

新規レクチン様タンパク質の結晶構造解析と糖との結合解析

影山大夢¹, 小野寺かこ¹, 松井崇^{1,3}, 小川智久^{1,2}, 横山武司¹, 田中良和¹¹東北大学大学院生命科学研究科, ²東北大学大学院農学研究科, ³北里大学理学部

Crystal Structure Analysis and Sugar Binding Analysis of a Novel Lectin Like Protein

Hiromu KAGEYAMA¹, Kako ONODERA¹, Takashi MATSUI^{1,3}, Tomohisa OGAWA^{1,2},
Takeshi YOKOYAMA¹, Yoshikazu TANAKA¹¹Graduate school of Life Sciences, Tohoku University, ²Graduate school of Agriculture, Tohoku University,³Faculty of Science, Kitasato University

Abstract

本研究では、新規レクチン様タンパク質 Thrombocortecin (ThC) の構造と機能を解析した。大腸菌発現系を用いて調製した ThC から作製した結晶を結晶加工装置で円柱状に加工し、硫黄の異常散乱効果を利用した SAD 法により構造を決定した。最終的に 1.4 Å の分解能で ThC の構造を決定した後、ソーキング法により糖との複合体構造を取得し、その結合様式の詳細を明らかにした。また、高濃度の試料を用いて行う結晶構造解析で得られる結果が、必ずしも正しい分子特性を示さないことがあるということがわかり、構造解析と精密な物理化学解析を並行して実施することの重要性が改めて示された。

1. はじめに

これまでに天然物を利用、応用した薬剤は A. Fleming の Penicillin を皮切りに数多く発見されており [1], 現在でも天然物中からの候補化合物の探索やその改良が盛んに行われている [2]。また、近年、抗体をはじめとした生理活性タンパク質が創薬対象分子として注目を集めている。

酒井 (北大・水産) らはミクロネシア産海綿 (*Corticium sp.*) から抽出された約 14 kDa のタンパク質 Thrombocortecin (ThC) に Thrombopoietin (TPO) と同様に造血幹細胞を血小板に分化させる働きがあることを発見した [3, 4]。また、ThC のアミノ酸配列はエドマン分解と質量分析により決定され、フコース結合性レクチンのアミノ酸配列と類似性が高いことが示された。次に酒井らはその分子特性を明らかにするために ThC の構造解析に取り組み、海綿から抽出、精製した ThC (nThC) の結晶化、X線回折データの収集に成功した。しかし、配列類似度が高いタンパク質をサーチモデルとした分子置換法では位相決定できなかった。加えて、nThC はミクロネシア産海綿からしか得られず、その収量も乾燥した海綿 20 g からわずか 1 mg ということもあり、長きにわたり位相決定ができず、その分子構造は未知であった。

これらの背景から、本研究では、ThC の大腸菌発現系を構築して新たに X線回折データを取得し、硫黄の異常散乱効果を利用した単波長異常分散法 (S-SAD 法) [5] により、その構造を決定し、最終的に過去に収集した X線回折データを用いて nThC の立体構造を 1.4 Å の分解能で決定することに成功した。また、等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いた物理化学的解析を行い、糖との結合特性を詳細に評価した。

2. 大腸菌発現系により調製した ThC (rThC)

先行研究において、ThC はフコース及びマンノースと結合することが示唆されていたため、ITC により、大腸菌発現系により調製した ThC (rThC) とそれらの糖との結合能を評価したところ、フコースとマンノースのいずれにおいても結合を確認できなかった (Fig. 1A, Table 1)。

次に、rThC 試料をシッティングによる蒸気拡散法により結晶化した。得られた結晶は、溶媒による吸収を抑えるために、深紫外レーザーによる結晶加工装置により、円柱状に加工した後 (Fig. 1B)、2.7 Å の波長の X線を用いて S-SAD データを取得した。得られたデータを用い、S-SAD 法により初期構造を決定した後、1.1 Å の波長で取得したデータを用いて、構造精密化を行った。

SHELX にて rThC に含まれる 8 つの硫黄原子のうち 4 つの位置を決定し、これを用いて構造を決定することができた。得られた結晶構造は、ホモダイマーを形成していた (Fig. 1C)。これは、サイズ排除クロマトグラフィーの結果から予測される分子量と一致しており (Fig. 1D)、ThC は生体内において二量体で存在することが示唆された。

3. 海綿から抽出・精製した ThC (nThC)

以前に取得されていた nThC の回折データを用いて、rThC をサーチモデルとした分子置換法により、その構造を 1.4 Å の分解能で決定した。しかし、25 番目のリジン残基において、モデルとマップが一致せず、そのマップの形状から、この残基がグルタミンまたはグルタミン酸である可能性が示された (Fig. 2)。そこで、リジンをグルタミンに置換した変異体 (ThC K25Q, 以後 mThC) 及びグルタミン酸に置換した変異体 (ThC K25E) を作製した。

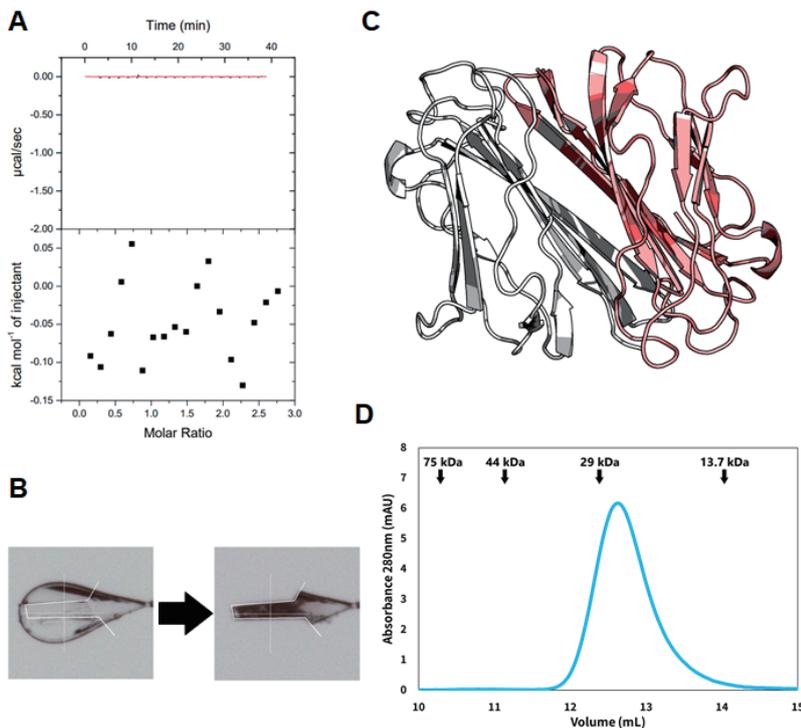


Figure 1

A: Result of isothermal calorimetry. rThC did not bind to fucose. B: Processing of crystal by deep ultraviolet laser. Crystal is processed into cylinder to reduce the solvent. C: Crystal structure of rThC homodimer D: Result of size exclusion chromatography.

Table 1 Affinities and thermodynamic parameters of binding

protein	ligand	5 mM CaCl ₂	K_D (μ M)	ΔH (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)
mThC	fucose	+	4.72 ± 0.25	-8.14	-2.94
		-	NB	NB	NB
	mannose	+	66.2 ± 15.3	-0.76	16.6
		-	NB	NB	NB
rThC (Q25K)	fucose	+	NB	NB	NB
ThC+G	fucose	+	NB	NB	NB

Not bound is indicated by "NB".

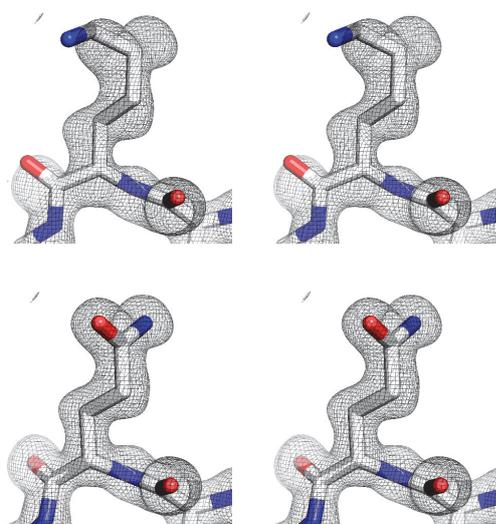


Figure 2 Electron density of the 25th residue (stereo view)
Atomic models of Lys (top) and Gln (bottom) in the electron density of nThC. Gln fits well (bottom) whereas Lys does not with the electron density (top).

4. ThCK25Q (mThC)

ここで、nThCにおいて液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) によるアミノ酸配列解析を実施したところ、25番目の残基がグルタミンであることを確認できた。また、糖カラムを用いた試験で、mThCはフコース及びマンノースとの結合が確認された (Fig. 3A)。加えて、ITCにより、フコースとマンノースとの結合解離定数 K_D を算出したところ、それぞれ、4.7 μ M、66 μ M と算出された (Fig. 3B, Table 1)。これらの結果から、エドマン分解と質量分析によって決められた配列は25番目の残基が間違えており、グルタミンが正しい残基であると考えた。これ以降の実験には mThC を使用した。

次に、mThCを結晶化し、得られた結晶を Ca²⁺ とフコースまたはマンノースを添加したバッファーにソーキングし、回折データを取得した。分子置換法により、フコースまたはマンノースとの複合体の構造を決定した (Fig. 3C)。糖結合部位は ThC ホモダイマー 1 分子につき 2 カ所確認された。フコースとマンノースとの結合様式は、非常に類似しており、2 分子の Ca²⁺ を介し、mThC の 8 つの残基と、

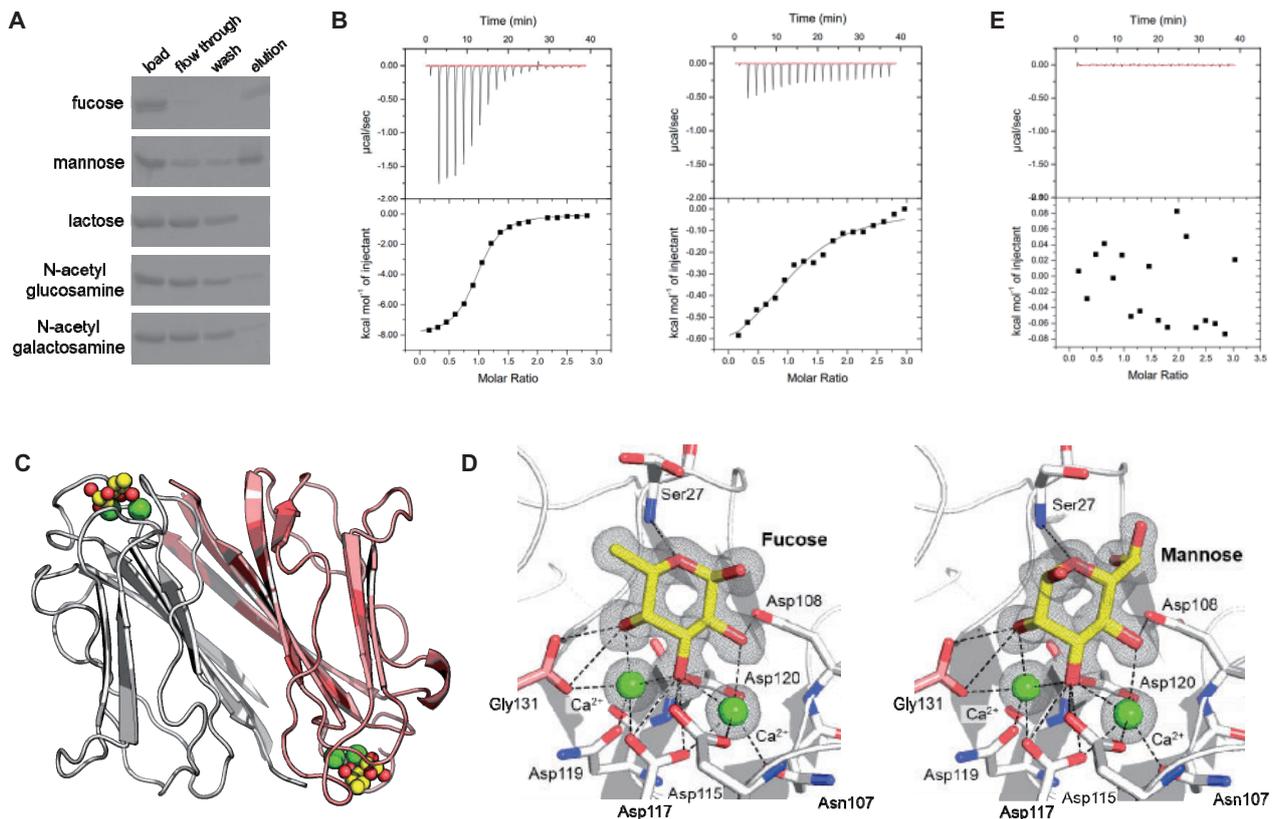


Figure 3 A: Binding assay with sugar columns. The bands of elution fractions of fucose and mannose appear, while the others do not. B: Results of ITC of ThC vs fucose or mannose. ThC is bound to both fucose and mannose, but the K_D values are different (fucose: 4.7 μ M, mannose: 66 μ M). C: Crystal structure of ThC and fucose complex. ThC is shown as white and pink ribbon models. Ca^{2+} ions and fucose are shown as green balls and yellow and red balls. D: Results of ITC of ThC added glycine to C-terminal (ThC+G). E: Close-up views of the fucose (left) and mannose (right) binding site of ThC. The bound Ca^{2+} ions and fucose or mannose are shown as green balls and yellow stick models. Residues of a chain are colored white and another chain are colored pink. Fo-Fc maps of the fucose, mannose and Ca^{2+} is shown.

糖の2, 3, 4位の水酸基が結合していた。また、結合に関与するThCの残基の1つは一方のプロトマーのC末端のグリシン (Gly131) のカルボキシ基であった (Fig. 3D)。そこで、C末端にグリシンを付加した変異体 (ThC+G) を作製し、カルボキシ基の位置をずらし、結合に関与できなくしたところ、予想通り、フコースが全く結合しなくなることが示され (Fig. 3E)、C末端のカルボキシ基の位置が糖結合に非常に重要であることが示唆された。また、 Ca^{2+} 非存在下では糖との結合がみられず、 Ca^{2+} はThCと糖の結合に必要であることが示された (Table 1)。

5. 考察

5-1. ThCの本来の意義

今回明らかになったThCの結晶構造は、代表的なフコース結合性レクチンの1つであるPA-IILの構造および糖結合様式と酷似していた [6]。また、PA-IILと類似した構造、結合様式を有するレクチンはこれまでにいくつか報告されている [6-10]。これらのThC類縁タンパク質の多くは細菌のタンパク質であり、宿主細胞への感染の補助や細胞間の連絡分子として機能していることが示唆されている [11]。加えて、ThCは海綿の抽出物から発見されたが、この海綿のゲノムにはThCの配列は見つからなかった。以

上の結果より、ThCは海綿に共生する微生物の産物である可能性が示唆され、ThCにおいても微生物が宿主細胞に感染する際の補助や、細胞間の連絡分子として使用されている可能性が高いと考えられる。

5-2. マンノースとフコースとの結合親和性の違い

X線結晶構造解析ではフコースとマンノースは同様の様式で結合していたが、ITCによる解析では K_D 値が10倍以上異なっていた (Table 1)。この理由を明らかにするために構造を詳細に確認すると、28番目のアルギニンの位置がフコース結合ThCとマンノース結合ThCでわずかに異なることがわかる (Fig. 4)。これは、フコースの1位の水酸基がArg28と水分子を介した水素結合を形成することによるものであり、これにより結合力が増加していると考えられる。また、結合の ΔH と ΔS を比較するとフコースの方が ΔH が負に大きいことから (Table 1)、フコースは水素結合を介した特異性の高い結合をしており、対してマンノースは ΔH が不利で、 ΔS が有利あることから水素結合が弱く、疎水性相互作用による寄与が大きいことが示唆された。これらのことから、一見、構造は同じであるが、その結合特性は異なっている可能性が考えられ、結合の本質を理解するには、様々な手法を用いて多角的に解析をするこ

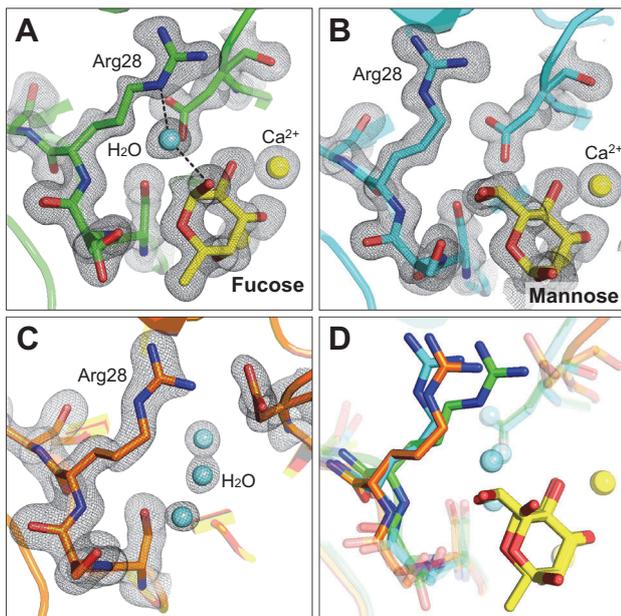


Figure 4 The close-up views of binding site between Arg28 of ThC and monosaccharide. **A:** Stick models of ThC (green), water (sky blue), fucose and Ca^{2+} (yellow). **B:** Stick models of ThC (cyan), mannose and Ca^{2+} (yellow). **C:** Stick models of ThC (orange) and water (sky blue). **D:** The superposed models of A, B and C.

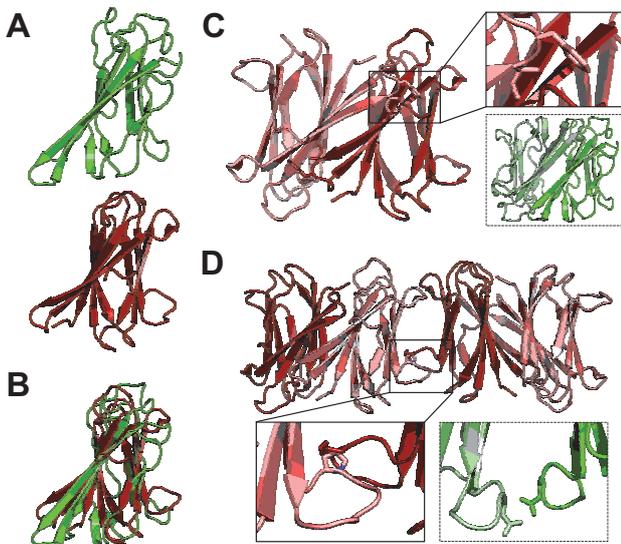


Figure 5 **A:** Monomeric structure of ThC (top, green) and search model (BC2L-C C-terminal domain; PDBID: 2XR4, bottom, red). **B:** Superposition of ThC and search model. Colors are according to A. **C:** The dimer of search model (red) created by superposing on ThC dimer in crystal (green). b-seats sterically clashed with another protomer. **D:** Steric clash between search model located by superposing on ThC dimer (red). Interface between protomers of ThC is also shown as a reference, in which protomers do not sterically clash (green, bottom right).

とが重要であるということが示された。

5-3. 分子置換法では構造決定できなかった理由

最終的に得られた nThC の構造と、以前分子置換法でサ

ーチモデルとして用いた構造 (BC2L-C C-terminal domain; PDBID: 2XR4) とを比較すると、全体構造は類似していた (Fig. 5A)。しかし、これら 2 分子を重ね合わせると β -シートの一部の向きが異なることがわかる (Fig. 5B)。これにより、ThC がダイマーを組んだ際に、この β シートがもう一方のプロトマーに接触してしまうことがわかった (Fig. 5C)。また、非対称単位間においても、一部、隣の分子と接触していることが確認でき (Fig. 5D)、こうした立体障害が生まれてしまうために、分子置換法では構造が決定できなかったと考えられる。

6. まとめ

本研究により、海綿より抽出された生理活性を有する新規レクチン様タンパク質とそのリガンドである糖との複合体構造を明らかにし、分子レベルでの結合様式を明らかにした。

X線結晶構造解析や糖カラム結合試験といったリガンドを高濃度で添加する実験においてはフコースとマンノースという異なる単糖に対する分子特性は同じ結果を示すが、ITC のようなより精密な物理化学的解析では、異なる結果を示した。これらの結果は、分子特性を評価する際には、構造解析と精密な物理化学的解析を併用することが解釈の齟齬を防ぐのに重要であることを示している。

また、構造解析の手法はクライオ電子顕微鏡 [12] や高速 AFM [13] のような新たな手法のみならず、結晶構造解析のように歴史のある手法も日々進化し続けている。本研究においても、酒井らが結晶構造解析を始めたころには S-SAD 法はまだ認知されておらず、使用することができなかった。仮に現在、nThC の結晶が得られたならば、S-SAD 法による構造解析は第一選択肢となり、その構造は容易に決定できるだろう。もう一点、重要なのが近年発展の目覚ましい構造予測プログラムの利用である。最近、AlphaFold2 [14, 15] を使って作成された構造モデルをサーチモデル用いて分子置換法を試したところ、長らく成功できなかった nThC の結晶構造を難なく決定することができ、大変驚いた。これらの結果を踏まえ、我々研究者は、常に新たな手法を取り入れながら、研究を進めことが極めて重要だと改めて感じている。

7. 謝辞

本研究は、北海道大学の酒井隆一教授及び辺浩美さんとの共同研究によるものである。また、X線回折実験は PF BL-1A, BL-5A で行った (課題番号 2020G114)。惜しみなくご助力いただいた関係者の皆様に感謝いたします。

引用文献

- [1] A. K.-T. C. Joan. W. Bennett, *Advances in Applied Microbiology* **49**, 163 (2001).
- [2] J. Drews, *Science* **287**, 1960 (2000).
- [3] H. Watari, H. Nakajima, W. Atsumi, T. Nakamura, T. Nanya, Y. Ise, R. Sakai, *Toxicology & Pharmacology* **221**, 82 (2019).

- [4] H. Watari, H. Kageyama, N. Masubuchi, H. Nakajima, K. Onodera, P. J. Focia, T. Oshiro, T. Matsui, Y. Kodera, T. Ogawa, T. Yokoyama, M. Hirayama, K. Hori, D. M. Freymann, N. Komatsu, M. Araki, Y. Tanaka, R. Sakai, *bioRxiv* (2021).
- [5] Z. Dauter, M. Dauter, E. Fortelle, G. Bricogne, G. M. Sheldrick, *Journal of Molecular Biology* **289**, 1, 83 (1999).
- [6] J. Adam, M. Pokorná, C. Sabin, E. P. Mitchell, A. Imberty, M. Wimmerová, *BMC Structural Biology* **7**: 36 (2007).
- [7] D. Sudakevitz, N. Kostlánová, Gitit Blatman-Jan, E. P. Mitchell, B. Lerrer, M. Wimmerová, D. J. Katcoff, A. Imberty, N. Gilboa-Garber, *Molecular Microbiology* **52**, 691 (2004).
- [8] M. Pokorná, G. Cioci, S. Perret, E. Rebuffet, N. Kostlánová, J. Adam, N. Gilboa-Garber, E. P. Mitchell, A. Imberty, M. Wimmerová, *Biochemistry* **45**, 24, 7501 (2006).
- [9] E. Lameignere, T. C. Shiao, R. Roy, M. Wimmerova, F. Dubreuil, A. Varrot, A. Imberty, *Glycobiology* **20**, 87 (2010).
- [10] O. Šulák, G. Cioci, E. Lameignè re, V. Balloy, A. Round, I. Gutsche, L. Malinovská, M. Chignard, P. Kosma, D. F. Aubert, C. L. Marolda, M. A. Valvano, M. Wimmerová, A. Imberty, *PLoS Pathogens* **7**, 9, e1002238 (2011).
- [11] G. A. Ingram, *Journal of Fish Biology* **16**, 23 (1980).
- [12] W. Kühlbrandt, *Science* **343**, 1443 (2014).
- [13] D. Rugar, P. Hansma, *Physics today* **23** (1990).
- [14] M. Alquraishi, *Bioinformatics* **35**, 22, 4862 (2019).
- [15] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, *Nature* **596**, 583 (2021).

(原稿受付日：2021年12月17日)

著者紹介

影山大夢 Hiromu KAGEYAMA



東北大学大学院 生命科学研究所 分子化学生物学専攻 博士前期課程2年
〒980-8577
宮城県仙台市青葉片平2-1-1
e-mail: hiromu.kageyama.s3@dc.tohoku.ac.jp

略歴：2020年3月東北大学農学部応用生物化学科卒業。2020年4月東北大学大学院生命科学研究所分子化学生物学専攻入学。

最近の研究：タンパク質複合体のクライオ電顕微鏡構造解析
趣味：温泉巡り

横山武司 Takeshi YOKOYAMA



東北大学大学院生命科学研究所 助教
〒980-8577
宮城県仙台市青葉片平2-1-1
e-mail: takeshi.yokoyama.d1@tohoku.ac.jp

略歴：2008年 東京大学 大学院工学研究科博士課程後期修了，2008年～2012年 米国 NY 州保健部門 Wadsworth Center Creative Biomedical Research Institute 博士研究員，2012年～2013年 産業技術総合研究所 バイオメディシナル研究センター 協力研究員，2013年～2018年 理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター (CLST) 研究員，2018年より 理化学研究所 生命機能科学研究センター (BDR) 研究員，2019年9月より現職 (理化学研究所 BDR と兼任)

最近の研究：リボソームのクライオ電顕構造解析
趣味：フルート演奏

田中良和 Yoshikazu TANAKA



東北大学大学院生命科学研究所 教授
〒980-8577
宮城県仙台市青葉片平2-1-1
e-mail: yoshikazu.tanaka@tohoku.ac.jp

略歴：2004年3月東北大学 大学院工学研究科博士課程後期修了，2004年4月～2006年3月 北海道大学 大学院理学研究科 博士研究員，2006年4月～2008年1月 東京大学 大学院新領域創成科学研究科 博士研究員，2008年1月～2012年3月 北海道大学 創成研究機構 テニユアトラック特任助教，2012年4月～2017年3月 北海道大学 大学院先端生命科学研究所 准教授，2017年4月より現職

最近の研究：化学と構造生物学の融合領域の開拓
趣味：教務委員長，町内会役員，PTA 会長

松井崇 Takashi MATSUI

北里大学理学部 講師
〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1
e-mail: matsui@kitasato-u.ac.jp

小川智久 Tomohisa OGAWA

東北大学大学院農学研究科 教授
〒980-8572 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉468-1
e-mail: tomohisa.ogawa.c3@tohoku.ac.jp