

## 学位論文題名

Structure-function studies on the invertebrate  
chitin-binding protein tachycitin(無脊椎動物由来キチン結合タンパク質タキサイチンの  
構造と機能に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

カブトガニの体液中には血球(顆粒細胞)が存在し、その細胞質は大顆粒および小顆粒により満たされている。タキサイチンは、小顆粒中に存在するシステインに富む抗菌タンパク質(73残基)で、C末端のスレオニン残基はアミド化されていることが知られている。タキサイチンは、①グラム陽性菌、陰性菌および真菌の成長を阻害する機能(抗菌活性)、②グラム陰性菌を凝集する機能(細菌凝集活性)、③キチンに特異的に結合する機能を有することが知られている。しかし、タキサイチンの機能発現のメカニズムはまだ解明されていない。

タキサイチンは無脊椎動物由来キチン結合タンパク質およびキチナーゼに存在するキチン結合ドメイン(約65残基)とアミノ酸配列の相同性を示していることから、キチン結合ドメインを1つ有すると考えられている。しかしながら、無脊椎動物由来キチン結合タンパク質ファミリーに属するタンパク質の立体構造解析およびキチン結合部位の同定はまだ行われていない。そこでまず、 $^1\text{H-NMR}$ 分光法を用いてタキサイチンの水溶液中での立体構造解析を行った。NMR装置はVarian UNITY Inova 500およびJEOL Alpha-600 NMR分光計を用い、二次元のDQF-COSY、TOCSY(mixing time = 75、85ms)、NOESY(mixing time = 75、120、250ms)スペクトルを測定した。各種二次元NMR法を用いた $^1\text{H-NMR}$ シグナルの連鎖帰属は73残基のうちシグナルが観測された72残基について全て終了した。化学シフトの二次構造依存性(Chemical Shift Index method; CSI)を用いた解析結果とスピン結合定数 $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ による解析結果および、 $\beta$ シートに特徴的なNOEの観測によって、3本鎖逆平行 $\beta$ シートと2本鎖逆平行 $\beta$ シートの存在が示された。 $\beta$ シート内部で水素結合に関与すると考えられるNHプロトンの化学シフトの温度依存性(温度係数;  $\text{ppb} \cdot \text{K}^{-1}$ )は極めて小さかった。タキサイチンの立体構造の算出にはX-PLOR Version 3.851を用い、束縛条件として、1009個のNOEの距離情報、35個の二面角情報、13個の水素結合情報、5個のジスルフィド結合情報を用いた。この結果、ポテンシャルエネルギーが十分に小さく、収束の良い25個の水溶液構造が算出された。これら25個の構造の平均構造からのRMSDは主鎖原子(N、 $\text{C}_\alpha$ 、C')で $1.15 \pm 0.21 \text{ \AA}$ (残基6-68)、さらに側鎖原子を加えると $1.95 \pm 0.24 \text{ \AA}$ であった。N末端側の5残基とC末端側の5残基についてはNOEの距離情報が少ないため、構造の収束が悪かった。タキサイチンの立体構造はN末端側の3本鎖逆平行 $\beta$ シート(Pro17-Val19、Ser26-His31、Leu34-Asn39)、C末端側の2本鎖逆平行 $\beta$ シート(His45-Asn47、Val52-Asp54)とそれに続く短いヘリカルターン(Pro56-Ala59)で構成され、この2つ

の $\beta$ シートによってサンドイッチ様の構造を形成していることが示された。

タキサイチンのキチン結合部位を同定するため、既に立体構造が決定されている植物由来キチン結合タンパク質（ヘベイン、小麦胚芽アグルチニン、Ac-AMP2）との立体構造の比較を行った。その結果タキサイチンの Cys40-Gly60 までの部分構造が植物由来キチン結合タンパク質の部分構造と大きさや配向の点で類似していることが明らかになった。この領域は2本鎖逆平行 $\beta$ シートとそれをつなぐヘアピンループ（Asn47-Val52）、ヘリカルターンおよび一対のジスルフィド結合（Cys40-Cys53）によって特徴的な二次構造モチーフ（キチン結合モチーフ）を形成していた。タキサイチンのセグメント Cys40-Gly60 とヘベインのセグメント Cys12-Ser32 を重ね合わせることで構造の比較を行った結果、両者の原子間の重なりは極めて一致している（主鎖の RMSD =  $\sim 1.5$  Å）ことが示された。これまでの研究で、ヘベインの Trp21 と Trp23 の芳香族側鎖がキチンとの疎水結合に関与し、さらに Ser19 の側鎖の OH 基が水素結合でキチンに結合していることが知られている。タキサイチンとヘベインの構造を重ね合わせると、タキサイチンの Asn47、Tyr49、Val52 はヘベインのキチン結合残基 Ser19、Trp21、Trp23 にそれぞれ対応した位置に存在していた。以上の結果はタキサイチンのキチン結合部位が Asn47、Tyr49、Val52 を含む領域に存在することを示唆している。無脊椎動物由来および植物由来キチン結合タンパク質の間でのキチン結合モチーフの保存性を調べるため、タキサイチンの Cys40-Gly60 に対応する領域を使って、アミノ酸配列のアラインメントを行った。アラインメントテストの結果、構造形成に重要な役割を果たすアミノ酸 Cys、Pro、Gly が無脊椎動物、植物の両者でよく保存されていた。さらにキチン結合残基であると推定される残基（Asn47、Tyr49、Val52）では、極性アミノ酸と疎水性アミノ酸の分布の保存性が高かった。1999年に「無脊椎動物由来および植物由来キチン結合タンパク質は収斂進化の関係にある」という仮説が Shen と Jacobs-Lorena によって提案された。これは即ち「異なる起源に由来するタンパク質がキチン結合機能を獲得する上で共通の立体構造を構築するように進化してきた」という考えである。我々の決定した無脊椎動物由来キチン結合タンパク質（タキサイチン）の立体構造および立体構造に基づいたアミノ酸配列のアラインメントの結果はこの仮説を裏付ける重要な実験的証拠であると考えられた。

タキサイチンの構造と機能に関してさらに研究を進めるため、大腸菌を宿主とした組換え型タキサイチンの大量発現系の構築を行った。これまでの研究でタキサイチンの C 末端のスレオニン残基は、カプトガニ体内では翻訳後修飾によってアミド化されていることが知られている。組換え型タキサイチンが天然型タキサイチンと異なる点は、この C 末端のスレオニン残基がアミド化されていない点である。タキサイチンは大腸菌内で発現させると不溶性顆粒に蓄積された。そこでまず、タキサイチンを不溶性顆粒から活性再生させるため、尿素による可溶化、rapid dilution 法による巻き戻し、および巻き戻し条件の最適化を行った。活性再生後のタキサイチンの精製にはキチンアフィニティーカラムを用いた。精製された組換え型タキサイチンの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは天然型タキサイチンのものとほぼ同一の化学シフト値を示した。疎水性コアの形成に特徴的な 0~0.5ppm 付近に高磁場シフトした NMR シグナル（Leu37、Leu44、Val44 のメチルプロトン）も両者で観測された。以上の結果は組換え型タキサイチンが正しいフォールドに巻き戻されたことを示している。組換え型タキサイチンと天然型タキサイチンの抗菌活性を測定した結果、組換え型タキサイチンは、真菌（*Pichia pastoris* GS115）に対する抗菌活性は保持しているが、グラム陽性菌（*Staphylococcus aureus* 209P）とグラム陰性菌（*Escherichia coli* B）に対しては抗菌活性を失った。組換え型および天然型タキサイチンの NMR 測定結果で両者は同一の立体構造を形成していることが示されたことから、この抗菌活性の違いは組換え型タキサイチンの C 末端にアミド基がないことに起因して生じたものと考えられた。このことは、アミド化されたタキサイチンの C

末端が細菌に対する抗菌活性に不可欠であることを示している。以上の結果から、キチン結合部位の他に、C 末端のアミド基がタキサイチンの抗菌活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	新田	勝利
副査	教授	田中	勲
副査	助教授	渡辺	信久
副査	助教授	出村	誠

学位論文題名

## Structure-function studies on the invertebrate chitin-binding protein tachycitin

(無脊椎動物由来キチン結合タンパク質タキサイチンの構造と機能に関する研究)

タキサイチンは近年、有明海に生息する無脊椎動物カブトガニの血球から単離され、その高度な生体防御機構を支える抗菌タンパク質とみなされている。タキサイチンの生物活性として、(1)細菌および真菌の成長を阻害する機能、(2)細菌を凝集する機能、(3)キチンに特異的に結合する機能が知られているが、その機能発現のメカニズムは明らかではない。一方、タキサイチンは無脊椎動物由来キチン結合タンパク質に存在するキチン結合ドメインとアミノ酸配列の相同性を示している。このことからタキサイチンはキチン結合ドメインを1つ有すると考えられるが、無脊椎動物由来キチン結合タンパク質ファミリーに属するタンパク質の立体構造解析およびキチン結合部位の同定はまだ行われていないため、タキサイチンのキチン結合機能に関する詳細は明らかでない。本研究は、タキサイチンの立体構造と機能を分子レベルで解明する目的で行われた。

学位論文は、2章から構成されている。第1章では、タキサイチンの水溶液中での立体構造を決定し、キチン結合部位について考察を行っている。申請者はまず、カブトガニの血液から精製したタキサイチンを用いて各種二次元NMRの測定を行い、シグナルが観測された72残基について<sup>1</sup>H-NMRシグナルの帰属を全て終了させた。この帰属結果に基づいて、化学シフトの二次構造依存性とスピン結合定数を用いた解析および、βシートに特徴的なNOEの観測を行い、3本鎖逆平行βシートと2本鎖逆平行βシートの存在を明らかにした。次に、NMR測定で得られた情報と5個のジスルフィド結合情報を束縛条件として分子動力学計算を行ない、ポテンシャルエネルギーが十分に小さく、収束の良い25個の水溶液構造の算出に成功した。この結果、タキサイチンの

立体構造は、N末端側の3本鎖逆平行 $\beta$ シートと、C末端側の2本鎖逆平行 $\beta$ シートおよびそれに続く短い $\alpha$ ヘリックスで構成され、2つの $\beta$ シートによってサンドイッチ様の構造を形成していることが明らかとなった。さらに申請者は、立体構造が既に決定されている植物由来キチン結合タンパク質（ヘベイン）との立体構造の比較を行い、タキサイチンのCys40-Gly60までの部分構造が植物由来キチン結合タンパク質のキチン結合部位周辺の構造と大きさや配向の点で類似していることを見出した。タキサイチンとヘベインの立体構造の重ね合わせおよび、立体構造に基づいたアミノ酸配列のアラインメントを行い、タキサイチンのキチン結合部位がAsn47、Tyr49、Val52を含む領域に存在していると推察した。これらの結果から、無脊椎動物由来キチン結合タンパク質は、植物由来キチン結合タンパク質と共通するキチン結合モチーフを有することが明らかとなり、1999年に提案された「無脊椎動物由来および植物由来キチン結合タンパク質は収斂進化の関係にある」という仮説を検証するための重要な知見を与えた。

第2章では、組換え型タキサイチンの大量発現系を構築し、タキサイチンの真菌および細菌に対する抗菌活性について考察している。組換え型タキサイチンがカブトガニの血液から精製された天然型タキサイチンと異なる点は、C末端のスレオニン残基がアミド化されていない点である。申請者はまず、大腸菌の不溶性顆粒からの巻き戻し条件を最適化し、組換え型タキサイチンの精製法を確立した。組換え型タキサイチンが正しいフォールドに巻き戻されたことの確認は、組換え型および天然型タキサイチンのNMRスペクトルの化学シフト値の比較によってなされた。次に抗菌活性測定によって、組換え型タキサイチンは真菌に対する抗菌活性を保持しているが、細菌に対しては抗菌活性を失うことを見出した。組換え型および天然型タキサイチンのNMR測定結果で、両者は同一の立体構造を形成していることが示されたことから、この抗菌活性の違いは組換え型タキサイチンのC末端にアミド基がないことに起因して生じたものと推論した。申請者は、以上の結果に基づき、キチン結合部位の他に、アミド化されたC末端がタキサイチンの抗菌活性に重要な役割を果たしていることと結論している。

学位論文の公開発表の質疑応答では、申請者は自らの経験や過去の論文の内容を引用することによって、質問に対して的確に回答した。

以上のように申請者は、新規の抗菌タンパク質の立体構造を決定し、その構造と機能の相関に関する重要な知見を示した。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認定した。