

平成25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
	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
	林 順司	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

平成25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。

ウェルシュ菌ファージ由来エンドライシン (Psm) の X 線結晶解析

グラム陽性菌は、およそ 250Å の厚さの細胞壁を持ち、細胞の形態を保っている。細胞壁は、*N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸が交互にβ(1→4)結合したグリカン鎖を 8~12 アミノ酸のペプチド鎖が架橋した網目構造のペプチドグリカンからなる。エンドライシンは、細菌に感染したファージ由来の遺伝子にコードされており、細胞壁ペプチドグリカンを加水分解し、溶菌化を導く酵素群である。エンドライシンは、細菌の外側からも作用し、特異的に宿主細菌を死滅させることから、新たな抗生物質として注目されている。本研究では、ガス壊疽や食中毒の原因となるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*) ファージ由来のエンドライシン (Psm) について、全長タンパク質 (Psm) および触媒ドメイン (Psm_{cat}) の X 線結晶解析を行った。Psm は、N 末側に GH25 ファミリー (リゾチーム) に属する触媒ドメインと、C 末側に細胞壁結合ドメイン (cell wall binding domain, CBD) を持つ。CBD は、2 つの細菌性 SH3 (SH3_3, pfam08239) ドメインが近似的 2 回対称に配置された新奇な構造をとっていた。通常、SH3 ドメインはペプチドを認識する。このことから、Psm の CBD は、ペプチドグリカン中のペプチド鎖を特異的に認識して、触媒ドメインがグリカン鎖を加水分解するのを助けているという機構が考えられる。

図1. Psmの全体構造。結合しているGlcNAc, HEPES, 酢酸, マロン酸分子とともに示す。SH3CDメインの拡大図にはc-Crk(真核生物SH3ドメイン)・リガンド複合体中のペプチドを重ねてある。触媒部位の拡大図には、黄色ブドウ球菌エンドライシンCpl-1・リガンド複合体中のペプチドグリカン成分を重ねてある。

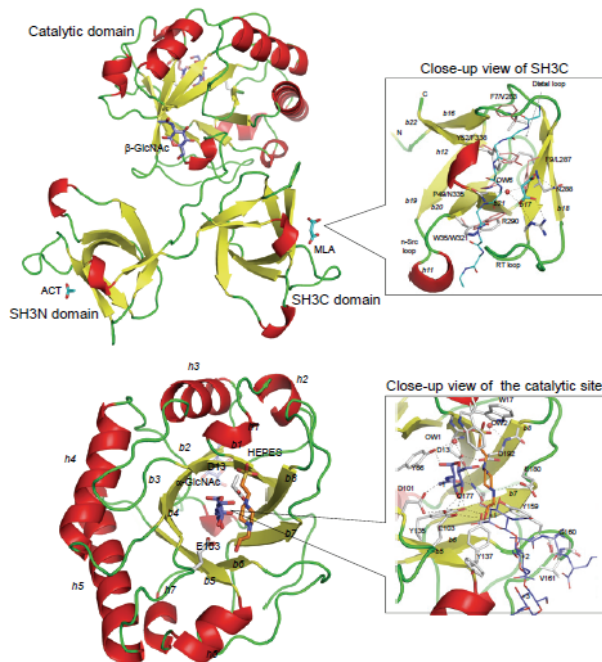


図2. Psm基質結合モデルを表面電荷とともに示す(左)。提唱されているGH25酵素の2つの触媒反応機構, General acid/base mechanismとNeighboring-group mechanism(右)。Psmのモデル構造からは、Neighboring-group mechanismが支持される。

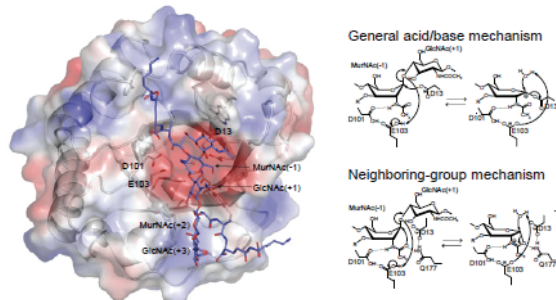
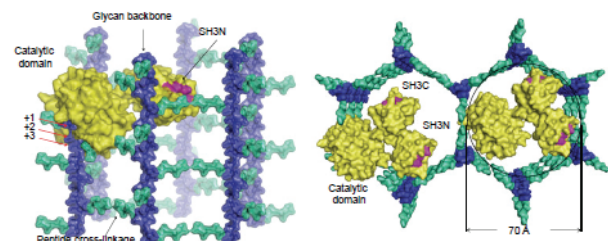


図3. Psm細胞壁認識モデル。Psmの触媒ドメインは、グリカン鎖をサブサイト+1,+2,+3で認識して結合している。予想されるSH3N-SH3Cドメインのペプチド結合部位をマゼンタで示す。SH3N-SH3Cドメインは、グリカン鎖と直交したペプチド架橋を認識すると考えられる。



今後の展望

本事業期間内（平成22－25年度）に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究発展の展望について記載してください。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。今後は、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。今後は、これらのうち少なくとも1つの立体構造を決定したい。また、今年度の研究成果であるエンドライシンおよび関連溶菌酵素であるオートライシンについても、それらの細菌細胞壁認識分解機構について、さらの研究を進展させていきたい。

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研究 (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」

科学研究費補助金基盤研究 (C) (一般) 課題番号: 25440028 平成 25-27 年度 代表者: 吉田裕美 「希少糖生産酵素群の基質複合体の X 線構造に基づく包括的な触媒反応機構の解明」

研究業績

本研究に関連した、平成25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. Tamai, E., Yoshida, H., Sekiya, H., Nariya, H., Miyata, S., Okabe, A., Kuwahara, T., Maki, J. and Kamitori, S*. (2014). X-ray Structure of a Novel Endolysin Encoded by Episomal Phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* **92**, 326-337.
2. Asahina, Y., Kamitori, S., Takao, T., Nishi, N. & Hojo, H.* (2013). Chemoenzymatic synthesis of the immunoglobulin domain of Tim-3 carrying a complex-type N-glycan by using a one-pot ligation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 9733-9737. 査読有
3. 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. 査読有
4. Nonaka, Y., Ogawa, T., Oomizu, S., Nakakita, S., Nishi, N., Kamitori, S., Hirashima, M. & Nakamura, T. (2013). Self-association of the galectin-9 C-terminal domain via the opposite surface of the sugar-binding site. *J. Biochem.* **153**, 463-471. 査読有

[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)

○吉田裕美, 西望, 寺岡美沙, 山下哲, 神鳥成弘, 「安定型ヒト由来ガレクチン9変異体のX線結晶構造解析」第13回日本蛋白質科学会年会, 2013年6月, 鳥取

○Hiromi Yoshida, Nozomu Nishi, Misa Teraoka, Satoshi Yamashita, and Shigehiro Kamitori, X-ray structure of a stable protease-resistant galectin-9 with short linker, 38th FEBS Congress, July 2013, St.Petersburg (Russia)

○寺岡美沙, 吉田裕美, 西望, 中北愼一, 神鳥成弘, 「ヒトガレクチン9変異体のX線構造と糖鎖親和性の解析」第86回日本生化学会大会, 2013年9月, 横浜

○神鳥成弘, 吉田裕美, 玉井栄治, 関谷洋志, 牧純 「ウェルシュ菌フェージ由来エンドライシン (Psm) のX線結晶解析」平成25年度日本結晶学会年会, 2013年10月, 熊本

○吉田裕美, 吉田裕美, 吉原明秀, 寺岡美沙, 何森健, 神鳥成弘, 「希少糖生産酵素 *Acinetobacter* sp. 由来 L-リボースイソメラーゼのX線結晶構造解析」2014年度農芸化学会大会, 2014年3月, 神奈川

[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。