

海産無脊椎動物由来レクチンの溶血活性・凝集活性の制御 Regulation of the hemolytic and hemagglutinating activities of the lectin from marine invertebrates

郷田 秀一郎、中川 珠希、高橋 優希

Shuichiro Goda, Tamaki Nakagawa, Yuki Takahashi

1. 序論

ナマコ的一种である海産無脊椎動物グミ (*Cucumaria echinata*) は、ウサギおよびヒトの赤血球に対して溶血活性を示すレクチン CEL-III を持つことが報告されている (Hatakeyama *et al.*, 1994)。CEL-III の単量体の立体構造解析の結果から、CEL-III は3つのドメインから構成されており、ドメイン1及び2は β トレフォイル構造を示し、糖鎖を認識し、結合する部位であることが明らかとなっている (Hatakeyama *et al.*, 2007)。また、膜孔を形成した七量体の立体構造も解明されており、立体構造からは機能が推定されていなかったドメイン3の一部が2本の β ストランド構造へと変化し、七量体化することによって14本の β ストランドから成る β バレル構造を形成していることが明らかとなっている (Unno *et al.*, 2014)。これまでグミで見られていなかった溶血性レクチンであるが、近年、アミノ酸配列相同性を示すタンパク質が海産無脊椎動物から報告されている。その中にサンゴの一種であるハイマツミドリイシ (*Acropora millepora*) 由来レクチン AML-I がある。AML-I は全長のタンパク質では、赤血球に対して凝集させる活性を示すものの、CEL-III では保存されていないC末端の19残基 (図1: 緑文字) を切除する変異体 (AML-I Δ C) を作成すると、CEL-III と同様に溶血活性を示す (図1)。このことから、溶血活性と凝集活性という異なる活性がC末端の19残基によって変わることが示された。そこで、ナマコ及びサンゴ由来レクチンのC末端領域にプロテアーゼ認識配列を挿入し、プロテアーゼで切断することによって、溶血と凝集の活性を制御することができるレクチンの創製を目的とした。

AML-I	QVNCVNP IEIGEV RLKSKQKCIDISGASGKGNVMPFRCD SLDDQQLVM CD DTIRNV KSN	60
CEL-III	QVLC TNPLDIGEL RSFKSKQCVDIVGNQSGN IATYDCDGLSD QQIIICG DG IRNEARN	60
AML-I	NCF SAGT TGSGN VISTT CVL FKIPEYQ KWKYKSI TFKDRGGI WQ EAREI INMKSGKCL	120
CEL-III	YCF TPD GS GNANVM SSPCTLY FEI FPSS QRWRQ RRK TF TNGGIE QVATEI INLASGKCL	120
AML-I	DVAGIQ GN NI GTYS CTGEHD QYFYFR SKGKLLAHGRLV VQKSG LCL DVSGD QGGQRHD	180
CEL-III	DIEGSD TGDI GVYD CQNL DD QYFYVR SRGPEL FYGR L RNEK SDLCL DVEG SDG-----K	175
AML-I	NNVLIYNCEKAPD QFFS FYQY GELV NEKSR LCLD VSGIDGSGN VMYD CEGTYD Q MWSQP	240
CEL-III	GNVLMY SCE DNLD QWFR Y YENGEI VNAKSGM L DVEGSDGSGN VGIR CD DLR Q M WSRP	235
AML-I	RQ FC DGDYCSFMN KA SGKCL DV SGN QASR GSN VLP W SCD GAP DR Q FKW ESGN WLP T PT ADW	300
CEL-III	NAYCNGDYCSFLN KE SNKCL DV SGD Q GTG--DVGTW QCD GL PPQ RFK W VFD DWE V PT TATW	293
AML-I	HMVGCN Q NGKVT QEI SNEISY ST TESETSAVEITAAIEAETLFGSVSL SAST SYSL SKE W	360
CEL-III	NMVGCN Q NGKVS Q ISNTISFS ST VTAGVAVEV SST TEKGVIFAKATVSVK VTA SL S KAW	353
AML-I	TSSQ SQ TRAIT FT FCENYD SG KPFV RG CM WQ LEVT TKER HAENEM R W TP QIVK CTR NQ EQ P	420
CEL-III	TNSQ SQ ST TA ITYTCDNYD S DEF TR GC MW Q LA IE TT EVKSGD LLV W NP QIVK CTR SN TAP	413
AML-I	KCP PF TRC MD ED CTR CGE LL ASRAALN KR FLLN LNE K	457
CEL-III	GCAP FT KCANED CT FCTDI-----	432

図1 AML-I及びCEL-IIIのアミノ酸配列

2. 実験方法

タンパク質の発現は、発現ベクターに pET-19b を用い、宿主には BL21 (DE3) 及び BL21CodonPlus (DE3)-RIPL を用いて行った。ナマコ由来 CEL-III に AML-I の C 末端 19 残基を付加したもの及び、サンゴ由来 AML-I の C 末端領域にプロテアーゼ認識配列を挿入し、末端の 19 残基を除けるようにしたものを作成した。プロテアーゼにはタバコエッチウイルス由来プロテアーゼ (TEV プロテアーゼ) を用いた。タンパク質の生産は大腸菌を 37°C で培養することによって行い、IPTG を加えることによって発現を誘導後、一晚培養を

行った。集菌後、遠心を行うと目的タンパク質の生産が封入体に見られたことから、変性剤を用いた可溶化と、希釈による変性剤の濃度の低下によって正しい構造への巻き戻しを行った。赤血球に対する活性測定は5% ウサギ赤血球を用いて行った。

3. 結果

1) CEL-III の C 末端に AML-I の 19 残基の付加

CEL-III の C 末端に AML-I の 19 残基を付加するときに、その間に TEV プロテアーゼ認識配列を挿入したものとしていないものの2種類を作成した。いずれの変異体も大腸菌を宿主に用いて生産を行い、封入体からの巻き戻し、Ni キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製を行った。得られたタンパク質を用いて赤血球に対する活性測定を行った。その結果、CEL-III に直接 AML-I の C 末端 19 残基を付加したものでは溶血活性が見られた。一方、さらに TEV プロテアーゼ認識配列を挿入したものは凝集活性が確認された (図2)。このことから、CEL-III の C 末端へのアミノ酸残基の付加は活性に影響を与え、直接つなげたものでは活性の変化は見られなかったが、より長いアミノ酸配列を付加することによって凝集活性へと変化させることに成功した。そこで、TEV プロテアーゼ処理によって、活性が変換するか実験を行ったところ、TEV プロテアーゼ処理後のタンパク質は安定性が低いためか沈殿を生じてしまい、活性を測定することはできなかった。

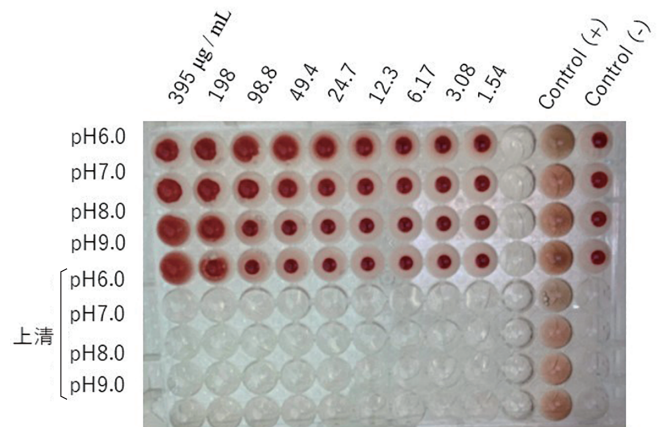


図2 CEL-III に AML-I の C 末端 19 残基を付加したものの赤血球に対する活性測定結果

2) AML-I の C 末端 19 残基を切除するためのプロテアーゼ認識配列の挿入

サンゴ由来レクチン AML-I は、本来の全長配列で凝集活性を示し、C 末端の 19 残基を除いた変異体は溶血活性を示す。このことから、C 末端の 19 残基の手前に TEV プロテアーゼ認識配列を挿入すると、同酵素によって赤血球に対する活性を制御できるものと考えた。まず始めに TEV プロテアーゼ認識配列の挿入変異体の作成を行い、大腸菌を宿主に用いた組換えタンパク質としての生産に成功した。変異体タンパク質は封入体として生産されたため、変性剤による可溶化後、巻き戻しを行った。精製は Ni キレートアフィニティークロマトグラフィーによって行った。得られたタンパク質の活性を測定したところ、本来の全長タンパク質と同じ凝集活性を示した。そこで、TEV プロテアーゼを用いて C 末端 19 残基の切除を行った。精製は再び金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによって行ったが、プロテアーゼ処理後のタンパク質は容易に凝集して回収することができなかった。そこで、凝集体の形成を防ぐために、0.8 M アルギニン存在下での TEV プロテアーゼ処理および精製を行った。その結果、凝集体の形成は防ぐことに成功したが、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーで TEV プロテアーゼを除くことはできなかった。そこで、TEV プロテアーゼ存在下での活性測定を行ったところ、溶血活性が見られた (図3)。同濃度の TEV プロテアーゼのみの存在下では、溶血活性が見られなかったことから TEV プロテアーゼの影響は見られなかった。これらのことから、TEV プロテアーゼによる切断で、溶血活性と凝集活性の制御に成功した。

4. 考察

AML-I の C 末端 19 残基は溶血性レクチンの活性に大きく影響を与えていたものの、CEL-III への付加に関しては直接付加したものは、元の溶血活性のままであった。しかしながら、TEV プロテアーゼ認識配列を加えることで溶血活性ではなく、凝集活性を示した。このことは、より長い残基の付加によって、これらの残基が膜孔を形成する部位と相互作用して溶血活性を阻害したものと推測された。

サンゴ由来 AML-I の C 末端 19 残

基を除くことができる変異体の作成に成功し、プロテアーゼによる切断で活性を制御することに成功した。しかしながら、精製によって TEV プロテアーゼを除くことができていないため、今後、同タンパク質のみの単一の状態に精製することを検討していく。アルギニン非存在下でのプロテアーゼ処理では凝集体の形成が観察された。組換えタンパク質として生産した AML-I には N 末端には His-tag が付加されており、TEV プロテアーゼによって切除できるようにしている。この N 末端の切除がタンパク質の安定性に影響していることが考えられるため、C 末端 19 残基を TEV プロテアーゼとは異なるプロテアーゼによって切断することが考えられた。

5. 謝辞

ここに記述した研究の成果は、創価大学学内研究費によって行われた。

6. 引用文献

Hatakeyama T, Kohzaki H, Nagatomo H, Yamasaki N.

Purification and characterization of four Ca^{2+} -dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*.

J Biochem. 1994 Jul; 116 (1): 209-14. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124495.

Hatakeyama T, Unno H, Kouzuma Y, Uchida T, Eto S, Hidemura H, Kato N, Yonekura M, Kusunoki M.

C-type lectin-like carbohydrate recognition of the hemolytic lectin CEL-III containing ricin-type α -trefoil folds.

J Biol Chem. 2007 Dec 28; 282 (52): 37826-35. doi: 10.1074/jbc.M705604200. Epub 2007 Oct 31.

Unno H, Goda S, Hatakeyama T.

Hemolytic lectin CEL-III heptamerizes via a large structural transition from α -helices to a β -barrel during the transmembrane pore formation process

J Biol Chem. 2014 May 2; 289 (18): 12805-12. doi: 10.1074/jbc.M113.541896. Epub 2014 Mar 20.

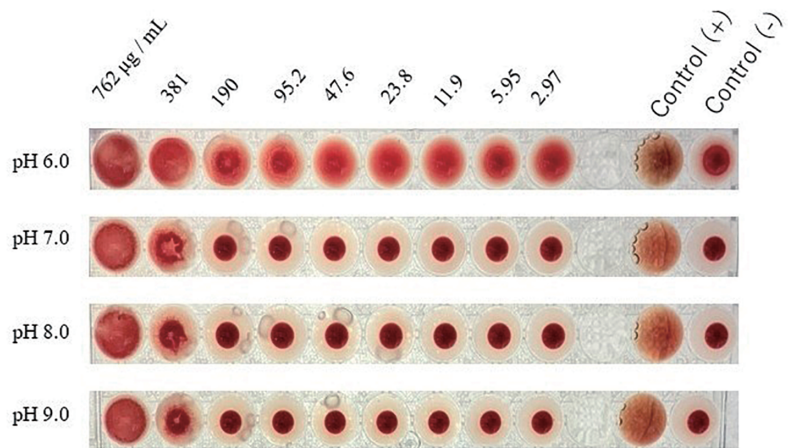


図3 AML-I の C 末端に 19 残基を TEV プロテアーゼで切除できる認識配列を付加したものの赤血球に対する活性測定結果