

# 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 Assit. Prof. Toru Yoshida, Ph.D

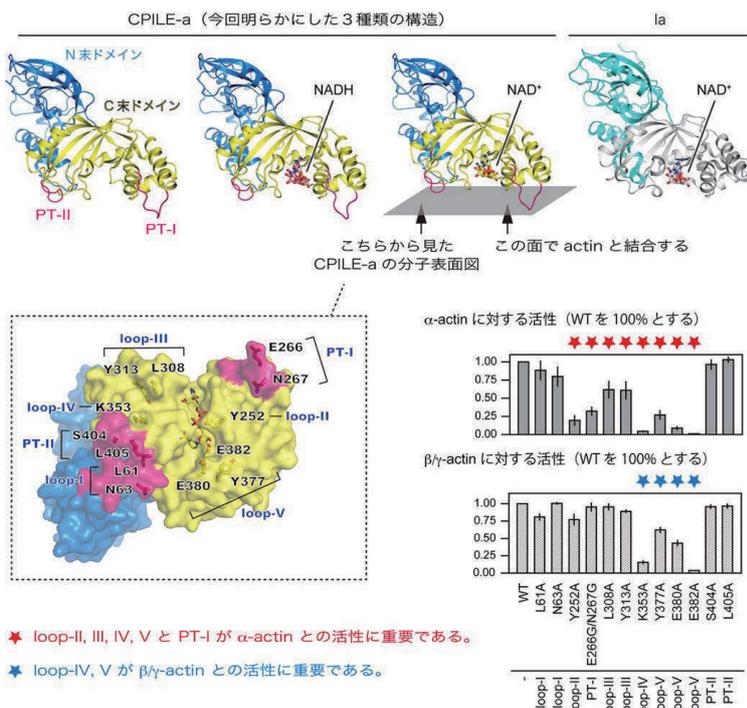
## 1. 研究概要

タンパク質の複合体の構造生物学：すなわちタンパク質とタンパク質がいかに結びつくかに興味を持ち、研究を行っている。特に感染症に関わる因子の構造生物学を進めている。

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。我々はX線結晶構造解析を主要な手段として、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。ADPリボシル化毒素とそのヒト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。この反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な反応状態での結晶構造解析を進めている。

## 2. 本年度の研究成果

(1) 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binary毒素である。ウェルシュ菌のiota毒素(Ia,Ib)との相同性は50%程度であるが、その毒性に違いがあることが報告された。Iota毒素ではIaはアクチン特異的なADPリボシル化毒素、一方Ibは細胞膜上でオリゴマーを作り、Iaを透過するトランスポーターと考えられている。CPiLEの食中毒原因毒素としてのアッセイすなわち腸管を用いたFluid accumulating 活性は、CPiLE-bのみでもあり、CPiLE-aで増強することが示されている。我々は、食中毒毒素の作用機構解明のためCPiLE-aの構造機能解析を行った (PLoS ONE 2017)。CPiLE-aの結晶はPEGを沈殿剤として得られ、初期位相は水銀を用いたMAD法で得られた。この後、構造精密化し、最終構造を得た。今回得られた構造は、基質なし、NAD<sup>+</sup>複合体 (本来の基質であるNAD<sup>+</sup>が結合したもの)、NADH複合体である。Iaと構造を比較すると、Iaにはない2つのExtra Protruding Loop (PT-Iと PT-II) が存在することがわかった (下図)。すでに我々のグループで研究が進んでいる、Iaと基質タンパクのアクチンとの複合体との結晶構造から、CPiLE-

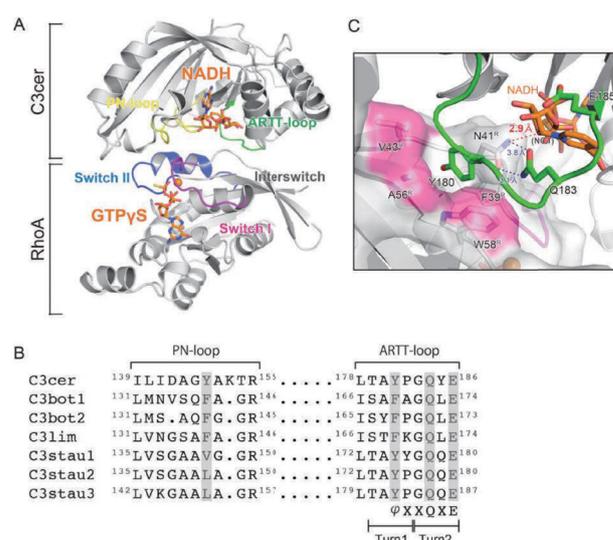


a-actin複合体のモデルを構築し、アクチン結合部位と思われるアミノ酸の変異体を作成して、その役割を検討した。Iaは2つのドメインからなり、C末端ドメインにNAD<sup>+</sup>が結合し、この周りの5つのループ(N末端ドメインのloop-I、C末端ドメインのloop-II-V: loop-Vには基質アミノ酸Arg177の認識に関わるARTT-loopの2つのGluも存在する)がアクチンとの結合に関与していることがわかってきたが、CPiLE-aでは、loop-II-IVと領域外のPT-Iの変異体もαアクチンとの結合すなわち活性に影響することがわかった (左図)。

その一方でβ/γアクチンに対する活性を見ると、loop-IVとVの変異体では活性が落ちたが、その他の部位の変異体では大きく変化が見られなかった。また、β/γアクチンに対するADP-リボシル化活性は、αアクチンに対する活性のわずか36%であった。

この結果は、CPILE-a類のボツリヌス菌の酵素C2-IIが $\beta/\gamma$ アクチンしかADPリボシル化しないことは対照的である。現在、構造が未知の膜結合のタンパク質透過装置CPILE-bの構造と機能の研究を進めている。

(2)アクチンをADPリボシル化する毒素は多く知られているが、我々の研究室では、このタイプの毒素とヒト基質タンパク質複合体の構造および其の反応を明らかにしてきた(PNAS 2008, PNAS 2013)。また2015年、全く異なる基質RhoAをADPリボシル化するC3 exoenzymeとその基質(RhoA)複合体の結晶構造解析に成功した(JBC 2015)。RhoA特異的ADPリボシル化酵素C3はRhoAのAsn41を特異的にADPリボシル化する毒素であり、1989年に見出された。代表的なRhoファミリー分子にはRhoA、Rac1、Cdc42があるが、C3はRhoAのみをADPリボシル化する。Rho GTPaseはそのGTP結合型とGDP結合型で、構造が変化し、シグナル伝達スイッチとして働く。C3 exoenzymeとその基質RhoA複合体の結晶構造解析の結果、わかったことは次の点である。(1)RhoAのシグナル伝達スイッチとして機能する可変領域(switch Iとswitch II)はRhoA(GDP)とRhoA(GTP)で大きく構造が異なることが知られていた。しかしながら、C3が結合した複合体構造ではC3-RhoA(GDP)およびC3-RhoA(GTP)はどちらも同じ可変領域の構造をとる(switch Iは単体のRhoA(GDP)と同じ、switch IIは単体のRhoA(GTP)と同じ)。すなわち、C3の結合により構造変化をおこす。その結果、RhoA(GDP)とRhoA(GTP)はどちらの状態でもADPリボシル化される。(2)C3およびRhoAの認識機構が初めて明らかになった。特に以下の点が興味深い。IaとC3はどちらも似た構造を持つADPリボシル化毒素であるが、その基質はアクチンのArg177とRhoAのAsn41である。毒素には共通したADP-ribosylation turn turn loop (ARTT loop)があり、最初のターンに存在する疎水性側鎖が基質RhoAの認識をし、次のターンに存在するQXEのグルタミンが修飾されるRhoA Asn41の認識に関わると予測されていた。一方IaではEXEであり、最初のグルタミン酸が修飾されるアクチンのArg177の認識に関わる、すなわち、修飾アミノ酸の選別は、このように行われていると予測されていたが、その実験的な証明はされていなかった。C3-RhoAの複合体構造は、Gln(QXE)がRhoA Asn41と水素結合を形成して、特異的な認識をし、さらに、この近傍にNADHのNC1が存在していることが明らかになった。この関係はADPリボシル化にとって理想的な関係であると考えられる(右図)。更に、RhoAシグナルに関わるADPリボシル化の影響を検討するため、ADPリボシル化したRhoAとGDIとの複合体研究を進めている。また、ある種の細菌毒素はRhoA、Rac1、Cdc42のシグナルを脱アミド化修飾することでそのシグナル攪乱を行う。この脱アミド化に関わる毒素とその基質複合体の構造解明を目的に、その解析を進めている。



### 3. Research projects and annual reports

We have been focusing our research on the structural biology of infectious disease. Especially our target is macromolecular complex and we would like to reveal the interaction between the infectious factor protein and human protein.

(1) Unusual 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 enterotoxin consisting of two components: *C. perfringens* iota-like enterotoxin-a (CPILE-a), which acts as an enzymatic ADP-ribosyltransferase, and CPILE-b, a membrane binding component. Here we present the crystal structures of apo-CPILE-a, NAD<sup>+</sup>-CPILE-a and NADH-CPILE-a. Though CPILE-a structure has high similarity with known iota toxin-a (Ia) with NAD<sup>+</sup>, it possesses two extra-long protruding loops from G262-S269 and E402-K408 that are distinct from Ia. Based on the Ia-actin complex structure, we focused on actin-binding interface regions (I-V) including two protruding loops (PT) and examined how mutations in these regions affect the ADP-ribosylation activity of CPILE-a. Though some site-directed mutagenesis studies have

already been conducted on the actin binding site of Ia, in the present study, mutagenesis studies were conducted against both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin in CPiLE-a and Ia. Interestingly, CPiLE-a ADP-ribosylates both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin, but its sensitivity towards  $\beta/\gamma$ -actin is 36% compared with  $\alpha$ -actin. Our results contrast to that only C2-I ADP-ribosylates  $\beta/\gamma$ -actin. We also showed that PT-I and two convex-concave interactions in CPiLE-a are important for actin binding. The current study is the first detailed analysis of site-directed mutagenesis in the actin binding region of Ia and CPiLE-a against both  $\alpha$ - and  $\beta/\gamma$ -actin.

(2) We have been analyzed Ia (actin specific ADP-ribosyltransferase) with actin. Recently we also revealed C3 exoenzyme (RhoA specific ADP- ribosyltransferase) with Rho GTPases (JBC 2015). C3 has long been used to study the diverse regulatory functions of Rho GTPases. How C3 recognizes its substrate and ADP-ribosylation proceeds are still poorly understood. Crystal structures of C3-RhoA complex reveal that C3 recognizes RhoA via switch I, switch II and interswitch regions. In C3-RhoA(GTP) and C3-RhoA(GDP), switch I and II adopt the GDP and GTP conformations, respectively, which explains why C3 can ADP-ribosylate both nucleotide forms. Based on structural information, we successfully changed Cdc42 to active substrate with combined mutations in the C3-Rho GTPase interface. Moreover, the structure reflects the close relationship among Gln183 in the QXE-motif (C3), a modified Asn41 residue (RhoA) and NC1 of NAD(H), which suggests C3 is the prototype ART. The structures show directly for the first time that the ARTT-loop is the key to target protein recognition and also serve to bridge the gaps among independent studies of Rho GTPases and C3. Now we are trying to reveal the complex structure of ADP-ribosylated RhoA with GDI to understand the effect of ADP-ribosylation on Rho signalling. Furthermore, we are trying to reveal the complex structure of Rho family deamidase with Rho GTPase.

#### 4. 論文著書など

Yoshida T, Ogola HJ, Amano Y, Hisabori T, Ashida H, Sawa Y, Tsuge H, Sugano Y. Anabaena sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers.

Proteins. 84(1):31-42. doi: 10.1002/prot.24952 (2016).

Toda A, Tsurumura T, Yoshida T, Tsumori Y, Tsuge H. Structural Basis of Rho GTPase recognition by C3 Exoenzyme. Photon Factory Highlights 2015. 58-59 (2016).

#### 5. 学会発表など

津下英明：ワークショップ「細菌病原性の分子機序研究の最前線」ADP リボシル化毒素 C3 がシグナル伝達阻害を引き起こすしくみ、日本細菌学会、大阪国際交流センター（大阪）、2016.3.25

津下英明：細菌由来 ADP リボシル化毒素の作用機構と基質特異性、大阪府立大学(大阪)、獣医学専攻オープンセミナー、2016.7.22  
Waraphan Toniti, Toru Yoshida, Toshiharu Tsurumura, Daisuke Irikura, Chie Monma, Yoichi Kamata, and Hideaki

Tsuge : Characterization of Actin ADP-ribosyltransferase from Clostridium perfringens iota-like enterotoxin. ICC05-AEM2016 Unazuki(Toyama), 2016.9.8

Toru Yoshida, and Hideaki Tsuge :ADP-ribosylation of RhoA by C3 exoenzyme. ICC05-AEM2016 Unazuki (Toyama), 2016.9.8

村田晴香、ウェルシュ菌産生イオタ毒素Ib成分の構造解析、生化学会、仙台国際センター（仙台）、2016, 9.25

津下英明、戸田暁之、鶴村俊治、吉田徹：シンポジウム「モノ・ポリADPリボシル化によるシグナル伝達系の意義」C3 exoenzymeとRhoA複合体の結晶構造解析に基づく基質特異性、日本分子生物学会、パシフィコ横浜（横浜）、2017.12.2

#### 6. その他特記事項

##### 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究（C）課題名「ADP リボシル化毒素 C3 の RhoGTPase 認識機構の解明」研究代表者：津下英明、取得年度：H27-H29 年（3 年）

## 学外活動

Journal of Biological Chemistry, Editorial boards member

Journal of Crystallography (Hindawi) Editorial board

Advances in Biology (Hindawi) Editorial board

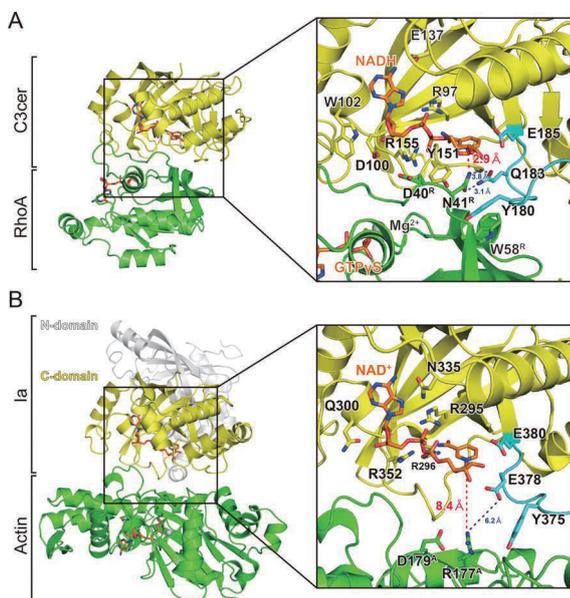
日本学術振興会 回折構造生物第 169 委員会 委員

ビタミン B 研究委員会 委員

日本生化学会 評議員

## 京都産業大学タンパク質動態研究所のメンバーとしての活動

現在までの津下研究室でバイナリー毒素の研究は下記のように進んできた。(1) アクチン特異的 ADP リボシル化毒素 Ia の結晶構造と機能の解析(JMB 2003) (2) Ia と其の標的アクチンの複合体構造解析 (PNAS 2008) (3) Ia-アクチン複合体結晶に NAD をソーキングすることで、ADP リボシル化の前後の構造解析と ADP リボシル化反応機構の解明 (PNAS 2013) (4) 異なる標的である RhoA 特異的 ADP リボシル化毒素 C3 毒素と RhoA の複合体の構造解析 (JBC 2015)。この研究を更に発展させて行く。



Ia-アクチンの複合体構造(A)と C3-Rho の複合体構造 (B)の比較

バイナリー毒素はアクチン特異的な ADP リボシル化毒素とそれを細胞内に透過する膜透過装置：トランスロケータからなる。我々の研究室では細菌のアクチン特異的 ADP リボシル化毒素とヒトアクチン複合体研究など、この分野の構造生物学の最先端研究を推し進めてきたが、特に、膜透過装置：トランスロケータの構造を明らかにしたいと考えている。この研究から、「どのようにしてアクチン特異的 ADP リボシル化毒素がこのトランスロケータを介して細胞内へ通過するのか」という重要な問いに答えていきたいと考えている。

## 高エネルギー加速器研究機構での活動

高エネルギー加速器研究機構、放射光科学研究施設の『Photon Factory (PF) Highlight』は放射光科学研究施設を用いた研究成果のうち、国内外に向けて非常にインパクトがあった成果、さらには新たな測定・解析手法を提唱する非常に重要な成果等が掲載される。2015 年度の生命科学分野における成果として 11 の研究成果が紹介され、其のうちの一つとして以下の我々の研究が紹介された。

Structural Basis of Rho GTPase recognition by C3 Exoenzyme A. Toda, T. Tsurumura, T. Yoshida, Y. Tsumori and H. Tsuge (Kyoto Sangyo Univ)  
<http://www2.kek.jp/imss/pf/science/publ/pfhl/2015/>

