

Title	A群レンサ球菌における菌体表層タンパクのX線結晶構造解析
Author(s)	東, 孝太郎
Citation	平成27年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2016
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54645
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

平成 27 年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	ひがし こうたろう 東 孝太郎	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	3年
ふりがな 共同 研究者名	たけべ かつき 武部 克希	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	3年
	つつみ ゆみ 堤 友美		歯学部 歯学科		3年
アドバイザー教員 氏名	山口 雅也	所属	大学院歯学研究科口腔細菌学教室		
研究課題名	A 群レンサ球菌における菌体表層タンパクの X 線結晶構造解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

【背景】A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は比較的症状の軽い咽頭炎から劇症型の壊死性筋膜炎など、様々な炎症性の疾患を引き起こすグラム陽性の病原細菌である。毎年、全世界で A 群レンサ球菌による咽頭炎や皮膚感染症が 7 億件以上発生し、65 万人以上が軟部組織壊死やショックを伴う侵襲性感染症に罹患している。さらに、2015 年には劇症型 A 群レンサ球菌感染症（いわゆる人食いバクテリア）の日本における患者数が過去最高となったことが報道された。しかし、A 群レンサ球菌による病態発症機構は未だ解明されていない事も多く、特に劇症型感染症の病態発症機構は不明な部分が多く、有効なワクチンや予防法も確立されていないのが現状である。

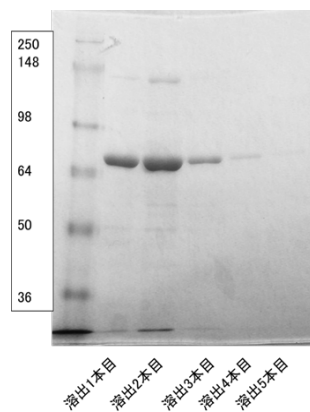
【研究目的】A 群レンサ球菌は複数の菌体表層タンパクを介して宿主の分子と相互作用することで宿主に定着し、さらに免疫機構を回避して増殖する。このように、A 群レンサ球菌の菌体表層タンパクはその病原性を発揮する上で重要な役割を果たすことが知られているが、その一方で、立体構造が不明な分子が多く残されている。本研究では A 群レンサ球菌の病原性に寄与する菌体表層タンパクのうち、特に構造が不明な分子について立体構造を X 線結晶構造解析法によって明らかにする。またそれらを構造生物学的な観点からその機能を理解することを目的とする。また、タンパク単体での立体構造が明らかになったものは、宿主分子との相互作用解析を行い、相互作用させた状態での結晶化も試みる。これによって病原因子の構造と結合様式を解明する。この研究の成果は将来的にこれらの構造をターゲットにした創薬への基盤になることが期待できる。具体的には、細胞壁架橋モチーフである LPXTG 配列を持つタンパク群のうち、メタロプロテアーゼである PepO を解析の対象とする。A 群レンサ球菌の PepO に関しては、これまでに立体構造は報告されていない。

【研究方法】A 群レンサ球菌よりゲノム DNA を精製し、PCR 法と遺伝子合成酵素により発現プラスミドを構築した。次に、得られたプラスミドを導入した大腸菌に組換えタンパクを発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより目的タンパク質を粗精製した。続いて、単離した目的タンパク質を限界濾過によって濃縮し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって純度を高めた。この精製タンパクと市販の結晶化スクリーニングキットを用いて、様々なタンパク質濃度及び温度条件下で結晶化条件を探索した。得られた結晶化条件付近で、ハンギングドロップ法で沈殿剤濃度、塩濃度、pH 等の条件を段階的に振り、最適な結晶化条件の探索を行った。

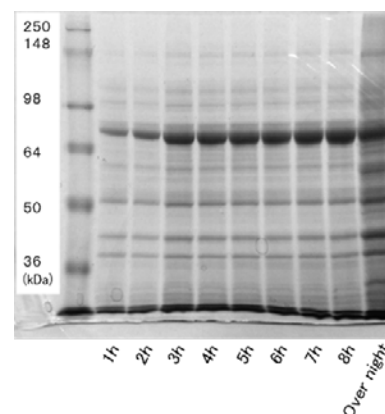
【研究経過】教員より、A 群レンサ球菌からクローニングした PepO の発現プラスミド pQE30/pepO を保有する大腸菌株の分与を受けた。

まず、組換え PepO の発現を確認する実験を行った。大腸菌(XL-10 Gold 株 pQE30/pepO)をアンピシリン (最終濃度 100 $\mu\text{g/mL}$) を含むルリアベルターニ液体培地 (3 mL) で 37°C の振盪培養を行った。培養した菌液を、アンピシリン (最終濃度 100 $\mu\text{g/mL}$) を含むルリアベルターニ液体培地(100 mL) に植え継ぎ、37°C で 2 時間振盪培養した後に、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG, 最終濃度 1 mM) を加え、組換えタンパクの発現を誘導した。さらに一晩 30°C で振盪培養した。得られた菌液を 4°C, 8000 rpm, 3 分間の遠心を数回行うことで、大腸菌菌体を回収した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS, 20 mL) を加え、10 分間超音波菌破碎機にて菌体の破碎を行った。4°C, 8000 rpm, 20 分間遠心し、菌体破碎液の上清を回収した。得られた上清を TALON ヒスチジンタグ融合タンパク質精製レジンに加え、室温で 1 時間反応させた。レジンを PBS で 5 回洗浄した後に、溶出緩衝液を 1 mL ずつ 5 回流することで組換え PepO を精製した (#1~#5)。SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、100°C で 10 分間加熱処理をした後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。左から、分子量マーカー、TALON カラム精製後 #1~#5 の順にサンプルを泳動した (図①)。TALON カラムで精製・溶出したタンパク液からは 70 kDa 付近に濃いバンドが出たことから、これが PepO のバンドであると考えられる。よって、PepO は大腸菌 (XL-10 Gold 株 pQE30/pepO) で正常に発現していることが確認できた。

図① : TALON カラム精製後サンプル



図② : IPTG 投入後の経時的変化



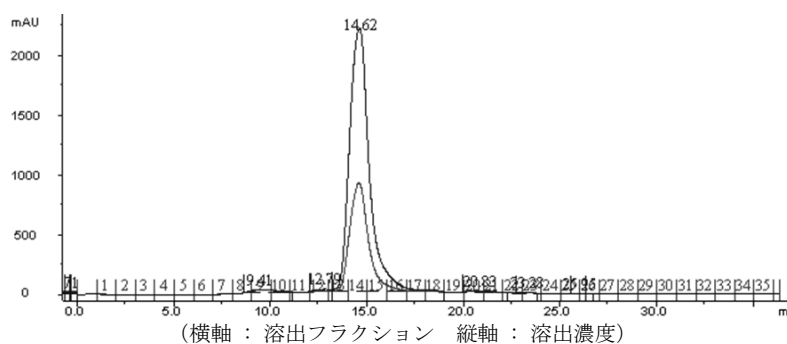
次に、組換えタンパクの発現誘導後の最適な培養時間を確認する実験を行った。通常、組換えタンパク質の十分な産生量を得るためには6~8時間と考えられており、PepOの産生も同じほどの時間が必要であると考え、PepOの産生量を経時的に確認した。大腸菌(XL-10 Gold株 pQE30/pepO)をアンピシリン(最終濃度 100 µg/mL)を含むルリアベルターニ液体培地(3 mL)で37°Cの振盪培養を行った。培養した菌液を、アンピシリン(最終濃度 100 µg/mL)を含むルリアベルターニ液体培地(100 mL)に植え継ぎ、37°Cで2時間振盪培養した後に、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG, 最終濃度 1 mM)を加え、組換えタンパクの発現を誘導した。IPTG添加から1時間ごとに菌液(300 µL)をエッペンチューブにとり、遠心分離(12000 rpm, 30秒間)を行った。採取した菌液について、上清を捨て、菌体にSDS-PAGEサンプルバッファーを加え、100°Cで10分間加熱処理し、SDS-PAGEを行った。左から、分子量マーカー、IPTG添加1~8時間後の菌液、IPTG添加後一晚培養した菌液の順に流した(図②)。IPTG添加後、3時間以降はバンドの濃さに差が見られないという結果が得られたため、IPTG添加後3時間で精製を行った方が効率は良いと考えられた。

続いて、限外濾過による濃縮とゲル濾過クロマトグラフィーを行い、タンパク純度を高めた。TALONカラムで溶出した1 mLずつエッペンチューブ(#1~#5)に溶出したサンプルの#1~#4を遠心限外濾過フィルターSpin-Xで1 mLまで濃縮して、ゲル濾過クロマトグラフィーによって分子半径ごとに溶出フラクションを得た(図③)。シングルピークで左右に対称なつりがね型分布になっていたので純度を高めることができたと考えられる。

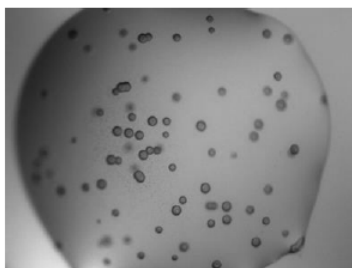
得られた高純度のタンパク溶液と結晶化スクリーニングキット PEG/Ion (Hampton Research社)および Wizard (株式会社リガク)を用いて結晶化条件の探索を行った。結果として有力な2つの条件が得られた(図④,⑤)。

この条件をもとにハンギングドロップ法で沈殿剤濃度、塩濃度、pH等の条件を段階的に振った結晶化プレートを作成した。いくつかの結晶が得られ、結晶のSDS-PAGEにより、PepOであることを確認した。しかし、いずれもきれいな単結晶とは言えず、この結晶が成長して大きくなったとしても、高分解能での回折データ収集は難しいと考えられる。よって、現在ハンギングドロップ法によって沈殿剤濃度、塩濃度、pH等の条件を段階的に振り、最適な結晶化条件の検索を行っている。

図③：ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出フラクションと溶出濃度

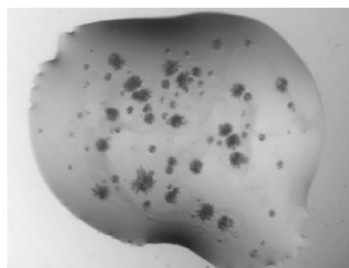


図④ : PEG/Ion



< PEG/Ion > PEG, NiCl₂, MgCl₂

図⑤ : Wizard



< Wizard > PEG, Zinc acetate

【今後の研究計画】PepO については最適な結晶化条件の探索を進め、まずは単体での良質な単結晶をつくりだす。そして、Spring-8 の高輝度 X 線による X 線結晶構造解析を行い、決定された構造を PDB に登録する。相互作用解析も同時並行で行い、結合する宿主分子を同定する。また、複合体での結晶化を試み、成功した場合、複合体での構造決定を行う。

A 群レンサ球菌の病原因子について構造生物学的な視点から解明をし、Protein Data Bank (PDB) に登録し、全世界に公開する。これによって、将来的には Structure Based Drug Design (SBDD) に役立てることができ、A 群レンサ球菌の病原因子をターゲットに創薬を行う際の基盤となりうると考えられる。

A 群レンサ球菌の他の立体構造未決定である病原因子、ヒアルロン酸分解酵素 HylA, フィブロンクチン結合タンパク FbaA, FbaB についても PepO 同様の戦略で解析を進める。