

感染症分子研究センター 研究報告

津 下 英 明

京都産業大学 感染症分子研究センター

要 旨

感染症分子研究センターは、疫学研究に病原分子研究を加えた組織である。センターの構成は下記の5つの部門からなる。令和元年度の研究の成果を報告する。

第1部門 鳥インフルエンザ研究部門	高桑 藪田
第2部門 人獣共通感染症研究部門	西野 前田
第3部門 節足動物媒介感染症研究部門	前田 染谷
第4部門 感染症制御研究部門	横山
第5部門 感染症分子研究部門	津下 藪田

キーワード：鳥インフルエンザ、人獣共通感染症、節足動物媒介感染症、感染症制御、感染症分子

はじめに

鳥インフルエンザ研究センターは、他に類を見ない鳥インフルエンザ専門の特化型の研究機関として、平成18年10月の開設以来、社会に向けて研究成果を発信し社会の負託に応えてきた。特に産官学連携においては、国内外の研究機関との共同研究、受託研究等を通して抗菌性、抗ウイルス性の素材や材料等を開発し、鳥インフルエンザウイルスの感染を未然に防ぐことで社会に貢献をしてきた。鳥インフルエンザ研究センターで重ねてきた研究実績・成果をさらに発展させて、学术界・産業界・地域社会に向けさらには世界へとより一層の貢献を果たしていくために、平成30年度から鳥インフルエンザ研究センターを発展的に解消して、感染症分子研究センターが設置された。感染症分子研究センターの主な設置目的は、下記のとおりである。

(1) 鳥インフルエンザウイルスから研究対象を拡大して、広く“感染症”に関する寄生虫、細菌、真菌、ウイルス等の病原体を扱うことで、より広範な研究成果を生み出して社会に貢献していく。(2) 感染症分子の研究を通して、予防と治療法開発につながる基礎研究を進めていく。(3) 研究対象を拡大することにより、より積極的に産業界や他研究機関との共同研究・受

託研究等を推進することで、社会の負託に応えていく。(4) さまざまな感染症に係る正しい知識・予防法などの啓発活動を通して、感染症の拡大を防ぎ、地域社会への貢献を果たしていく。

第1部門 鳥インフルエンザ研究部門 高桑 藪田

1. 研究概要

A型インフルエンザウイルスは水禽類、家禽類などの鳥類、ヒト、ブタ、ウマなどの哺乳類等の多様な宿主に感染する。全ての亜型は自然宿主である水禽類に由来するが、ヒトを含む哺乳類に感染するウイルスの亜型は限られていた。1997年に香港で発生したH5N1亜型鳥インフルエンザは、ヒトへの感染は報告されなくなったものの、現在もアジアを中心に世界的に流行し、国内の養鶏場において発生を繰り返している。さらにH5N1亜型以外の亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染が確認されている。2013年に発生以降、中国ではH7N9亜型ウイルスにより、少なくとも600名以上が死亡している。また、ヒトに感染性を示す鳥インフルエンザウイルスの亜型が、多数出現してきている。そこで、国内や高病原性鳥インフルエンザの常在国であるベトナムの野鳥が保有している鳥インフルエンザウイルスを調査し、ウイルスの伝播における野鳥の役割を解明する。また、鳥インフルエンザウイルスが哺乳類での増殖性の獲得に関与するウイルスの変異を探索し、今後、出現し得るパンデミックウイルスの予測を目指す。さらに、野鳥等によって国内に持ち込まれたウイルスの養鶏場等への侵入による被害を抑えるため、防疫等に有効な新たな消毒薬を共同研究等による開発を目指す。

2. 本年度の研究成果

(1) 国内に飛来する野鳥の鳥インフルエンザウイルスの保有状況を調査するため、山陰地方、琵琶湖周辺、賀茂川に飛来した野鳥から糞便試料を採取し、ウイルス分離を行った。糞便サンプル743から、低病原性のH5N2亜型を含む6株の鳥インフルエンザウイルスを分離した(H5N2亜型ウイルスの分離については環境省と情報共有を行った)。高病原性鳥インフルエンザの国内での発生を未然に防ぐため、今後も野鳥のウイルスを継続して監視する必要がある。ベトナムの野鳥における鳥インフルエンザウイルス汚染状況の把握のため、野鳥から採取した試料からウイルス分離したH5N1、H5N6亜型ウイルスについて系統解析を行った。ベトナムの野鳥から分離されたH5N1亜型高病原性ウイルスは、2014年から2015年に中国、ベトナムで流行したウイルスが含まれるクレード2.3.2.1cに属し、以降散発的な発生しか起きておらず、ベトナム国内の野鳥の間で維持されていた可能性があることを示した。H5N6亜型高病原性ウイルスは中国で発生し、ベトナム国内でも発生が報告されたウイルスを含むクレード2.3.3.4に属し、ベトナム国内に野鳥によって持ち込まれた可能性があることを示した。このことは、ベトナム国内および近隣諸国への高病原性鳥インフルエンザウイルスの伝播に野鳥が重要な役割を果たしていると考えられた。

(2) 近年、多数の亜型の鳥インフルエンザウイルス株がヒトに感染することが明らかとなって

いる。ヒトに感染性を示す鳥インフルエンザウイルス株の多くは、ウイルス内部タンパク質遺伝子が H9N2 亜型ウイルスに由来することが示されている。野鳥から分離される鳥インフルエンザウイルスの哺乳類への伝播、感染リスクを評価するため、H9N2 亜型のプロトタイプ株と近年にベトナムの野鳥から分離された H9N2 亜型株を用いて、マウスへのウイルス接種実験を行った。その結果、プロトタイプ株はマウスでの継代ができなかったのに対し、近年の野鳥分離株はマウスで継代が可能であった。さらに、ウイルスが継代によりマウスに適応し、増殖性と病原性が高まった。マウス継代による高い病原性の獲得に、PB2 の 627 番目のアミノ酸以外の変異が関与することが強く示唆され、感染性及び適応性に関わる新たな変異部位が同定された。以上より、近年の野鳥から分離された株は、哺乳類に対しての感染性及び適応性が、高いことが示唆された。

(3) 継続して実施している化研（株）、京都府との共同研究により、ヨード活性炭の不活化効果は、持続性が高いことが明らかとなっている。そこで、現在、鳥インフルエンザの防疫のため養鶏場の周囲に散布されている消石灰と、鳥インフルエンザウイルスに対する効果の持続性について比較検討し、ヨード活性炭は、環境要因に左右されず、不活化効果の持続性が高いことが示された。今後、消石灰に換わる鳥インフルエンザの予防的散布剤として、製品化に向けてさらに改良した素材の開発を行っている。

論文・著書

藪田淑予，大槻公一，高桑弘樹，小松弘樹：優れた殺菌効果をもつオルトジクロロベンゼン・クレゾール複合製剤の抗鳥インフルエンザウイルス活性，日本獣医師会雑誌，72(4): 205-209. doi: 10.12935/jvma.72.205 (2020)

学会発表

なし

その他

なし

第2部門 人獣共通感染症研究部門 西野 前田

1. 研究概要

ヒトと動物の双方に感染する病原体により引き起こされる人獣共通感染症は、ヒトに重篤な疾患を引き起こすとともに、家畜を含む多くの動物種に重大な疾患を引き起こす。本研究部門では、ヒト、家畜、野生動物および愛玩動物に持続的に感染し、神経疾患を引き起こすボルナウイルス（BoDV）の研究を行っている。BoDVは、血清疫学調査において、動物では約20%、ヒトでは献血者において数%から抗体が検出されており、特に動物では予想以上に広がっている。感染動物の多くが不顕性感染をしているが、運動障害、行動学的異常、味覚障害などを発症する場合があります、重篤な場合は致死性である。そのため、感染動物の発症機序を明らかにすることは動物とヒトにおける本疾病を予防するうえで重要な課題である。

一方、日本脳炎ウイルス（JEV）やデングウイルス（DENV）、ウエストナイルウイルス（WNV）等が引き起こすフラビウイルス感染症では、ウイルスの抗原性が似ているため、感染の鑑別が困難であり、その方法論の開発が急務である。そこで、本研究ではウイルスの中空ウイルス粒子（SvPs、ウイルスの殻の中にゲノムRNAを含まない）やウイルス様粒子（VLP、一度だけ感染するレポーター発現粒子）を用いた、安全で信頼性の高いフラビウイルス感染鑑別法の開発を目指している。また、ウイルスの感染に重要であると考えられているエンベロープ蛋白質（E）蛋白質のドメインIIIを標的とする、抗ウイルス薬の開発を目指している。

2. 本年度の研究成果

(1) ボルナ病ウイルス感染初代培養グリア細胞における遺伝子発現の違いを調べるためにマイクロアレイ解析を行った。今年度、その結果をもとに変動のあった遺伝子群を解析する。ボルナ病ウイルス感染後の発病メカニズムを探るために、ウイルス感染後期のマウスに副腎皮質ホルモン（CORT）を放出する錠剤を埋め込み、病態の変化を解析した。その結果、CORT処置により体重や肉眼的臨床症状、脳内のウイルス量は明らかな変化が認められなかったが、CORTの影響が消失する時期において行動学的異常や脳炎の増悪化が認められ、ストレス負荷が病態悪化の原因になる可能性が示唆された。

(2) フラビウイルスに属するJEV、WNVおよびデングウイルス1型（DENV1）のE蛋白質のドメインIII（EDIII）領域を有し、他のE蛋白質DIおよびDII領域はWNVに由来するキメラE蛋白質の発現プラスミドをヒトの腎臓細胞に由来する293T細胞に導入した。細胞内では目的蛋白質の産生が確認された。一方、細胞外へのVLPの放出はJEVとWNVのキメラVLPは効果的であったが、DENV1キメラVLPでは検出限界以下であった。現在、各キメラVLP発現細胞蛋白質を用いたフラビウイルス感染鑑別法について検討している。

論文・著書

なし

学会発表

西野佳以：ボルナウイルス感染におけるストレスの影響．第4回小動物ウイルス病研究会学術集会（高槻市）2019.8.25 【招待講演】

立花 蓮，深田彩人，窪田裕樹，木村享史，西野佳以：Effects of pre-administration of corticosterone on Borna disease virus infection. 第67回日本ウイルス学会（東京都）2019.10.29-31

深田彩人，河北尚輝，北村眞穂，木戸脇恵理，山田泰唯，立花 蓮，窪田裕樹，齋藤敏之，西野佳以：Corticosterone induces behavioral abnormality in the mice acute infected with mammalian 1 borna virus. 第67回日本ウイルス学会（東京都）2019.10.29-31

その他

なし

第3部門 節足動物媒介感染症研究部門 前田 染谷

1. 研究概要

ヒトと動物の双方に感染する病原体により引き起こされる人獣共通感染症は、ヒトに重篤な疾患を引き起こしたり、家畜に重大な損害を与えることがある。これらの病原体は、しばしば節足動物に媒介される。野生動物やそれに寄生している節足動物は、これらの病原体の伝播に大きな役割を果たしていると考えられる。また、重症血小板減少症候群などの発生により明らかになったように、野生動物に寄生する節足動物は、これまで知られていない病原体を保有している可能性もある。一方、近年、野生動物が生息域を拡大し、市街地に侵入して家屋や農作物を荒らすなどの問題が顕在化している。このことは、野生動物やその外部寄生虫とヒトとの接触機会が増加しつつあり、市街地における節足動物媒介性感染症の発生を誘発する可能性を示唆している。そこで、本研究では、市街地やその近辺に生息する野生動物を捕獲し、外部寄生虫の採取および血液や臓器の採取を行い、野生動物の既知および未知の病原体の保有状況を調査する。

2. 本年度の研究成果

(1) 節足動物媒介性細菌感染症のひとつに、リケッチア感染症がある。リケッチアは偏性細胞内寄生性の細菌のため、マダニなどの節足動物に寄生している。ヒトにはマダニの刺咬などにより感染し、日本紅斑熱などの疾患を引き起こす。また、バルトネラはノミの媒介により哺乳動物に感染し、ヒトにおいてはネコひっかき病などの感染症を引き起こす。過年度に引き続き、これらの細菌の生態を明らかにするため、野生動物の生息状況調査および節足動物の生息状況調査を継続して実施した。また、採集した野生動物の血液および外部寄生虫から、病原体の分離を試みたところ、関西野生動物研究所と共同して捕獲したハクビシン3検体から、バルトネラを分離した。現在、この細菌の性状について詳細に解析中である。

(2) 2019年度、京都市で捕獲されたハクビシン56検体から血清を分離し、トゴトウイルス(THOV)の中和試験により中和抗体陽性率を調査したところ、ハクビシン3検体(5.4%)が陽性となった。野生動物における感染状況の調査においては、経年調査、定点調査が必要である。また、調査個体数を増やす目的から、次年度以降も引き続き調査する必要がある。

(3) 2013年に京都市で捕集したフタトゲチマダニから分離したTHOVのヒトや動物における病原性は不明である。そこで、昨年度に引き続きハムスターにおけるTHOVの病原性を確認した。4週齢・雌のシリアンハムスターの腹腔にTHOVを接種した。感染後、継時的に各動物の血液を採取し、血液細胞学および血液化学的解析を行った。血液細胞学的に白血球数の軽

微な増加、ヘマトクリット値の顕著な増加と血小板数の顕著な減少が認められた。さらに、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓などの臓器を摘出し、全 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により炎症性蛋白質遺伝子発現の経時的变化を観察したところ、Th2 優位な変化が起こっていた。これらの結果は、THOV 感染ハムスターにおいては、血管透過性の亢進による血漿の漏出と血管の破綻、免疫系の高度な破綻が起き致死の経過をたどることが示唆している。

論文・著書

なし

学会発表

中塚聖菜, 山形 幸, 吉田彩乃, 原田真緒, 辻本絢香, 好井健太郎, 染谷 梓, 前田秋彦: ハムスターのトゴトウイルス感染に伴う病態発現の解析. 第 54 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (高知) 2019.5.24

辻本絢香, 好井健太郎, 染谷 梓, 前田秋彦: トゴトウイルスのマウスへの馴化. 第 54 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (高知) 2019.5.24

中塚聖菜, 辻本絢香, 好井健太郎, 染谷 梓, 前田秋彦: ハムスターのトゴトウイルス感染に伴う病態発現の解析. 第 162 回日本獣医学会学術集会 (つくば) 2019.9.10-12

辻本絢香, 好井健太郎, 染谷 梓, 前田秋彦: トゴトウイルスのマウスへの馴化. 第 162 回日本獣医学会学術集会 (つくば) 2019.9.10-12

村岡 綾, 有地 蘭, 仲澤 伶, 前田秋彦, 染谷 梓: 京都市におけるマダニのリケッチア保有率および系統学的解析. 第 162 回日本獣医学会学術集会 (つくば市) 2019.9.12

辻本絢香, 好井健太郎, 染谷 梓, 前田秋彦: マウスに馴化したトゴトウイルスは BALB/c マウスに致死性を示す. 第 24 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (東京) 2019.10.23

中塚聖菜, 好井健太郎, 染谷 梓, 前田秋彦: CHO 細胞におけるトゴトウイルス持続感染の解析. 第 24 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (東京) 2019.10.23

辻本絢香, 好井健太郎, 染谷 梓, 前田秋彦: マウスに馴化したトゴトウイルスは BALB/c マウスに致死的病態を示す. 第 67 回日本ウイルス学会 (東京) 2019.10.29-31

中塚聖菜, 好井健太郎, 染谷 梓, 前田秋彦: トゴトウイルスの CHO-K1 細胞における持続感染. 第 67 回日本ウイルス学会 (東京) 2019.10.29-31

金 美来, 村岡 綾, 古賀由希恵, 川道美枝子, 三宅慶一, 前田秋彦, 染谷 梓: 京都市内で捕獲されたハクビシンにおけるバルトネラの分離. 第 63 回日本細菌学総会 (名古屋市) 2020.2.19

その他

なし

第4部門 感染症制御研究部門 横山

1. 研究概要

回転することで、プロトンの移動と ATP の分解もしくは合成をエネルギー共役させるタンパク質は、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) と ATP 合成酵素 F_0F_1 に大別できる。V-ATPase は、ATP を使って小胞内にイオンを輸送し、その酸性化を通して様々な生理現象を担う。たとえば、毒素の活性化や、抗原タンパク質の分解による抗原提示など感染症に関する重要な分子基盤を担っている。一方、 F_0F_1 は、真核生物ではミトコンドリアや葉緑体に存在し、また結核菌などのバクテリアの細胞膜にも存在する。V-ATPase や F_0F_1 の分子機構を明らかにし、それらを標的とした分子創薬につなげるには、原子分解能レベルの全体構造を解明する必要があるが、その有望な手段がクライオ電子顕微鏡による構造解析である。クライオ電子顕微鏡は、今や構造生物学の主流となり、結晶化が困難で構造解析できない膜タンパク質などの構造を、時には原子分解能近くの精度で見ることを可能にする有力な手法になった。我々は、この技術をいち早くとりいれ、世界に先駆けて V 型 ATP 合成酵素の回転に伴う構造変化を明らかにした。また、結核菌の F_0F_1 は、抗結核薬の有望な標的分子であり、多剤耐性症化した結核感染症に対する薬剤の創出につながるものが期待される。感染症の分子基盤の重要な部分を担う V-ATPase の構造機能の解明、および抗結核剤の創出につながる結核菌 F_0F_1 の構造決定をする目的として研究を進めている。

2. 本年度の研究成果

本年度も、引き続き単粒子解析による V-ATPase の構造解析を行い、分解の改善を目指した。分解能を向上させるために、ナノディスクで可溶化した V-ATPase の電子顕微鏡による撮影と構造解析を進めた。ナノディスクは、膜タンパク質の疎水性部分に円盤状の脂質領域を作り出し、膜タンパク質を水溶液中に分散させる方法である。界面活性剤がないので、ミセルによる S/N 比の低下や、表面張力の低下による氷厚調整の難しさを回避することができる。加えて、より性能の良い電子直接検出カメラによる電子顕微鏡画像の撮影も行った。前年度まで撮影に使用したカメラ (Falcon II) は、撮影速度が遅く、一日あたりの撮影枚数が 200 枚程度であり、分解能を上げるために必要な大量の単粒子画像を得るのは困難であった。また、電子を直接カウンティングして画像の質を上げる機能もなく、分解能を上げるのに必要な量子効率も高くない。そこで、これらの弱点を克服できる K3 というカメラを備えた電子顕微鏡で撮影を行った。K3 の撮影速度は、Falcon II の 10 倍以上で、一晩で数千枚の撮影が可能である。また、電子カウンティングが可能で、画像のシグナルノイズ比を格段に向上させることができる。今回、大阪大学の電顕サイトで V-ATPase の凍結グリッドを作成し、東京大学にある電顕サイトに凍結グリッドを持ち込み撮影し、そのデータを本学で解析した。約 1 万枚の電子顕微鏡画像か

ら、400 万個以上の V-ATPase の単粒子画像を抽出し、画像解析ソフト RELION で解析した。クラス分け後、もっとも粒子数が多いクラスについて解析を進めた。精密化操作後、溶媒の密度を引いた後の構造に関しては、フーリエシエル相関 0.143 で分解能 2.8 Å の構造を得た。これは現在発表されている中でもっとも分解能が良い V-ATPase の構造である。これにより原子モデルを構築することができた。V_o 部分についても解析を進め、3.9 Å 分解能の密度マップを得ることができ、ここから V_o 部分の原子モデルを構築した。

結核菌 F_oF₁ に関しては、構造解析に適した発現・精製系の構築を進めた。結核菌 F_oF₁ の全遺伝子を合成し、発現ベクターに組み込んだ。F_oF₁ を欠失した大腸菌に F_oF₁ を含む発現ベクターを形質転換し、発現の条件検討を行った。試行錯誤の結果、F_oF₁ 由来の ATP 分解活性を膜画分に検出した。この条件で、発現ベクターを含む大腸菌を 10 L 以上培養し、30 g 程度の大腸菌を得た。ここから、his-tag を利用したアフィニティー精製、ゲルろ過精製により、F_oF₁ の純度を上げていき、最終的に 8 割程度の純度の結核菌 F_oF₁ を得ることができた。この標品を、負染色して電子顕微鏡で観察したところ、F_oF₁ と推定される単粒子を観察することができた。次年度は、再現よく精製できるようにした後、電子顕微鏡による撮影、構造解析に着手する予定である。

論文・著書

1. Nakanishi Atsuko, Kishikawa Jun-ichi, Mitsuoka Kaoru, Yokoyama Ken Cryo-EM studies of the rotary H⁺-ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*. (2019) Biophysics and Physicobiology 140-146

学会発表

1. 古田 綾, 岸川淳一, 中西温子, 光岡 薫, 横山 謙 “好熱菌 V/A-ATPase のヌクレオチドフリー構造の解析” 第 45 回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 口頭発表
2. 岸川淳一, 中西温子, 古田 綾, 加藤貴之, 光岡 薫, 横山 謙 “好熱菌 V 型 ATP 合成酵素の膜内在性ドメイン V_o の構造解析” 第 45 回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 口頭発表
3. 三谷奈穂, 中野敦樹, 岸川淳一, 横山 謙 “キメラ軸を持つ V1-ATPase の 1 分子解析” 第 45 回日本生体エネルギー研究会討論会 北九州市 12/2019 ポスター発表
4. 中西温子, 岸川淳一, 玉腰雅忠, 光岡 薫, 横山 謙 “Nanodisc に再構成した好熱菌由来 V-ATPase の単粒子解析” 生理研研究会 岡崎市 11/2019
5. 中西温子, 岸川淳一, 玉腰雅忠, 光岡 薫, 横山 謙 “Single-particle analysis of lipid nanodisc-reconstituted V-ATPase from *Thermus thermophilus*” 第 57 回日本生物物理学会 宮崎市 9/2019

6. 岸川淳一, 加藤貴之, 古田 綾, 中西温子, 光岡 薫, 横山 謙 V 型 ATP 合成酵素の膜内
在性ドメイン Vo の単粒子解析 Single particle analysis of membrane Vo domain of V type
ATP synthase 蛋白質科学会年会 6/2019 神戸ポートアイランド

その他

なし

第5部門 感染症分子研究部門 津下 藪田

1. 研究概要

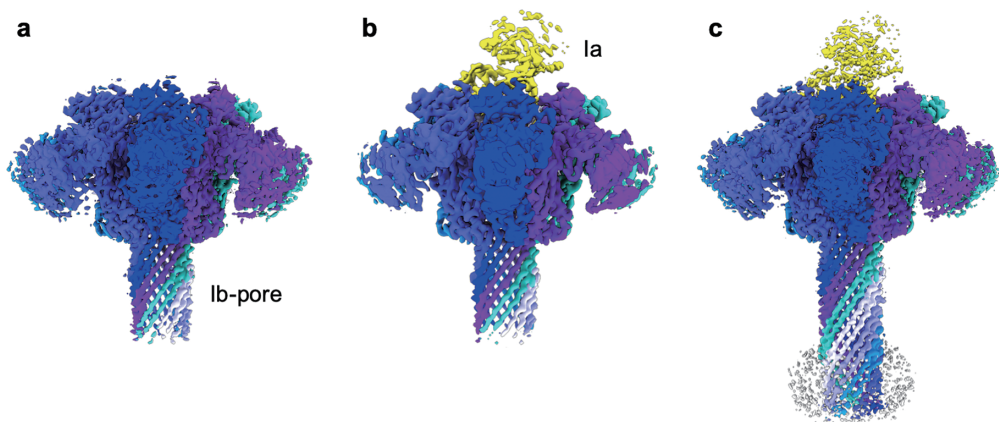
タンパク質の構造は今や生命の基礎理解に必要不可欠なものとなりつつある。タンパク質複合体、特に感染症因子と宿主であるヒトのタンパク質の相互作用を見たいと考えている。この基礎研究から将来的には感染症を予防や治癒する新たな創薬の可能性が生まれる。現在以下の研究テーマを軸として研究を進めている。X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡を主要な手段として用いる。

(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、宿主のタンパク質を修飾し、宿主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装置（トランスロコン）Ibからなる。特にトランスロコン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

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



Ib膜孔とIaが結合したIb膜孔のクライオ電子顕微鏡による密度マップ

形成、③これに Ia が結合し、Ia の立体構造がほどけて、④ Ia 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。最初の構造解析の目的は、500 KDa 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 20 KDa のプロ配列 (pro) と 75 KDa 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。構造解析の結果 Ib 膜孔、Ia-Ib 膜孔の構造をそれぞれ 2.9 Å の分解能で決定することに成功した。Ia-Ib 膜孔複合体は報告されている二成分毒素の酵素-膜孔複合体で唯一、3 Å を切る高分解能の構造となった。Ia-Ib 膜孔の解析から、二成分毒素において初めて、酵素成分が二次構造を失う様子を捉え、膜透過の直前の姿を報告した。この結果は 2020 年 3 月、博士前期課程 2 年山田が First author となり、Nature Structural & Molecular Biology 誌に掲載された。この分野の競争は激しく米国の 2 つグループがデフィシル菌の二成分毒素 CDT の構造を Nature Microbiology および PNAS に報告したが、二成分毒素複合体の構造を高分解能で解析し、酵素成分のアンフォールド機構も明らかにしたのは我々の論文だけである。また、山田は 2019 年 6 月に Swiss Davos で開かれた細菌毒素の国際会議 ETOX19 では 15 分の口頭発表に選ばれ、好評であった。さらに山田と津下は 2019 年 11 月には生理研の発表でトピックスの研究として招待された。

論文・著書

1. Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, Tsuge H. Cryo-EM structures reveal translocational unfolding in the clostridial binary iota toxin complex. **Nat Struct & Mol Biol.** 27(3): 288-296. doi: 10.1038/s41594-020-0388-6. (2020) (査読あり)

学会発表

1. Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, and Tsuge H Cryo-EM structure of clostridial binary toxin translocon Ib-pore”, European Workshops on Bacterial Protein Toxins - ETOX19, Davos (Switzerland), 2019.6.22-26
2. Monma C, Saiki D, Shimojima Y, Suzuki J, Sadamasu K, Yamada T, Tsuge H, Kamata Y “Diarrheagenic activity of each component of CPILE as a new enterotoxin produced by *Clostridium perfringens* isolated from foodborne outbreaks” CLOSPATH 11, Leiden (Netherlands) 2019.8.19-22
3. 山田等仁, 津下英明 “ウェルシュ菌 2 成分毒素 膜孔複合体の単粒子解析” 生理研研究会 クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析～みんなのクライオ電顕～岡崎コンファレンスセンター (愛知), 2019.11.6-26-27 (招待講演)

4. 山田等仁, 吉田 徹, 川本暁大, 光岡 薫, 岩崎憲司, 津下英明 “Cryo-EM structure of clostridial binary toxin translocation channel Ib-pore” 第 57 回日本生物物理学会, シーガイアコンベンションセンター (宮崎), 2019.9.24-26

その他

1. 京都産業大学, 大阪大学, 筑波大学, 大学プレスセンターなど
「細菌毒素タンパク質が膜透過するメカニズムをクライオ電子顕微鏡により解明—英国科学誌「Nature Structural & Molecular Biology」オンライン版に掲載」(津下)
2. Tsuge H., and Yamada T. “Posing just before protein translocation in bacterial binary toxin” *Nature Research Microbiology Blog* (招待) <https://naturemicrobiologycommunity.nature.com/users/352568-hideaki-tsuge>

Performance Reports of Center for Molecular Research in Infectious Diseases

Hideaki TSUGE

Abstract

Center for Molecular Research in Infectious Diseases consists of five groups. Each section is pursuing studies about avian influenza, zoonoses, arthropod-borne infectious disease, infectious disease control, and molecular research in infectious diseases.

This year topic:

The iota toxin produced by *Clostridium perfringens*, is a binary toxin comprising two independent polypeptides: Ia, an ADP-ribosyltransferase, and Ib, which is involved in binding to the cell and translocation of Ia across the cell membrane. In this year, Tsuge *et al.* reported the cryo-EM structure of the translocation channel Ib-pore and its complex with Ia. This study reveals a novel mechanism of N-terminal unfolding that is crucial for protein translocation and provides a structural basis for the inhibitor design. This is summarized as a color figure.

Keywords: avian influenza, zoonoses, arthropod-borne infectious disease, infectious disease control, molecular research in infectious diseases