

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な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。

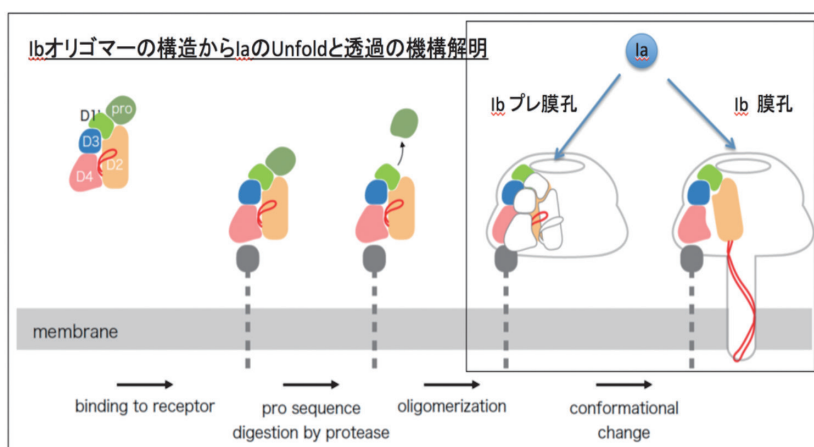
(1) 細菌タンパク質輸送装置の構造と機構の解明：*C.perfringens*が持つ二成分毒素はアクチンをADPリボシル化するIaとこれをエンドサイトーシスを経て細胞内へ輸送する装置Ibからなる。この数年、クライオ電子顕微鏡によりIbの構造と機能に焦点を当てた研究を進めてきた。今年度初めてIb膜孔とIa-Ib膜孔複合体の構造を明らかにした。

(2) 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. 本年度の研究成果

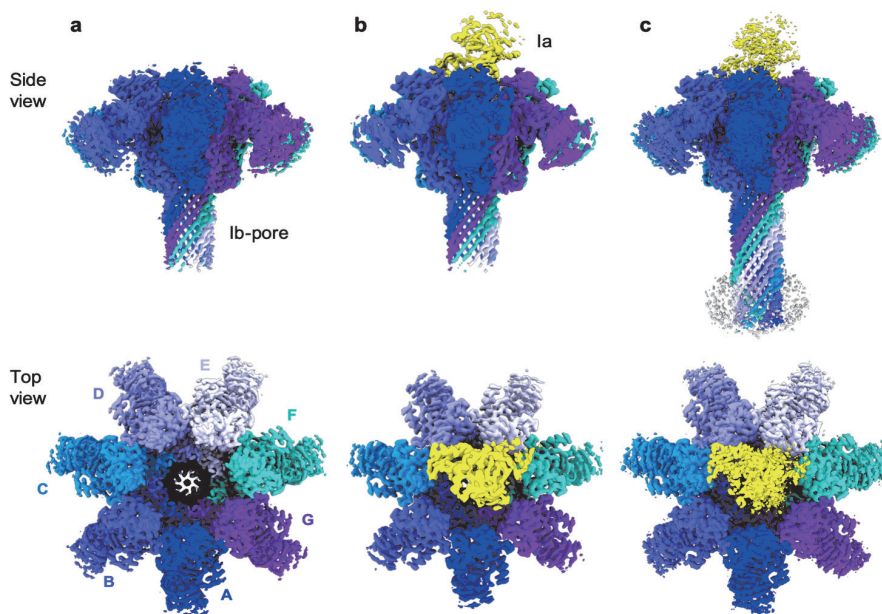
(1) 二成分毒素：Ib膜孔とIa結合Ib膜孔のクライオ電子顕微鏡による構造決定

*C.perfringens*が持つ二成分毒素はアクチンを特異的ADPリボシル化する毒素Iaとこれを細胞内へ輸送する装置Ibからなる。我々は以前より二成分毒素の研究を進めており、Ia単体および基質アクチンとの複合体の構造をX線結晶構造解析で明らかにし、構造と機能の解析を進めてきた。二成分毒素の毒性発現機構を理解するには、Ibの研究が欠かせない。しかし、膜タンパクであることから、サンプル調整と結晶化が難しかった。このためクライオ電子顕微鏡による解析を進めてきた。サンプル精製方法の改良およびグリッドのスクリーニングを進めて、高分解能のデータ収集に成功し、その解析からIb膜孔の高分解能解析に成功した。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。以前の解析から、分解能は悪いが、Ibはプロ配列(pro)を切

断すると、プレ膜孔を経由して、膜孔になることは、わかってきた。プレ膜孔から膜孔への変化は、長いベータバレルを注射針のように突き出し膜に孔をあける。この領域は疎水性のため、サンプル調整の段階で、アグリゲーションを抑える何かしらの手段が必要であった。このため我々はLMNG(Lauryl Maltose Neopentyl Glycol)



(左) Ib膜孔 (中) Ia結合-Ib膜孔 (short stem) (右) Ia結合-Ib膜孔 (long stem)

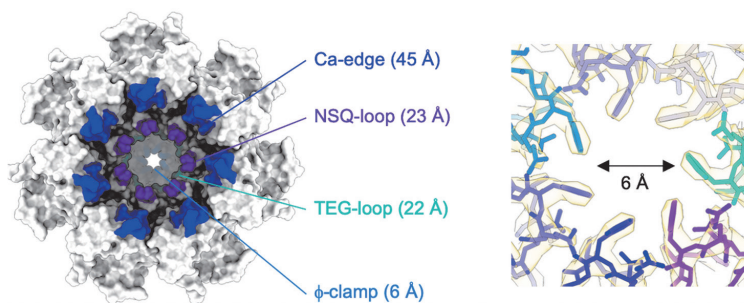
Ia 1分子がIb 7量体からなるIb膜孔に結合する。

完全長のlong stemだけでなく、膜結合への過渡的な中間体である

Ib膜孔 (short stem)の存在が明らかになった。

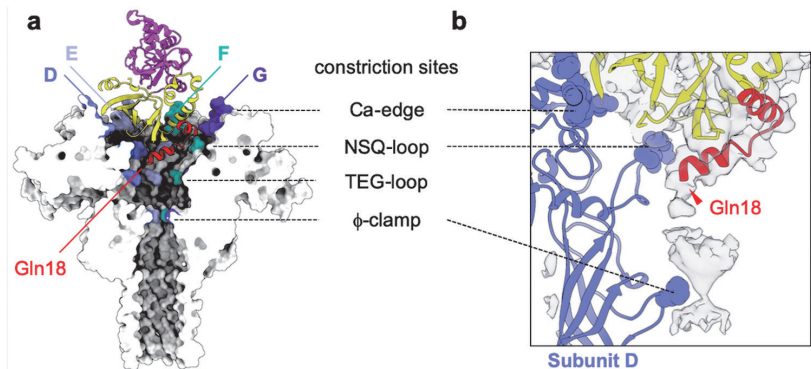
の濃度と精製の過程でいつ加えるかを詳細に検討した。さらにクライオ電子顕微鏡にのせるグリッド作成でも、このLMNGの濃度が高いとノイズとなることから、アグリゲーションを抑えつつ、ノイズとならない最適な濃度を探った。こうして見つかった、最適な条件を用いてサンプル調整とグリッド作成を行い、大阪大学・蛋白質研究所のTitan Kriosを用いて撮影を行い、C7対称性を用いて2.9 Å分解能での構造を得た。Ib膜孔は7量体からなる。さらにIaを通過させるために、これが結合する様子を捉えたいと考え、調整したIb膜孔にIaを加えて、データを収集、C1対称性を用いた解析を行った。クラス分けの段階でベータバレルが完全長のものと、膜挿入部がまだ組み立てられていない短いものを分けることができ、それぞれ解析を行い、2.9 Åと2.8 Å分解能での解析に成功した。この結果から、以下のことがわかってきた

(1) Iaは7量体のIb膜孔の一つに結合する。(2) IaはN末端のドメインで結合し、アクチンADPリボシル化活性を持つC末端ドメインは、その上に位置する。(3) IaのN末端はこの結合により末端の α ヘリックスが一部解ける。(4) このIaのN末端の先は、Ib膜孔の狭窄部位(直径6 Å)である ϕ クランプへと



Ib膜孔は6 Åの狭窄部位を持つ。またIbモノマーのN末端にあるカルシウム結合が安定な構造を作り (Ca-edge)、7量体を形成し、ここにIaが上から載るように結合する。

続いていた。このことから Ia の Ib 膜孔を介しての膜透過は N 末端から解けて行われると考えられる。また (5) プレ膜孔から膜孔へは、ベータバレルが完全でない、短い short stem 型が中間体として存在し、おそらく、これから完全長 (long stem 型) になることで膜への完全挿入がなされる。明らかになっている異なるグループに属する二成分毒素、炭素菌毒素との比較から Ib 膜孔の新規の特徴



Ia は Ib 膜孔に N 末端ドメインを使って結合する。この結合で N 末端の α ヘリックスが解ける。Ib 膜孔は蛋白質のアンフォールドと膜透過を担う装置であることが明らかになった。

的な、タンパク質膜輸送機構を提唱した。これらの結果を、今年 3 月、*Nature Structural & Molecular Biology* 誌へ掲載した (京都産業大学、山田 (M2)、吉田、津下と大阪大学、筑波大学の共同研究)。

(2) クロストリジウム二成分毒素の比較研究

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 (CPIL) と命名された。CPIL は CPIL-a、CPIL-b の 2 つのコンポーネントからなる binary 毒素である。前述のイオタ毒素と比較しながら CPIL-b 膜孔調整と構造解析を始めた。また人で腸炎を起こすディフィシル菌の CDT は二成分毒素であり、この比較研究も始めている。これらクロストリジウム属の二成分毒素の、タンパク質の輸送機構を明らかにする。この研究は阻害剤開発の基礎研究となる。

(3) ADP リボシル化の特異性

我々は ADP リボシル化毒素 (酵素) とその基質タンパク質の複合体の丸ごとの構造解析を進めてきた。特に Ia-アクチン複合体、C3-RhoA 複合体、ScARP-グアニン複合体の研究により、ADP リボシル化はタンパク質のアミノ酸であれ、あるいは DNA の塩基であれ同じような認識機構で、基質を認識して ADP リボシル化するという事を明らかにした。しかしながら、人 PARP (ポリ ADP リボシル化あるいはモノ ADP リボシル化) の認識機構はまだよくわかっていない。この解明のため、構造解析を進めている。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our target is macromolecular complexes, 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.

This year's accomplishments

(1) The iota toxin produced by *Clostridium perfringens* type E, 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. We reported the cryo-EM structures of the

translocation channel Ib-pore and its complex with Ia. The high-resolution Ib-pore structure demonstrates a similar structural framework as observed for the catalytic ϕ -clamp of the anthrax protective antigen pore. However, the Ia-bound Ib-pore structure showed a unique binding mode of Ia. One Ia binds to the Ib-pore, and the Ia N-terminal domain interacts with Ib via two other Ib-pore constriction sites via multiple weak interactions. Furthermore, Ib-binding induces Ia N-terminal α -helix tilting and partial unfolding, whereupon the unfolded N-terminus continues to the ϕ -clamp gate. This study reveals a novel mechanism of N-terminal unfolding that is crucial for protein translocation. The study was reported in *Nat Struct & Mol Biol*.

(2) Recently, 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 binary toxin consisting of two components: *C. perfringens* iota-like enterotoxin-a (CPILe-a), which acts as an actin ADP-ribosyltransferase, and CPILe-b, a membrane-binding and protein-translocation component. We are trying to reveal the structure and functions of CPILe-b compared with Ib-pore.

(3) We are interested in the specificity of ADP-ribosyltransferase (ART). We have revealed the complex structures of Ia-actin, C3-RhoA and ScARP-guanine for the last ten years. From these structures, we understood they all use the ARTT-loop in common. Furthermore, we consider that this is a common substrate recognition mechanism for all ARTs, all protein/amino acid-target and DNA/base-target ARTs. However, it is still an open question of the specificity of human PARPs, which belongs to a different group of ART. Thus, we are trying to reveal the structures of PARP in order to understand the specificity.

4. 論文, 著書など (2019.1~2020.3)

原著論文

Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, Tsuge H.
Translocational unfolding in clostridial binary iota toxin complex.

BioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/721969> (2020)

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) (査読有り)

5. 学会発表など (2019.1~2020.3)

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 (口頭発表:山田)

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

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 (口頭発表:山田)

吉田徹、津下英明: DNA を基質とする ADP リボシル基転移酵素の基質認識機構、酵素補酵素研究会、ホテルアウィーナ大阪 (大阪) , 2019.7.4-5

半田達也、津下英明: 病原菌由来モノ ADP リボシル基転移酵素の基質認識機構に関する研究, 酵素補酵素研究会、ホテルアウィーナ大阪 (大阪), 2019.7.4-5

津下英明: タンパク質膜透過チャンネルの単粒子構造解析, 第453回ビタミンB 研究協議会、パレスサイドホテル (京都) 2019.8.30-31

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

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ランスロコンの構造機能解析 A」研究代表者: 津下英明, 取得年度: H30-H31 年 (2 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 代議員

3) 記事掲載

Nature Research Microbiology Community

Posing just before protein translocation in bacterial binary toxin

Hideaki Tsuge

<https://naturemicrobiologycommunity.nature.com/posts/61288-posing-just-before-protein-translocation-in-bacterial-binary-toxin>

