

タンパク質構造生物学研究室 Laboratory of Protein Structural Biology

教授 津下英明 Prof. Hideaki Tsuge, Ph.D

助教 吉田徹 Assist. Prof. Toru Yoshida, Ph.D

1. 研究概要

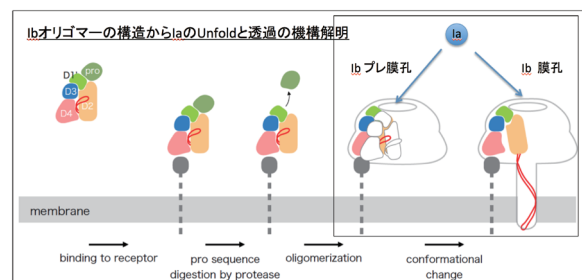
タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要不可欠なものとなりつつある。我々はX線結晶構造解析を主要な手段として、タンパク質複合体、特に感染症因子とホストであるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治療する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。ADP リボシル化毒素とその標的分子複合体の構造生物学：様々な病原微生物はADP リボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。この反応特異性とその反応機構の詳細を明らかにすべく、様々なADP リボシル化毒素(酵素)とその基質複合体での結晶構造解析を進めている。

2. 本年度の研究成果

(1) *C.perfringens* が持つ binary 毒素を研究の対象に、(A) binary 毒素の A サブユニット Ia の基質アクチンの認識機構と部位特異的 Arg のADP リボシル化機構の解明 (Tsuge et al.PNAS 2008,Tsurumura et al.PNAS 2013) と (B) 膜孔形成毒素 Ib を介した Ia の膜透過の仕組みの解明を目的として研究を進めている。

(A) 近年日本で起きた食中毒で、ウェルシュ菌のエンテロトキシン (CPE)欠損株の関与が疑われ、新規の食中毒毒素が見出された。この毒素は*Clostridium perfringens* iota-like toxin (CPILE)と命名された。CPILEはCPILE-a, CPILE-bの2つのコンポーネントからなるbinary毒素である。ウェルシュ菌のIota毒素(Ia,Ib)との相同性は50%程度であるが、その毒性に違いがあることが報告された。Iota毒素ではIaはアクチン特異的なADPリボシル化毒素、一方Ibは細胞膜上でオリゴマーを作り、Iaを透過するトランスポーターと考えられている。昨年、我々は、食中毒毒素の作用機構解明のためCPILE-aの構造機能解析を行い、本年論文として報告した (PLoS ONE 2017)。さらに現在、構造が未知の膜孔形成のCPILE-aの透過装置CPILE-bの構造と機能の研究を進めており、その発現精製を行い、オリゴマーの形成を見ている (1-Bも参照)。

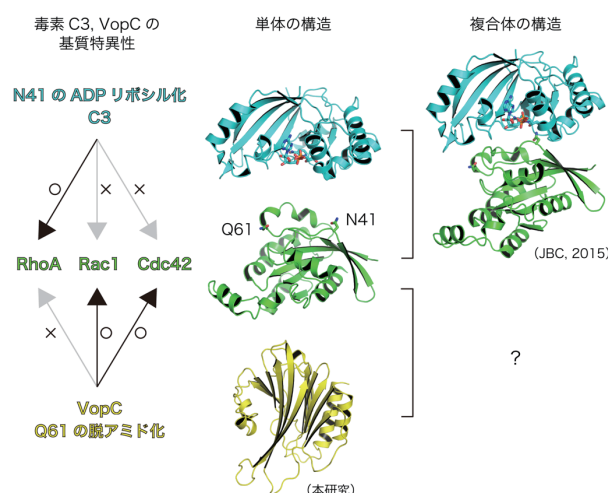
(B) Ia がアクチンのADP リボシル化毒性を発揮するためにはIb が①水溶性プレ膜孔オリゴマーを形成、次に細胞膜上で構造変化をおこし②Ib オリゴマーからなる膜孔を形成、③これにIa が結合し、Ia の立体構造がほどけて、④Ia がIb オリゴマー膜孔を通過する、この4つのステップが必要となる (下図)。最初の構造解析の目的は、500KDaのオリゴマーを作るプレ膜孔および膜孔の構造を明らかにすることである。Ib は20KDaのプロ配列(pro)と75KDaの4つのドメインからなるボディ(Ib)からなる。大腸菌で発現させたGST-pro-Ibをトリプシン、キモトリプシンで処理し、GSTとproを切断、ゲルろ過でオリゴマーフラクションを取り、負染色電子顕微鏡画像およびクライオ電子顕微鏡データを取得した。さらにcryo EMを用いた単粒子解析をおこなった。現在その解析の継続と、サンプル調整を変えることで、より良い分解能のデータを取得できないかを検討を加えている。



(2) 腸炎ビブリオは主に海水中に生息する細菌であり、本菌で汚染された魚介類を生食することで、ヒトに感染して腸炎ビブリオ食中毒を発症させる。エフェクターVopC はtypeIIIの分泌装置を介して分泌され、Rho GTPaseであるCdc42のGlnを脱アミド化することで、宿主細胞に影響し、感染しやすくする場を作っていると考えられる。食中毒原因菌の毒素の作用機作を明らかにするためVopCの結晶構造解析を行った。既にVopCと似た毒素である大腸菌のCnf1の構造は明らかになっているが、その基質特異性は異なり、Cnf1ではRhoA特異的である。これらの脱アミド化毒素のRho GTPaseの認識機構と反応機構は、基質タンパク質との複合体の構造が明らかでないためによくわ

かっていない。我々は単体の結晶構造だけでなく、Cdc42複合体での構造解析と、認識機構を知るための基質変異体を用いた機能解析を進めている。本年度の研究により、その単体の構造が明らかになった。現在、その機能解析を進めている。

(3) 細菌による monoADP リボシル化は様々なタンパク質を標的に修飾を行うことが知られていた。しかしながら、近年 DNA を標的とした ADP リボシル化も起こることが知られ、脚光を浴びている。特にヒトの DNA 修復に関わる PARP (ポリ ADP リボシル化酵素) もそのタンパク質を標的とした基質と基質認識機構はわからないことが多かった。しかし、本年 PARP が DNA を基質とすることが複数のグループから報告された。最初に見つけられた DNA を標的とした ADP リボシル化はモンシロチョウに存在するピエリシンである。国立がん研究所の杉村等によって見つかったが、そのホモログが細菌にも存在し、DNA、特にそのグアニンを特異的に ADP リボシル化することがわかってきた。我々のグループでは DNA を標的として ADP リボシル化する酵素の構造と機能解析を進めており、その構造から重要なデータを得ており、論文での発表を進めている。



3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our target is macromolecular complex and we would like to reveal the interaction between the infectious factor protein and human protein. These basic researches were expected to find a novel drug in infectious disease.

(1) Binary Toxin

(A) Unusual outbreaks of food poisoning in Japan were reported in which *Clostridium perfringens* was strongly suspected to be the cause based on epidemiological information and fingerprinting of isolates. The isolated strains lack the typical *C. perfringens* enterotoxin (CPE) but secrete a new enterotoxin consisting of two components: *C. perfringens* iota-like enterotoxin-a (CPILa), which acts as an enzymatic ADP-ribosyltransferase, and CPILb, a membrane binding component. Here we present the crystal structures of apo-CPILa, NAD⁺-CPILa and NADH-CPILa. Though CPILa structure has high similarity with known iota toxin-a (Ia) with NAD⁺, it possesses two extra-long protruding loops from G262-S269 and E402-K408 that are distinct from Ia. These results were published in this year with functional studies (PLoS ONE, 2017). We also try to reveal the structure of CPILb.

(B) Iota-toxin from *C. perfringens* type E is a binary toxin composed of an enzymatic component (Ia) and a pore-forming protein translocon (Ib). Ia is an ADP-ribosylating toxin that ADP-ribosylates actin. ADP-ribosylation of G-actin at arginine 177 causes the depolymerization of the actin cytoskeleton and finally leads lethal and dermonecrotic in mammal cells. On the other hand, Ib of binary toxin is important machinery for protein translocation: Ia translates over the membrane to the cytosol via Ib as pore-forming translocon. First we would like to reveal the structure of pre-pore and pore of Ib using cryoEM and crystallography. Our final purpose is to understand the mechanism of Ia translation via Ib.

(2) Effector of *V. parahaemolyticus*

Vivrio parahaemolyticus is a Gram-negative marine bacterium that causes acute gastroenteritis in humans. The virulence is dependent of a type III secretion system and VopC is one effector which is homologue of

the catalytic domain of cytotoxic necrotizing factor (CNF). VopC was reported to deamidate Rac1 and Cdc42 but not RhoA. To understand the mechanism of recognition of Rho GTPase and ADP-ribosylation, we are going to solve the structure of VopC together with biochemical studies.

(3) DNA-targeting ADP-ribosyltransferase

Traditionally, ADP-ribosylation has been considered a protein modification. However, emerging evidence suggests that DNA ADP-ribosylation is also common. The first DNA-targeting ART was found in Pierid butterflies and was thus named as pierisin. To date, six pierisins (pierisin-1, -1b, and -2~5), ScARP, and Scabin are considered to belong to the pierisin family. We try to unravel the structure of ScARP to know the mechanism of DNA recognition and guanine ADP-ribosylation.

4. 論文著書など

Suzuki Y., Tsuge H., Hondoh H., Kato Y., Uehara Y., Maita N., Hosokawa K., Ueta S. Precipitant-free lysozyme crystals grown by centrifugal concentration reveal structural changes. *Crystal Growth and Design* (2018) *in press*

Kobayashi H, Otsubo T, Teraoka F, Ikeda K, Seike S, Takahashi E, Okamoto K, Yoshida T, Tsuge H, Yamanaka H. Involvement of the Arg566 residue of *Aeromonas sobria* serine protease in substrate specificity. *PLoS One*. 12(10): e0186392. (2017)

Toniti W, Yoshida T, Tsurumura T, Irikura D, Monma C, Kamata Y, Tsuge H. Crystal structure and structure-based mutagenesis of actin-specific ADP-ribosylating toxin CPILe-a as novel enterotoxin. *PLoS One*. 12(2): e0171278. (2017)

5. 学会発表など

津下英明: ウェルシュ菌の食中毒に関わる新規 ADP リボシル化毒素 CPILe : Iota 毒素との比較、第 447 回ビタミン B 研究協議会、大阪大学中之島センター (大阪)、2017.3.4

Toru Yoshida, Hidetomo Kobayashi, Hiroyasu Yamanaka, Hideaki Tsuge: Structure determination of *Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin by X-ray crystallography. ETOX18, Institut Pasteur (Paris), 2017.06.27

Waraphan Toniti, Toru Yoshida, Toshiharu Tsurumura, Daisuke Irikura, Chie Monma, Youichi Kamata, Hideaki Tsuge: Crystal structure and structure-based mutagenesis of actin-specific ADP-ribosylating toxin CPILe-a as novel enterotoxin ETOX18, Institut Pasteur (Paris), 2017.06.27

津下英明: ヒト ADP リボシル化酵素 (PARP) と細菌モノ ADP リボシル化毒素との構造と機能の比較、第 450 回ビタミン B 研究協議会、京都大学友会館 (京都)、2017.10.28

6. その他特記事項

(1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究 (C)

課題名「ADP リボシル化毒素 C3 の RhoGTPase 認識機構の解明」研究代表者: 津下英明, 取得年度: H27-H29 年 (3 年)

科学研究費補助金・若手研究 (B)

課題名「モノ ADP リボシル化毒素に不可欠な 2 種類の特異性を理解する」研究代表者: 吉田徹, 取得年度: H29-H31 年 (3 年)

(2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

Journal of Crystallography (Hindawi) Editorial board

Advances in Biology (Hindawi) Editorial board
日本学術振興会 回折構造生物第 169 委員会 委員
ビタミン B 研究委員会 委員
日本生化学会 評議員

