが明らかになった。しかしながら、WT-rCEL-III を Ca^{2+} イオン存在下でリフォールディングすることで溶血活性が 10 倍増加することが確認された。これは、 Ca^{2+} イオン存在下でリフォールディングすることによって糖結合ドメインが、糖とより結合しやすい構造に折りたたまれたためだと考えられた。次に種々の CEL-III 部位特異的変異体を作製し、それらの諸性質について検討を行った。その結果、糖結合部位 2α への糖結合が溶血活性発現に必須であること、ならびに α -ヘリックス領域の不安定化によって会合性や溶血活性が上昇することが明らかになり、 α -ヘリックス領域の構造変化が CEL-III の溶血活性発現に深く関わっていることが示唆された。また、分子表面に位置する塩基性アミノ酸であるアルギニン残基の正電荷と標的細胞膜上のリン酸部分の負電荷との相互作用が活性発現に関与していることが示唆された。

第 4 章ではドメイン-1/2 及びガラクトース、ラクトース複合体の X 線結晶構造解析を行った。その結果、ドメイン-1/2 に存在する 5 つの糖結合部位のうちサブドメイン 2α の糖結合部位のみラクトースのグルコース部分 3 位の OH 基と水素結合を形成していた。この結果より、サブドメイン 2α への糖鎖の結合が、ドメイン 3 の構造変化の引き金になっていることが示唆された。

以上、本研究では、CEL-III のドメイン 3 が標的細胞膜上で膜孔を形成するために重要な構造的特徴ならびに個々のアミノ酸残基の役割についての有用な知見を得た。CEL-III の細胞膜孔形成には、ドメイン 3 が細胞表面上で大きな構造変化をすることが必要であり、その際に α -ヘリックス領域が β -シートへ変換するものと考えられた。さらに、その際には、ドメイン-1/2 に存在する 5 つの糖結合部位のうち、特にサブドメイン 2α の糖結合部位への特異的糖鎖の結合と、それによって引き起こされるドメイン 3 の構造変化が深く関わっていることが示唆された。今回の研究は溶血性レクチンの作用機構の解明のみならず、細菌由来膜孔形成毒素やアルツハイマー病などのコンフォメーション病に関与する自己会合性タンパク質の構造と機能の解明にも寄与するものと期待される。