

Title	Crystallization and preliminary crystallographic studies of the Pasteurella multocida toxin catalytic domain
Author(s)	宮澤, 雅之
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47495
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	宮 澤 雅 之
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20950 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Crystallization and preliminary crystallographic studies of the <i>Pasteurella multocida</i> toxin catalytic domain (<i>Pasteurella multocida</i> 皮膚壊死毒素活性ドメインの結晶学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 堀口 安彦 (副査) 教授 杉本 央 教授 本田 武司

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

Pasteurella multocida toxin (PMT) は進行性ブタ萎縮性鼻炎の原因菌である *Pasteurella multocida* で唯一確認されているタンパク毒素である。PMT は、動物への皮内投与で皮膚壊死を起こすほか様々な細胞に対して細胞増殖活性を示すことが知られている。標的細胞内では三量体 G タンパク質の Gq と G12/13 依存性のシグナル経路を同時に活性化するというユニークな作用を持つことが知られているが、その際の標的分子および作用機構は不明である。PMT は 1,285 アミノ酸残基からなる 146 kDa のポリペプチドであり、N 末端領域は標的細胞との結合に関与し、C 末端領域は毒素活性そのものに関与すると考えられている。また、N 末端領域 (アミノ酸位 1-529) は大腸菌の細胞壊死因子 (CNF) の N 末端領域と 27% の一次配列上の相同性を示す。C 末端領域 (アミノ酸位 581-1,285) は 3 つのアミノ酸残基 (Cys1165、His1205、His1223) が毒素活性に必須であることが報告されているが、一次構造上の相同性があるタンパクは報告されていない。本研究では、PMT の毒素活性の本態をその構造から検討するために、C 末端領域断片 (アミノ酸位 569-1,285、C-PMT) の結晶化と X 線回折の初期解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

N 末端にヒスチジンタグを付加した C-PMT 遺伝子を挿入したベクターを構築し、これを大腸菌株 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL を用いて発現させ、産生された C-PMT をアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過の 3 段階で精製した。精製試料の純度は SDS-PAGE と Native PAGE で確認し、毒素活性は HVJ envelope vector を用いて Swiss3T3 細胞の細胞質内へ直接に C-PMT を導入し、細胞の形態変化観察と ³H-チミジンを用いた細胞増殖活性の測定により確認した。

10 mM Tris-HCl pH 7.5 緩衝液中で 15 mg/ml の濃度に調製した C-PMT を結晶化試料とした。結晶化条件のスクリーニングは市販のスクリーニングキットを用いて行い、ポリエチレングリコールやリン酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、リン酸カリウム・ナトリウムを沈殿剤とする条件から結晶を得た。さらに検討を行った結果、20℃での sitting-drop 蒸気拡散法にて、1.6 M リン酸アンモニウム、0.1 M MES pH 6.5 の溶液 2 μl と結晶化試料 2 μl、リ

ザーバー溶液として 1.6 M リン酸アンモニウム、0.1 M MES pH 6.5 を 500 μ l 用いた条件下でおよそ 0.5 \times 0.5 \times 0.1 mm の最良の板状結晶を得た。

得られた C-PMT の結晶に 30%トレハロースを凍結保護剤として用いた条件で良好な回折像が得られ、分解能 1.90 Å の回折データを収集した。プログラム HKL-2000 を用いたデータ処理から、本結晶の空間群は *C2*、格子定数は $a=111.0$ 、 $b=150.4$ 、 $c=77.1$ Å、 $\beta=105.5^\circ$ であった。溶媒含量は 67.7% でタンパク結晶として典型的な値で、非対称単位あたり 1 分子の C-PMT が含まれると推測された。

構造解析の結果から、C-PMT 分子は、87 \times 84 \times 30 Å の大きさで 33 のヘリックスと 16 の β シートからなるトロイの木馬様の構造をしており、それぞれ脚、胴、頭に相当する C1、C2、C3 と名付けた三つのドメインから構成されることがわかった。C1 は *C. difficile* toxin B の脂質への会合に関与する N 末端ドメインと立体構造上の相同性を持ち、C2 は 2 つの α/β バレルを持つ大きなドメインで全体の分子構造を維持すると推定された。また、C3 は活性中心と推定されるクレフトを形成し、そのクレフトには水素結合で結ばれ、かつ活性に必須の His-Asp が存在し、両者と近傍の Cys あるいは Ser が catalytic triad を形成すると推定できた。

[総 括]

PMT の毒素活性に関与すると考えられる C 末端領域の構造を明らかにするために、結晶化条件を検討し、初めて結晶化に成功した。その後の構造解析から C-PMT は三つのドメインから構成されることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

Pasteurella multocida 毒素 (PMT) は、宿主細胞の三量体 G タンパク質の Gq と G12/13 依存性のシグナル経路を同時に活性化する作用を持つが、その標的分子および作用機構は不明である。本研究では、毒素活性に関与すると考えられている C 末端領域断片 (アミノ酸位 569-1,285、C-GPMT) の結晶化と X 線回折の初期解析を行った。

C-PMT の最適結晶化条件を検討し、その条件下で得られた結晶から、分解能 1.90 Å の X 線回折データを収集した。本結晶の空間群は *C2*、格子定数は $a=111.0$ 、 $b=150.4$ 、 $c=77.1$ Å、 $\beta=105.5^\circ$ であった。C-PMT は、脂質への会合に関与する *C. difficile* toxin B の N 末端側領域と立体構造上の相同性を持つドメイン、全体の分子構造を維持するドメイン、および活性中心と推定されるクレフトを形成するドメインの三つのドメインから構成されることがわかった。

本研究により、PMT の毒素活性領域の立体構造の基本情報が明らかとなった。この成果は、PMT の作用機構解析に重要な情報を与えるものであり、学位の授与に値すると考える。