

# 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) 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た。このタンパク質膜透過機構の解明が大きな目標である。

(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、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. 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に 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で、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。Ia は N 末端のドメインで、7 量体の Ib 膜孔に一つ結合する。最も重要なのは、この結合により、Ia の N 末端の  $\alpha$  ヘリックスが一部解ける点である。さらに 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 膜孔を介した膜透過は N 末端から解けて行われると考えられる。また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 (*Nature Structural & Molecular Biology*, 2020)。

続いて、抗生物質耐性菌の感染が問題となっているディフィシル菌が持つ二成分毒素 CDT の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて明らかにした (*Nature Communications*, 2022)。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 量体構造をとることが報告されてきたが、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。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 (写真 1 枚目参照)。この分解能は 2.6 Å 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た。さらに、CDTa が CDTb 膜孔に結合した状態での構造解析から、結合したばかりの CDTa と CDTb 膜孔複合体と、CDTa の N 末端の  $\alpha$  ヘリックスが一部解けた状態と CDTb 膜孔複合体の 2 つの構造をそれぞれ精密化して明らかにした。これは N 末

端の $\alpha$ ヘリックスのアンフォールディングの動的な様子を捉えた初めての報告である。これらの二成分毒素のタンパク質膜透過の仕組みはまだよくわかっていない。これらのタンパク質膜透過システムをトキシン膜透過システムと名づけ、さらに研究を進めている。

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) 新規二成分毒素 CPILE (BEC)の構造と機能

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 (CPILE)と命名された。CPILE は CPILE-a, CPILE-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 CPILE-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、CPILE-b のクランプ最狭窄部位は 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 の塩基であれ同じ基質認識機構で、ADP リボシル化するということを明らかにした。これら ADP リボシル化毒素の研究から、その分子機構はわかってきたが、まだヒト PARP などの分子機構は不明な点が多く面白い。

#### (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、67KDa 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。現在、クライオ電子顕微鏡を用いて、この膜孔毒素の構造を明らかにしようとしている。

### 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 have reported the cryo-EM structures of the translocation channel Ib-pore and its complex with Ia (**Nat Struct & Mol Biol.**, 2020) Furthermore, this year, we reported binary CDT (CDTa and CDTb) toxin complex from the most clinically important bacterium *Clostridioides difficile* (formerly *Clostridium*) (**Nature communications**, 2022). CDTb has been proposed to be a di-heptamer, but its physiological heptameric structure has not yet been reported. Here, we report the cryo-EM structure of CDTa bound to the CDTb-pore, which reveals that CDTa binding induces partial unfolding and tilting of the first CDTa  $\alpha$ -helix. In the CDTb-pore, an NSS-loop exists in 'in' and 'out' conformations, suggesting its involvement in substrate translocation. Finally, 3D variability analysis revealed CDTa movements from a folded to an unfolded state. These dynamic structural information provide insights into drug design against hypervirulent *C. difficile* strains.

(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 studying the difference of the pore in CPILe-b compared with Ib-pore and CDTb-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 (2022.4~2023.3)

Kawamoto A., Yamada T., Yoshida T., Sato Y., Kato T., and Tsuge H. (2022) Cryo-EM structures of the translocational binary toxin complex CDTa-bound CDTb-pore from *Clostridioides difficile*. **Nature communications**, 13(1):6119. doi: 10.1038/s41467-022-33888-4. (査読あり)

### 5. 学会発表など (2021.4~2022.3)

- 1) 山田等仁、川本晃大、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二成分毒素 CDTa CDTb 複合体の構造解析  
第 22 回日本蛋白質科学会 2022.6.7-9 [D3 山田：学生口頭発表賞受賞]
- 2) 西田和哉、山田等仁、津下英明

スクミリンゴガイ膜孔形成毒素 PcPV-2 の構造と機能の解析

第 68 回トキシンシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6

3) 吉田徹、内田悠斗、山田等仁、津下英明

*C. perfringens* 由来に成分毒素 CPiLEb の貫通膜孔は、セリンで形成された最狭窄部位をもつ

第 68 回トキシンシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6

4) 山田等仁、川本晃大、吉田徹、加藤貴之、津下英明

ディフィシル菌が産生する二成分毒素の構造解析

第 68 回トキシンシンポジウム (オンライン) 2022.9.5-6

5) 友田駿、山田等仁、津下英明

イオタ毒素 Ia-GFP キメラのタンパク質膜透過の確認と構造解析

第 60 回生物物理学会 函館 2022.9.28-30

6) 内田悠斗、吉田徹、山田等仁、津下英明

Effect of narrowest clamp of binary toxin on cell toxicity

第 60 回生物物理学会 函館 2022.9.28-30

7) 山田等仁、杉田征彦、野田岳志、津下英明

クライオ電子顕微鏡による高分解能構造解析で明らかになってきた二成分毒素の膜透過機構

第 60 回生物物理学会 函館 2022.9.28-30 [D3 山田：口頭発表および学生発表賞受賞 (ポスター)]

8) 山田等仁、吉田徹、津下英明

ディフィシル菌の二成分毒素のタンパク質膜透過の動的な様子

第 469 回ビタミン B 研究委員会 京都 2022.11.19

## 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

「ウイルス・幹細胞システム医生物学共同研究拠点」共同研究課題 京都大学医生物学研究所

課題名：リボソームに再構成した Ib 膜孔のクライオ電子顕微鏡による構造解析 研究代表者：津下英明

取得年:2022

(2) 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

Toxins, Editorial boards

ビタミン B 研究委員会 委員

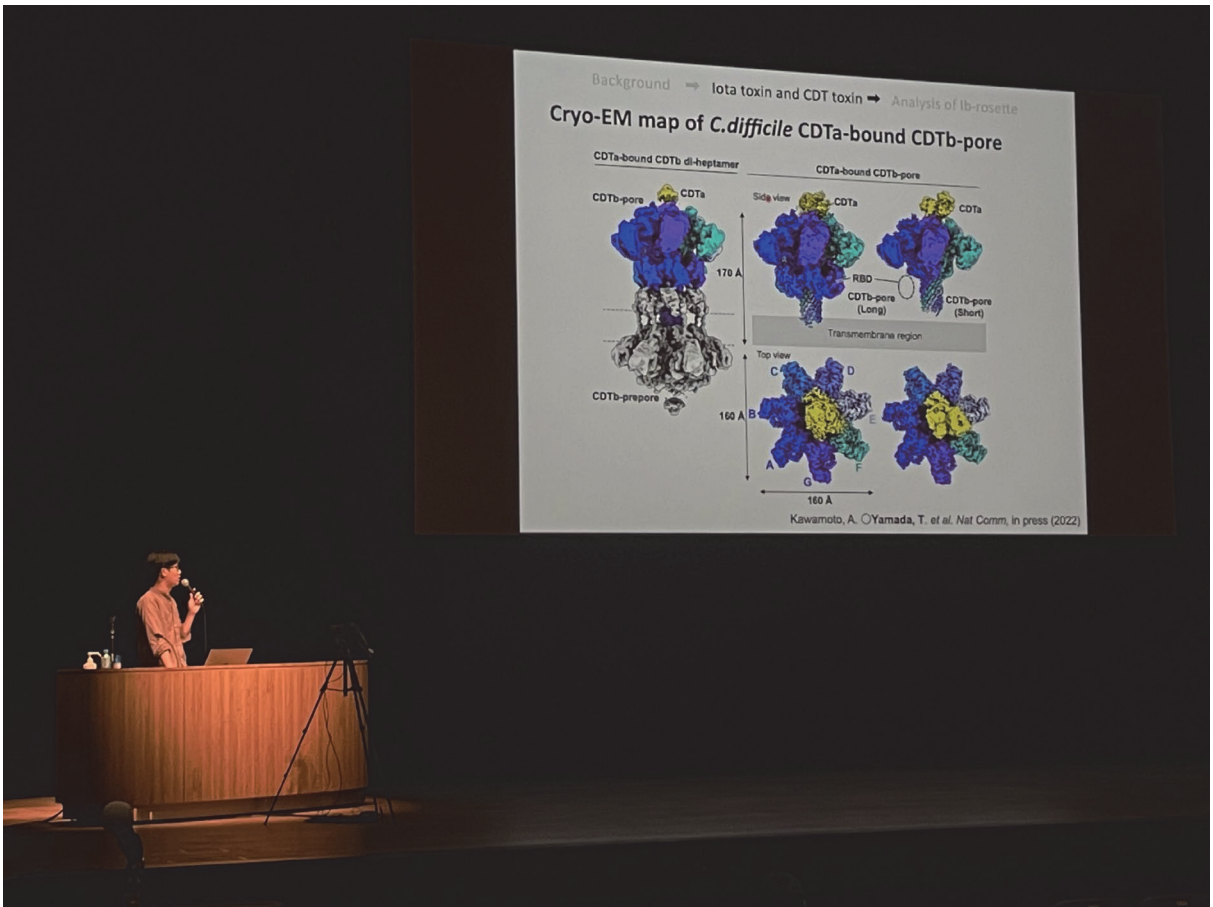
日本生化学会 評議員

(3) 受賞等

D3 の山田等仁さんが、下記の 2 つの学会で受賞しました！

第 21 回日本タンパク質科学会 学生口頭発表賞受賞

第 60 回生物物理学会 学生発表賞受賞 (ポスター)



第 60 回生物物理学会 函館年会で



琵琶湖畔で

