The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	定着阻害剤の開発に向けた腸管毒素原性大腸菌の定着機構の解明
Author(s)	沖, 大也
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72305
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　沖　大也　）	
論文題名	定着阻害剤の開発に向けた腸管毒素原性大腸菌の定着機構の解明

論文内容の要旨

腸管毒素原性大腸菌（Enterotoxigenic *Escherichia coli*：ETEC）は、発展途上国で生活する人々や旅行者の深刻な下痢症の原因菌であり、世界中で年間約4億人が感染し、約40万人が死亡すると推定されている。ETECは定着因子（Colonization Factors ： CFs）の働きにより小腸上皮細胞に付着すると、バイオフィルムやマイクロコロニーなどを形成して定着し、毒素を産生する。これらの定着過程は、腸管を標的とする病原性細菌にとって最も重要な感染過程であり、有望な創薬標的と考えられるため、ETECだけでなく他の病原性細菌においても活発に研究が行われている。病原性細菌特有の腸管定着機構が分子レベルで明らかになれば、宿主常在菌に影響を与えず、病原性細菌のみを選択的に排除する様な化合物を設計することができ、さらに、病原性細菌に対して耐性菌を生み出すような選択圧をかけない新規治療法の開発にもつながる可能性がある。

大阪空港の検疫で発見されたETEC 31-10株が保有するCFである定着因子抗原III（Colonization factor antigen/III：CFA/III）は、14種類の遺伝子からなる*cof*オペロンから構築される線毛性CFである。CFA/IIIは、線毛の大部分を構成するメジャーピリンCofAと少数発現するマイナーピリンCofBからなるIV型線毛を菌体表面に形成する。近年、申請者らはCofAおよびCofBの立体構造決定に成功し、CofBの特徴的な三量体構造がCofAからなるCFA/III線毛の先端部に位置し、線毛形成に関わることを報告した。さらにCofBはC末端にH型レクチンドメインを有するものの、現在までに糖鎖との結合は報告されておらず、より詳細な機能解明が必要であった。一方で、CFA/IIIが*cof*オペロンにコードされている分泌タンパク質CofJの菌体外への分泌に関与する報告例もあり、CFA/IIIの具体的な機能については、未だ統一的な見解が得られていない。

本学位論文において、申請者は先ず分泌タンパク質CofJの機能解析を行った。遺伝子欠損株を用いたCaco-2細胞への付着実験、透過型電子顕微鏡による菌体表面構造の観察、さらにウエスタンブロッティングによる分泌タンパク質CofJの検出を行い、ETECの腸管定着には、菌体表面におけるCFA/III線毛の形成と菌体外へのCofJの分泌の両方が必要であることを明らかとした。この知見に基づき、分泌されたCofJとCFA/III線毛との相互作用がETECの腸管定着過程において重要であると仮説を立て、アフィニティカラムを用いたプルダウンアッセイと等温滴定型熱量測定により、CofJと2種類の線毛構成タンパク質との相互作用解析を行った。実験の結果、CofJは線毛の大部分を構成するCofAとは全く結合せず、線毛先端部に存在するCofBと相互作用することが明らかになった。また、CofJの結晶構造中において可動性が高いと予想されたN末端の24残基が結合に不可欠であることを明らかとした。CofJのN末端領域24残基とCofBとの相互作用の詳細を解明するために、合成したN末端領域のペプチド（CofJ（1-24））とCofBを混合し、共結晶化を行った。得られた結晶について大型放射光施設SPring-8において回折実験を行い、最終的に最高分解能3.52ÅのCofJ(1-24)-CofB複合体構造の決定に成功した。構造解析の結果、CofJ(1-24)のSer5からPro15までの領域が、CofBのC末端ドメインの各三量体界面に疎水性相互作用と水素結合を介して特異的に結合することが明らかとなった。驚くべきことに、CofJ（1-24）の結合部位は、前述したCofBのH型レクチンドメインの糖認識領域と一致していた。従って、CofBはC末端のH型レクチンドメインを分泌タンパク質との結合という異なる目的のために利用していることが示唆された。さらに、溶液中におけるCofJとCofBの会合状態を決定するために超遠心分析法による解析を行った結果、CofJ単量体がCofB三量体の上方に位置するCofJ-CFA/III線毛複合体構造のモデル構築をするに至った。

構築したCofJ-CFA/III線毛複合体モデルにおいて、CofJは線毛先端部のCofBの更に上方に存在しており、CofJがCFA/III依存的に菌体外に分泌される実験結果とも矛盾せず、さらに、腸上皮細胞との相互作用に直接関与することが示唆された。この仮説は、精製したCofJが*cofJ*遺伝子欠損株のCaco-2細胞への付着率を有意に回復させた結果に加えて、抗CofJポリクローナル抗体のFab断片がCFA/III発現株のCaco-2細胞への付着を顕著に阻害する結果により実証された。また、CofJ-CFA/III線毛モデルにおけるCofJのN末端相互作用領域の反対側には、チロシン残基が

密集した領域が存在することが明らかとなった。芳香族アミノ酸クラスターの存在は、CofJと構造類似性のある膜孔形成毒素において共通しており、脂質の親水性頭部を認識する多価脂質結合サイトとして機能することが示唆されていることから、当該チロシン残基の変異株を作製し、付着実験を行った結果、Caco-2細胞への付着率が大きく減少した。CofJの脂質に対する結合能は、腸上皮細胞への初期付着を成立させるための場所を確保し、その後のマイクロコロニー形成や他の腸内細菌との競合において、ETECに有利な条件を提供するという生存戦略の一つであると考察できる。さらに、CofBのC末端ドメインのアミノ酸配列を用いてBLAST検索を行った結果、薬剤耐性菌として問題となる多数の腸内細菌がCofBと同様のマイナーピリンを保有していることが示唆された。これらの腸内細菌においても、線毛先端部のマイナーピリンが、それぞれに対応した分泌タンパク質と相互作用をすることで、ヒト宿主の腸上皮細胞に付着、増殖し、病原性を発現している可能性がある。

本研究から明らかになったETECの付着機構に基づき、マイナーピリンCofBと分泌タンパク質CofJの相互作用を効果的に阻害するようなペプチドを設計し、細胞実験により、阻害能を検証した。その結果、CofJのCofBとの相互作用領域を含み、三本鎖コイルドコイル構造を形成するGCN4タグにより三量体化したペプチドが、CFA/III発現株の腸上皮細胞への付着を顕著に抑制することが明らかになった。この実験結果から、三量体化ペプチドはETECに対する有望な定着阻害剤候補と考えられた。

以上、本研究から得られた知見は、ETECを含む腸管病原性細菌に対する効果的な予防および治療法確立へ向けた基盤情報として役立つことが期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　沖　大也　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	大久保　忠恭
	副 査　教授	小比賀　聡
	副 査　教授	西野　邦彦

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は、定着阻害剤の開発に向けた腸管毒素原性大腸菌（Enterotoxigenic *Escherichia coli* : ETEC）の定着機構の解明を行うために、主にX線結晶構造解析法を用いてETECの腸管定着に関与するタンパク質の立体構造を決定し、付着機構のモデルを提案した。ETECは、発展途上国で生活する人々や旅行者の深刻な下痢症の原因菌であり、世界中で年間約4億人が感染し、約40万人が死亡すると推定されている。ETECは定着因子（Colonization Factors : CFs）の働きにより小腸上皮細胞に付着すると、バイオフィルムやマイクロコロニーなどを形成して定着し、毒素を産生する。これらの定着過程は、腸管を標的とする病原性細菌にとって最も重要な感染過程であり、有望な創薬標的と考えられるため、ETECだけでなく他の病原性細菌においても活発に研究が行われている。病原性細菌特有の腸管定着機構が分子レベルで明らかになれば、宿主常在菌に影響を与えず、病原性細菌のみを選択的に排除する様な化合物を設計することができ、さらに、病原性細菌に対して耐性菌を生み出すような選択圧をかけない新規治療法の開発にもつながる可能性がある。 大阪空港の検疫で発見されたETEC　31-10株が保有するCFである定着因子抗原III（Colonization　factor antigen/III：CFA/III）は、14種類の遺伝子からなるcofオペロンから構築される線毛性CFである。CFA/IIIは、線毛の大部分を構成するメジャーピリンCofAと少数発現するマイナーピリンCofBからなるIV型線毛を菌体表面に形成する。近年、申請者らはCofAおよびCofBの立体構造決定に成功し、CofBの特徴的な三量体構造がCofAからなるCFA/III線毛の先端部に位置し、線毛形成に関わることを報告した。さらにCofBはC末端にH型レクチンドメインを有するものの、現在までに糖鎖との結合は報告されておらず、より詳細な機能解明が必要であった。一方で、CFA/IIIがcofオペロンにコードされている分泌タンパク質CofJの菌体外への分泌に関与する報告例もあり、CFA/IIIの具体的な機能については、未だ統一的な見解が得られていない。

申請者は先ず分泌タンパク質CofJの機能解析を行った。遺伝子欠損株を用いたCaco-2細胞への付着実験、透過型電子顕微鏡による菌体表面構造の観察、さらにウエスタンブロッティングによる分泌タンパク質CofJの検出を行い、ETECの腸管定着には、菌体表面におけるCFA/III線毛の形成と菌体外へのCofJの分泌の両方が必要であることを明らかとした。この知見に基づき、分泌されたCofJとCFA/III線毛との相互作用がETECの腸管定着過程において重要であると仮説を立て、アフィニティカラムを用いたプルダウンアッセイと等温滴定型熱量測定により、CofJと2種類の線毛構成タンパク質との相互作用解析を行った。実験の結果、CofJは線毛の大部分を構成するCofAとは全く結合せず、線毛先端部に存在するCofBと相互作用することが明らかになった。また、CofJの結晶構造中において可動性が高いと予想されたN末端の24残基が結合に不可欠であることを明らかとした。CofJのN末端領域24残基とCofBとの相互作用の詳細を解明するために、合成したN末端領域のペプチド（CofJ（1-24））とCofBを混合し、共結晶化を行った。得られた結晶について大型放射光施設SPring-8において回折実験を行い、最終的に最高分解能3.52ÅのCofJ(1-24)-CofB複合体構造の決定に成功した。構造解析の結果、CofJ(1-24)のSer5からPro15までの領域が、CofBのC末端ドメインの各三量体界面に疎水性相互作用と水素結合を介して特異的に結合することが明らかとなった。驚くべきことに、CofJ（1-24）の結合部位は、前述したCofBのH型レクチンドメインの糖認識領域と一致していた。従って、CofBはC末端のH型レクチンドメインを分泌タンパク質との結合という異なる目的のために利用していることが示唆された。さらに、溶液中におけるCofJとCofBの会合状態を決定するために超遠心分析法による解析を行った結果、CofJ単量体がCofB三量体の上方に位置するCofJ-CFA/III線毛複合体構造のモデル構築をするに至った。

構築したCofJ-CFA/III線毛複合体モデルにおいて、CofJは線毛先端部のCofBの更に上方に存在しており、CofJがCFA/III

依存的に菌体外に分泌される実験結果とも矛盾せず、さらに、腸上皮細胞との相互作用に直接関与することが示唆された。この仮説は、精製したCofJがcofJ遺伝子欠損株のCaco-2細胞への付着率を有意に回復させた結果に加えて、抗CofJポリクローナル抗体のFab断片がCFA/III発現株のCaco-2細胞への付着を顕著に阻害する結果により実証された。また、CofJ-CFA/III線毛モデルにおけるCofJのN末端相互作用領域の反対側には、チロシン残基が密集した領域が存在することが明らかとなった。芳香族アミノ酸クラスターの存在は、CofJと構造類似性のある膜孔形成毒素において共通しており、脂質の親水性頭部を認識する多価脂質結合サイトとして機能することが示唆されていることから、当該チロシン残基の変異株を作製し、付着実験を行った結果、Caco-2細胞への付着率が大きく減少した。CofJの脂質に対する結合能は、腸上皮細胞への初期付着を成立させるための場所を確保し、その後のマイクロコロニー形成や他の腸内細菌との競合において、ETECに有利な条件を提供するという生存戦略の一つであると考察できる。さらに、CofBのC末端ドメインのアミノ酸配列を用いてBLAST検索を行った結果、薬剤耐性菌として問題となる多数の腸内細菌がCofBと同様のマイナーピリンを保有していることが示唆された。これらの腸内細菌においても、線毛先端部のマイナーピリンが、それぞれに対応した分泌タンパク質と相互作用をすることで、ヒト宿主の腸上皮細胞に付着、増殖し、病原性を発現している可能性がある。

本研究から明らかになったETECの付着機構に基づき、マイナーピリンCofBと分泌タンパク質CofJの相互作用を効果的に阻害するようなペプチドを設計し、細胞実験により、阻害能を検証した。その結果、CofJのCofBとの相互作用領域を含み、三本鎖コイルドコイル構造を形成するGCN4タグにより三量体化したペプチドが、CFA/III発現株の腸上皮細胞への付着を顕著に抑制することが明らかになった。この実験結果から、三量体化ペプチドはETECに対する有望な定着阻害剤候補と考えられた。

以上、本研究から得られた知見は、ETECを含む腸管病原性細菌に対する効果的な予防および治療法確立へ資するものであり、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。