

研究題目 溶液 NMR 法による酸化還元依存的なガレクチンの構造機能制御機構の解明

研究組織

研究代表者：金村 進吾（関西学院大学理学部）
共同研究者：齋尾 智英（徳島大学先端酵素学研究所）
研究分担者：奥村 正樹（東北大学学際科学フロンティア研究所）
：関 凧沙（関西学院大学理工学研究科）
：倉持 円来（関西学院大学理工学研究科）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

ガレクチンは、細胞シグナル伝達、細胞接着、免疫、アポトーシス、神経保護、血管新生など様々な生命現象に関与する糖結合性タンパク質であり、哺乳類では 15 種類のガレクチンが同定されている。ヒトガレクチン-1 (hGal-1) は、分子量 14.5 kDa の球状タンパク質であり、細胞質で合成された後、細胞外に分泌され機能を発現する。また hGal-1 の特徴として 6 つのシステイン残基を有していることが挙げられ、これまでの研究から hGal-1 内の 6 つのシステイン残基の酸化還元状態と、それに応じた構造変化が機能調節に重要であることが示唆されている (Guardia, et al., *Glycobiology* 2014)。システイン残基全てが還元状態にある還元型 hGal-1 は二量体を形成しており (Hirabayashi, et al., *Glycobiology* 1993)、糖結合活性を保有することで (Leppanen, et al., *J Biol Chem.* 2005)、細胞接着等に関与する (Jung, et al., *J Neurosurg.* 2008)。一方、6 つのシステイン残基が分子内で 3 本のジスルフィド結合を形成した酸化型 hGal-1 は、二次構造変化を伴って単量体となり糖結合活性を失い、神経軸索の再生という全く異なる生理機能に関与することが示される (Horie, et al., *J Neurosci.* 2004)。そこで申請者は hGal-1 の酸化還元調節機構を明らかにするために、各システイン残基の酸化還元反応性、酸化還元依存的な構造変化、酸化還元状態の生理学的意義、生体内での調節因子を探求した。その結果、hGal-1

の 1 つのシステインペア (Cys16-Cys88) が酸化還元依存的な構造変化および機能調節に必須であることがわかった。さらに、このシステインペアの酸化還元調節因子として、小胞体内酸化還元酵素群である Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリーが機能していることが示唆された。このように、hGal-1 の酸化還元調節機構に関して、分子、細胞レベルで明らかにしつつあるが、未だ hGal-1 の酸化還元調節機構の詳細は明らかではない。その一因として、還元型 hGal-1 の立体構造が決定されているのに対し、酸化型 hGal-1 の立体構造が決定されていないことが挙げられる。そこで本研究では、酸化型 hGal-1 の立体構造決定を行い、hGal-1 の酸化還元調節機構を原子レベルで理解することを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

還元型 hGal-1 の結晶構造が決定されているのに対し、酸化型 hGal-1 は未だ決定されていない。その背景に、酸化型 hGal-1 は還元型 hGal-1 に比べて、一部二次構造が崩れた構造を取っており結晶化が困難であることが挙げられる。そこで、溶液 NMR 法によって酸化型 hGal-1 の立体構造決定を目指した。本研究では純度の高い酸化型 hGal-1 (野生型) の取得が困難であることから、hGal-1 の酸化還元調節に必須の Cys16-Cys88 以外のシステイン残基をセリン残基に置換した変異体 (Cys16-Cys88) を用いた。溶液 NMR 測定には、同位体標識した ^{15}N ラベル化お

よび ^{15}N , ^{13}C ラベル化酸化型 hGal-1 変異体を調製し用いた。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

溶液 NMR により hGal-1 Cys16-88 変異体の酸化型、還元型構造情報の取得に着手した。その結果、良好な HN-TROSY-HSQC スペクトルの取得に成功し、酸化還元依存的な hGal-1 の構造変化が示唆された(図 1、左)。また、詳細なスペクトル解析の結果、還元型の信号は全体的に分散しており、高次構造を保持していることがわかった。一方で、酸化型の信号は中央部に密集している信号も観察されたことから、一部の構造が崩壊していることが示唆された。さらに、酸化型の信号数はアミノ酸残基数よりも非常に多く、分散信号の強度が還元型よりも弱いことから、酸化型 hGal-1 は、少なくとも 2 状態間の平衡であることが示唆された。

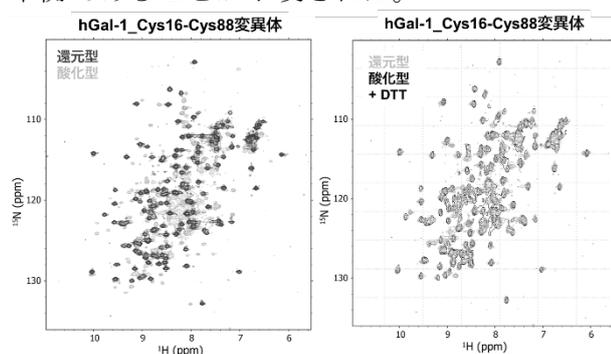


図 1. 酸化型、還元型 hGal-1 の HN-TROSY-HSQC スペクトル(左)、還元型、酸化型 hGal-1+還元剤の HN-TROSY-HSQC スペクトル(右)

次に、酸化型から還元型への可逆性を調べるために、酸化型に還元剤である DTT を添加し、NMR 測定を行った。その結果、信号数が多く、中央に密集していた酸化型の信号とは異なり、還元型の信号に一致したスペクトルが得られた(図 1、右)。この結果から、hGal-1 の酸化還元反応は可逆的であることがわかった。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

現在までに生化学、生物物理学、細胞生物学的手法により研究を進め、hGal-1 の酸化還元調節、PDI による触媒に関して分子レベルで明らかにしてきたが、詳細な機構には至っておらず原子レベルでの機構解明が必要である。そこで、齋尾教授が持ち合わせる独自の NMR 構造解析技術(メチル基選択的安定同位体標識、メチル

TROSY 測定法、常磁性ランタノイドプローブ技術など; Saio, et al., *Science* 2014)を取り入れることで構造生物学的手法を大幅に強化できる。これによって、原子・分子から細胞レベルの多階層アプローチによる詳細な機構解明が可能となる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

1) 金村進吾、黒井邦巧、岡田莉奈、松崎元紀、山口宏、伊藤大、李映昊、稲葉謙次、齋尾智英、中林孝和、奥村正樹. 「酸化還元依存的なヒトガレクチン 1 の構造機能制御機構の解明」. 第 45 回日本分子生物学会, 千葉, 12 月 1 日, 2022 年
2) 金村進吾、黒井邦巧、岡田莉奈、松崎元紀、山口宏、伊藤大、李映昊、稲葉謙次、齋尾智英、中林孝和、奥村正樹. 「ヒトガレクチン 1 の酸化還元依存的な機能制御における分子構造基盤」. 第 95 回日本生化学会, 名古屋, 11 月 10 日, 2022 年

3) Kanemura, S. “Structural insights into the oxidoreductases engaged in the extracellular or intracellular redox pathways.” *Protein Folding, Aggregation, Misfolding Disease, and Disease Crosstalk* (2nd International Symposium on Protein Folding and Misfolding-induced Protein Aggregation), Korea, September 2nd, 2022

4) 金村進吾、黒井邦巧、岡田莉奈、松崎元紀、山口宏、伊藤大、李映昊、稲葉謙次、齋尾智英、中林孝和、奥村正樹. 「酸化型ガレクチン 1 の分子構造基盤」. 第 22 回日本蛋白質科学会, つくば, 6 月 7 日, 2022 年

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

酸化型 hGal-1 の立体構造決定のために、 ^{15}N , ^{13}C ラベル化酸化型 hGal-1 変異体のスペクトルを取得したが、良好なスペクトルではなかった。良好なスペクトル取得に向けたサンプル調製及び測定条件検討を行う必要がある。今後は、酸化型 hGal-1 の立体構造決定に加えて、hGal-1 の機能調節因子である PDI ファミリーとの相互作用解析、複合体構造解析を行うことで、hGal-1 の機能調節の全容解明に取り組む。