

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、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。

(3) リボソーム不活性化タンパク質の構造生物学: さまざまな植物にはリシン類似の蛋白質毒素が存在し、リボソームのリシンサルシループのアデニンを引き抜くことが知られている。当研究室の羽深は、白粉花の根由来の MAP が大腸菌のリボソームを不活性化することを見出している (Habuka et al, JMB 1991)。この構造を明らかにするため、最先端の構造生物学的方法で研究を進めている。具体的には MAP 単体の結晶構造解析、及びリボソームとの複合体のクライオ電子顕微鏡の構造解析を進めていく。また MAP はウイルスに対する抗ウイルス活性を持つことが知られている。この現象の解明を目指す。

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、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 膜孔の一つに結合する。最も重要なのは、この結合により、Ia の N 末端の α 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 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)。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 やデフィシル菌毒素 CDTb では最狭窄部位は Phe でできた ϕ 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。

(2) 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。我々の以外の研究でも、最近の研究では DNA の ADP リボシル化は脚光を浴びている。さらに蛤由来の DNA ADP リボシル化酵素 CAPR-1 の活性特異性と構造を明らかにするための研究を進めている。

(3) リボソーム不活性化タンパク質の構造生物学：さまざまな植物にはリシン類似の蛋白質毒素が存在し、リボソームのリシンサルシループのアデニンを特異的に引き抜くことが知られている。MAP 単体の結晶化に成功し、2.2 Å のデータを測定、解析を行った。さらにシンクロトロンでの測定を行い、高分解能での解析を目指す。また現在、大腸菌リボソームとの複合体のクライオ電子顕微鏡の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 focus is macromolecular complexes, and we would like to reveal the interaction between the infectious factor protein and human protein. These basic researches are 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, last year, we reported binary CDT (CDTa and CDTb) toxin complex from the most clinically important bacterium *Clostridioides difficile* (formerly *Clostridium*) (*Nature communications*, 2022).

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.

(2) 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.

Recently, DNA ADP-ribosyltransferase including ScARP and pierisin are in the spot light. Now we are trying to reveal the function and structure of DNA ADP-ribosyltransferase, CAPR-1 from *Meretrix lamarckii*.

(3) We are studying the function and structure of *Mirabilis jalapa* antiviral protein (MAP). MAP is ribosome inactivating protein, which deactivate *E.coli* ribosome. We try to solve the structure of MAP by

crystallography and also reveal the complex structure with E.coli ribosome by cryo-EM. Furthermore, MAP has anti-viral activity., but the molecular mechanism is open question. We are also interested in the anti-viral activity of MAP.

4. 論文, 著書など

Sven Falke, Julia Lieske, Alexander Herrmann, Jure Loboda, Katarina Karničar, Sebastian Günther, Patrick Y.A. Reinke, Wiebke Ewert, Aleksandra Usenik, Nataša Lindič, Andreja Sekirnik, Klemen Dretnik, Hideaki Tsuge, Vito Turk, Henry N. Chapman, Winfried Hinrichs, Gregor Ebert, Dušan Turk, Alke Meents (2024) Structural elucidation and antiviral activity of covalent cathepsin L inhibitors
Journal of Medicinal Chemistry
2024, 67, 9, 7048–7067 (査読あり)

津下英明

細菌ADPリボシル化酵素の基質認識機構とその細胞膜透過に関する研究

ビタミン 2023 Vol9,12,540-551

5. 学会発表など

- 1) 津下英明 “二成分毒素：ADP リボシル化酵素成分の基質認識機構と細胞膜透過機構について” 日本環境変異原ゲノム学会 シンポジウム「有毒生物と遺伝子変異」、東京、2023.6.3 (招待講演)
- 2) 津下英明 “細菌 ADP リボシル化酵素の基質認識機構とその細胞膜透過に関する研究” 第 75 回日本ビタミン学会、仙台、2023.6.17-18 (招待講演)
- 3) 三谷優季、津下英明 “ウェルシュ菌イオタ毒素 Ib serine-clamp 変異体の単粒子構造解析及び活性測定” 蛋白質科学会 名古屋、2023.7.5-8 ポスター発表
- 4) 吉田徹、門間千枝、滝口創太郎、藤田祥子、内田悠斗、山田等仁、川野竜司、津下英明 “二成分毒素 CPILeB のセリンで形成された膜貫通孔” 第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 口頭発表
- 5) 迫田憲亮、山田等仁、津下英明 “ウェルシュ菌イオタ毒素の膜透過機構の研究” ポスター発表 第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8
- 6) 西田和哉、山田等仁、津下英明 “スクミリングガイの膜孔形成毒素、PcPv-2 オリゴマー構造の撮影の試み” 第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 ポスター発表
- 7) 羽深典之、津下英明 “Ribosome -Inactivating Protein のリボソーム特異性と抗ウイルス活性に関する研究” 第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 ポスター発表
- 8) 三谷優季、川野竜司、滝口創太郎、津下英明 “電気生理による二成分毒素のポアシグナル測定” 第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 ポスター発表
- 9) 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から見えてきたウェルシュ菌イオタ毒素の膜孔形成機構” 第 69 回トキシシンポジウム 京都、2023.9.7-8 口頭発表
- 10) 津下英明 “スクミリングガイ (Pomacea canaliculata) 卵塊のタンパク質の物性” 第 473 回ビタミン B 研究協議会、京都 楽友会館、2023.11.10 口頭発表
- 11) Yuki Mitani, Sotaro Takiguchi, Ryuji Kawano, Hideaki Tsuge “Construction of a membrane translocation assay system for C. difficile binary toxin by electrophysiological technique” 日本生物物理学会、名古屋、2023.11.14-16 ポスター発表

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) 21H02452

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

科学研究費補助金・挑戦的研究 (萌芽)

課題名：リボソーム不活性化タンパクとリボソームのクライオ電子顕微鏡による丸ごと複合体解析

研究代表者：津下英明 取得年:2023~2024

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

第 75 回日本ビタミン学会 学会賞

「細菌 ADP リボシル化酵素の基質認識機構とその細胞膜透過に関する研究」

津下英明



2023 年度 卒業式で



第 69 回トキシシンポジウム
京都産業大学むすびわざ館で開催