

|         |                                                             |
|---------|-------------------------------------------------------------|
| 氏名      | はやし だ みのる<br>林 田 稔                                          |
| 学位の種類   | 博士 (理 学)                                                    |
| 学位記番号   | 理 博 第 2819 号                                                |
| 学位授与の日付 | 平成 16 年 3 月 23 日                                            |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当                                            |
| 研究科・専攻  | 理学研究科 生物学専攻                                                 |
| 学位論文題目  | アメリカヤマゴボウ ( <i>Phytolacca americana</i> ) 根茎由来レクチンの構造生物学的研究 |

論文調査委員 (主査) 教授 岡 穆 宏 教授 藤 吉 好 則 教授 七 田 芳 則

### 論 文 内 容 の 要 旨

レクチンは、赤血球や糖鎖複合体などを凝集する能力を有する糖結合タンパク質の総称で、糖鎖結合部位を2個以上有するものである。レクチンは様々な生理活性を示し、赤血球凝集活性、がん細胞特異的凝集活性や細胞障害活性などの他に、溶血特性、アポトーシス誘導、免疫グロブリン産生調節などの機能を有している。これ以外にも、レクチンのリンパ球に対する生理活性の一つとしてマイトジェン活性と呼ばれるリンパ球分裂促進能を有する他、リンパ球の抗原依存性活性化に関連したシグナル伝達などの細胞認識過程において細胞表面の複合糖質へのレクチンの結合が関係することも示唆されるに至り、レクチンの多機能性に注目が集まってきていた。ある種のレクチンが自身で異なる四次構造を形成して様々な機能を発揮していることから、近年、レクチンの機能発現におけるタンパク質間相互作用の重要性が指摘されていた。また、糖鎖擬似ペプチドがレクチンの活性を阻害することから、糖鎖の分子構造を真似たペプチド阻害剤の開発も始められていた。しかし、レクチンとこれらの分子との相互作用における構造基盤については理論的にも実験的にもほとんど何も明らかにされていなかった。そこで、分子構造を比較することでレクチン活性を制御する分子間相互作用に関する構造基盤を明らかにする目的で、レクチンとしては稀なマイトジェン活性を有するアメリカヤマゴボウ根茎由来レクチン (PL) の立体構造をX線結晶解析法により決定し、PLの構造生物学的研究を行った。アメリカヤマゴボウ根茎には、PL-A, PL-B, PL-C, PL-D1 および PL-D2 の5種類のレクチンが含まれている。これらの各分子は、約40アミノ酸残基からなる糖鎖結合ドメイン2個以上がそれぞれ数残基のリンカーで連結されており、ポリペプチド鎖内のドメイン数を異にすることで異なる赤血球凝集活性やマイトジェン活性を発揮していると考えられていた。

本研究では5種のPL分子のうち反復ドメイン3個からなると推定されるPL-C, 2個からなると推定されるPL-D1とPL-D2およびPL-D2糖鎖複合体の結晶構造をそれぞれ1.80, 1.65, 1.50および1.80Å分解能で決定し、構造比較解析を行った。まずPL-D1およびPL-D2糖鎖複合体はハンギングドロップ蒸気拡散法とマイクロシーディング法の併用で、PL-D2は添加剤を加えたバッチ法とマイクロシーディング法の併用で、それぞれ単結晶を得た。各結晶の構造解析には分子置換法を適用し、小麦胚芽アグルチニンの一つのドメインを初期モデルにしてPL-D2構造を決定し、続いてPL-D2構造を初期モデルにしてPL-D1およびPL-D2糖鎖複合体の構造を決定した。一方、PL-Cは双晶になる傾向が強かったが、添加剤を加えたハンギングドロップ蒸気拡散法により単結晶化し、水銀およびウランでラベルしたPL-C誘導体結晶を調製して重原子同型置換法により構造を決定した。

構造解析の結果、アミノ酸配列からの推定通り、各PL分子の構造はよく似た立体構造を採る糖鎖結合ドメインの反復で形成され、各ドメインは三残基程度のリンカーにより連結されており、各々のドメインは特徴的な二次構造を持たないものの保存された四つのジスルフィド結合で三次元構造が保持されていた。更に詳細に構造比較することで、PL分子それぞれの活性に関する特徴を説明する構造情報を得た。PL-D1とPL-D2は前者がC-末端側に二残基長い以外に一次構造の違いはないにもかかわらず、PL-D1はPL-D2と異なりマイトジェン活性を示さないことが知られていた。両者の構造比較から、

この原因はPL-D1のC-末端伸長二残基が分子表面に突出し揺らいで相手分子との相互作用を妨害するからであることを暗示する結果を得た。また、PL-D2結晶ではC-末端に結合したカルシウムイオンが隣接分子と配位結合ネットワークを形成して結晶構造を安定化していた。これはPL-D1結晶では観られなかった。PL-D2糖鎖複合体結晶中では、PL-D2分子は結晶学的対称操作によって関係付けられる隣接分子との間で一つの糖鎖を共有することにより糖鎖によって架橋されたらせん状の分子鎖を形成していた。この分子鎖中に観察されるタンパク質-糖鎖間相互作用様式から実際に起こる相互作用に関する構造情報を得た。PL-D1およびPL-D2は単量体で存在していたが、PL-Cは糖鎖結合部位間の疎水的相互作用によりhead-to-tailの二量体構造を形成し、糖鎖を収容するための空間をなくしていた。PL-C二量体中に観られたタンパク質間相互作用がPL-D2糖鎖複合体結晶構造で観察されたタンパク質-糖鎖間相互作用と様式で類似している事も明らかになった。その一方で、糖鎖結合部位の接触面積比較から、PL-Cの糖鎖結合部位でのタンパク質間相互作用はPL-D2のタンパク質-糖鎖間相互作用よりも相補的であり、そのような強固な二量体構造の形成はPL-Cの赤血球凝集能の欠如と関係していることを明らかにした。

以上のように、申請論文は一連のアメリカヤマゴボウ根茎由来レクチンの結晶化およびX線結晶構造解析に成功し、構造中に観察された多様な相互作用の解析から本レクチンの活性発現の基盤となる構造情報を明らかにした。更に細胞表面上で実際に起こるレクチン-リガンド間相互作用の反映と期待させる構造基盤も明らかにした。

なお、主論文の基礎となる論文2編は、申請論文の研究成果の一部を共著者とともに公表したものである。

#### 論文審査の結果の要旨

レクチンは生体防御に係わると云われているタンパク質であるが、これまでその細胞内での真の機能については不明のままであった。近年になって生化学的研究が進むにつれて、レクチンは赤血球や糖質複合体などを凝集させる糖結合タンパク質で糖鎖結合部位を二つ以上持つものと定義されるに至った。そして、その機能として、赤血球凝集活性、がん細胞特異的凝集活性、細胞障害活性、溶血特性、アポトーシス誘導、免疫グロブリン生産調節、ミトジェン活性などの他、リンパ球の抗原依存性活性化に関連したシグナル伝達などの細胞認識過程における細胞表面の複合糖質への結合も示唆されるなど、様々な機能を持つタンパク質であることが分かってきた。このような機能に関わる研究の進歩に伴ってレクチンの分子構造に関する研究も盛んに行われるようになってきた。そして、近年、レクチンの多様な機能は異なる四次構造を形成することにより発揮されているという研究結果から、レクチンの機能発現におけるタンパク質間相互作用の重要性が指摘されていた。しかし、レクチンと糖鎖のみならずタンパク質やペプチドとの相互作用の重要性が指摘されてはいたものの、その構造基盤についてはほとんど明らかにされていなかった。

本申請論文ではレクチンとしては稀なミトジェン活性を有するアメリカヤマゴボウ根茎由来レクチン(PL)の一連の分子立体構造をX線結晶解析により決定した。アメリカヤマゴボウ根茎からは5種のPL分子が単離されていた。7個の糖鎖結合ドメインからなって柔軟性に富みかつ多量の糖鎖が付加されているPL-Bと少量しか含まれずPL-Bの一部と考えられるPL-Aについては結晶化できず構造解析できなかった。しかし、それ以外のPL-C、PL-D1、PL-D2およびPL-D2糖鎖複合体については、いずれも結晶化が困難であったが添加剤やシーディング法の適用により結晶化に成功し、X線構造解析が可能となった。特に、PL-Cは双晶になる強い特性を持っていたが、ジオキサンを添加剤として加えることで単結晶化に成功した。このことが本研究の幅を広げることに繋がった。まず、糖鎖結合ドメイン2個からなりミトジェン活性を示すPL-D2とC-末端二残基長い以外に一次構造の差がないがミトジェン活性を示さないPL-D1の構造比較から、伸長二残基が分子表面に突出し揺らぐことで相手分子との相互作用を妨害しミトジェン活性を喪失させることを暗示する結果を得た。PL-D2のC-末端にカルシウムの結合が認められたが、この結合位置は糖鎖結合部位から離れた所であることから糖鎖結合には直接関係ないと結論づけた。ただ、カルシウム結合のミトジェン活性への関与は今後の課題として残された。また、PL-D2は糖鎖複合体結晶中で結晶学的対称により関係付けられる隣接分子間で一つの糖鎖を共有することにより糖鎖を介したらせん状の分子鎖を形成していることを明らかにした。PL-D2が現実の生体反応場において糖鎖を共有してこのようならせん構造を採るとは考えにくい、ここで得られたタンパク質-糖鎖間相互作用に関する構造情報は現実の相互作用様式を反映していることは明らかであった。

次いで糖鎖結合ドメイン3個からなるPL-Cの構造解析から、PL-Cが糖鎖結合部位間疎水的相互作用で二量体を形成していることを明らかにした。PL-Cはマイトジェン活性を有するが赤血球凝集能を有しない。ここでのPL-C構造解析の結果から、PL-Cは二量体を形成して糖鎖結合空間を無くすことで糖鎖結合能を失い、その事が赤血球凝集活性を示さない結果に結びついていることを明らかにした。更にPL-C二量体におけるタンパク質間相互作用様式はPL-D2糖鎖複合体結晶中で観察されたタンパク質-糖鎖間相互作用様式と類似しているが、糖鎖結合部位での接触面積の比較によりPL-Cの糖鎖結合部位でのタンパク質間相互作用はPL-D2のタンパク質-糖鎖間相互作用よりも相補的であることも明らかにした。これは、このような強固な二量体構造の形成がPL-Cの単量体での存在を困難にし、かつPL-Cの赤血球凝集能の欠如と深く関わっていることを示す結果であった。これら一連の結晶構造解析でPL分子の多様な相互作用様式に関する構造基盤情報を得たことによって、細胞表面上で実際に起こるレクチンの複雑な相互作用を理解する上で基本となる構造情報を得られたことは明らかである。このように、本論文はX線解析で決定した立体構造を比較してレクチンのタンパク質間相互作用による高次構造形成と機能の関係、レクチン-糖鎖間相互作用による糖結合様式および両相互作用様式における類似性に関する構造基盤について初めて明らかにした。

ここで得られた研究成果は、アメリカヤマゴボウ根茎由来レクチンが高次構造を変化させることによって多様な活性を示す構造基盤を明らかにしたもので、レクチンの相互作用多様性の構造研究、とりわけこれまで殆ど理解されていなかったレクチンのタンパク質間相互作用とタンパク質-糖鎖間相互作用の類似性に関する研究およびレクチンの活性制御剤の開発研究の突破口を開いた点において高く評価される。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問を行った結果、合格と認めた。