

平成23年度特別経費（プロジェクト分）
「香川グライコリソース（希少糖・ヒト型糖鎖）を用いたナノ糖質生命科学研究推進事業」
研究グループ別研究成果報告書

（本報告書は、必要に応じてホームページ上で公開しますので、知的財産に関連する記述等については注意してください。）

研究組織			
研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。			
研究課題名	糖鎖結合タンパク質および糖質関連タンパク質の X 線結晶解析		
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先
	神鳥 成弘	総合生命科学研究センター・教授	TEL
			e-mail
本人	kamitori@med.kagawa-u.ac.jp		
秘書等			
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等
	吉田 裕美	総合生命科学研究センター・准教授	ガレクチンおよび希少糖生産酵素の X 線結晶解析
	山下 哲	総合生命科学研究センター・博士研究員	病原性細菌由来糖鎖結合タンパク質の X 線結晶解析
	寺岡 美沙	総合生命科学研究センター・研究員	タンパク質の精製・結晶化
	茅原 静佳	工学部・大学院生 (M1)	希少糖および希少糖生産酵素の X 線結晶解析

平成 23 年度研究成果概要

研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

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) を持っている。平成 21 年度において、2 つの CRD を同時に持つプロテアーゼ耐性変異型ヒトガレクチン 8 (G8Null) の 3 次元構造を X 線結晶解析により決定した。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。今年度は、G8Null と糖鎖 (シアルラクトース, ラクトース) との複合体 (G8Null/SiaLac/Lac), および G8 の N-CRD とシアルラクトサミンとの複合体 (G8N-CRD/SiaLacNAc) の高分解能 X 線結晶解析に成功した (図 1)。G8Null/SiaLac/Lac 複合体においては、SiaLac は N-CRD に、Lac は C-CRD に結合していた。これは、それぞれの CRD の基質親和性の違うからであり、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が Arg45, Gln47, Arg59, Lys71, Arg72 であることがわかった。G8Null は、結晶中で C-CRD を背中合わせにして 2 量体を形成していた (図 2)。さらにこの 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していた。また、G8N-CRD/SiaLacNAc においては、N-CRD を界面とした 2 量体を形成していた (図 1B)。以上のことから、G8 は、様々なタイプの 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 (図 3)。G8 の機能発現には 2 つの CRD の存在が重要であり、今回の成果は、より詳細な G8 の機能解明にとって有用な情報をもたらすと考えられる。

図 1. G8Null/SiaLac/Lac の構造 (A) と G8N-CRD/SiaLacNAc の構造 (B)。

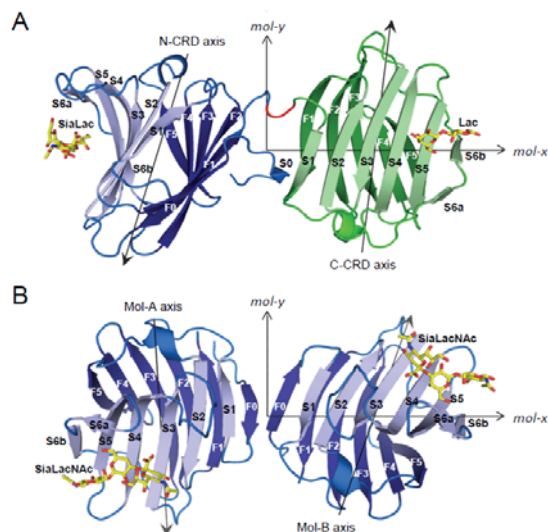


図 2. G8Null/SiaLac/Lac の 2 量体構造 (Mol-A と Mol-B) と格子構造

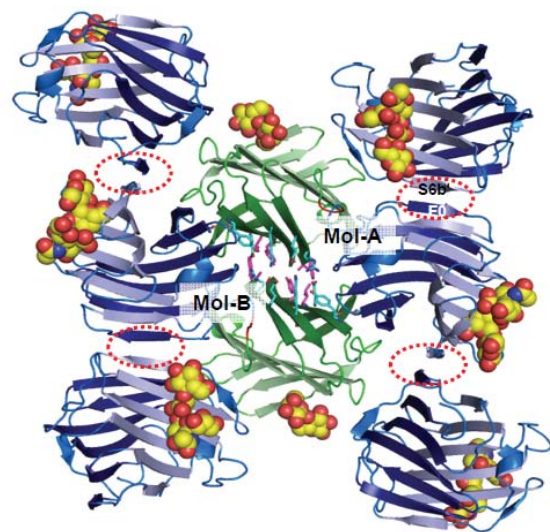
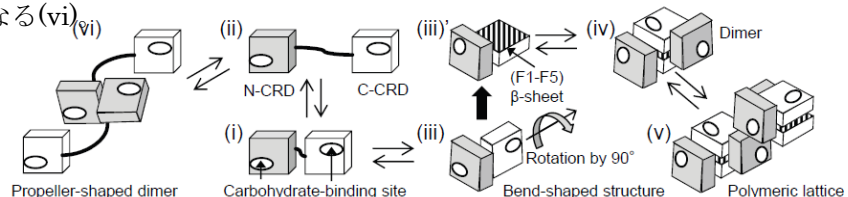


図 3. 予想される G8 の多重会合モード。G8 の 2 つの CRD は、近づいたり (i), 離れたりしている (ii)。近づいたときに G8Null の構造をとり (iii), (iii)', C-CRD が背中合わせで 2 量体を形成 (iv), さらに大きな格子構造を形成する (v)。2 つの CRD が十分離れた場合、N-CRD 同士が界面となり 2 量体となる (vi) (vi)



今後の研究計画

平成 23 年度に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究計画について具体的に記載してください。図を挿入してもかまいません。

(1) ガレクチン変異体の合成と生理活性測定

ガレクチン 9 およびガレクチン 8 の X 線結晶解析に成功し、糖鎖親和性に関与しているアミノ酸をいくつか同定できている。これらのアミノ酸に変異を導入し、糖鎖親和性を変えたガレクチン変異体を作成し、X 線結晶解析および生理活性測定を行い、立体構造・糖鎖親和性・生理活性の三者の相関関係を明らかにした。

(2) 病原性細菌由来の糖鎖結合タンパク質の X 線結晶解析

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、多くの糖鎖プロセッシング酵素を菌体外に分泌する。これらのタンパク質は、一般に糖鎖を特異的に切断する触媒ドメインと複数の糖鎖結合ドメインを持ち、腸管上皮細胞上の糖鎖を非還元末端から特異的に 1 糖ずつ切断し、菌体の細胞表面へのアクセスを容易にさせていると考えられている。これらのタンパク質の個別のドメインの X 線結晶解析はいくつか報告されているが、全長タンパク質の報告例はない。現在、大量調製が可能なものは、2 種類の N-アセチルグルコサミニダーゼ (NagH, NagJ)、2 種類のシアリダーゼ (NanI, NanJ)、1 種類のガラクトシダーゼ (BgaA)、の計 5 つである。これまでに、NagH および BgaA の全長タンパク質の結晶を得ることに成功したが、構造解析可能な X 線回折データを得るには至っていない。これらについて引き続き X 線結晶解析に向けた結晶化を行っていききたい。また、他の病原性細菌等の糖鎖結合タンパク質についても X 線結晶解析を行っていききたい。

特記すべき事項

本研究に関する受賞 (学生対象の賞も含む)・プレスリリース・大型外部資金獲得につながった等、特記すべき事項があれば記述してください (ささいなことでもかまいません)。本欄は必須ではありませんので、「該当なし。」でも可ですが、できるだけ記載してください。

本事業により、以下の外部資金の獲得に成功した。

科学研究費補助金基盤 (B) (一般) 課題番号: 23370054 平成 23-25 年度 代表者: 神鳥成弘 「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」

科学研究費補助金若手研究 (B) 課題番号: 23770122 平成 23-24 年度 代表者: 吉田裕美 「新規単糖異性化反応機構の解明を目指した希少糖生産酵素群の X 線結晶解析」

研究業績

本研究に関連した、平成 23 年度中の発表した、[1] 査読がある原著論文 (Corresponding Author には*印を付す。), [2] 著書, [3] 招待講演, [4] 学会発表 (発表者には○印), [5] 産業財産権 (特許等), [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等) を通し番号を付して記入してください。本事業の参加者にはアンダーラインを引いてください。記入欄が足りない場合は、用紙を追加してください。

[1] 査読がある原著論文

1. Yoshida, H., Yamashita, S. Teraoka, M., Itoh, A., Nakakita, S., Nishi, N., & Kamitori, S.* (2011). X-ray Structure of a Protease-resistant Mutant Form of Human Galectin-8 with Two Carbohydrate Recognition Domains. *FEBS J.* (to be submitted.)
2. Yoshida H, Teraoka M, Yoshihara A, Izumori K, Kamitori S.* (2011). Overexpression, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of L-ribose isomerase from *Acinetobacter sp.* strain DL-28. *Acta Crystallogr. Sect F* **67**, 1281-1284.
3. Kamitori, S.,* Ueda, A., Tahara, Y., Yoshida, H., Ishii, T. & Uenishi, J. (2011). Crystal structures of rare disaccharides, α -D-glucopyranosyl β -D-psicofuranoside, and α -D-galactopyranosyl β -D-psicofuranoside. *Carbohydr Res.* **346**, 1182-1185.

[2] 著書

該当なし。

[3] 招待講演

該当なし。

[4] 学会発表(○は発表者)

4. ○吉田裕美, 寺岡美沙, 何森健, 神鳥成弘 「糖環開環機構の解明を目指した *Pseudomonas stutzeri* 由来 L-ラムノースイソメラーゼ変異酵素の構造解析」平成 24 年農芸化学会大会, 2012 年 3 月発表予定 (京都)
5. ○玉井栄治, 関谷洋志, 吉田裕美, 成谷宏文, 神鳥成弘, 桑原知己, 牧 純 「ウエルシュ菌特異的溶菌酵素 Psm の酵素活性中心の解析」第 85 回日本細菌学会総会, 2012 年 3 月発表予定 (長崎)
6. ○Yoshida, H., Yamada, M., Takeda, K., Nishitani, T., Ohyama, Y., Yamaji, M., Ishii, T., Takada, G., Izumori, K. & Kamitori, S. X-ray structures of the enzymes used for rare sugar production and their catalytic reaction mechanisms. Rare Sugar Congress, November 2011, Takamatsu, Japan.
7. ○Yoshida, H., Teraoka, M., Izumori, K. & Kamitori, S. Structure analysis of mutant L-rhamnose isomerase from *Pseudomonas stutzeri* to elucidate the ring opening mechanism. Rare Sugar Congress, November 2011, Takamatsu, Japan.
8. ○玉井栄治, 吉田裕美, 田所隼人, 成谷宏文, 関谷洋志, 神鳥成弘, 岡部昭延, 牧 純 「ウエルシュ菌特異的溶菌酵素 Psm の構造と機能解析」第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2011 年 10 月 (岡山)
9. ○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-lactosamine 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)
10. ○山下 哲, 吉田裕美, 殿塚隆史, 小熊恵二, 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)
11. ○Yoshida, H., Teraoka, M., Yoshihara, A., Izumori, K. & Kamitori, S. Crystal structure of a rare sugar producible enzyme L-ribose isomerase from *Acinetobacter sp.* 36th FEBS Congress, June 2011, Torino, Italy.
12. ○山下 哲, 吉田裕美, 殿塚隆史, 小熊恵二, 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)
13. ○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)

[5] 産業財産権 (特許等)

該当なし。

[6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等)

該当なし。