

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 Assit. Prof. Toru Yoshida, Ph.D

1. 研究概要

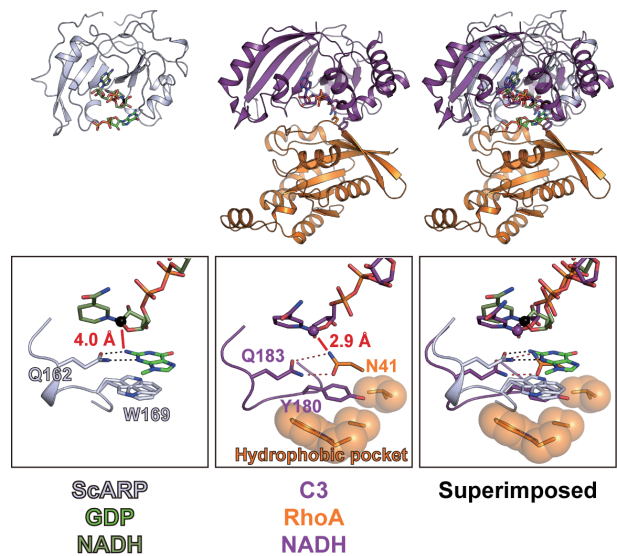
タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要不可欠なものとなりつつある。タンパク質複合体、特に感染症因子とホストであるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治療する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を主要な手段として用いる。

(1) 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) 細菌トランスロコンの構造と輸送機構の解明：*C.perfringens* が持つバイナリー毒素は上述したアクチンを ADP リボシル化する Ia とこれを膜内へ輸送するトランスロコン Ib からなる。トランスロコン Ib の構造と機能に焦点を当てた研究を進めている。

2. 本年度の研究成果

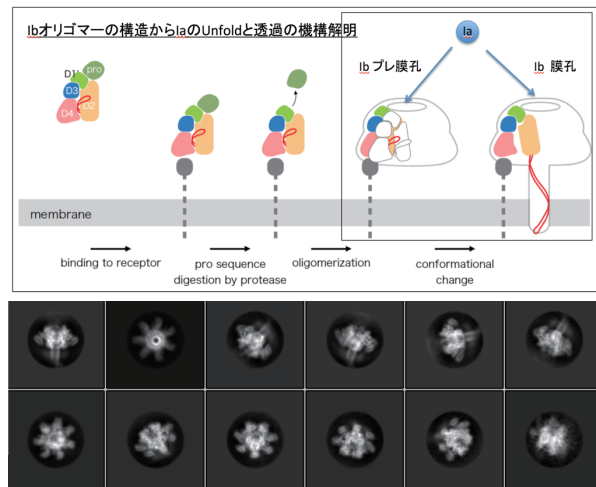
(1) モンシロチョウに存在する酵素ピエリシンは DNA を ADP リボシル化する酵素として、国立がんセンター杉村らによって見出された。ピエリシンは、種々のがん細胞に対して細胞傷害活性を示すことから研究が進められてきた。我々のグループでは、タンパク質を標的とした細菌由来の ADP リボシル化毒素の構造と機能を、特に基質タンパク質との複合体から明らかにする研究を長年行っている。その基質認識についてさらなる理解を進めるために、DNA を ADP リボシル化する酵素の構造と機能に興味をもち研究を行った。放線菌にもこれに似た酵素 ScARP が存在する。ピエリシンと ScARP の違いは、ピエリシンは二重らせんの DNA を好んで認識し、ScARP は低分子のグアニンに対して特異性を示すことであった。このグアニン特異性について知りたいたと考え、ScARP と GDP の共結晶化を行いその構造を明らかにした。得られた構造を、既に我々が構造を明らかにしている、RhoA の Asn を ADP リボシル化する C3 毒素と対比した。どちらも酵素の ARTT ループ上の Gln(Q) が ScARP ではグアニンを、もう一方の C3 では Asn の認識を行っていた。その基質認識機構は、ARTT と NAD⁺ と基質の相対配置は、基質が塩基とアミノ酸と別のものでありながら、驚くほど似ている（図参照）。普遍的な ADP リボシル化の基質の認識機構を明らかにした。



(2) *C.perfringens* が持つ binary 毒素である、膜孔形成毒素 Ib の構造と機能解析を進めている。膜孔形成毒素 Ib はアクチン特異的 ADP リボシル化する酵素 Ia を膜透過させるトランスロコンである。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。

(3) 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typell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。その単体の構造が得られ、その結果を、生化学にフィードバックして研究を進めている。



Ib-oligomer 単粒子解析 2D クラス画像

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) ScARP is a member of the pierisin family of DNA-targeting ADP-ribosyltransferases (ARTs). Pierisin group enzymes ADP-ribosylate the N² amino groups of guanine residues in DNA to yield N²-(ADP-ribos-1-yl)-2'-deoxyguanosine. Though the structures of pierisin-1 and Scabin were revealed recently, the mechanism of specific substrate recognition was poorly understood because of a lack of substrate-binding structure. We revealed the structure of ScARP bound to NADH and GDP (substrate). The structure showed that guanine of GDP was trapped between N-ribose of NADH and Trp159. Interestingly, N² and N³ of guanine form hydrogen bonds with OE1 and NE2 of Gln162, respectively. We present the first direct observation that the ADP-ribosylating toxin turn-turn (ARTT)-loop including Trp159 and Gln162 plays a key role in the specificity of DNA-targeting guanine specific ART as well as protein-targeting ART such as C3 exoenzyme. We propose that the ARTT-loop recognition is a common substrate recognition mechanism in the pierisin family. Furthermore, this complex structure with minimum elements of ADP-ribosylation sheds light on similarities and differences among two major subclasses that are distinguished by conserved structural motifs: H-Y-E in the ARTD subfamily and R-S-E in the ARTC subfamily. The spatial arrangements of electrophile and nucleophile are same, providing the first clear insight of the common reaction mechanism in both ARTs. ARTC (ScARP) uses the ARTT-loop to recognize substrate whereas ARTD (Arr) uses the C-terminal helix instead of the ARTT-loop. These characterizations would facilitate to make better inhibitors of ARTs.

(2) 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 pore-forming translocon.

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 translocation via Ib.

(3) 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.

4. 論文著書など

Yoshida T. and Tsuge H. Substrate N² atom recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting, guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP.

Journal of Biological Chemistry,293(36):13768-13774(2018)

Suzuki Y., Tsuge H., Hondoh H., Kato Y., Uehara Y., Maita N., Hosokawa K., and Ueta S. Precipitant-Free Lysozyme Crystals Grown by Centrifugal Concentration Reveal Structural Changes.

Crystal Growth and Design,18 (8):4226-4229(2018)

5. 学会発表など

Yoshida T, Yamada T, and Tsuge H Membrane transport and ADP-ribosylation mechanism of binary toxin *C. perfringens* iota toxin , International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” , 比叡山延暦寺会館 (京都),2018.8.26-29. (口頭発表)

Yoshida T, and Tsuge H Substrate recognition and reaction mechanism of DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase, International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” , 比叡山延暦寺会館 (京都),2018.8.26-29.

Yamada T, Yoshida T, and Tsuge H Cryo-EM single particle analysis of *C. perfringens* binary toxin, International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” , 比叡山延暦寺会館 (京都),2018.8.26-29.

津下英明: DNAを標的としたADPリボシル化酵素の基質認識機構,第453回ビタミンB 研究協議会、オークラホテル高松 (香川,2018.8.31

津下英明 : From Protein to DNA Modification: Substrate recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP, 日本分子生物学会 ワークショップ ADP-ribosylation in intra- & extracellular communication and diseases,パシフィコ横浜,2018.12.3-6 (口頭発表)

津下英明: Clostridium Binary Toxin : 膜孔形成タンパク質トロンソロコンの作用機構について,京都薬科大学,2018.2.25

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「クライオ電子顕微鏡と X 線結晶構造解析による二成分毒素トロンソロコンの構造機能解析」研究代表者：津下英明, 取得年度：H30-H32 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

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

