

平成24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 (M2)	希少糖および希少糖生産酵素の X 線結晶解析

平成24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。

立体構造解析に基づくボツリヌス菌ヘマグルチニン HA70 の糖鎖認識反応機構 (研究業績#3)

ボツリヌス菌が産生する神経毒素は、非毒素成分および3つのヘマグルチニン成分 (HA33, HA17, HA70) とともにプロジェニター毒素複合体を形成している。ヘマグルチニン成分は、上皮細胞上の糖鎖に結合することにより毒素の侵入を助けている。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) とシアル化糖鎖との複合体の X 線結晶解析および糖鎖マイクロアレイによる結合アッセイを行った。その結果、HA70/C 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。

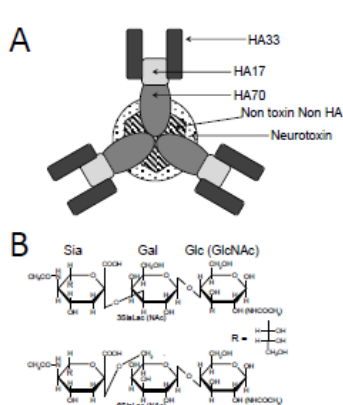


図1. (A) 予想されているプロジェニター毒素複合体の模式図。14の分子からなると考えられている。(B) α 2-3-シアルクトース(3SiaLac)、 α 2-3-シアルクトサミン(3SiaLacNAc)、 α 2-6-シアルクトース(6SiaLac)、 α 2-6-シアルクトサミン(6SiaLacNAc)の化学構造式。

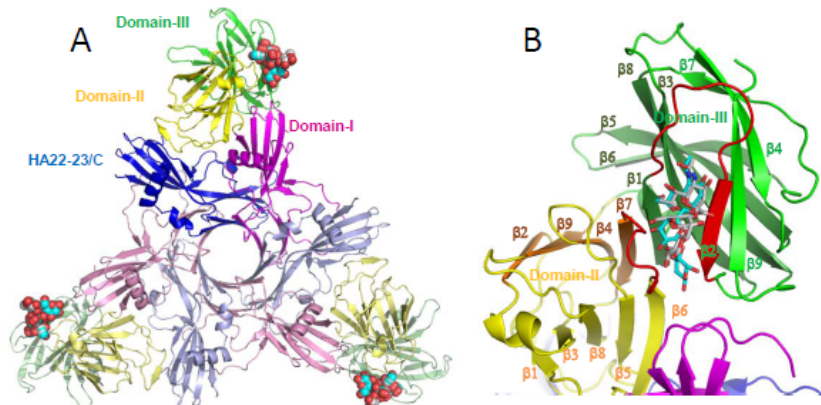


図2. (A) HA70/Cの3量体構造を示す。結合している3SiaLac(グレー色)、6SiaLac(シアン色)を空間充填モデルで描いている。結晶化中に、HA70/Cは2つのフラグメント、HA22-23/C(青色)とHA55/Cに分解されていた。HA55/Cは、ドメインI(マゼンタ色)、II(黄色)、III(緑色)からなる。(B) 糖鎖結合部位の拡大図を示す。ここでは、結合糖鎖は棒状モデルで描いている。ドメインIIの β 2-7シートとドメインIIIの β 1-8シートは連続的に大きな β -シートを形成している。ドメインIIの β 1-6シートとドメインIIIの β 2-7シートは、大きな β -シートと平行に位置するが、それらの間にはギャップがあり、ここに糖鎖が結合する。糖鎖と相互作用している部分は赤色で示す。

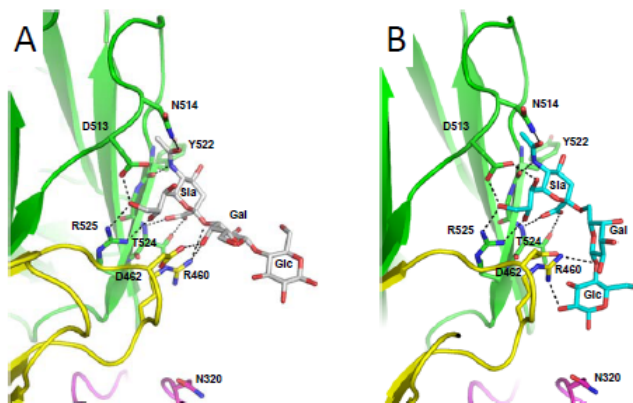


図3. (A) 結合した3SiaLacとHA70/Cとの間の水素結合を点線で示す。3SiaLacは伸長したコンフォメーションをとっている。(B) 6SiaLacは折れ曲がったコンフォメーションで結合している。6SiaLacNAcの占有率は低く、HA70/Cの糖鎖結合親和性は3SiaLacの方が6SiaLacNAcよりも高いと考えられる。

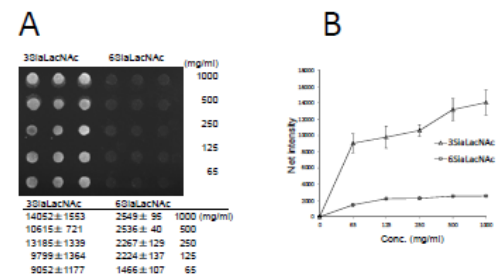


図4. (A) 糖鎖マイクロアレイによる結合アッセイの結果を示す。SiaLacNAc修飾したBSAを濃度を変えて(65-1000 μ g/ml)、エボキシ活性化したガラス板にスポットした。Cy3標識したHA70/C(10 μ g/ml)を用いてリガンドカップリングを行った。バックグラウンド補正を行った後、3回測定したそれぞれのスポットのシグナルを平均した。(B) エラーバーとともにグラフに表す。3SiaLacNAcの方が結合親和性が高いことがわかる。

今後の研究計画

平成24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9・糖タンパク質複合体のX線結晶解析

これまでにガレクチン8および9についてそれらの糖鎖複合体の立体構造を決定してきた。しかしながら、生体内での糖鎖認識機構をより詳細に解明するためには、糖鎖だけでなく糖鎖が付加した状態(糖タンパク質, 糖脂質)と糖鎖結合タンパク質との相互作用を研究する必要がある。ガレクチン9のターゲットタンパク質として Tim-3 (糖タンパク質) が同定されている。平成25年度中には、ガレクチン9・Tim-3 複合体のX線結晶解析に着手したい。

(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。平成25年度中には、これらのうち少なくとも1つの立体構造を決定したい。

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24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, Yoshihara A, Teraoka M, Yamashita S, Izumori K, Kamitori S. (2013). Structure of l-rhamnose isomerase in complex with l-rhamnopyranose demonstrates the sugar-ring opening mechanism and the role of a substrate sub-binding site. *FEBS Open Bio* **3**, 35-40.
2. 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.
3. 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.

[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)

1. 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
2. 山下哲, 吉田裕美, 神鳥成弘, 「サルモネラ菌の接着に関与するβ型外膜蛋白質 PagC および Rck の巻戻しと結晶化」第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年6月, 名古屋
3. Hiromi Yoshida, Misa Teraoka, Akihide Yoshihara, Ken Izumori and Shigehiro Kamitori, X-ray structure of L-ribose isomerase in complex with L-ribose and a deduced catalytic mechanism, 22nd IUBMB 37th FEBS Congress, September 2012, Sevilla (Spain)
4. 吉田裕美, 茅原静香, 吉原明秀, 寺岡美沙, 石井知彦, 何森健, 神鳥成弘, 「X線構造解析による *Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼにおける 1-deoxy 3-keto-D-galactitol の認識機構に関する研究」第85回日本生化学会大会, 2012年12月, 福岡
5. 吉田裕美, 玉井栄治, 関谷洋志, 牧純, 神鳥成弘, 「ファージ由来ウエ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 (発表予定)

[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。