

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.

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) 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。我々は2020年度にIb膜孔とIa-Ib膜孔複合体の構造を明らかにした。これにより、二成分毒素のタンパク質透過の機構の理解が進んだ。

(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。

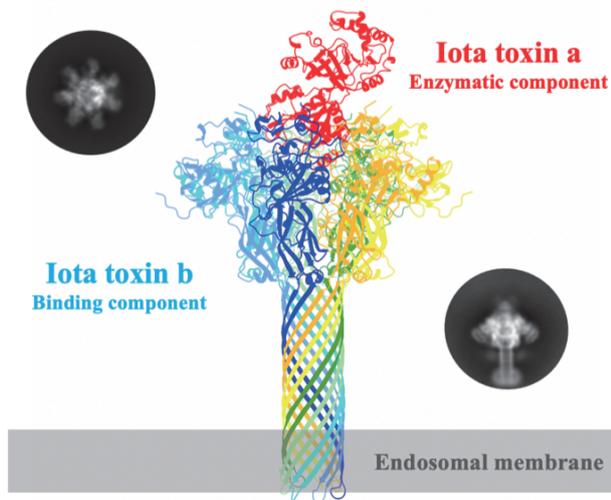
2. 本年度の研究成果

(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。

2020年3月、我々はIb膜孔と、Iaが結合したIb膜孔の構造をクライオ電子顕微鏡を用いた解析で明らかにした。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膜孔に一つ結合する。(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6Å)である ϕ クランプへと続いていた。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膜孔の新規の特徴的な、タンパク質膜輸送機構を提唱した。これらの結果を、2020年3月および2021年に報告した(Nat Struct & Mol Biol. 27(3):288-296. : 京都産業大学、山田(D1)、吉田、津下と大阪大学、筑波大学の共同研究および *Methods Enzymol.* 2021;649:125-148. 山田&津下)。

Iota toxin complex from E type *Clostridium perfringens*



ディフィシル菌は、抗菌薬の投与の後の腸炎の最も一般的な原因として知られる。いくつかの毒素を持ち、TcdA, TcdB のアクチンのグリコシル化に関わる主要な毒素の他、強毒性株では第3の毒素である、二成分毒素の関与が疑われている。最近、米国の2つのグループがディフィシル菌の二成分毒素の膜孔の構造 (CDTb) を明らかにしている。どちらも CDTb の7量体が上下に2つ重なった14量体構造である。この14量体は膜孔形成、また CDTa 透過にも不適なアーティファクトと考えられる。このため、我々は生理的な状態の CDTb 膜孔および CDTa 結合した CDTb 膜孔の構造を明らかにすべく実験を進めている。将来の二成分毒素の阻害剤の開発も考えて研究を進めている。

(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 リボシル化の基質特異性

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-グアニン複合体を明らかにしてきた。これらの研究から、ADP リボシル化の一般的な基質認識機構を明らかにした。すなわち、タンパク質のアミノ酸も、あるいは DNA の塩基も同じ基質を認識機構で認識と ADP リボシル化するという事を明らかにした。研究に携わった、吉田 (現在、日本女子大学) がこの総説を書き、論文採択された (*Toxins*, 2020)。

3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our focus 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*. Furthermore, we are currently trying to reveal the structure of C. difficile binary toxin (CDTa and CDTb) complex.

(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 (2020.4~2021.3)

原著論文

Tsuge H. A myelin sheath protein forming its lattice.

J. Biol. Chem. 295(26):8706-8707.

doi: 10.1074/jbc.H120.014273. (2020) (査読有り)

Yoshida T, Tsuge H. Common Mechanism for Target Specificity of Protein- and DNA-Targeting ADP-Ribosyltransferases

Toxins (Basel). 2021 13(1):40. doi: 10.3390 (査読有り)

Yamada T, Tsuge H.

Preparation of *Clostridium perfringens* binary iota-toxin pore complex for structural analysis using cryo-EM

Methods Enzymol. 2021;649:125-148. doi:10.1016/bs.mie.2021.01.032. (査読有り)

5. 学会発表など (2020.4~2021.3)

津下英明“二成分毒素膜孔複合体の単粒子解析”日本顕微鏡学会 第 76 回学術講演会紙上開催、2020.5.25-27 (招待講演)

津下英明“二成分毒素複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析：ADP リボシル化毒素の細胞内輸送機構の解明”第 460 回ビタミン B 研究協議会（愛知）、2020.8.29

津下英明“見えてきたタンパク質膜透過機構、クロストリジウム二成分毒素複合体の単粒子解析から”第 46 回生体エネルギー研究会、長土堀青少年交流センター（金沢）、2020.12.10(招待講演)

6. その他特記事項

1) 外部資金

なし

2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

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
なし

