

Title	毒素原性大腸菌の腸管定着における構造基盤の解析
Author(s)	深草, 俊輔
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60070
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	深 草 俊 輔
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学位記番号	第 25960 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	毒素原性大腸菌の腸管定着における構造基盤の解析
論文審査委員	(主査) 教授 大久保 忠恭 (副査) 教授 宇野 公之 教授 小比賀 聡 教授 高木 達也

論文内容の要旨

毒素原性大腸菌 (ETEC) はコレラ様の下痢を引き起こす。このETECの病原性発現には、腸上皮細胞への定着が必須であり、定着因子がその役割を担う。中でもCFA/IIIはIV型線毛に分類される線毛を形成する定着因子である。CFA/IIIは機能解析の進んでいるCFA/Iなどの他のETECの腸管定着因子とは異なった線毛形成、定着機序を持ち、未だその詳細は解明されていない。

これまでの研究からCFA/IIIを構成する蛋白質群の中でも分泌蛋白質CofJと線毛形成因子CofA, CofBが腸管定着機構に必要と考えられている。CofAは線毛の主要構成サブユニットとして線毛構造を形成する一方、CofBのCFA/III線毛における役割はこれまで不明であった。また、分泌されたCofJはCFA/III線毛と相互作用し付着装置を形成して、腸管上皮細胞上に存在する未知のレセプターとの結合を担うと推測されている。従ってCFA/IIIの腸管定着機構を分子レベルで解明するためには線毛及びCofJについて構造生物学的観点からの解明が必要であると考えられる。そこで本研究ではCofJと線毛形成蛋白質であるCofA, CofBの三種の蛋白質について立体構造、相互作用、会合状態の解析により、付着機構のモデル構築に取り組んだ。これらの情報はCFA/IIIの腸管定着能の解明に必要なのみならず、ETECに対する効果的なワクチンおよび治療薬の開発に役立つことが期待される。

腸管付着因子CofJは大腸菌発現系で大量発現、精製し、PEG3350と酢酸カルシウムを含む条件で結晶化に成功した。また、ソーキング法によりジスプロシウムを結晶に導入し、単波長異常分散(SAD)法による位相決定を行った。収集したデータセットから分解能2.0 ÅでCofJの結晶構造を決定した。さらに超遠心分析機を用いた沈降速度法による分子量分布の測定を行い、CofJはほぼ単量体で存在している事が明らかとなった。

CofJ単量体の立体構造はβサンドイッチ構造を基本として、その上下にループ領域が存在する構造であった。この構造を元に立体構造検索を行ったが、類似構造は発見できず、新規構造であることが明らかとなった。CofJ分子表面について調べたところ、βサンドイッチ構造上部のループ上に6残基のチロシンが溶媒に露出していることを見出した。一方、βサンドイッチ構造下部のループ領域表面には疎水性表面が存在し、結晶中では他のCofJ分子と疎水性相互作用を行っていた。これらの構造的に特徴のある分子表面領域のいずれかが線毛や受容体との相互作用に関わる事が予想される。

CofAはCFA/III線毛を主に形成し、N末端に相同性の高い疎水性領域を持つ。このため、N末端疎水性領域を欠損したコンストラクトを作成し、大腸菌発現系で大量発現、精製したところ、結晶化に適した溶解度のCofAが得られた。PEG4000を用いた結晶化条件で単結晶を得た。最高分解能0.9 Åのデータセットを収集することができ、結晶構造はCofA中に存在している硫黄原子を用いたSAD法により決定した。

これまでに立体構造決定された線毛形成蛋白質との比較から、CofAの立体構造はコレラ菌由来のTcpAに

類似しており、IV型線毛サブユニットに共通してみられる構造的特徴を保持していた。そこで既存のTcpAフィラメントモデルをベースにCofA線毛のモデル構築を行い、サブユニット間衝突のないCofAフィラメントモデルを構築した。このCofAフィラメントモデルの直径は約80 Åと、電子顕微鏡写真からの値70 Åとほぼ同等であった。TcpAで報告されているサブユニット間相互作用がCofAフィラメントモデルにも発見された一方、フィラメントモデル表面の電荷について比較したところCofAはTcpAと異なり全体的に陰性の電荷を帯びていた。これらの事からCFA/III線毛はTcpA線毛と同じ様式で線毛を形成している一方、線毛表面の電荷分布等は全く異なった様相を示しており、TcpA線毛と異なる様式で腸管に付着すると推定された。

CofBもまた線毛構成サブユニットであり、CofAと同様にN末端疎水性領域を切断したコンストラクトを作成し、大腸菌発現系を用いて大量発現、精製し、酢酸ナトリウムを主成分とする結晶化条件において単結晶を得た。CofBの野生型結晶はX線回折測定において約1.9 Åの最高分解能を示した。構造決定にはCofBセレンメチオニン誘導体結晶を使用し、セレン原子を用いたSAD法によりCofBの立体構造を決定した。

得られたCofB結晶構造は3ドメイン構造であり、N末端のドメインはCofAと類似した立体構造であることから、このドメインで線毛に組み込まれるものと考えられた。一方、残りのドメインにはジスルフィド結合が存在し、βシートを基本とした構造を取っていた。CofBの結晶構造は単量体で得られたが、超遠心分析により溶液中では三量体であった。そこで、結晶構造中において三量体の探索を行ったところ、三回対称軸に沿ったCofB三量体構造を得ることができた。このCofB三量体構造は中央のドメインが各分子間で相互にβシートの交換を起こしておりこれがCofB三量体化をより安定かつ強固なものにしていると考えられる。このCofB三量体は、分子モデリングにより線毛先端に組み込むことができたことから、CofB三量体は線毛のキャップ部分として機能することが示唆された。

さらにCofJと相互作用が予想される線毛形成蛋白質CofAとCofBについてプルダウンアッセイを行ったところ、CofJはCofBと相互作用する結果が得られた。そこで、CofB-CofJ複合体の精製を行ったところ、安定な複合体を精製することが出来た。この複合体について超遠心分析沈降速度法を用いてその分子量分布を解析したところ、単分散であり、算出分子量からCofBとCofJは1:1若しくは1:2で結合していると考えられた。すなわち、CofJはCofBと複合体を形成し、複体内においてCofBは単量体で存在することが明らかとなった。このため、CofBは三量体で線毛先端に組み込まれる他、単量体で線毛途中に組み込まれる可能性が考えられた。単量体をCofAフィラメント途中に組み込んだモデルの構築にも無理なく成功した。

これらの情報を総合し、CofBは三量体となり主にCofAから構成される線毛の形成開始に働くとともに、単量体として線毛途中に組み込まれ、CofJと結合することで付着機能を発揮するというCFA/IIIの定着機構モデルを提案した。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli* : ETEC) の腸管定着における構造基盤の解析研究のために、腸管定着に必須のタンパク質CofA, CofB, CofJの発現・精製を行い、生物物理学的及び構造生物学的研究手法を駆使して3種類のタンパク質の立体構造決定と相互作用解析を行い、ETECの腸管定着機構を解明した。ETECは発展途上国で深刻な問題となっている乳幼児下痢症の主要因であり、腸管定着因子群CFA/IIIに属するタンパク質CofA, CofBにより菌体上に線毛を形成して腸管上皮細胞へ付着して定着し病原性を発現している。一方、線毛形成には関与しない分泌タンパク質CofJもCofA, CofBと同様に腸管付着能の発現に必須であることが報告されていた。しかし、これらタンパク質の立体構造及び線毛形成と腸管付着における役割は明らかにされていなかったため、申請者はCofA, CofB, CofJの大量発現系を構築し結晶化可能な純度のタンパク質精製を行った。難溶性のCofA, CofBのN末端部位に存在する疎水性領域を切断したコンストラクトを作成して溶解性を向上させ、位相決定のため硫黄、セレンやジスプロシウム原子を用いたSAD法を利用する等の工夫を行いCofA (分解能0.9 Å), CofB (分解能2.0 Å), CofJ (分解能2.0 Å) の高分解能で立体構造を決定することに初めて成功した。さらに、CofAの立体構造から対称操作、エネルギー最小化を行うことで直径80 ÅのETEC線毛モデルの構築を行った。また、CofBの立体構造から線毛の先端部に3量体で存在する可能性と線毛中間部に取り込まれたときにCofB分子の2/3が線毛より飛び出す可能性が示された。CofJの立体構造はこれまでに報告されていない新規のフォールディングであることが明らかにされた。電気泳動及び分析超遠心の結果からCofBとCofJが結合することがわかり、

ETECの腸管定着機構のモデルを初めて提案した。

上記成果はETECの腸管定着機構の解明と深刻な下痢感染症に対して腸管定着を阻害する新規医薬品の開発に関して有用な知見を与えるものであると考えられ博士（薬学）の学位論文として相応しいものと認める。