

3rd International Workshop on Expression, Structure and Function of Membrane Proteins に参加して

-膜タンパク質の機能・構造における研究-

長崎大学大学院工学研究科 生産システム工学専攻 博士後期課程 1年 長尾 知直
(派遣期間：平成 24 年 9 月 22 日～平成 24 年 9 月 30 日)

私は、この度、フィレンツェ大学で行われた国際学会 3rd International Workshop on Expression, Structure and Function of Membrane Proteins にポスター発表として参加及び、ダイヤモンド放射光施設（イギリス）を訪問、見学、研究に関するディスカッションを行う機会に恵まれ現地での最新の研究に触れることができたことをここに報告します。



図.1 フィレンツェ大学にて。筆者



図.2 ダイヤモンド放射光施設にて。

左 筆者 右 郷田先生

1. 国際会議の概要

フィレンツェ大学はフィレンツェセントラルステーションからバスで 15 分と都市部にあり、12 の学部で約 60000 人の学生が学ぶ伝統ある大学です。わたしが参加した 3rd International Workshop on Expression, Structure and Function of Membrane Proteins は、生体活動での細胞過程において膜タンパク質がどのように関与しているか、膜タンパク質の構造・機能的な研究における最新の報告を行うものでした。これらはただ研究発表を行うものだけでなく、企業、産業での応用も目的としていました。

2. 発表内容と成果

海産無脊椎動物グミ (*Cucumaria echinata*) には、CEL-I-IV の四種類のカルシウム依存性レクチンが見出されている。これらのレクチンはいずれも、ガラクトース/およびNアセチルガラクトサミン含有糖鎖を認識し、その活性に 10 mM 程度の Ca^{2+} を必要とする。CEL-I(32 kDa) と CEL-IV (68 kDa) については C 型糖認識ドメインがそれぞれ二個または 4 個、ジスルフィド結合を介して会合した C 型レクチンである。

一方で CEL-III は通常のレクチンとは異なり分子質量 47.5 kDa の溶血性レクチンである。このレクチンはヒトやウサギなどの赤血球に対して強い溶血活性を示している。これは CEL-III が赤血球膜表面糖鎖に結合し、膜内で多量体化することによってイオン透過性の膜孔を形成、それによって生じる細胞膜内外の浸透圧差によって引き起こされると考えられている。

これまでの研究により CEL-III は cDNA の塩基配列およびタンパク質のアミノ酸分析から一次構造が決定され、X 線結晶構造解析により CEL-III 単量体及びその糖複合体は立体構造が明らかとなっている。その構造は N-末端は植物レクチン Ricin の B 鎖と類似の β -トレフォイル構造を有する 2 つの糖結合ドメインがあり、C 末端側領域 (ドメイン 3) はアミノ酸 300-350 残基の間に疎水性の高い領域を含んでおり、標的細胞と相互作用し細胞膜内でオリゴマーを形成するのに重要なドメインであると推測されている。しかしながら、多量体の原子レベルでの詳細な構造は解明しておらず、また多量体化における CEL-III の立体構造変化に関しても現在不明である。

ここで我々は細胞膜孔形成に基づく溶血活性発現機構を明らかにするため、ウサギ赤血球を用いた多量体化による多量体精製と結晶化に成功したことを報告しました。

(English abstract) CEL-III is a hemolytic lectin isolated from the sea cucumber *Cucumaria echinata*. This lectin binds to carbohydrates containing Gal/GalNAc at nonreducing ends in the presence of Ca^{2+} . After binding to cell surface carbohydrate chains, CEL-III oligomerizes to form membrane pores, thereby leading to colloid osmotic rupture of the cell membrane. We have already reported that the monomeric structure of CEL-III. This lectin is composed of three domains, among which domains 1 and 2 function as carbohydrate-binding domains and domain 3 acts as an oligomerization domain. The domains 1 and 2 adopt β -trefoil fold similar to the B-chain of the toxic lectin ricin, while the domain 3 has a novel fold including two α -helices and one β -sandwich structure. The two α -helices in domain 3 are situated at the interface of the three domains, and contain several hydrophobic amino acid residues, including two valine clusters. Therefore, it seems highly likely that the α -helix region in domain 3 plays an important role in the oligomerization on target cell membranes. However, structure of the pore forming oligomer of the CEL-III has not been clarified.

Here, we prepared the pore-forming oligomer of the CEL-III using rabbit erythrocytes. The CEL-III oligomer was then solubilized with n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM), purified by Lactose-fixed affinity column chromatography, and crystallized. The pore-forming CEL-III

complex crystals were obtained by vapor diffusion method with a precipitant solution containing of 0.1 M HEPES (pH 7.5), 18% Jeffamine M-600. Using synchrotron radiation, the crystals diffracted to 4.2 Å resolution.

3. 今後の展望と感想

私の研究は、膜結合 CEL-III 多量体の精製と結晶化に成功したものの、分解能は低くまた再現性が低い問題点が挙げられます。今回の国際学会において膜タンパク質研究の国際的交流の場に触れ、またダイヤモンド放射光施設における最新の研究設備を見ることで、現在の問題点における新たなアプローチを学ぶことができました。学会においては、結晶化に用いる試料の調製方法について、参加者から多くの質問を頂き、ディスカッションすることができました。今回の国際学会の参加は、学ぶ機会に溢れている新たな世界に触れることで、とても有意義な時間を過ごすことができました。ありがとうございます。今後は今回に学んだことを生かし結果とするため、さらなる研究に精進していきたいと思いません。