

# 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。Ib 膜孔と Ia-Ib 膜孔複合体の構造を明らかにしている。これに引き続き、抗生物質耐性菌が問題となり、その強毒化が懸念されている、ディフィシル菌の二成分毒素 CDT のクライオ電子顕微鏡により明らかにして、論文化に向けて検討している。

(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) トキシン膜透過システムの構造基盤

*C.perfringens* が持つ 2 成分毒素イオタ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。2020 年、Ib 膜孔の解析をクライオ電子顕微鏡で進め、その構造を、C7 対称性を用いて 2.9 Å 分解能で得た。Ib 膜孔は 7 量体からなる。さらに Ia の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、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  $\alpha$  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  $\phi$  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 2 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、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)。

ほぼこれと同時に、ディフィシル菌の 2 成分毒素 CDT の構造が海外のグループにより報告された。ディフィシル菌は抗生物質耐性菌の感染が問題とされ、2 つの毒素 (TcdA, TcdB) の他にイオタ毒素と類似の 2 成分毒素を持ち、この 2 成分毒素が重症化に関わっているかが注目されている。2 つのグループが、この毒素の構造を独立に発表した。面白いのは、この 2 つともにダイヘプタマーの構造であることである。イオタ毒素は 7 量体であるが、CDTb はこれが、2 つ合わさったダイヘプタマーの 14 量体構造をとる。この構造だと、膜に孔を開けることができない、また CDTa の膜透過にも支障があると考えられる。現在、CDT でも生理的な 7 量体の

構造があるのではないと考え、その構造決定を進めてきた。界面活性剤 LMNG の存在下で、CDTa 結合した CDTb 膜孔を調製、電子顕微鏡でのデータ測定と解析を進めてきた。その結果、ダイヘプタマーの 14 量体とともにイオタ毒素と同様の 7 量体の CDTb 膜孔構造が存在していることがわかってきた。これに CDTa を加えて、クライオ電子顕微鏡での構造決定を行った。其の結果 CDTa 1 分子が CDTb 膜孔に結合した構造を明らかにした。この分解能は 2.6Å である。さらに漏斗型の狭窄部位のひとつである NSS-loop に二状態があることを見出し、これが CDTa との結合とタンパク質透過に重要であることを検証している。初期の論文はすでに Research square に掲載した。本論文もリバイスを経て準備中である。  
<https://www.researchsquare.com/article/rs-1018941/v1>

我々は、2 成分毒素の構造だけでなく、細胞を対象にした in vivo アッセイおよび電気生理による膜孔測定すなわち in vitro アッセイの系を立ち上げて、機能を確認していこうとしている。さらに Ib を用いた膜孔タンパク質のデザインを目指している。nanopore を用いた DNA シーケンスはすでに実用化されている。同様に nanopore を用いたアミノ酸シーケンスは 20 種のアミノ酸を見分けることができるかどうか今後の課題であるが、それに適した膜孔タンパク質を用いることは重要であろう。これに向けて、Ib 膜孔は天然のタンパク質膜透過システムであり、これを用いた基礎と応用研究は重要であろう。

(2) 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 2 成分毒素である。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。面白いのは前述のイオタ毒素 Ib やディフィシル菌毒素 CDTb では最狭窄部位は Phe でできた  $\phi$  クランプでできており、これがタンパク質膜透過に最も中であることはわかっている。一方、CPIL-b のクランプ最狭部位は Ser であり、狭窄部位の大きさも疎水・親水といった違いもあり、どのような影響をしているのか興味深い。ここに焦点を置きながら、これらクロストリジウム属の 2 成分毒素の、タンパク質の輸送機構、毒性発現機構の全体を明らかにする。また、これらの透過阻害剤にも注目して研究をすすめている。

### (3) ADP リボシル化の基質特異性

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。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が、このような研究は世界でもほとんどない。これらの研究により、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ことが明らかにした。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。

### (4) スクミリンゴガイ二成分毒素の研究

スクミリンゴガイはアルゼンチン原産のリンゴガイ科の大型巻貝で、通称、ジャンボタニシと呼ばれる。日本では食用を目的として、持ち込まれたが、野生化した外来種で、稲を食害することから、防除対象となっている。田んぼで赤い卵塊を目にするが、この卵に 2 成分毒素が含まれており、1 つはレクチン、もう一つは膜孔毒素であることがわかっている。この卵塊から毒素を精製し、構造決定できないか検討を始めた。卵塊から毒素を精製した。98KDa のバンドは還元剤存在下で、68KD と 31KDa の 2 成分に分かれる。質量分析 MALDI-TOF を用いた mascot 解析から、スクミリンゴガイ由来の毒素であることを確認した。さらに精製した毒素成分が、インビトロで膜孔成分を膜孔化できないか検証をしている。

### 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  $\phi$ -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  $\alpha$ -helix tilting and partial unfolding, whereupon the unfolded N-terminus continues to the  $\phi$ -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* in 2020. 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) We are studying the two component toxin from *Pomacea canaliculata*. We purified the binary toxin from red egg of *Pomacea canaliculata* and ought to reveal the pore forming mechanism and function.

### 4. 論文, 著書など (2021.4~2022.3)

#### 総説

1) 吉田徹、津下英明

生化学 第93巻,第6号,p862-866 (2021)

みにれびゅう

ADP リボシル化酵素がタンパク質や DNA を特異的に修飾する仕組み

2) 吉田徹、山田等仁、津下英明

日本結晶学会誌 v64(2),p69-76 (2022)

X線結晶学者のためのクライオ電子顕微鏡解析の手引き

クライオ電子顕微鏡による二成分毒素の構造解析：トキシン膜透過システムの構造基盤（査読あり：総説）

## 5. 学会発表など (2021.4～2022.3)

1) 山田等仁 “クライオ電子顕微鏡による *Clostridium perfringens* が産生する二成分毒素の膜透過に伴うアンフォールディング機構の解析”

第 21 回日本タンパク質科学会（富山） 2021.6.7～9

2) Tomohito Yamada, Akihiro Kawamoto, Toru Yoshida, Hideaki Tsuge “Cryo-EM analysis revealed translocation unfolding in *C.perfringens* binary iota toxin”

ETOX21 (European Workshop on Bacterial Protein Toxins

2021)（オンライン） 2021.6.28-31

3) 山田等仁、吉田徹、川本晃大、光岡薫、岩崎憲治、津下英明 “クライオ電子顕微鏡によって明らかにした二成分毒素の膜透過機構”

第 67 回トキシンシンポジウム（オンライン）2021.9.9～10

4) 川本晃大、山田等仁、吉田徹、加藤貴之、津下英明

“クライオ電子顕微鏡によるディフィシル菌由来の二成分毒素複合体の構造とそのタンパク質膜透過機構”

第 465 回ビタミン B 研究委員会（京都楽友会館） 2021.11.27

5) 津下英明

S11 細菌毒素研究の新たな展開を目指して

“ウェルシュ菌およびディフィシル菌由来の二成分毒素：クライオ電子顕微鏡による複合体構造とその膜透過機構” 第 95 回日本細菌学会（オンライン）2022.3.29～30（招待講演）

## 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（B）

課題名：クライオ電子顕微鏡によるタンパク質膜透過の動的構造解析 研究代表者：津下英明

取得年:2021～2023

(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（10月まで）

(3) 受賞等

D2 の山田等仁さんが、下記の 3 つの学会で受賞しました！

第 21 回日本タンパク質科学会 若手奨励賞優秀賞

ETOX21 (European Workshop on Bacterial Protein Toxins 2021) Poster Prize

第 67 回トキシンシンポジウム 若手優秀賞

