

研究題目 ガレクチンの構造機能制御メカニズムの解明

研究組織

研究代表者：金村 進吾（関西学院大学理工学部）
 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）
 ：岡田 莉奈（関西学院大学理工学部）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

ガレクチンは、配糖体βガラクトシドを特異的に認識、結合する糖結合性タンパク質(レクチン)の一種であり、細胞増殖、細胞接着、神経保護、免疫、アポトーシスなどの様々な生命現象に関与している。それゆえにガレクチンの機能不全は、筋萎縮性側索硬化症をはじめとした神経変性疾患、癌、炎症、糖尿病など、あらゆる疾病に関わる重要な因子として知られている(Camby, et al., *Glycobiology*, 2006)。

ガレクチンファミリーの一つであるヒトガレクチン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、二量体を形成し糖結合能を持つことで細胞接着等に関与する一方、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 では、二次構造変化を伴って単量体となり糖結合能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わかっている。以上の知見から、hGal-1 の酸化還元制御が生命活動に重要であると考えられるが、どのようにして hGal-1 の酸化還元が制御されるのか、未だ多くは不明である。最近、我々は小胞体内局酸化還元酵素である Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリーが hGal-1 の酸化還元状態を制御する結果を見出した。

PDI ファミリーは、小胞体で生合成された新

生タンパク質の酸化的フォールディング(ジスルフィド結合形成を伴った折りたたみ)を触媒する酵素として知られており、小胞体内タンパク質品質管理を担っている。興味深いことに近年、PDI ファミリーは小胞体に留まらず分泌され、細胞外で機能するという報告がされているが(Kaiser, et al., *Nature*, 2007; Cho, et al., *J Clin Invest.*, 2008)、細胞外での PDI ファミリーの機能についても多くが不明である。そこで本研究では、原子・分子及び細胞レベルで、PDI ファミリーによる hGal-1 の酸化還元依存的な構造機能制御メカニズムの解明を目指した(図 1)。

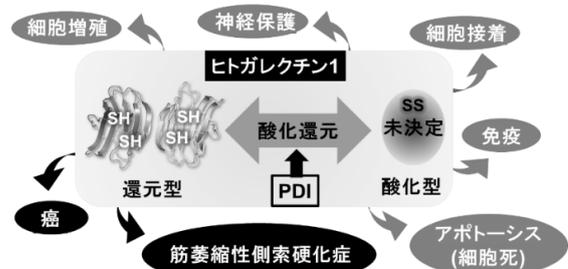


図 1. hGal-1 の酸化還元依存的な構造機能制御

[1-2]研究の方法・経過

①PDI ファミリーによる hGal-1 の酸化還元依存的な機能制御(分子レベル:ゲルシフトアッセイ法): hGal-1 と PDI ファミリー間のチオール・ジスルフィド交換反応を検証するために、ゲルシフトアッセイを行った。hGal-1 及び PDI ファミリーの酸化還元状態は、マレイミド基含有化合物によるチオール基の選択的ラベル化を利用した SDS-PAGE により解析された。

②PDI ファミリーによる hGal-1 の酸化還元依存的な機能制御(細胞レベル:赤血球凝集アッセイ法):赤血球に還元型 hGal-1 を添加すると、赤血球表面の糖鎖を認識して赤血球の凝集を

起こす。一方で、酸化型 hGal-1 は凝集活性を示さないため、赤血球凝集の有無を検証することで、PDI ファミリーによる hGal-1 の酸化還元依存的な機能制御を評価した。

③hGal-1 の酸化還元依存的な構造ダイナミクス(原子レベル: 溶液 NMR 法): 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 は未だ決定されておらず、原子レベルでの酸化還元依存的な構造ダイナミクスは不明である。本研究では、溶液 NMR 法によって酸化型 hGal-1 の構造決定を目指した。

[2] 研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

①SDS-PAGE 解析から、PDI ファミリー(PDI, ERp46)による hGal-1 の酸化還元反応が触媒的であり、PDI よりも ERp46 が効率的に還元型 hGal-1 を酸化していることがわかった(図 2)。

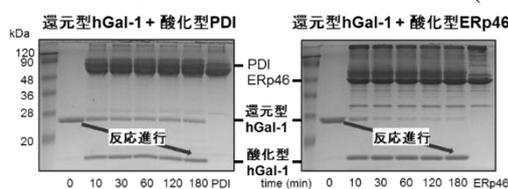


図 2. PDI, ERp46 による hGal-1 の酸化反応

②赤血球凝集実験の結果、還元型 PDI よりも還元型 ERp46 を添加した際の方が、赤血球の凝集度合いが上昇していた。この結果は、PDI と ERp46 とともに酸化型 hGal-1 を還元型にさせ、機能変化させていることを示している(図 3)。

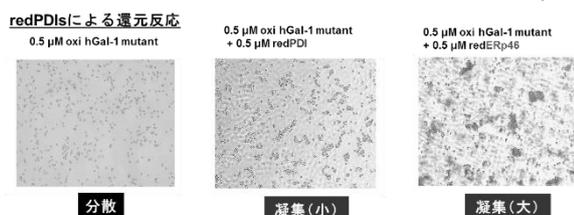


図 3. PDI (中)、ERp46 (右)添加による hGal-1 の赤血球凝集能の評価

③酸化型、還元型 hGal-1 の溶液 NMR 測定の結果、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 4)。現在、NMR 信号帰属中である。

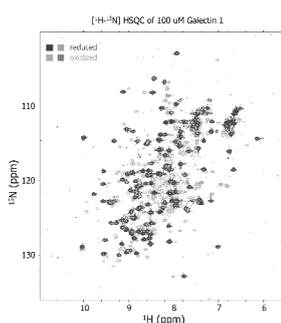


図 4. 酸化型(灰色)、還元型 hGal-1 (黒色)の HN-TROSY-HSQC スペクトル

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

溶液 NMR 法は、タンパク質の溶液構造の決定だけでなく、相互作用解析も行える利点がある。本共同研究において NMR 法を取り入れることにより、原子・分子から細胞レベルまでの総合的な詳細な機構解明が可能となった。今後、さらに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原子・分子レベルでの作用機序の理解が格段に深まると期待される。

[3] 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

- [雑誌] Matsusaki M, Okada R, Tanikawa Y, Kanemura S, Ito D, Lin Y, Watabe M, Yamaguchi H, Saio T, Lee YH, Inaba K, and Okumura M. Functional Interplay between P5 and PDI/ERp72 to Drive Protein Folding. *Biology*, 10: e1112, 2021.
- [雑誌] Okumura M, Kanemura S, Matsusaki M, Kinoshita M, Saio T, Ito D, Hirayama C, Kumeta H, Watabe M, Amagai Y, Lee YH, Akiyama S, and Inaba K. A unique leucine-valine adhesive motif supports structure and function of protein disulfide isomerase P5 via dimerization. *Structure*, 29: 1-14, 2021.

[3-2] 学会発表

- 岡田莉奈、金村進吾、黒井邦巧、松崎元紀、齋尾智英、山口宏、伊藤大、李映昊、中林孝和、稲葉謙次、奥村正樹。「酸化還元制御によるヒトガレクチン 1 の構造機能調節の理解」. 第 44 回日本分子生物学会, オンライン, 12 月 1 日, 2021 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

本共同研究により、hGal-1 の構造機能制御機構に関して、分子、細胞レベルで明らかになりつつあるが、未だ不明な点が多い。その一因として、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。今後は、酸化型 hGal-1 の立体構造決定および hGal-1 と PDI ファミリーとの相互作用解析、複合体構造解析を行い、hGal-1 の構造機能制御機構を原子レベルで理解することが課題である。