



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

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

高分子化学分野

学位申請者 沖 大也

目次

序論.....	2
本論.....	4
第一章 腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 由来分泌タンパク質 CofJ の機能解析...8	
第一節 背景.....	8
第二節 結果と考察.....	9
第二章 分泌タンパク質 CofJ を介した IV 型線毛の付着機構の解明.....28	
第一節 背景.....	28
第二節 結果と考察.....	28
第三章 腸管毒素原性大腸菌の定着阻害ペプチドの設計.....41	
第一節 背景.....	41
第二節 結果と考察.....	43
結語.....	51
謝辞.....	52
実験の部.....	53
第一章の実験.....	53
第二章の実験.....	59
第三章の実験.....	61
参考文献.....	64
主論文.....	68

序論

腸管毒性を有する病原性細菌の一種である腸管毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*: ETEC)は、水や食物を介してヒト消化管に侵入、増殖し、産生する易熱性腸管毒素(heat-labile enterotoxin: LT)又は耐熱性腸管毒素(heat-stable enterotoxin: ST)によってコレラ様の下痢を引き起こす (1)。ETEC による感染症は、発展途上国で生活する人々やその地域を訪れる旅行者の間で深刻な問題となっており、世界保健機関 (WHO) の統計によれば、世界中で年間約 4 億人が感染し、5 歳以下の乳幼児を中心として約 40 万人が死亡すると推定されている (2)。ETEC の感染メカニズムの解明と感染予防法の開発は喫緊の課題であるが、これまでに有効なワクチンや治療薬は開発されていない。現状では、水分補給による対症療法や抗生物質などによる治療が主であり、いずれの場合も高齢者や乳幼児に効果的ではなく、また抗生物質を用いた治療の場合、常在菌を含む腸内細菌叢の攪乱や耐性菌の出現なども問題になっている (3)。

ETEC は病原性を発現するための第一段階として、宿主の小腸上皮細胞へ付着する必要があるため、その為の定着因子 (Colonization Factors : CFs) を保有している。これまでに定着因子抗原 1 (CFA/I)、大腸菌表面抗原 1 (CS1) など 25 種類以上の CFs が報告されており (表 1)、それらの大部分が線毛性の定着因子である (4)。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 (5)。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。

ETEC が保有する定着因子は、定着因子 CFA/I に代表され、クラス 5 型に属するシャペロン・アッシャー(chaperone-usher : CU)経路により形成される線毛と、定着因子 CFA/III (CS8) や Longus (CS21) に代表される IV 型に属する線毛とに大別される (表 1)、ETEC の菌株は各々 1~3 種類の定着因子を保有していることが明らかになっている (6)。CU 経路により形成される線毛はよく研究されており、外膜のアッシャー (usher) タンパク質が、シャペロン (chaperone) タンパク質と結合したピリン

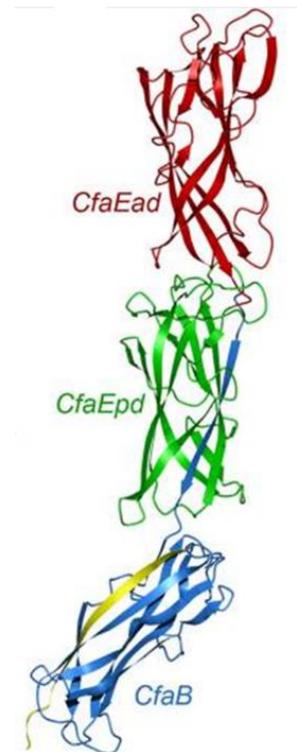


図 1 CFA/I 由来 CfaE-CfaB 融合タンパク質の結晶構造

マイナーピリン CfaE は、アドヘシン (CfaEad) とピリン (CfaEpd) ドメインからなり、メジャーピリン CfaB と β ストランド交換反応により重合する (12)。

と呼ばれる線毛サブユニットを順次会合させ、線毛の組み立てと菌体表面への運搬をすることで形成される (7)。この種の線毛は、マイナーピリンが線毛先端部に位置する特徴的な構造を採っており、線毛中の各ピリンサブユニットは、“ドナー-ストランド交換”と呼ばれる機構により、それぞれのサブユニットが N 末端に突き出た 1 本の β ストランドを続くサブユニットの β シートの一部にはめ込むことによって互いに連結される (図 1)。

少数のみ発現し、CU 経路により形成された線毛の先端部に位置するマイナーピリン (minor pilin) は、アドヘシンとしても機能することが知られ (4)、定着因子 CFA/I のマイナーピリン CfaE に代表されるように (図 1)、多くの場合 N 末端に C 型レクチンドメインを有する 2 つの Ig 様ドメインを形成する。線毛先端部の C 型レクチンドメインにおいて、糖鎖コンジュゲートまたはスフィンゴ糖脂質などの糖鎖部分を認識することが一般的であるため、この種の線毛は、ETEC の感染過程に広く共通している糖鎖を介した宿主-病原体間の相互作用に関与していると考えられている (8-11)。

表 1 ETEC が保有する定着因子

Colonization factor	Assembly class	FUP clade	Morphology	Colonization factor	Assembly class	FUP clade	Morphology
CFA/I	CU	α	Fimbrial	CS13	CU	κ	Fibrillar
CS1	CU	α	Fimbrial	CS23	CU	κ	Afimbrial
CS2	CU	α	Fimbrial	CS7	CU	U	Helical
CS4	CU	α	Fimbrial	CS20	CU	U	Fimbrial
CS5	CU	α	Helical	CS22	CU	U	Fibrillar
CS14	CU	α	Fimbrial	CS15	CU	U	Afimbrial
CS17	CU	α	Fimbrial	CS26	CU	U	Fimbrial
CS19	CU	α	Fimbrial	CS30	CU	U	Fimbrial
PCFO71	CU	α	Fimbrial	CS8(CFA/III)	Type IV	NA	Fimbrial
CS12	CU	$\gamma 2$	Fimbrial	CS21(longus)	Type IV	NA	Fimbrial
CS18	CU	$\gamma 2$	Fimbrial	CS11	U	NA	Fibrillar
CS3	CU	$\gamma 3$	Fibrillar	CS10	U	NA	Afimbrial
CS6	CU	$\gamma 3$	Afimbrial				

CU: chaperone-usher, NA: not applicable, U: unknown, Type IV: IV型線毛
 Fimbrial: 直径5-7 nmの固い線毛, Fibrillar: 直径2-3 nmの柔軟な線毛,
 Helical: 2本の繊維状構造が依り合わり形成する直径3.5-6.5 nmの螺旋構造
 Afimbrial: 電子顕微鏡で観察できない線毛

表 1 から明らかなように、ETEC が保有する 25 種類の線毛性 CFs の大部分は CU 経路により線毛を形成するが、CFA/III や Longus など一部の CFs は IV 型に分類される線毛を形成する (図 2)。IV 型線毛は、細菌の定着、細胞表面上の移動、バイオフィーム形成、細胞

接着、自己集合、そして DNA の取り込みを含む様々な機能に関与しており、それぞれの遺伝子配座やピリンサブユニットの分子量などからさらに IVa 型、IVb 型、IVc 型に大別され、CFA/III や Longus はどちらも IVb 型線毛に分類される (14)。

IVb 型に分類される線毛には、ETEC の他にも、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) の毒素共発現線毛 (toxin-coregulated pilus: TCP)、シトロバクター・ローデンチウム菌 (*Citrobacter rodentium*) の定着因子シトロバクター (colonization factor *Citrobacter*: CFC)、腸管病原性大腸菌 (*Enteropathogenic E. coli*: EPEC) に発現する束状線毛 (bundle-forming pilus: BFP) などがあり、それぞれ組織定着やバイオフィーム形成などに関わっている (15-17)。

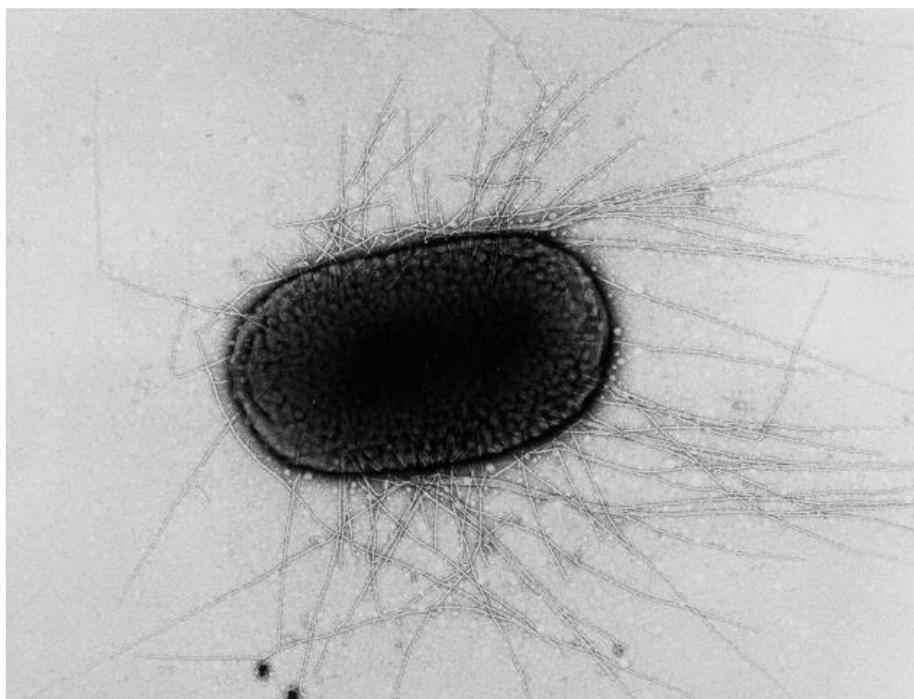


図 2 ETEC-CFA/III 産生株と IV 型線毛

透過型電子顕微鏡像、細い線毛が菌体の周囲に観察される。

IV 型線毛と CU 経路により形成されるクラス 5 型線毛は、線毛を構成するピリンの立体構造や、線毛形成機構が大きく異なっていることから、未だ詳細は理解が進んでいないが、腸管定着における機能も異なる可能性がある。特に、大阪空港の検疫で発見された ETEC 31-10 株は (図 2)、定着因子として、CFA/III を発現するが、他の定着因子と異なり糖鎖との結合による赤血球凝集反応を起こさない特徴を有する (18)。遺伝学的解析の結果、ETEC 31-10 株は、定着因子 CFA/III をプラスミドの形で保有していることが特定され (18)、*cofA*, *cofB*, *cofC*, *cofD*, *cofE*, *cofF*, *cofG*, *cofH*, *cofI*, *cofJ*, *cofP*, *cofR*, *cofS*, *cofT* の 14 種類の遺伝子から構成される *cof* オペロンにコードされた各タンパク質の働きで産生されることが示された。これまでに、アミノ酸配列の相同性やシグナルペプチドの配列情報などから、*cof* オペロンにコードされた各タンパク質の機能や局在が推定されているが (図 3) (19)、近年の立体構造解析の結果などからそれぞれのタンパク質のより詳細な機能が明らかになってきている。



- cofR, S* : 転写制御タンパク質
- cofA* : メジャーピリン (major pilin)
- cofB* : マイナーピリン (minor pilin)
- cofC, D, G* : 外膜タンパク質
- cofE, F, I* : 内膜タンパク質
- cofH* : ATPase
- cofJ* : 分泌タンパク質
- cofP* : Prepilin peptidase
- cofT* : 機能未知タンパク質

図3 Cof オペロンの構造と産生蛋白質の機能、局在

CofA は CFA/III 線毛を主に構成するサブユニット (メジャーピリン: major pilin) であり、アミノ酸配列の N 末端に IV 型線毛特有の疎水性領域を保有する (20)。CofB は CofA 同様に N 末端の疎水性領域を持つが線毛の主要構成因子ではないマイナーピリンである (21)。最近我々は、メジャーピリン CofA の球状ドメインが左巻き 3-start helix 構造を採るフィラメントモデルを提唱した (図 4)。得られたフィラメントモデルは 1 巻き (360°) 当たり 6 個の CofA サブユニットが左巻き螺旋状に並んだものが 3 本束なった構造を形成しており、一周当たり 18 個の CofA サブユニットから構成され、表面電荷は負に帯電していた (図 4)。

一方、マイナーピリン CofB は、X 線単結晶構造解析や超遠心分析の結果、ホモ三量体構造を形成することが明らかになり、メジャーピリン CofA から構成される線毛の先端部に位置することが報告された (21)。CofB の N 末端ドメインは、典型的な IV 型線毛の α/β -roll フォールドを形成しているのに対し、C 末端領域は 2 つの β ストランド豊富なドメインがドメインスワッピングを起こすことにより強固な三量体構造を形成していた。この三量体構造は、効率的に線毛を形成するための開始複合体の役割を担うことが、CofB を欠損させた大腸菌 CFA/III 産生株の線毛形成能が損なわれることから明らかとなった (図 5、図 6) (21)。三量体の形成開始複合体は、IV 型線毛だけでなく、IV 型線毛と進化的に関係のある II 型分泌システムにみられる疑似線毛システムにも保存されており (22)、病原性を増強させるための安定な線毛構造を効率的に形成するために進化した細菌の戦略であると考えられる。

また、線毛先端部において CofB の C 末端ドメインは H 型レクチンに分類されるタンパク質フォールドを形成しており、興味深いことに細胞性粘菌のキイロタマホコリカビ (*Dictyostelium discoideum*) が産生する H 型レクチンである Discoidin I の三量体構造と類似している (21)。H 型レクチンは、三量体の各分子会合面に保存された結合ポケットで N-アセチルガラクトサミン (N-acetylgalactosamine: GalNAc) 分子に結合することから、マイナーピリン CofB が小腸粘膜の糖鎖を標的とするレクチンとして機能する可能性が示唆された。しかしながら、現在までに CofB と糖鎖との結合は報告されておらず、ETEC 31-10 株が赤血球凝集反応を示さない過去の知見とも矛盾することから、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最近の報告例もあり (23)、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。

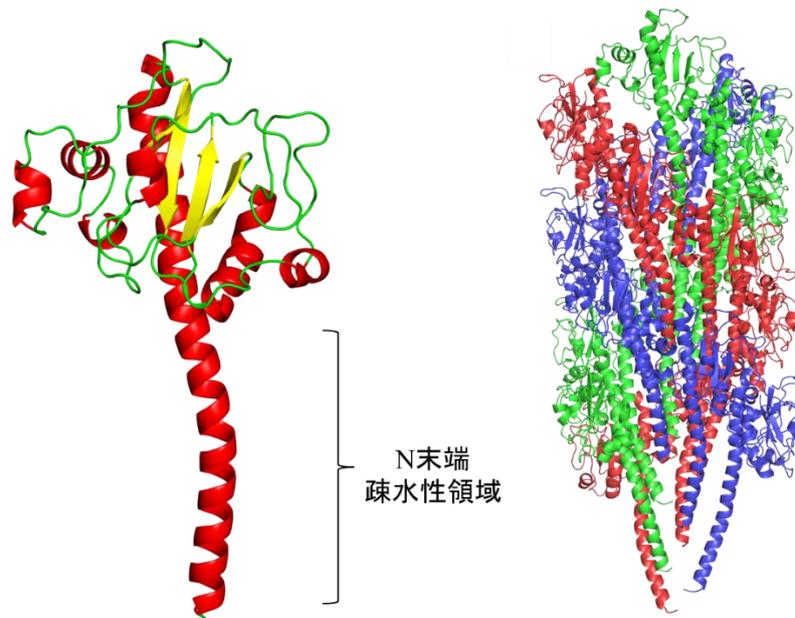


図4 CofA 結晶構造と CofA フィラメントモデル

(左図) CofA の結晶構造 (PDB code: 3VOR)。N 末端の疎水性ヘリックスはモデリングしている α ヘリックスを赤、 β ストランドを黄色、ループ構造を緑で表示している。

(右図) CofA フィラメントモデル。参考文献 (20) の図を改変している。

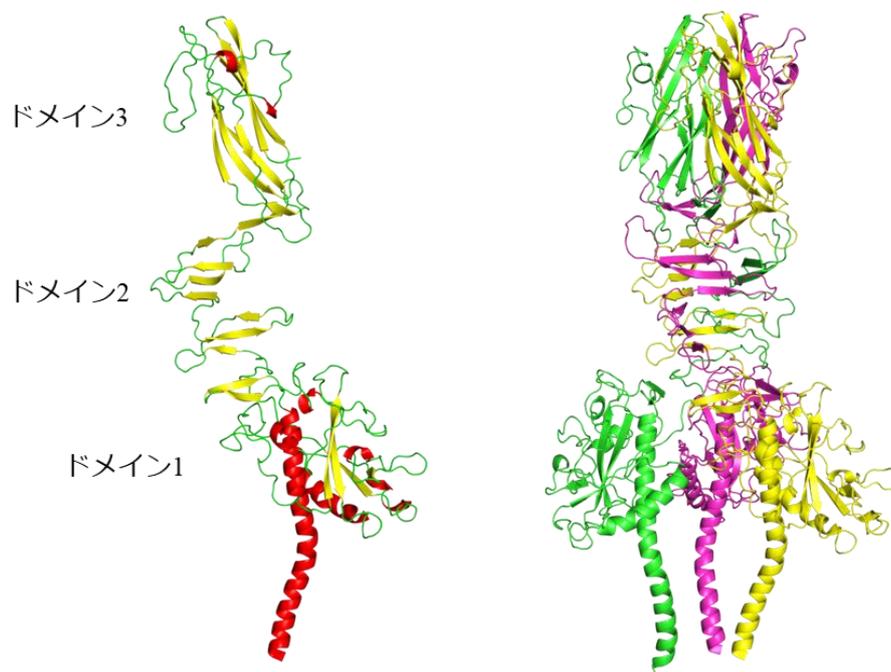


図5 CofB 結晶構造と CofB 三量体構造

(左) CofB の結晶構造 (PDB code: 5AX6)。N 末端の疎水性ヘリックスはモデリングしている。 α ヘリックスを赤、 β ストランドを黄色、ループ構造を緑で表示している。

(右) CofB の三量体構造

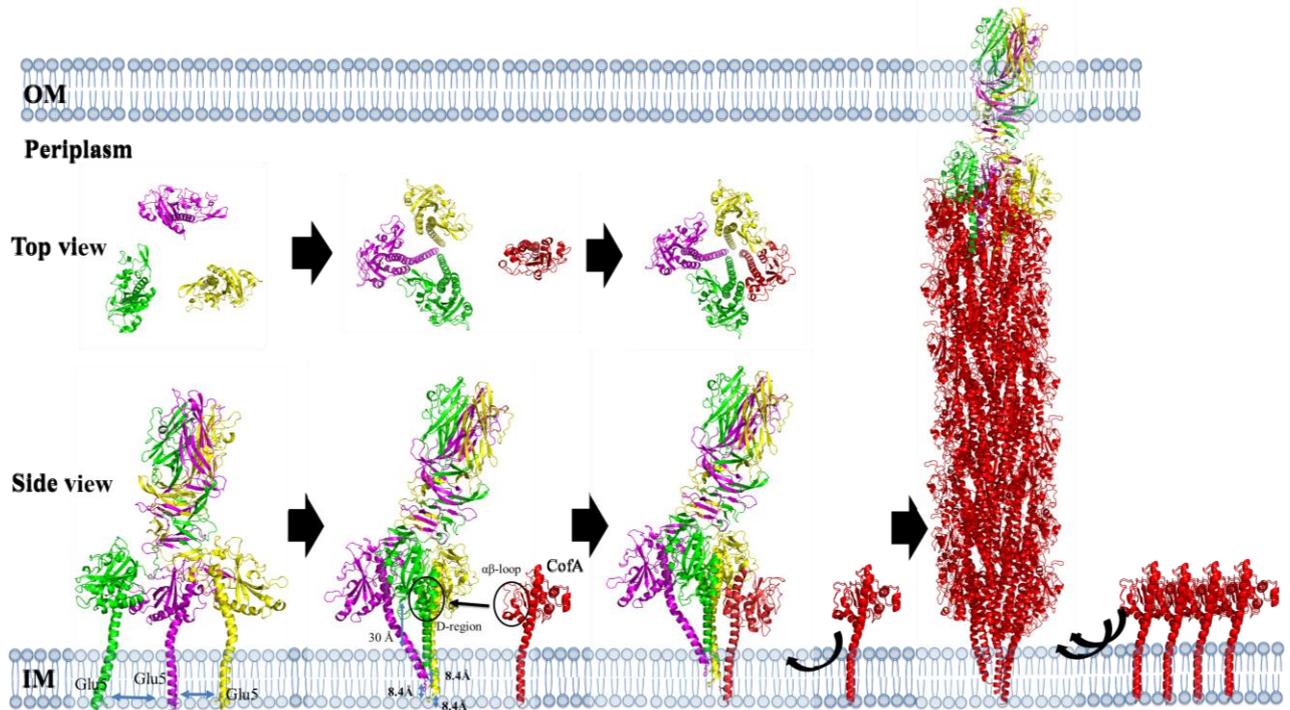


図6 CofBによる線毛形成開始機構のモデル

CofBのモデル構造(緑色、黄色、マゼンダ)。CofA(赤色)3分子のCofB分子はドメイン2,3の会合により三量体化する。上方から見た形成モデルも表示している。参考文献(21)の図を改変している。

本研究では、ETECの腸管定着におけるCFA/IIIの詳細な役割を理解するため、まずCFA/III線毛の糖鎖認識能を検証し、次にCFA/III線毛依存的に菌体外に分泌されるタンパク質CofJの機能解析を行った(第一章)。その結果、分泌タンパク質CofJが、ETECの標的細胞への付着に必須であることが明らかになり、さらに線毛の先端部に位置するマイナーピリンCofBのH型レクチンドメインと特異的に相互作用することが明らかになった。この結果から、ETECの腸管への定着には、IV型線毛だけでなく、線毛先端部に結合した分泌タンパク質も必要であることが明らかになった。続いて、ヒト結腸癌由来細胞を用いた細胞実験により、分泌タンパク質CofJが、CFA/III線毛と標的細胞との間に介在するETECの腸管付着機構を提唱した(第二章)。分泌タンパク質CofJは、マイナーピリンCofBとの結合領域の反対側に、チロシン残基に富む領域を有しており、変異実験の結果から、当該領域が標的細胞との相互作用に関与する可能性が示された。最後に、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(第三章)。その結果、CofJのCofBとの相互作用領域を含む三量体型のペプチドが、CFA/III産生大腸菌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。

本研究から得られる知見は、ETEC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。

本論

第一章 腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) 由来分泌タンパク質 CofJ の機能解析

第一節 背景

ETEC が菌体上に産生する CFA/III 線毛の先端部には H 型レクチンドメインを有するマイナーピリン CofB が存在する。CofB は、小腸上皮細胞表面の糖鎖と結合することで腸管への付着に関与することが予想されているが (21)、他の H 型レクチンファミリータンパク質に保存されている糖鎖認識サイトが長いループ構造に覆われており (図 7)、同様に糖鎖を認識するのか明らかではない。一方で、II 型分泌システムの疑似線毛と同様に、IV 型線毛がタンパク質の分泌に働く可能性が示唆されており、ETEC の CFA/III 線毛が同じく *cof* オペロンにコードされている分子量約 37 kDa のタンパク質 CofJ の分泌に関与することが指摘されている (23)。

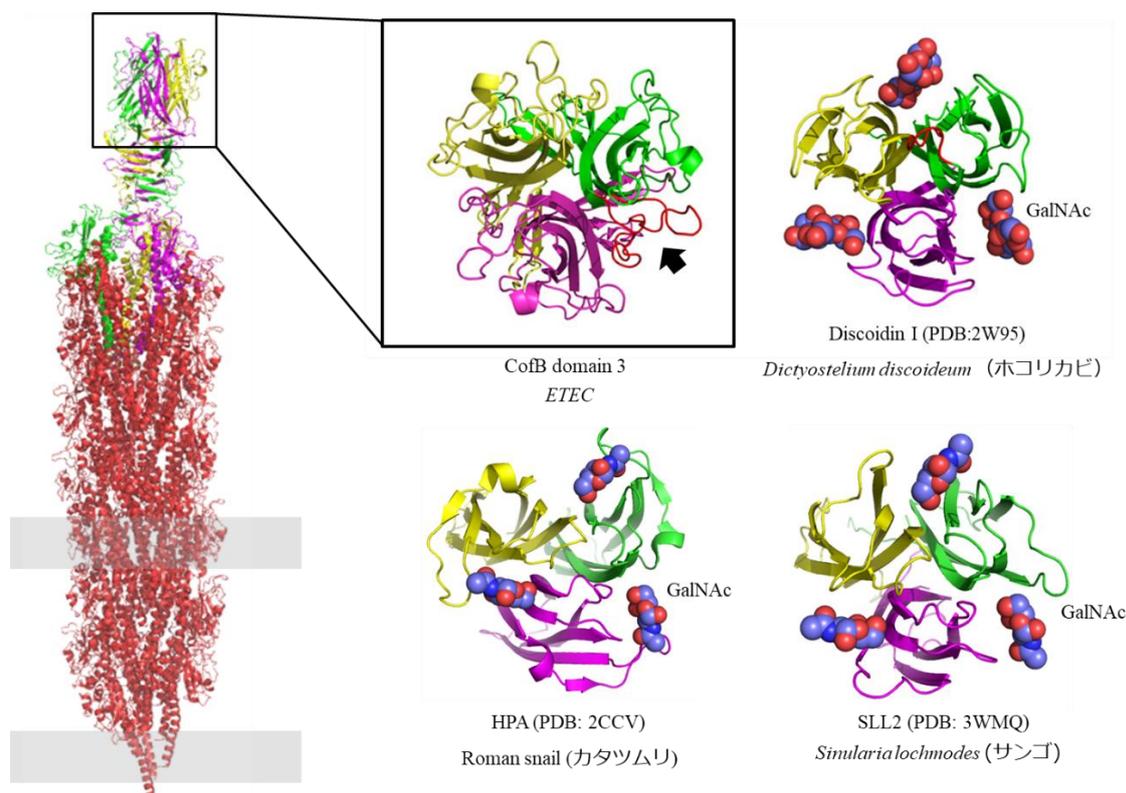


図 7 CFA/III 線毛の先端部に位置する CofB のドメイン 3 構造と他の H 型レクチンとの比較

黒矢印は糖結合サイトを覆っているループを示しており、当該ループは赤色で表示している。

Dictyostelium discoideum 由来 Discoidin I (PDB code: 2W95)、Roman snail 由来 HPA (PDB code: 2CCV)、*Sinularia lochnodes* 由来 SLL2 (PDB code: 3WMQ) を比較として表示している。

本章では、先ずマイナーピリン CofB の糖鎖結合能を等温滴定型熱量測定(isothermal titration calorimetry: ITC)により検証し、続いて、細胞実験、透過型電子顕微鏡像観察、相互作用解析により、ETEC の腸管定着における CFA/III 線毛と分泌タンパク質 CofJ の役割を検討した。

第二節 結果と考察

第一項 等温滴定型熱量測定による CofB と GalNAc の相互作用解析

マイナーピリン CofB の糖鎖結合能を検証するため、ITC により、H 型レクチンファミリータンパク質のリガンドである *N*-アセチルガラクトサミン(*N*-acetylgalactosamine: GalNAc) との結合実験を行った。その結果、結合に伴う熱量変化は観測されず (図 8)、他の H 型レクチンファミリータンパク質との立体構造比較からも推測されたように、CofB は GalNAc を認識しないことが示された。この結果から、CofB の H 型レクチンドメインは、ホモ三量体を形成することで線毛形成反応に関与するが、三量体界面を覆い隠す長いループ構造の影響のため、レクチンとしての機能は失われた可能性が示唆された。

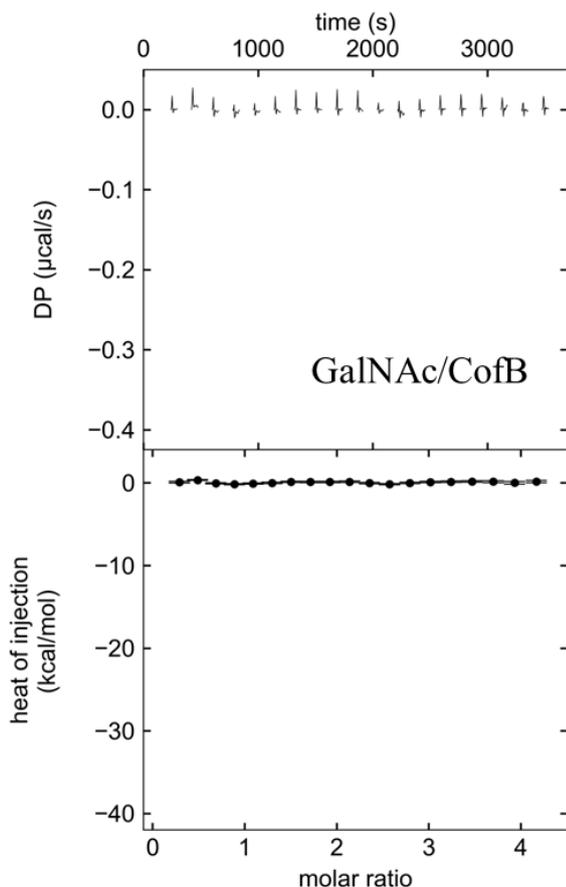


図 8 CofB と GalNAc の ITC プロファイル。

上段：観測されたサーモグラム。

下段：熱量変化プロット。

第二項 CofJ 欠損株を用いた付着実験

CFA/III が ETEC の腸管への付着に必要であることは明らかであるが、第一項の結果から、線毛先端に位置するマイナーピリン CofB は GalNAc と結合しなかった。一方、同じく *cof* オペロン上にコードされたタンパク質である CofJ は、CFA/III 依存的に菌体外に分泌されることから、腸管への付着に働く可能性がある (23)。そこで、CFA/III 線毛と分泌タンパク質 CofJ の腸管付着における役割を調べるため、*cof* オペロンを有する大腸菌株 (*cof*+株)、CofJ および CofB の各遺伝子を欠損させた大腸菌株 (Δ *cofJ* 株および Δ *cofB* 株) を各々培養し、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に対する付着実験を行った。付着実験後の細胞はギムザ染色液によって染色し、各菌株の細胞への付着の様子を観察した (図 9)。細胞への付着率は、付着実験後に回収した菌液から CFU (Colony forming unit) を計数し、添加した菌数で除すことで算出した (図 10)。

細胞実験の結果、全ての *cof* 遺伝子を有する *cof*+株の Caco-2 細胞への多くの大腸菌の付着が観測され、その付着率は $5.08 \pm 1.76\%$ であった。一方、分泌タンパク質 CofJ を産生しない *cofJ* 遺伝子欠損株と、線毛形成能を持たない *cofB* 遺伝子欠損株に付着した大腸菌は殆ど観測されず、それらの付着率はそれぞれ $0.12 \pm 0.04\%$ 、 $0.27 \pm 0.19\%$ であり、どちらも *cof*+株と比較して著しく付着率が減少した。このことから、腸管付着には CofJ が必須であることが示唆された。

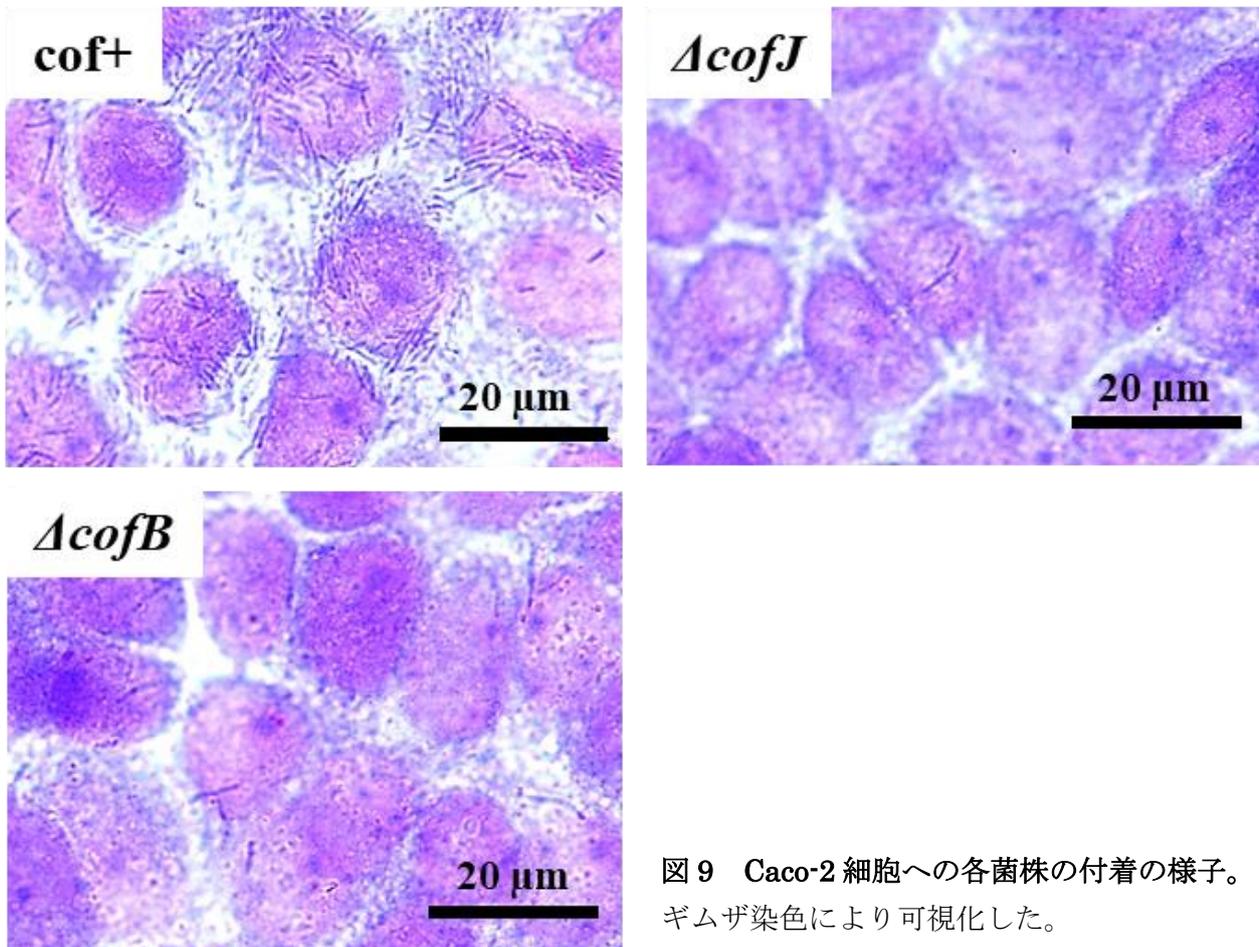


図 9 Caco-2 細胞への各菌株の付着の様子。
ギムザ染色により可視化した。

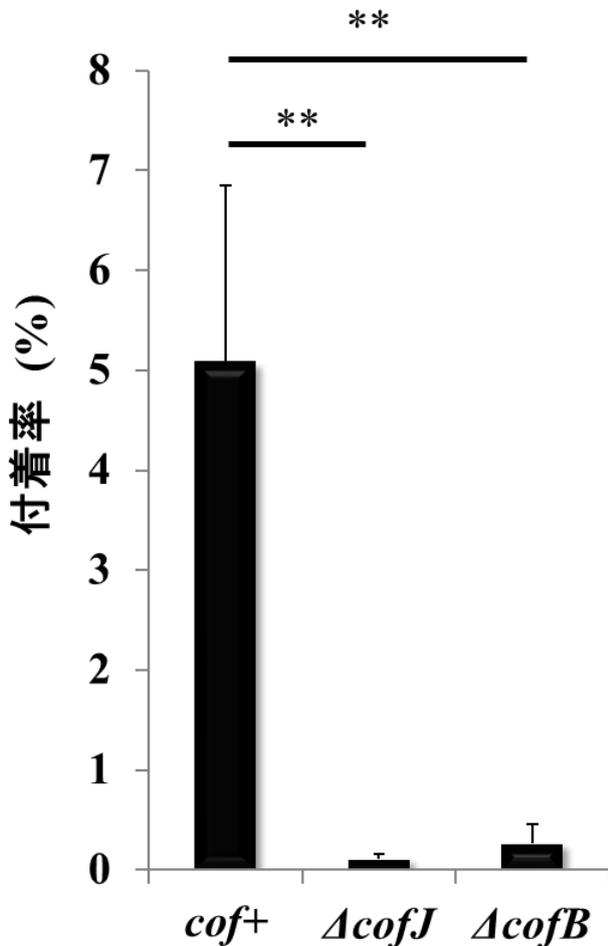


図 10 CFU 計数から算出した各菌株の Caco-2 細胞への付着率

第三項 透過型電子顕微鏡による菌体表面構造の観察

CofJ の遺伝子欠損が IV 型線毛形成に与える影響を調べるために、各菌株を用いて透過型電子顕微鏡(transmission electron microscopy: TEM)による電子顕微鏡像の撮影を行った。親水化処理をしたグリッドを各菌株を培養した CFA 寒天培地に付着させることで菌体と線毛を吸着させ、酢酸ウラニウム水溶液を用いてネガティブ染色をすることで観察を行った。染色の結果、過去に報告されたように線毛形成開始に重要となるマイナーピリン CofB の欠損株 (Δ *cofB* 株)では線毛が形成されていなかったが (21)、 Δ *cofJ* 株は、*cof+*株や以前に報告されている野生型の ETEC 31-10 株、ETEC 260-1 株と同様の数、長さ、形状の線毛を菌体表面上に形成していた (図 11) (19)。

以上の結果から、ETEC の腸管定着には、CFA/III 線毛と分泌タンパク質 CofJ の両方が必要であることが分かった。

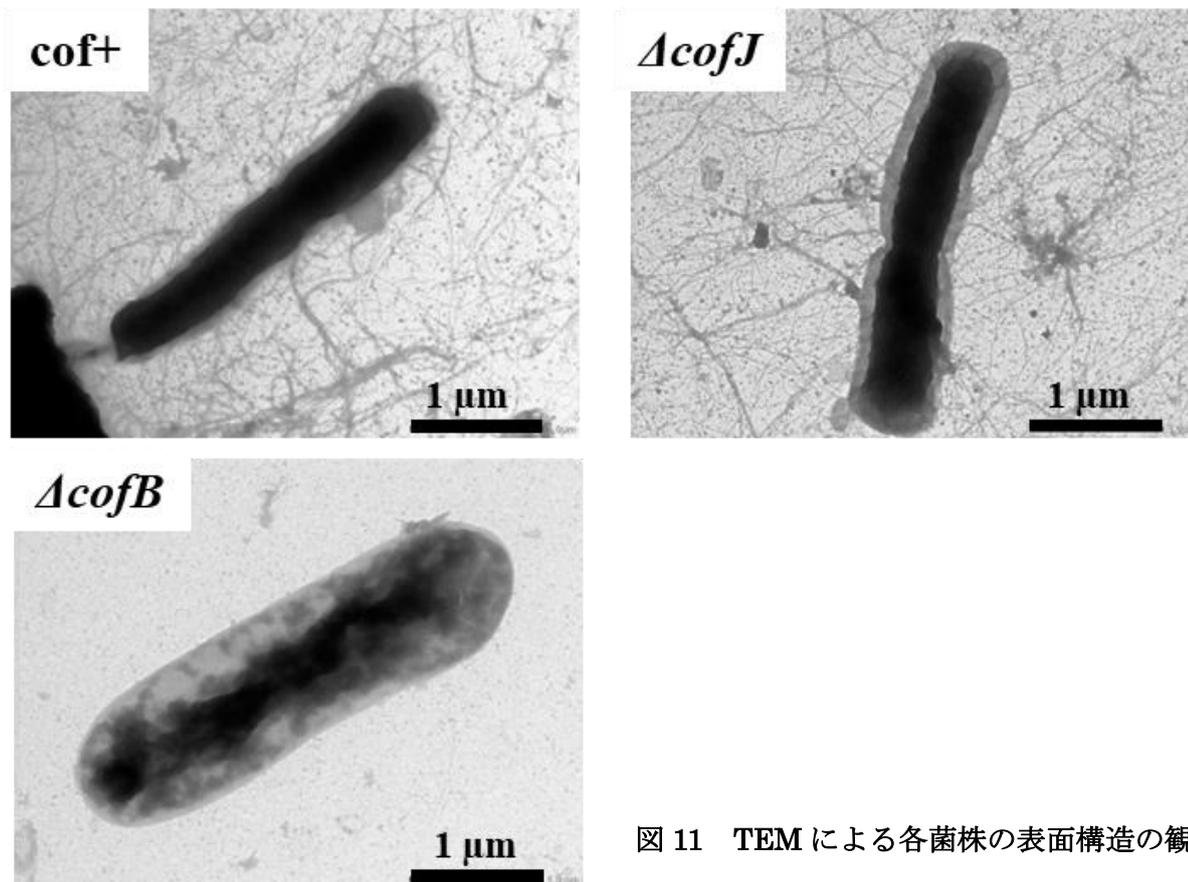


図 11 TEM による各菌株の表面構造の観察

第四項 ウェスタンブロッティングによる分泌タンパク質 CofJ の検出

次に、各菌株における CofJ の菌体外への分泌の有無をホースラディッシュペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase: HRP) を利用した化学発光ウェスタンブロッティングにより検出した。CFA 寒天培地で培養した菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) で懸濁させ回収したものを全細胞画分 (whole cell culture: WCC)、WCC を遠心分離後に 0.22 μm フィルター処理をしたサンプルを細胞上清画分 (Supernatant: Sup) とした。cof+株と ΔcofB 株は WCC に同程度 CofJ を発現していたが、ΔcofB 株では細胞上清画分への CofJ の分泌量が明らかに減少していた (図 12)。同等の CofJ の分泌量の減少は、メジャーピリン cofA 欠損株(ΔcofA 株)と外膜セクレチン cofD 欠損株(ΔcofD 株)でも観察された (図 12)。

過去に報告された cof オペロンのうち cofJ 遺伝子のみを含むプラスミド (pcofJ) を有する ETEC 31-10P pcofJ 株の CofJ 分泌量は無視できる程度であったが (23)、ΔcofB 株、ΔcofA 株、ΔcofD 株では、線毛もしくは外膜のセクレチンが存在しないため、CofJ の分泌が抑制されると予想されたが、cof+株と比べて少量であるが明確なバンドが検出された。これは過去に報告されたように、異種タンパク質発現系のため菌体膜が脆くなっており、ペリプラズム内の CofJ が漏出したためであると考えられる (23)。

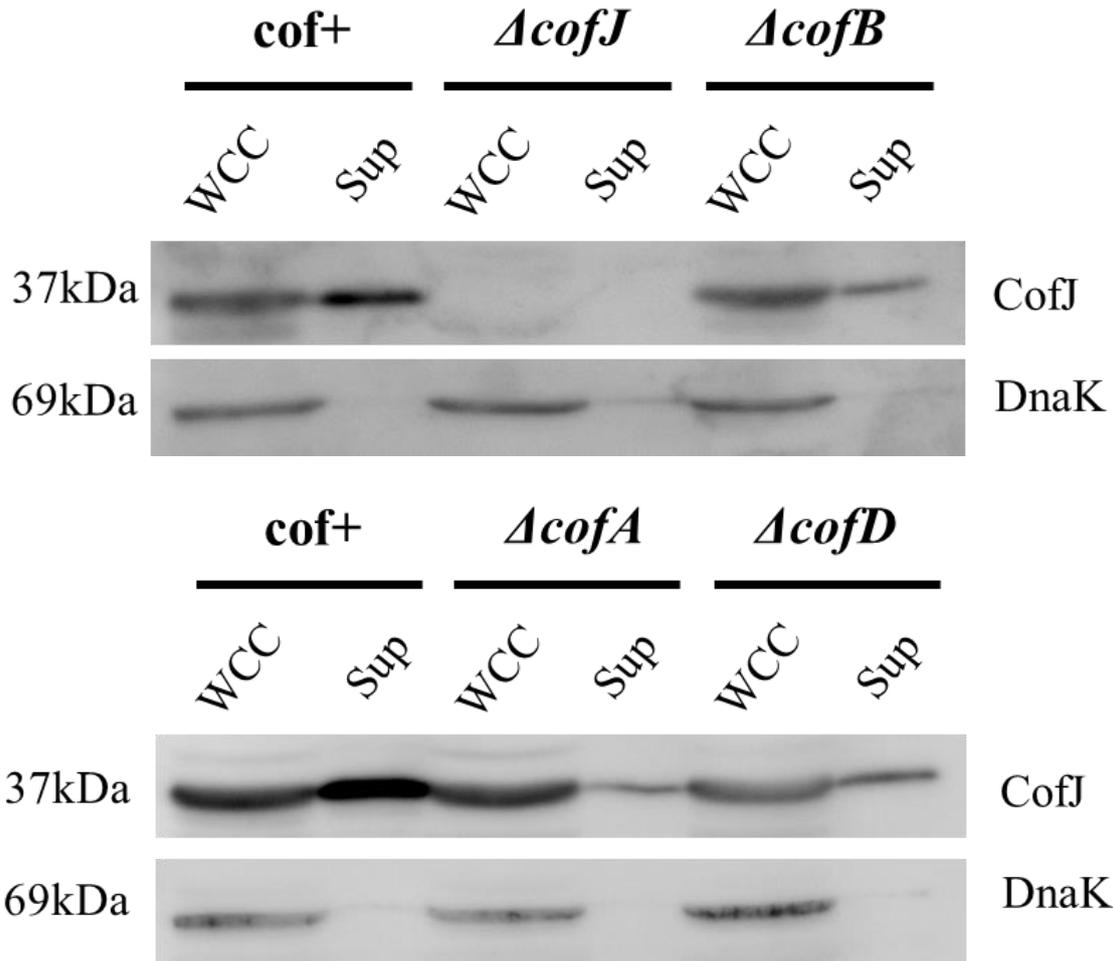


図 12 ウエスタンブロッティングによる各菌株の CofJ の分泌量の観察

第五項 CofJ と線毛構成タンパク質の相互作用解析

第二項、第三項の結果から、ETEC の上皮細胞への付着には、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が明らかとなった。この知見に基づいて、分泌された CofJ と CFA/III 線毛が相互作用することが ETEC の腸管付着過程において重要であると仮説を立てた。この仮説を検証するために、CofJ と線毛構成成分との相互作用解析をプルダウンアッセイと ITC によって行った。

精製した CofJ と His タグを付加した線毛構成タンパク質 CofA、CofB をそれぞれ混合し、アフィニティーカラムを用いて分離溶出したところ、各混合物の添加画分と溶出画分の SDS-PAGE は図 13 のようになった。CofJ 単独、及び CofJ と His タグ付き CofA の混合物については溶出画分に CofJ が認められなかった。一方、CofJ と His タグ付き CofB の混合物については溶出画分に CofB とともに CofJ が共溶出されていることが観察された。

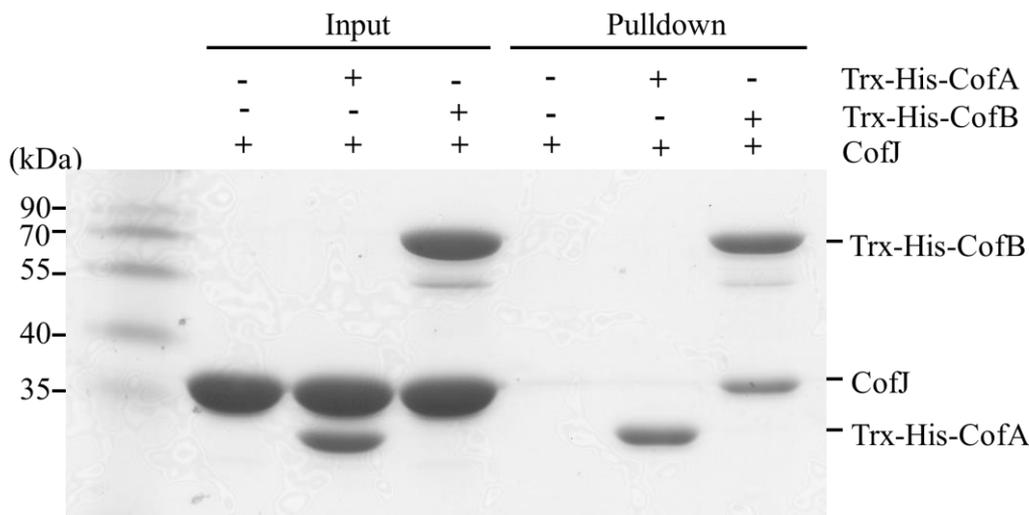


図 13 プルダウンアッセイにおける添加画分と溶出画分の SDS-PAGE 結果。

Trx はチオレドキシシグナルを表している。

また、各 ITC の滴定の際に発生した熱量を CofJ と CofA もしくは CofB のモル比に対してプロットすることにより、解離定数 K_d を算出した。その結果、CofJ 溶液を CofB 溶液に滴下した場合にのみ結合熱が観測され、 K_d は $0.14 \pm 0.01 \mu\text{M}$ であった (図 14)。この結果はプルダウンアッセイの結果と一致した。

以上の結果から、CofJ は線毛の大部分を構成しているメジャーピリン CofA ではなく、線毛先端部にのみ存在する CofB と結合することが明らかとなった。

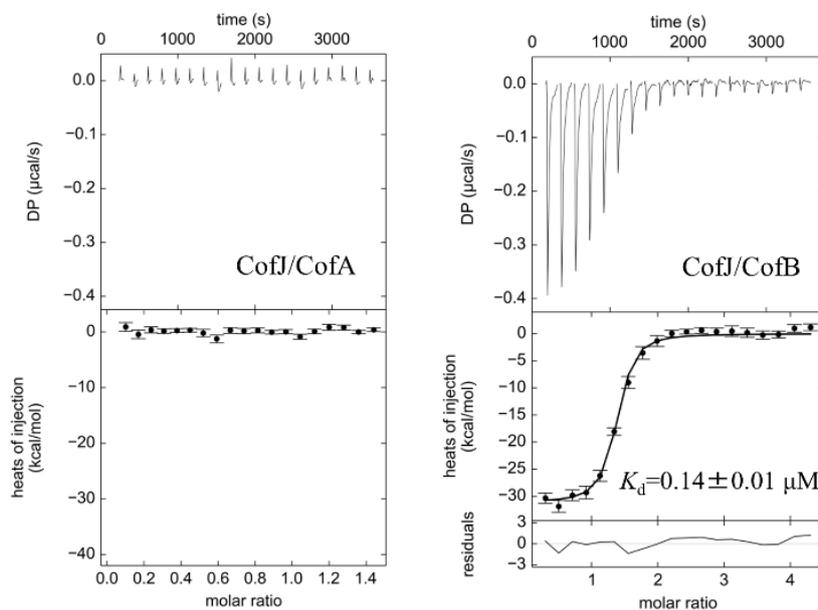


図 14 CofJ と CofA もしくは CofB との ITC プロファイル。

左図 上段：観測されたサーモグラム。下段：熱量変化プロット。

右図 上段：観測されたサーモグラム。中段：熱量変化プロットとフィッティング結果(実線)。下段：フィッティング残差

第六項 CofJ の相互作用領域の同定

前項の実験において、CofJ を低温条件下で2 ヶ月間程度保存すると、一部が分解して 2kDa 程度分子量が小さくなったバンドが確認されることが分かり(図 15)、興味深いことに、この一部分解した CofJ をプルダウンアッセイに用いたところ、分子量の減少したバンドは His タグの付加した CofB には全く結合しなくなることが明らかとなった (図 15)。

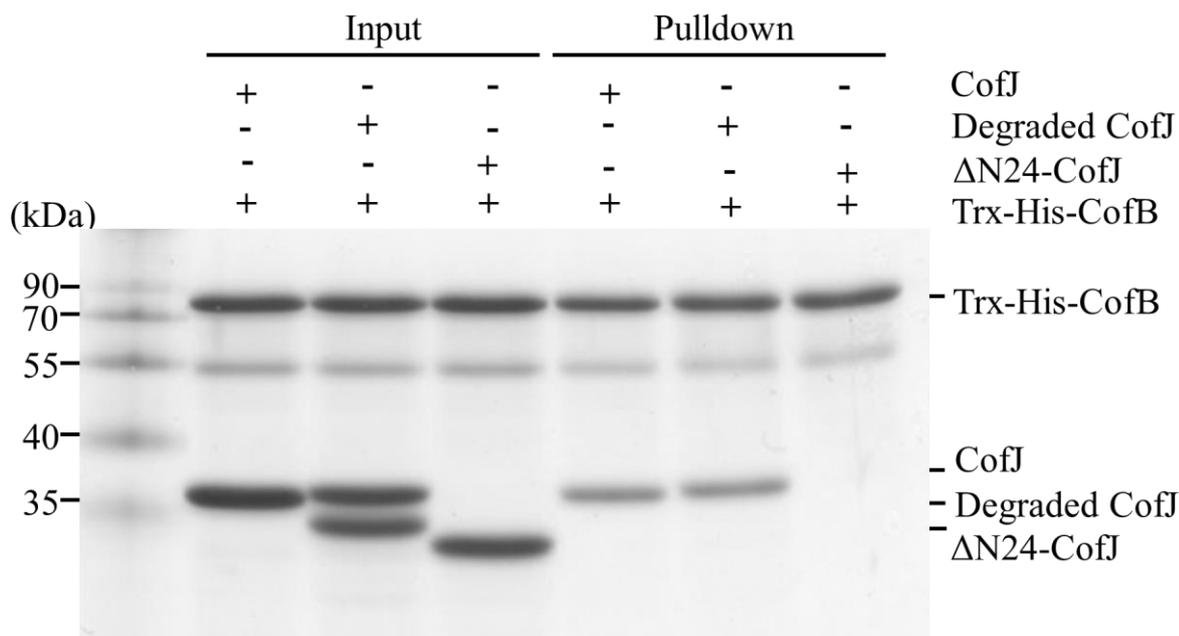


図 15 プルダウンアッセイにおける添加画分 (Input) と溶出画分 (Pulldown) の SDS-PAGE 結果

過去に報告された CofJ の結晶構造 (PDB code: 5YQ0) において、N 末端領域はディスオーダーしておりフレキシブルな領域であることが分かっている (図 16)。N 末端の当該領域には Lys16 や Arg24 など、トリプシン等のタンパク質分解酵素の標的となるアミノ酸が配置していることから、精製が不十分であり、この領域がプロテアーゼによる加水分解を受けた可能性も考えられる。その為、長期間の保存によって分解した 2 kDa 程度の断片が当該領域に由来すると推測し、N 末端の 24 残基を除いた CofJ (以下、 Δ N24-CofJ と呼称する) を精製し、プルダウンアッセイおよび ITC に用いたところ、CofJ に見られた CofB との結合能が完全に失われた (図 15、図 17)。さらに、合成した N 末端の 24 残基 (SPSSSEGGAF TVNMPKTSTVDDIR) からなるペプチド (CofJ(1-24)) は、CofB と結合することが確認された ($K_d = 8.8 \pm 1.6 \mu\text{M}$) (図 17)。

以上の結果から、CofJ は N 末端の可動性の高い領域において CofB と結合していることが明らかとなった。

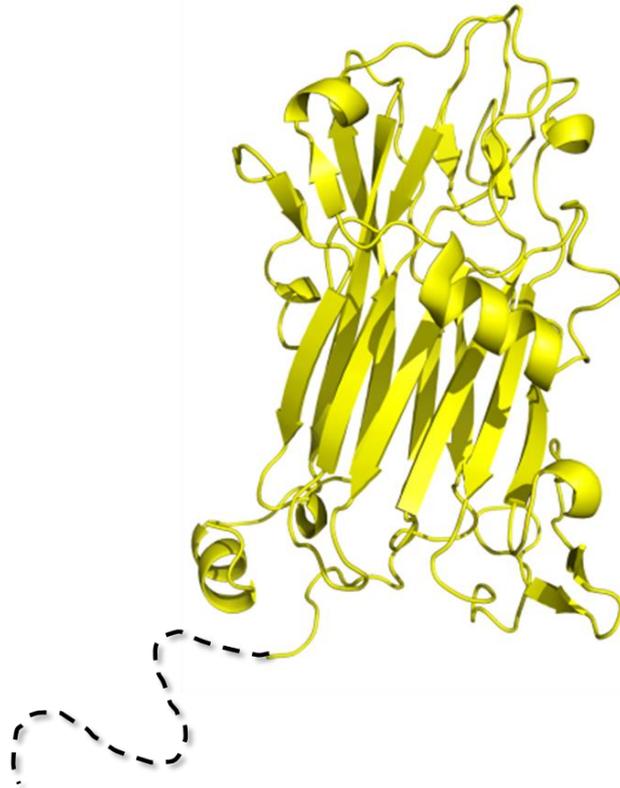


図16 CofJの結晶構造

点線部分は N 末端の
ディスオーダー領域

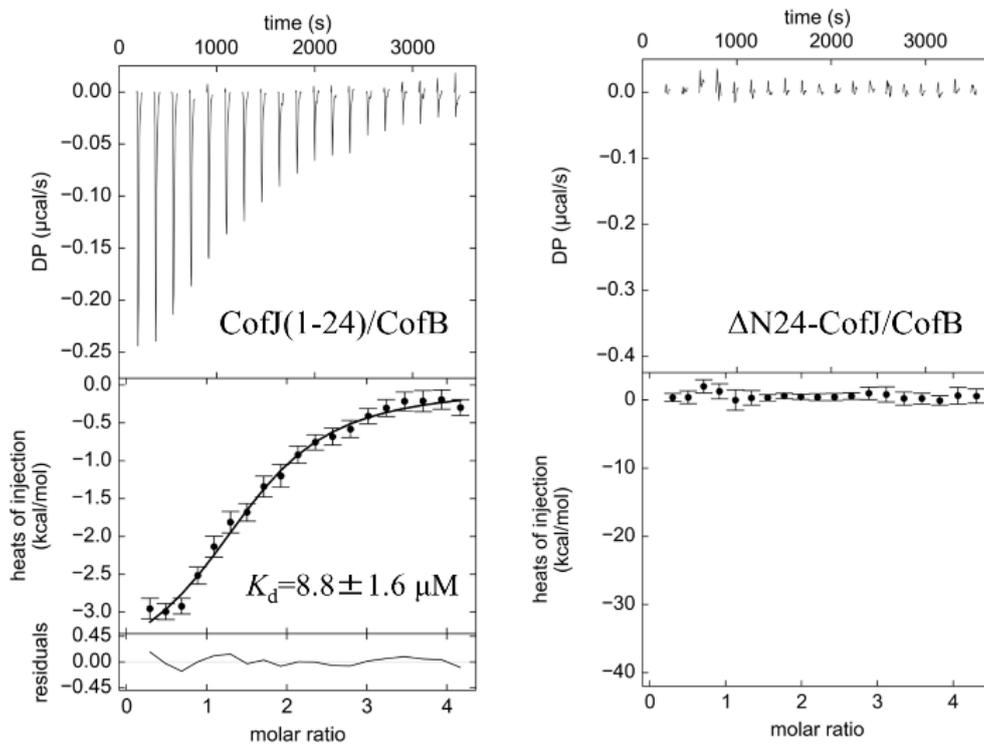


図17 CofB と CofJ (1-24) もしくは $\Delta\text{N24-CofJ}$ との ITC プロファイル。

左図 上段：観測されたサーモグラム。中段：熱量変化プロットとフィッティング結果(実線)。

下段：フィッティング残差

右図 上段：観測されたサーモグラム。下段：熱量変化プロット。

第七項 CofJ(1-24)-CofB 複合体の立体構造解析

CofJ の N 末端領域 24 残基と CofB 間の相互作用の詳細を解明するために、CofJ (1-24)と CofB を混合し、蒸気拡散法による共結晶化を行った (図 18)。得られた複合体結晶について、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL26B1 で回折実験を行った。その結果、最高分解能 3.52\AA の回折データの収集に成功した (図 19)。回折実験に関わる統計値を表 2 に示す。

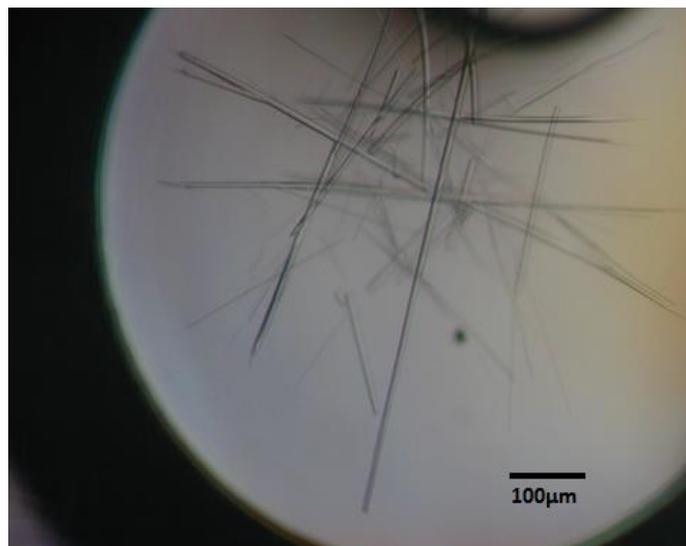


図 18 CofJ(1-24)-CofB 複合体結晶の一例。

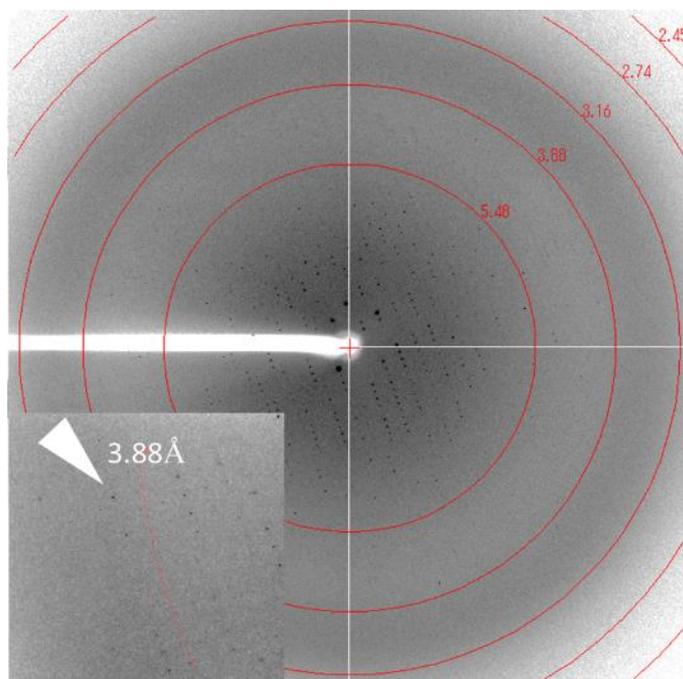


図 19 CofJ(1-24)-CofB 複合体結晶の回折像の一例。

既報の CofB 構造 (PDB code:5AX6) を各ドメイン分割した構造をテンプレートにした分子置換法を行った結果、位相決定に成功し、CofB のドメイン 3 の $\alpha 4/\beta 16$ ループと隣り合う CofB 分子の $\beta 17/\beta 18$ ループの境界部に CofJ(1-24)ペプチドに相当する電子密度が観測された。1 つの CofB モノマー中の Ala469、Thr484、Val497 および隣り合う CofB モノマー中の Val435 および Leu462 によって形成された疎水性の窪みに、CofJ(1-24)の配列中に含まれる嵩高い Phe10 の電子密度が観測されたため、当該残基を起点にしてモデリングしたところ、Ser5 から Pro15 までの 11 残基が水素結合を介して両側の CofB の長いループと結合しており、Ser1 から Ser4 および Lys16 から Arg24 の領域はディスオーダーしていた。最終的に、 R_{work} 値 0.192、 R_{free} 値 0.232 となる CofB のドメイン 3 の分子境界部に CofJ(1-24)が 3 分子結合した CofJ(1-24)-CofB 複合体構造を最高分解能 3.52 Å で決定することに成功した (図 20)。

表 2 CofJ(1-24)-CofB 複合体構造の結晶構造解析に関する統計値

Data collection		Refinement	
Beamline	SPring-8 BL26B1	Resolution (Å)	54.2-3.52 (3.61-3.52)
Detector	Saturn A200	Reflections	20668 (1459)
Wavelength (Å)	1.00000	No. Atoms	
Space group	$P6_5$	Protein	1473
Unit-cell parameters (Å, °)	$a=b=157.2, c=118.1, \gamma=120$	R_{work}	0.192 (0.302)
Total masured reflections	229612 (21871)	R_{free}	0.232 (0.365)
Unique reflections	20699 (2057)	R.M.S.D. from ideal	
Resolution (Å)	60.0-3.52 (3.58-3.52)	Bonds (Å)	0.004
R_{merge}	0.290 (1.863)	Angles (°)	0.777
$CC_{1/2}$	0.995 (0.500)	B -factors (Å ²)	106.5
Completeness (%)	100.0 (100.0)	Ramachandran plot analysis (%)	
Willson B -factors (Å ²)	90.7	Most favored	96.1
Average $I/\sigma(I)$	13.5 (2.0)	Allowed	3.7
Redundancy	11.1 (10.6)		

$R_{\text{work}} = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$ F_{obs} と F_{calc} はそれぞれ構造因子の実測値と計算値
 R_{free} は精密化に使用しない 10%の反射を用いて R_{work} の式から計算される。

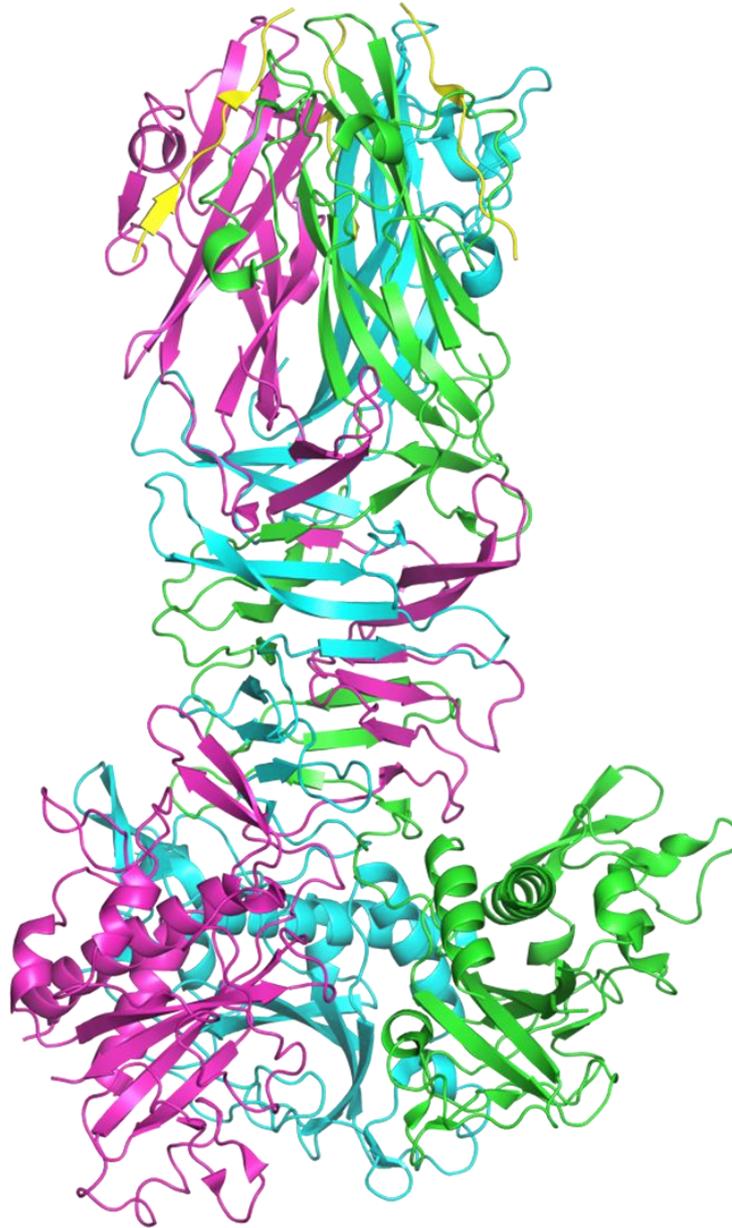


図 20 CofJ(1-24)-CofB 複合体の全体構造

CofB (シアン、マゼンダ、緑色)。CofJ(1-24)は黄色で表示している。

第八項 CofB 三量体の CofJ(1-24)認識機構

各三量体界面において、Ser5 から Pro15 までの CofJ(1-24)断片は、Val435, Leu462, Ala469, Thr484, Val497 から形成される疎水性の溝に、ペプチド断片中の Phe10 が突き刺さるようにして結合していた (図 21)。3 か所存在する分子境界の各々に結合した CofJ(1-24)の主鎖構造は凡そ同一であり、主鎖の α 炭素から計算した RMSD は 0.169 から 0.401Å であった (図 22)。

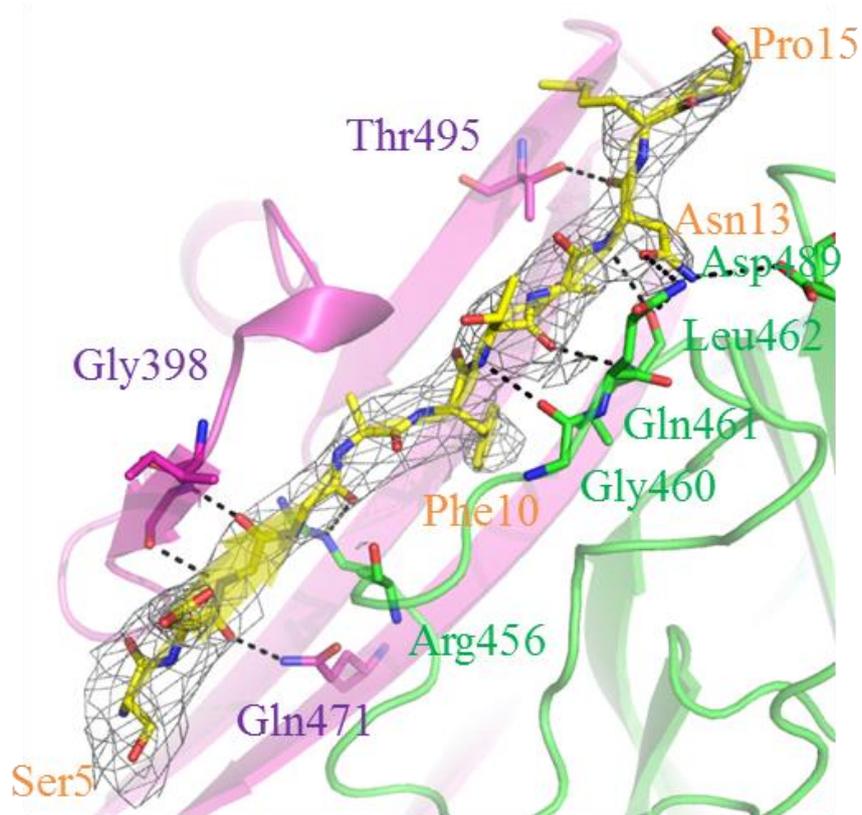


図 21 CofJ(1-24)-CofB 複合体における CofJ(1-24)の結合部位の拡大図。
網掛け部は、 $2F_o - F_c$ map (1.0σ)。

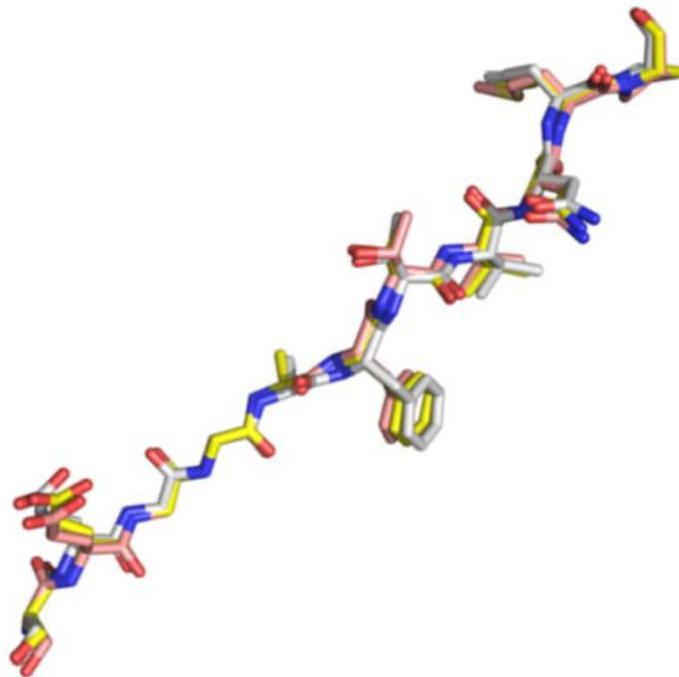


図 22 CofJ(1-24)-CofB 複合体構造における CofJ(1-24)分子の重ね合わせ。

複合体中の CofB 三量体は、以前に報告した CofB 単独の三量体構造と比較して、ドメイン 1 の配向が大きく異なっており、これはドメイン 1 とドメイン 2 の間のグリシンを含む運動性の高いループの存在によると考えられた。一方で、ドメイン 2 およびドメイン 3 においては、各分子同士のドメインスワッピングによって、強固な三量体構造を形成しており、CofJ(1-24)の結合部位領域以外に大きな構造変化はなかった (図 23、図 24)。

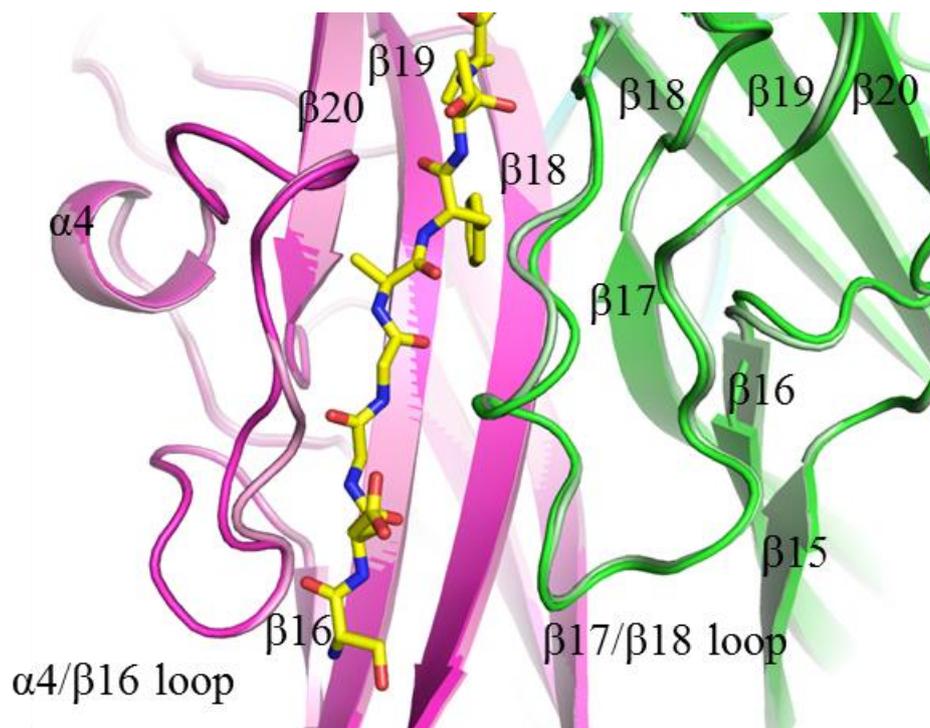


図 23 CofJ(1-24)-CofB 複合体構造 (ピンク、薄緑) と CofB 単体構造 (マゼンタ、緑、PDB code: 5AX6) との重ね合わせの CofJ(1-24) (黄色) 結合部位の拡大図。

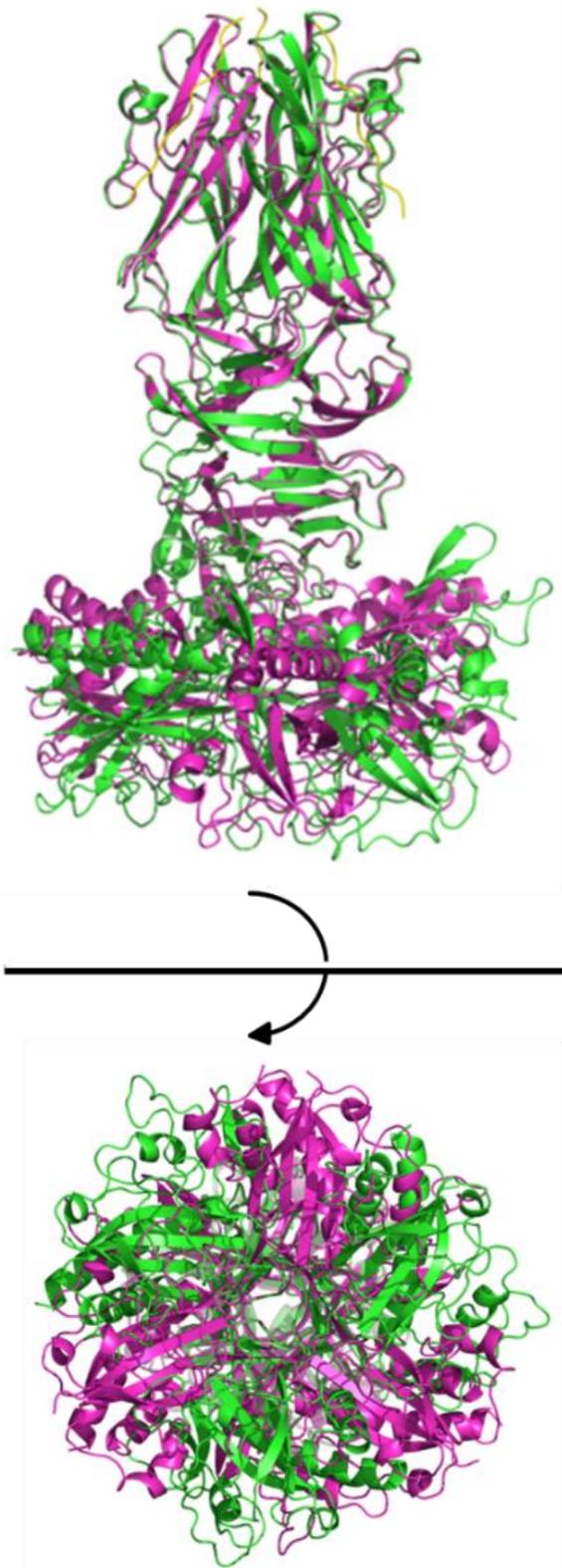


図 24 CofJ (1-24) -CofB 複合体 (緑) と CofB 単体構造 (マゼンタ, PDB code: 5AX6) との重ね合わせ。

(上図)側面から見た構造。(下図)CofB ドメイン 1 側から見た構造。

本研究で決定した複合体結晶構造において、CofB 三量体は疎水性相互作用と水素結合によって CofJ (1-24) の一部分 (Ser5-Pro15) のみを特異的に認識していた (図 21、図 25)。実際に、より短くした Ser4 から Lys16 までの 13 残基のペプチド CofJ(4-16)を用いた ITC の結果、CofJ(1-24)と同等の親和性 ($K_d = 4.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$) で CofB に結合したことから、当該領域が CofB との結合におけるコアであると考えられる (図 26)。さらに前項で述べたように、1 つの CofB モノマー中の Ala469、Thr484、Val497 および別の CofB モノマー中の Val435 および Leu462 によって形成された疎水性の溝に突き刺さっていた CofJ (4-16) の Phe10 (図 25) を Ala へ置換したペプチド CofJ(4-16)_F10A を使い、ITC を実施した結果、CofB との結合能が完全に失われたことから (図 26)、両者の結合には芳香族アミノ酸である 10 残基目のフェニルアラニンが特に重要であることが示された。

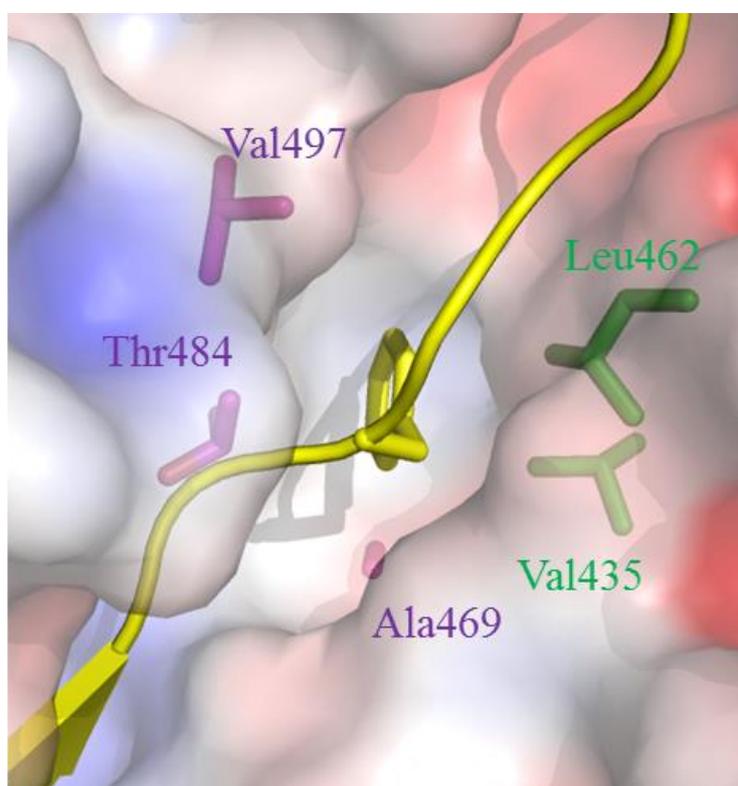


図 25 CofB の分子境界部に形成された疎水性の溝と CofJ(1-24)の Phe10 の相互作用

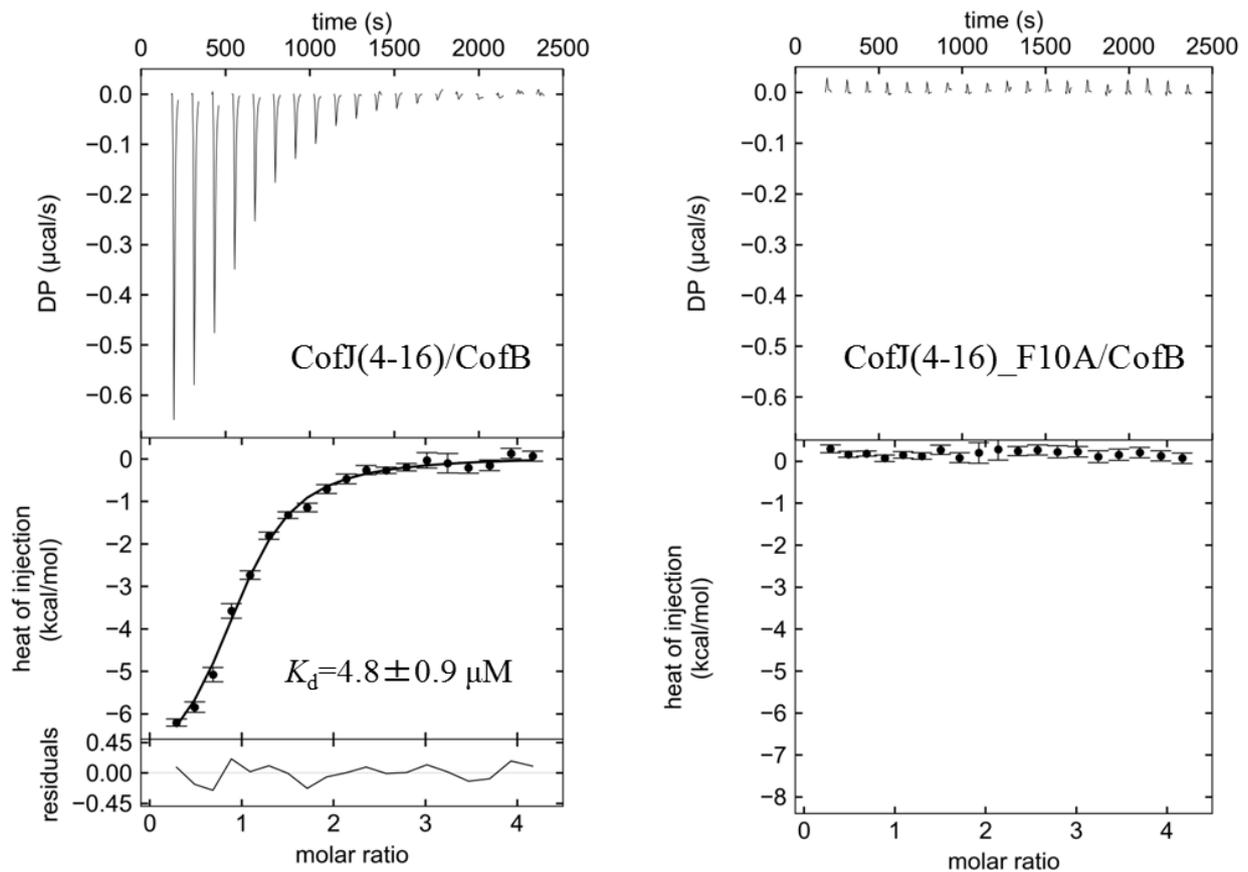


図 26 CofB と CofJ(4-16)もしくは CofJ(4-16)_F10A との ITC プロファイル。
 上段：観測されたサーモグラム。中段：熱量変化プロットとフィッティング結果(実線)。
 下段：フィッティング残差

CofB の $\beta 13$ から $\beta 21$ までの 9 本の β ストランドと $\alpha 4$ の α ヘリックスからなるドメイン 3 は、前述の通り、GalNAc 分子を認識する H 型レクチン三量体と構造的類似性を有している (21)。しかしながら、CofB の $\beta 17$ と $\beta 18$ の間のループは、ホコリカビ由来の Discoidin I の $\beta 11$ と $\beta 12$ 間のループよりも長く、GalNAc 認識領域のほぼ全体を覆っている (図 27)。驚くべきことに、三量体中で隣り合う CofB 分子の一方の長い $\beta 17/\beta 18$ ループと別の分子の $\alpha 4/\beta 16$ ループをわずかに構造変化させることで、CofB は、CofJ(1-24)の認識を可能にしていた (図 23、図 27)。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 CofJ 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。

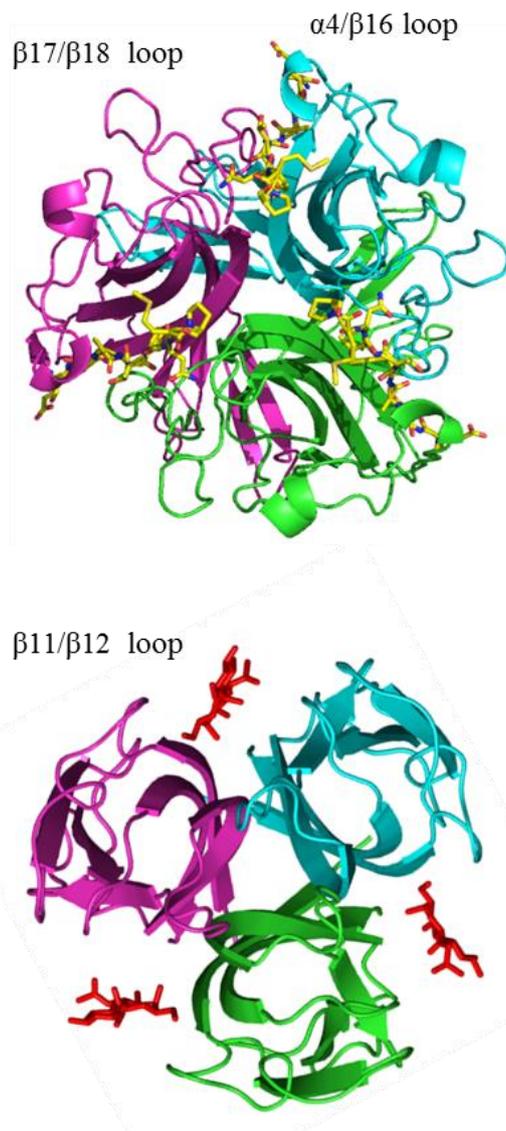


図 27 CofJ(1-24)-CofB 複合体と Discoidin I の H 型レクチンドメインの構造比較。
 (上図)CofJ(1-24)-CofB 複合体のドメイン 3。黄色のスティックモデルは CofJ(1-24)。
 (下図)Discoidin I の H 型レクチンドメイン(PDB code: 2W95)。赤色のスティックモデルは GalNAc。

第九項 超遠心分析法による CofJ-CofB の溶液中の会合状態の解析

溶液中における CofB と CofJ の結合比を決定するために、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した CofJ-CofB 複合体を超遠心分析法により解析した。超遠心沈降速度法により、精製された CofJ-CofB 複合体は溶液中において単分散で存在しており、約 8.7 S の s 値および 194 kDa の推定分子量を有していた (図 28)。我々は以前に、溶液中の CofB が 7.3 S (158 kDa) の s 値を有する三量体構造を形成することを報告している (21)。これらの結果は、溶液中の CofJ-CofB 複合体が、1 つの全長の CofJ 分子 (約 37.5 kDa) および 3 つの CofB 分子 (約 160.6 kDa) を有するヘテロ四量体 (約 198.1 kDa) として存在することを証明した。

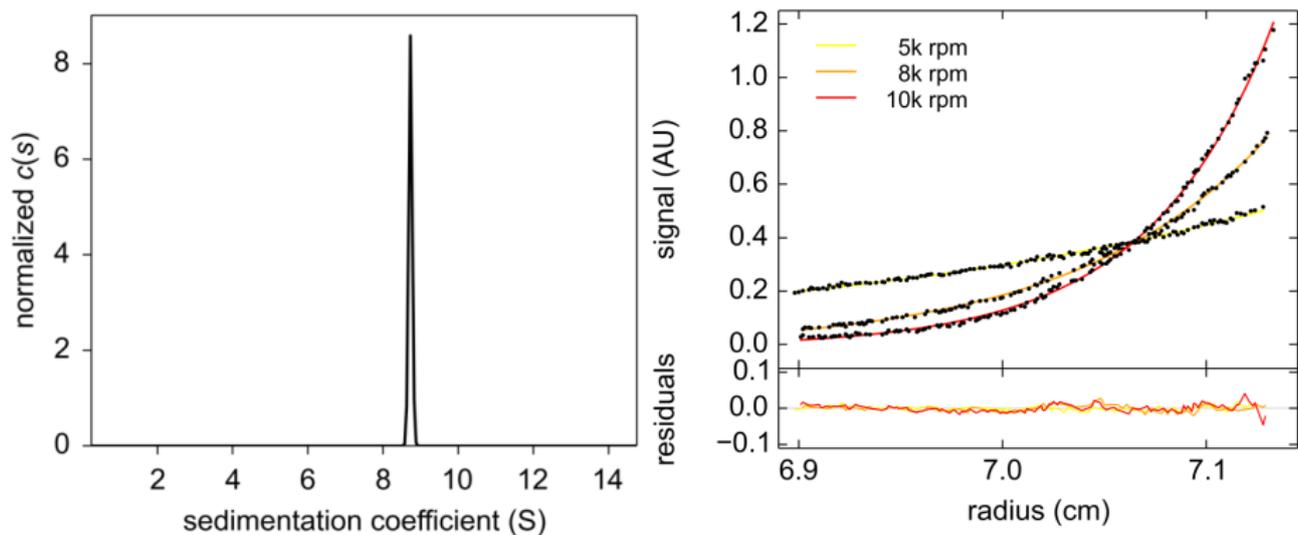


図 28 CofJ-CofB 複合体の超遠心分析結果。

(左図)沈降速度法により決定した CofJ-CofB 複合体の沈降係数分布。

(右図)上段：沈降平衡法の各回転数における沈降平衡プロファイルとフィッティング曲線。下段：フィッティング残差

第十項 CofJ-CFA/III 線毛複合体の構築

前項で決定した CofJ(1-24)-CofB 複合体構造と本章で明らかとした CofJ-CofB 複合体のストイキオメトリー、そして以前に報告した CFA/III 線毛モデル (21) を併せて、IVb 型線毛の先端部で CofJ 単量体がマイナーピリン CofB 三量体の上方に位置する CofJ-CFA/III 複合体の構造モデルを作成した(図 29)。CofJ の球状ドメインと N 末端相互作用領域(Ser5-Pro15)の間の柔軟なループ構造 (約 10 残基) は、CofB 三量体と球状ドメインとを離れた空間に配置することに寄与していることに加えて、他の CofJ 分子が立体障害を起こし結合できないようにしていると考えられ、1 : 3 という CofJ-CofB 複合体の特徴的な結合比の要因である可能性がある。注目すべきは、このモデルにおいて CofJ の底面は正に荷電しているが、CofB 三量体の上面は負に荷電している点である (図 30)。これらの表面電荷は、ITC 実験で観察されたように、全長の CofJ と CofJ(1-24)の親和性の違いを生むものであると考えられ、即ち CofJ の球状ドメインと CofB の上面とが一時的に静電的相互作用を形成していること示唆している (図 29、図 30)。

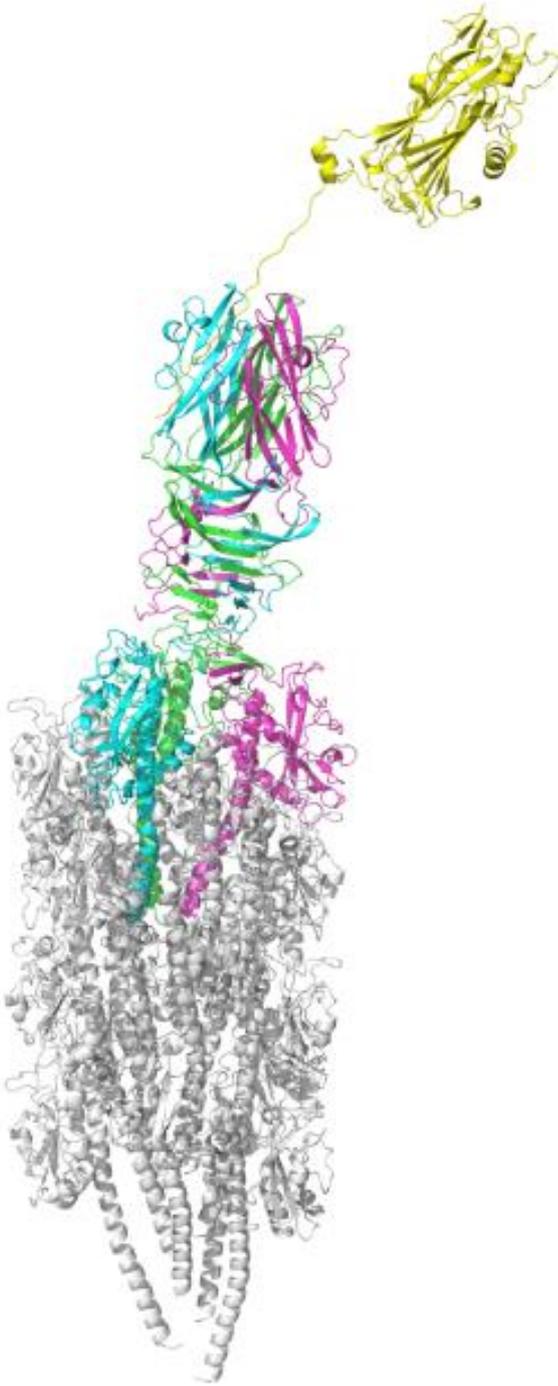


図 29 CofJ-CFA/III 線毛複合体のモデル構造。
CofA フィラメントモデル(灰色)、CofB 三量体構造(シアン、マゼンタ、緑色)、CofJ (黄色)

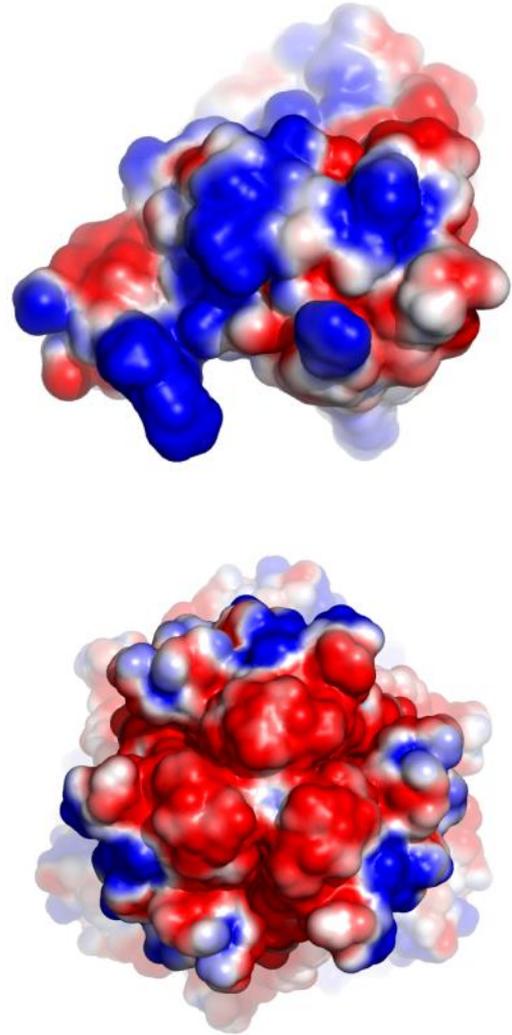


図 30 CofJ (上図) と CofB (下図) の表面電荷。
表面電荷は APBS (24) によって計算した。

第二章 分泌タンパク質 CofJ を介した IV 型線毛の付着機構の解明

第一節 背景

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、CFA/III 依存的に菌体外に分泌される実験結果とも矛盾しない。さらに、CofJ は菌体から最も遠位に位置していることから、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る。

本章では、ETEC の腸管付着における CofJ の役割に関してさらに詳しい知見を得るため、野生型 CofJ と CofB の認識に関わる N 末端領域の欠損体 ($\Delta N24$ -CofJ) を用いた付着実験を行い CofJ-CFA/III 線毛相互作用の菌体外における必要性を検討した。さらに抗 CofJ ポリクローナル抗体の Fab 断片、CofJ のチロシン変異株を用いた付着実験から、CofJ と腸上皮細胞との相互作用を解析し、得られた情報に基づき ETEC の腸管付着モデルの構築を試みた。

第二節 結果と考察

第一項 CofJ が腸管付着に与える影響の解析

第一章の結果から、CFA/III 線毛の先端に分泌タンパク質 CofJ が結合することが確認されたが、ETEC が腸上皮細胞へ付着する過程において、菌体外でも同様の相互作用が必要であるかは明らかではない。そこで、精製した CofJ または $\Delta N24$ -CofJ を $\Delta cofJ$ 株に添加し、Caco-2 細胞に対する付着実験を行った。その結果、精製 CofJ を加えた場合、加えなかった場合よりも多くの大腸菌の Caco-2 細胞への付着が観測され (図 31)、その付着率は $2.92 \pm 2.01\%$ となり優位に付着率が回復した (図 32)。

一方で CofB との相互作用領域である N 末端の 24 残基を除いた $\Delta N24$ -CofJ では、大腸菌の付着は殆ど見られず (図 31)、付着率の上昇は全く見られなかった (付着率 $0.08 \pm 0.03\%$) (図 32)。これらの結果は、菌体外における CofJ と CFA/III 線毛の相互作用が ETEC の腸管付着において重要であることを示している。

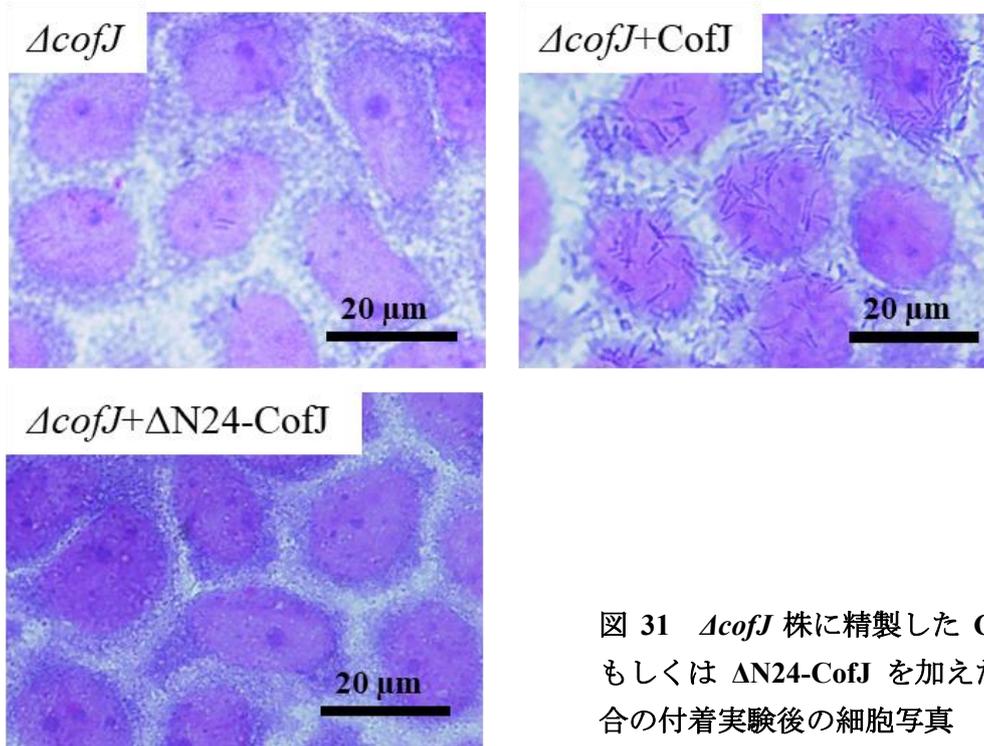


図 31 $\Delta cofJ$ 株に精製した CofJ もしくは $\Delta N24-CofJ$ を加えた場合の付着実験後の細胞写真

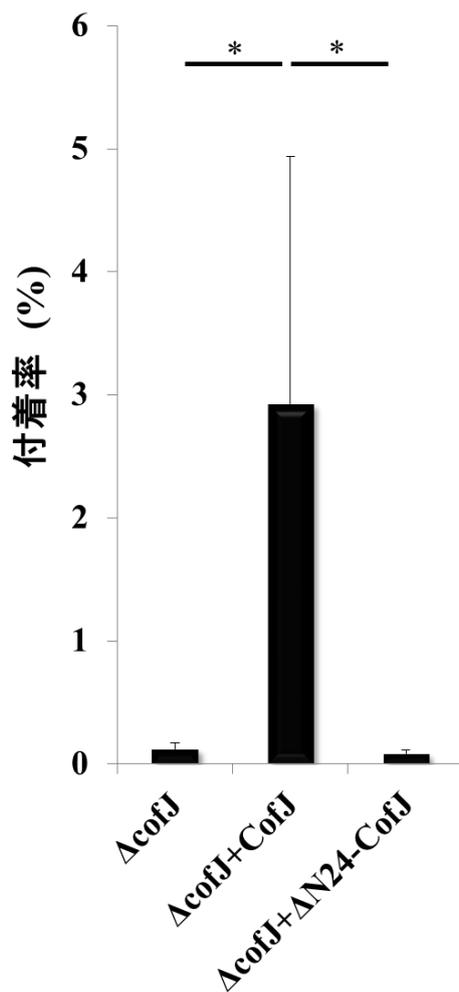


図 32 $\Delta cofJ$ 株に精製した CofJ もしくは $\Delta N24-CofJ$ を加えた場合の付着率。

さらに、抗 CofJ ポリクローナル IgG 抗体をシステインプロテアーゼであるパパインにより切断することで得られた Fab 断片を *cof+*株に加えた上で付着実験を行った結果、*cof+*株の Caco-2 細胞への付着を優位に阻害することができた (図 33、図 34)。これらの結果は、CofJ が ETEC の付着過程において、ヒト宿主細胞表面と CFA/III 線毛先端部の CofB 三量体の両方を架橋するアンカーの役割を果たしていることを示唆している。

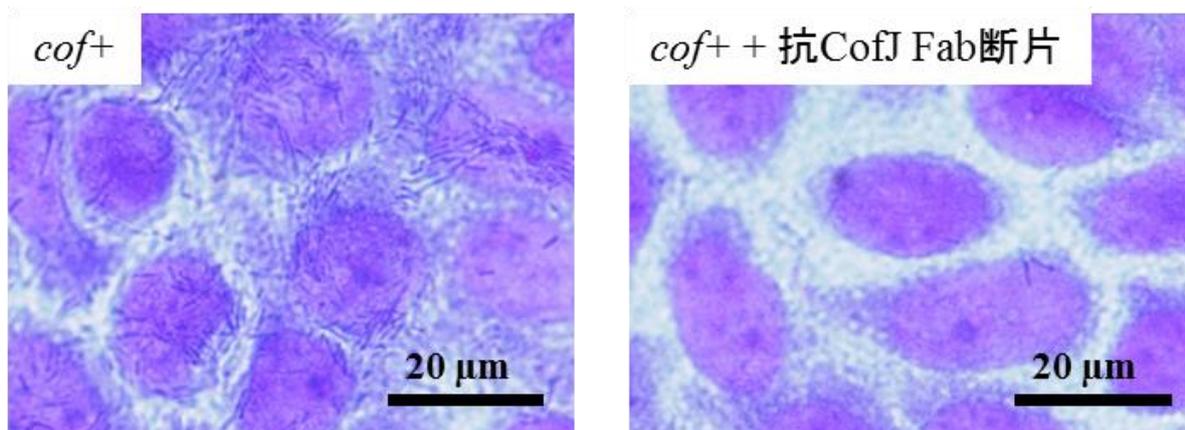


図 33 *cof+*株に抗 CofJ 抗体の Fab 断片を加えた場合の付着実験後の細胞写真。
抗 CofJ 抗体の Fab 断片濃度は 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

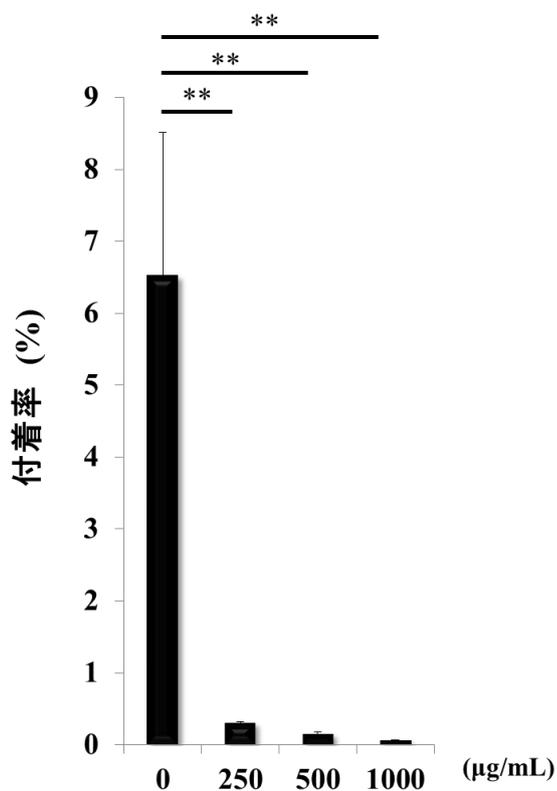


図 34 *cof+*株に抗 CofJ 抗体の Fab 断片を加えた場合の付着率。
横軸の数字は抗 CofJ 抗体の Fab 断片濃度。

第二項 Caco-2 細胞への付着におけるチロシンクラスターの影響

第二項で構築した 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チロシンクラスターが存在することが明らかとなった (図 35)。このような芳香環残基の存在は、CofJ と構造類似性のある膜孔形成毒素(Pore Forming Toxin: PFT)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 (図 36) (25、26、27)。CofJ においても、過去に HeLa 細胞や Caco-2 細胞のようなヒト上皮細胞への結合と同様に脂質とも結合することが報告されている (23)。

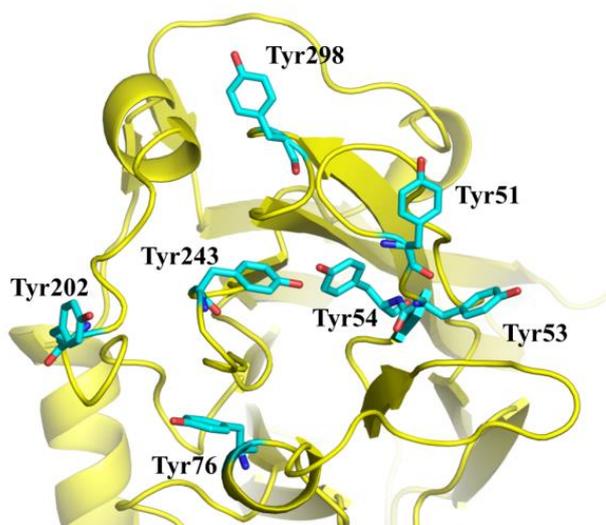


図 35 CofJ の構造の上部に形成されるチロシンクラスター。

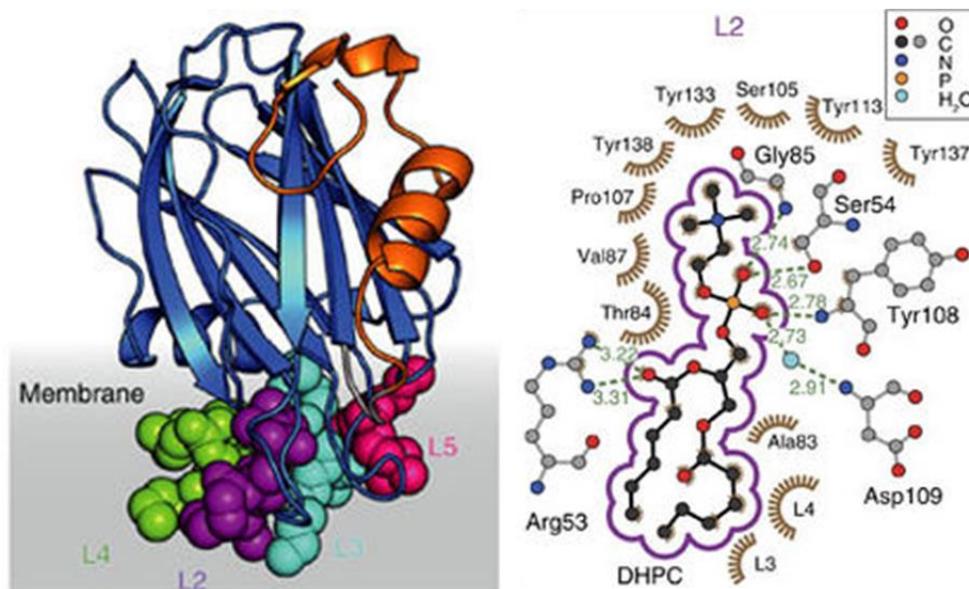


図 36 PFT である FraC の結晶構造。

(左図) FraC の結晶構造。L2,L3,L4,L5 は短鎖脂質である DHPC。
 (右図) L2 の DHPC の相互作用様式。参考文献 (25) の図を改変

そこで、CofJ のチロシンクラスターの役割を調べるために、51, 53, 54, 76, 202, 243, 298 番目のチロシン残基をそれぞれアラニン残基に置換した変異株を作製し、付着実験を行った。実験の結果、Y51A, Y54A, Y76A, Y202A, Y243A の 5 種類の変異株は大きく付着率が減少しており、これらのチロシン残基の変異は Caco-2 細胞への付着効率を優位に減少させることが明らかとなった (図 37、図 38、図 39、表 3)。また、Y53A 及び Y298A の 2 種類の変異株は、*cof+*株と比較して付着率があまり減少しておらず、付着過程においては他の 5 つのチロシン残基ほど重要でないと考えられる。

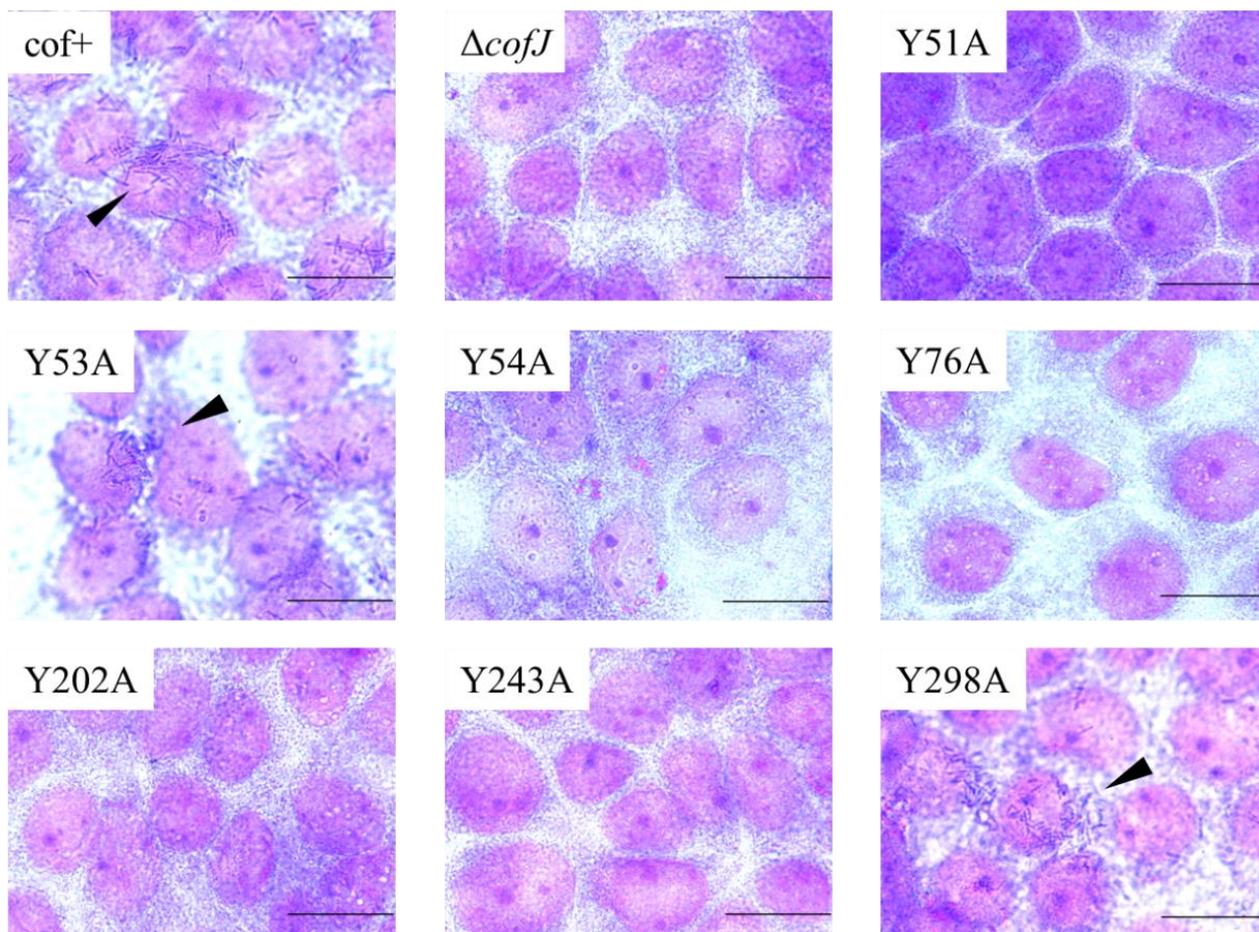


図 37 *cof+*株と CofJ のチロシンクラスター変異株を用いた付着実験後の細胞写真。黒矢印は Caco-2 細胞に付着した菌株を示している。スケールバーは 20 μm 。

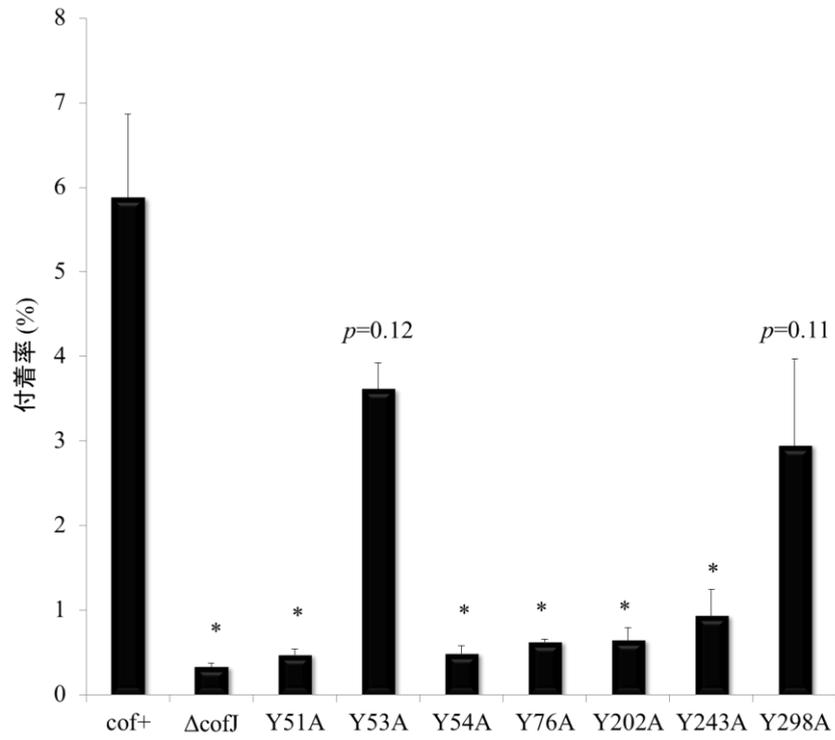


図 38. cof+株と CofJ のチロシンクラスター変異株を用いた場合の付着率

表 3. *cof+* と *CofJ* のチロシンクラスター変異株を用いた場合の付着率

	<i>cof+</i>	Δ <i>cofJ</i>	Y51A	Y53A	Y54A	Y76A	Y202A	Y243A	Y298A
平均値	5.88	0.33	0.47	3.61	0.49	0.63	0.66	0.94	2.95
標準誤差	1.00	0.05	0.07	0.31	0.09	0.04	0.15	0.31	1.03

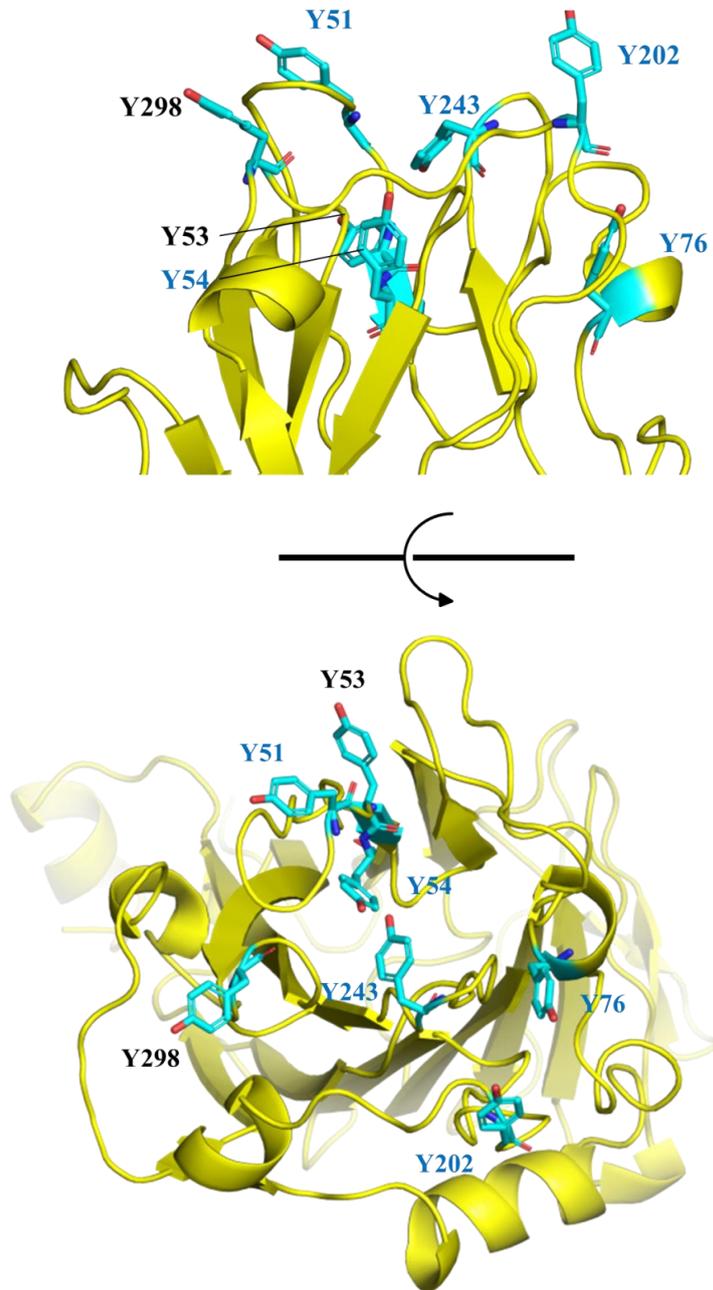


図 39 Caco-2 細胞への付着に關与するチロシンクラスター。

シアンで示したチロシン残基は、アラニン残基への変異によって Caco-2 細胞への付着率が優位に減少した。

第三項 腸管毒素原性大腸菌の定着因子 CFA/III の腸管定着モデルの構築

前項までの実験において ETEC の付着過程における CofJ のチロシンクラスターを含めた重要性を提示した。また、以前に報告された CofJ の結晶構造を、DALI server (28) を用いて類似構造検索を実施したところ、*Staphylococcus aureus* 由来の α -hemolysin、*Gardnerella vaginalis* 由来の vaginolysin、*Streptococcus pneumoniae* 由来の pneumolysin、*Pleurotus ostreatus* 由来の pleurotolysin A、*Clostridium perfringens* 由来の Perfringolysin O、*Streptococcus intermedius* 由来の intermedilysin などの PFTs と高い類似性を有することが明らかになった(図 40)。

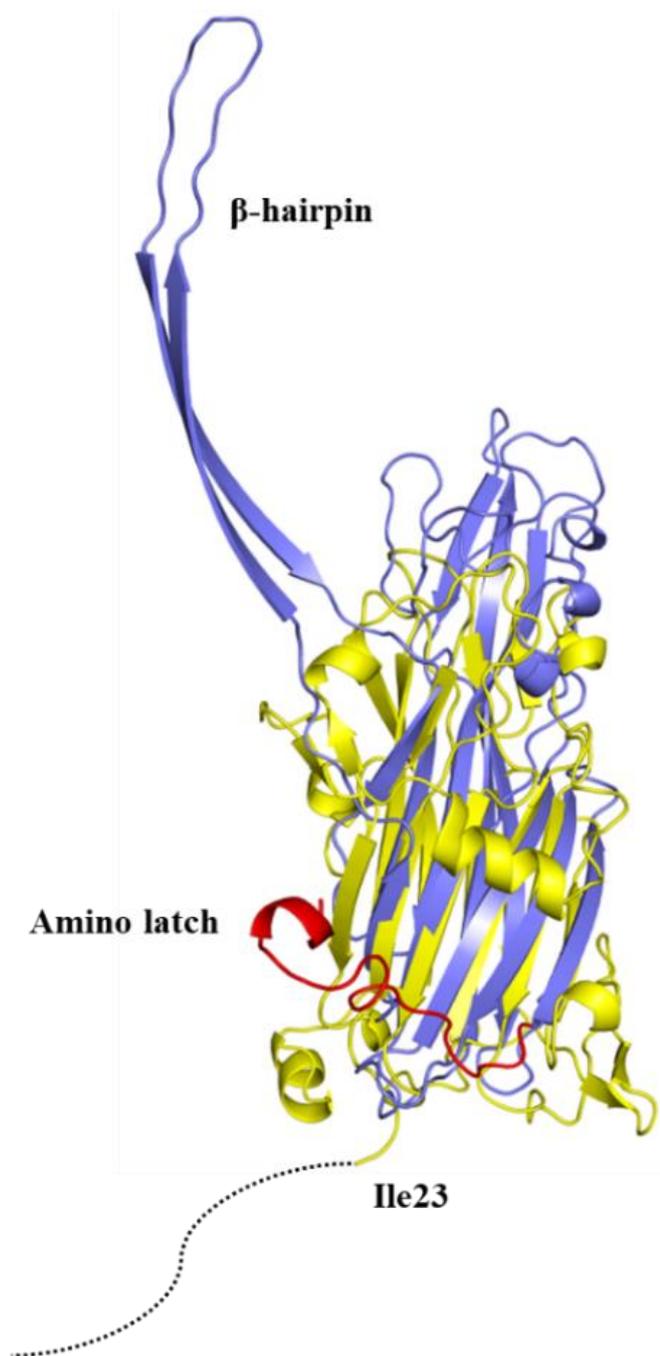


図 40 CofJ と α -hemolysin 構造の重ね合わせ。

CofJ(黄色、PDB code:5YQ0)。 α -hemolysin(紺色、PDB code:7AHL)。CofJの結晶構造中でディスオーダーしていた Ser1 から Asp22 までの 22 残基は黒い点線で表示している。 α -hemolysin において対応する N 末端領域である Ala1 から Val20 までの 20 残基は赤色で表示している。

さらに、CofJ の N 末端領域の空間的および方向的な配置は、 α -hemolysin の大きな特徴である”amino-latch”と呼ばれる N 末端部分のものと同様であった (図 40)。標的細胞表面上における α -hemolysin の pre-pore から pore 状態への移行において、初めは可動性が高く露出した amino-latch (15~20 残基) は、PFT の隣接するサブユニットを固定することによってオリゴマーの会合状態を安定化する (図 41) (29)。amino-latch 領域の分解は機能的な膜孔形成に影響を及ぼすことが知られている (26、27、29)。

注目すべきことに、CofB 三量体は CofJ の N 末端領域と特異的に相互作用し、この分泌タンパク質の膜孔形成を潜在的に妨げている可能性がある。現時点において CofJ が膜孔を形成するという実験的事実は存在していないが、PFT の pre-pore 状態を模した特徴的な構造によって、細胞表面と IV 型線毛の両方に結合する分子架橋として腸管付着に役立っていると考えられる (図 42)。

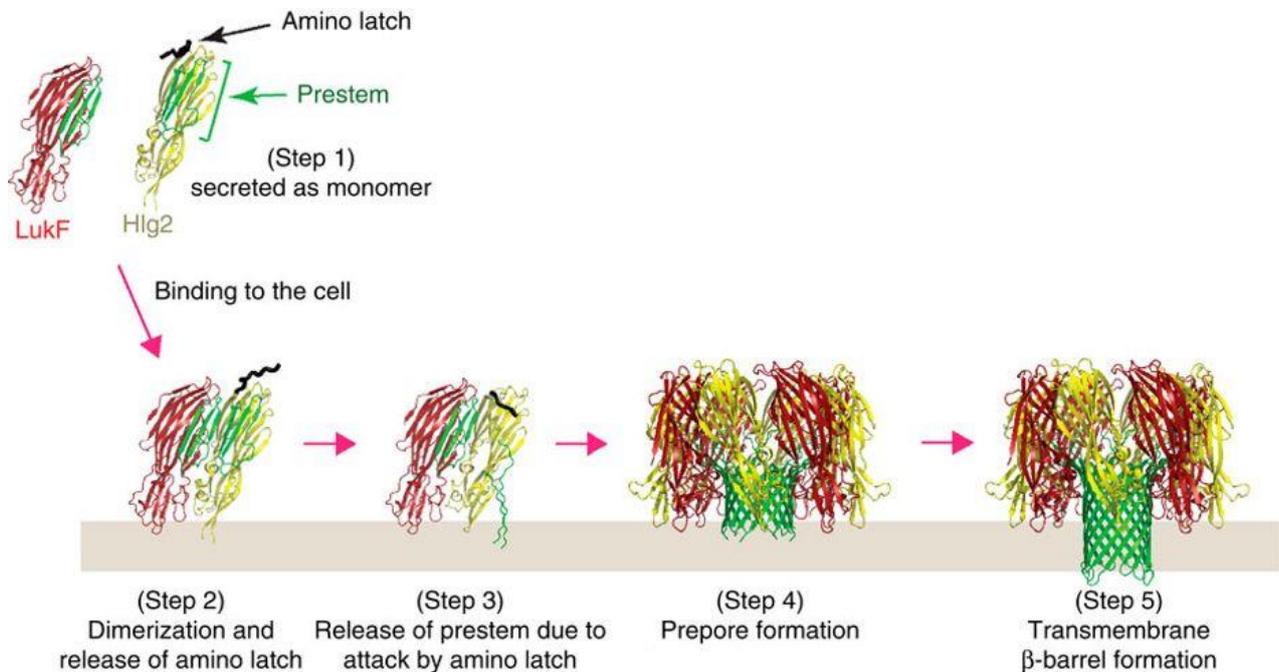


図 41 PFT によるポア形成機構のモデル図。

Staphylococcus aureus の産生する PFT、LukF、Hlg2 のポア形成機構。

参考文献 (29) の図を改変した。

CofJ の N 末端の相互作用部位の反対側に位置するチロシンクラスターは、実際に付着過程において、細胞の認識に重要な役割を果たしていた (図 37、38、39)。芳香族アミノ酸のクラスターの存在は、他の PFT においても一般的に見られ、細胞膜の脂質ヘッドグループ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おり (26、27)、CofJ においても脂質との結合が認められている (23)。CofJ の脂質に対する結合能は、腸上皮細胞への初期付着あるいは将来的な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管系細菌と競合において 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 (図 42)。

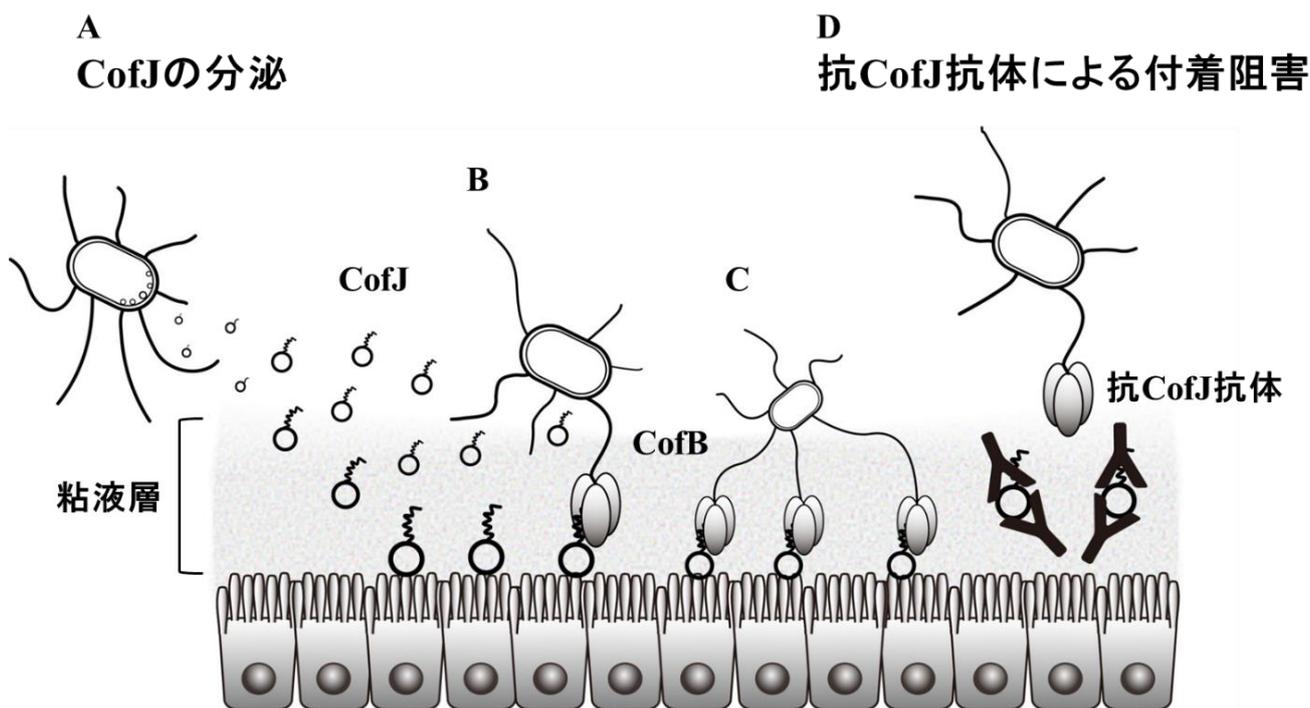


図 42 ETEC の初期付着と抗 CofJ 抗体による ETEC の定着阻害のモデル図。

(A) 小腸に侵入した ETEC は先ず CofJ 分子を分泌する。分泌された CofJ は腸上皮細胞表面に結合する。(B) ETEC は、CofJ の N 末端部位と IVb 型線毛の先端に存在する CofB 三量体の相互作用によって腸上皮細胞への付着を達成する。(C) 細胞表面上の CofJ 分子は別の ETEC の付着に利用される。細胞に強固に定着するために複数の線毛を使用して多価での結合も可能である。(D) ポリクローナル抗 CofJ 抗体は、CofJ と CofB 三量体との間の相互作用を阻害することによって ETEC の付着を阻害する。

第四項 IV 型線毛と分泌タンパク質を介した腸管定着機構の一般性

これまでに、CFA/III と同様に IVb 型線毛を産生する定着因子として、同じく ETEC の Longus、コレラ菌の TCP、シトロバクター・ローデンチウム菌由来の CFC などが知られており、いずれもオペロンにコードされた遺伝子により産生される(15-17)。興味深いことに、いずれのオペロンにも CFA/III における CofJ と同様に、分泌タンパク質の遺伝子がコードされているが(図 43)、それらのアミノ酸配列相同性は低い。しかしながら、N 末端領域のアミノ酸配列アライメントによって、CofJ の Phe10 に対応する芳香族残基を含む部分配列が、Longus の LngJ、TCP の TcpF、そして CFC の CfcJ の各分泌タンパク質の相当する配列と類似性を有していることが明らかとなった(図 44)。特に、高度に保存された芳香族残基はマイナーピリンとの結合に重要である可能性が高く、少なくとも ETEC、コレラ菌、シトロバクター・ローデンチウム菌などの IVb 型線毛を発現する腸内病原細菌において保存されているようである。

詳細な機構は不明であるが、*V. cholerae* の分泌タンパク質 TcpF の重要な 5 番目の芳香族残基を含む柔軟な N 末端 20 残基が、IVb 型線毛を介した TcpF 分泌、細菌付着、マイクロコロニー形成に関与していることが分かっているが (30)、これらの機能発現には前述した CFA/III と同様な相互作用モデルが重要であると考えられる。

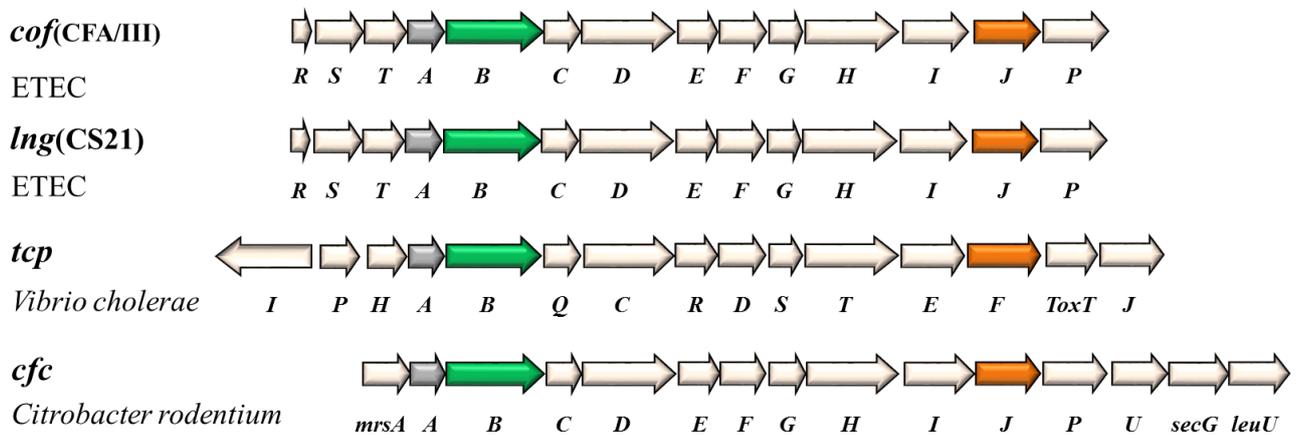


図 43 IVb 型線毛を形成するオペロン構造の比較。

ETEC が産生する定着因子 CFA/III、longus、*Vibrio cholera* が産生する定着因子 tcp、*Citrobacter rodentium* が産生する定着因子 cfc のオペロン構造の比較。

↓

CofJ	1	--SPS	SS	EGGA	F	TVNMPKTSTVDDIRGCPTLETP	32
LngJ	1	--STT	SS	EGGA	F	TVKMAKSSTVDDIKGCPTLETP	32
CfcJ	1	----K	SS	QNYG	F	SAGVKPCS-LWDTEFFPISFQVP	29
TcpF	1	FNDNY	SS	TSTV	Y	ATSNEATDSRGSEHLRYPYLEC	34

図 44 IVb 型線毛の分泌タンパク質の N 末端領域とのアミノ酸配列アライメント。

Longus の LngJ、TCP の TcpF、そして CFC の CfcJ のシグナル配列を除いた N 末端領域の配列を比較として表示している。

各分泌タンパク質のシグナル配列の切断部位は SignalP4.1 (31) により決定した。

黒矢印は全ての分泌タンパク質に保存されている芳香環残基を示している。

また、分泌タンパク質 CofJ が結合する CofB の H 型レクチンドメインのアミノ酸配列を用いたデータベース検索によって、多種多様な腸内細菌がマイナーピリン CofB に対応するタンパク質を有していることが分かった (表 4、図 45)。近年、臨床現場で繁用される β-ラクタマーゼ阻害剤に対する耐性菌が問題となっており、特に、*Serratia*、*Pseudomonas*、

Acinetobacter、*Citrobacter*、*Enterobacter* は SPACE と呼称され、その対策が重要視されている (32)。今回見出した腸内細菌の中には、SPACE のうち *Serratia*、*Citrobacter*、*Enterobacter* の少なくとも 3 種が存在していた。また、WHO が定義した新規抗生物質の開発が急務とされている 12 種類の薬剤耐性菌のうち (33)、高リスク群に属する *Enterobacter*、*Salmonella* とも含まれていた。これらの腸内細菌は、菌体表面上に形成した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。

表 4 CofB の H 型レクチンドメインのアミノ酸配列による BLAST 検索結果。

Organism	Accession number	E-value
<i>Escherichia albertii</i>	WP_059259580.1	3e-91
<i>Escherichia coli</i> (LngB)	EMV54823.1	1e-76
<i>Enterobacter lignolyticus</i>	WP_013365029.1	5e-71
<i>Serratia sp.</i>	WP_056781109.1	1e-22
<i>Salmonella enterica</i>	WP_088546469.1	1e-19
<i>Salmonella bongori</i>	WP_000680636.1	1e-19
<i>Ewingella americana</i>	WP_084674026.1	2e-17
<i>Cosenzaea myxofaciens</i>	WP_074388166.1	5e-17
<i>Rahnella aquatilis</i>	AFE60214.1	2e-14
<i>Morganella sp.</i>	WP_036419502.1	3e-11
<i>Citrobacter freundii</i>	WP_038634225.1	3e-07
<i>Providencia rettgeri</i>	WP_071548095.1	5e-07
<i>Enterobacter cloacae</i>	WP_095450582.1	2e-06
<i>Citrobacter werkmanii</i>	WP_085048648.1	5e-06
<i>Enterobacter mori</i>	WP_089599804.1	2e-05
<i>Citrobacter rodentium</i> (CfcB)	AAO17806.1	5e-05
<i>Klebsiella sp.</i>	WP_049838909.1	2e-04
<i>Citrobacter braakii</i>	WP_080860199.1	4e-04

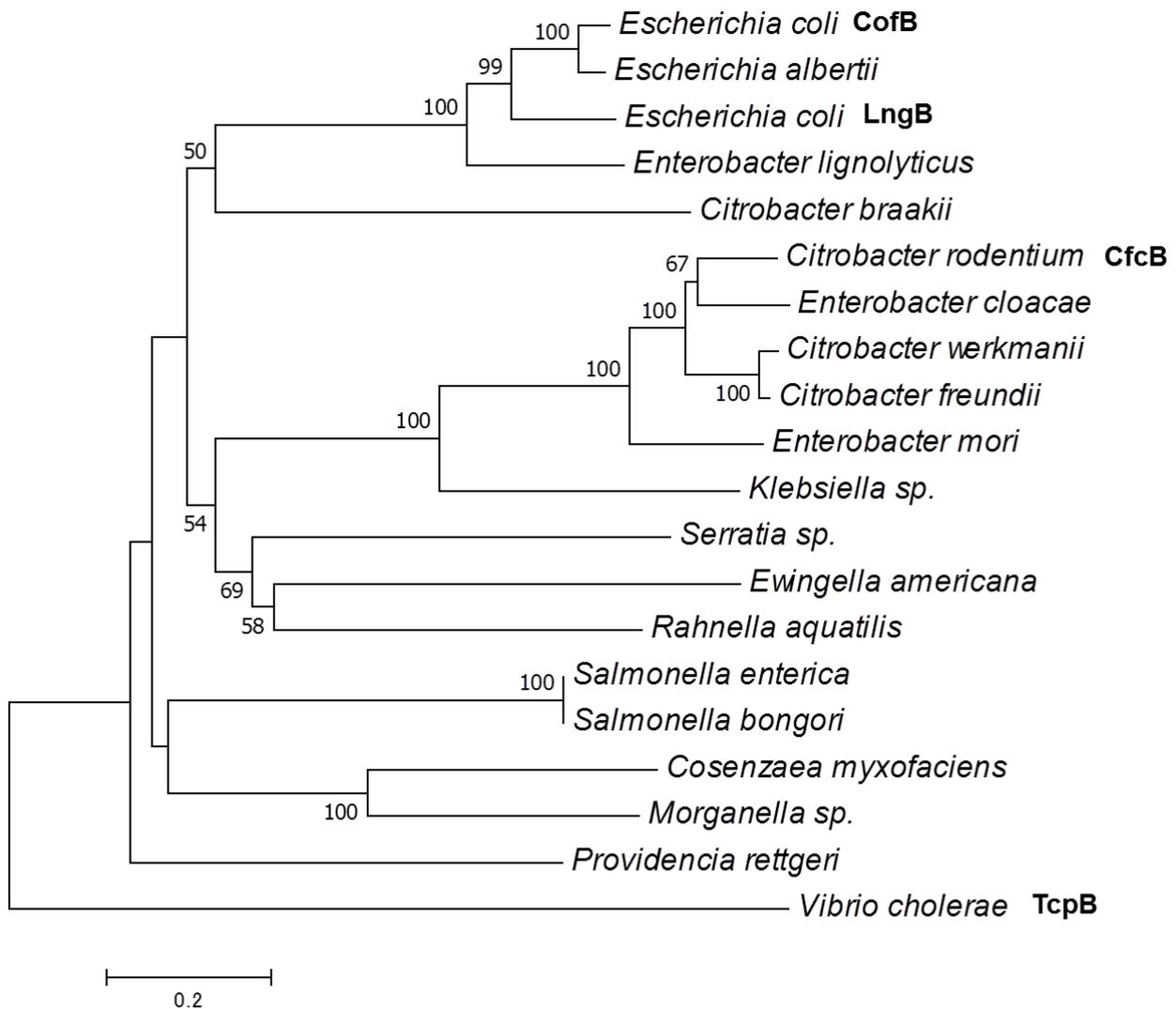


図 45 **CofB** と他のマイナーピリン(予測も含む)の系統樹。

表 4 で見出された腸内細菌の系統樹。太字で表示した *Escherichia coli* の **CofB**、*Escherichia coli* の **LngB**、*Citrobacter rodentium* の **CfcB**、*Vibrio cholerae* の **TcpB** は、これまで IVb 型線毛を有していることが明らかとなっていたマイナーピリンである。表 4 には *Vibrio cholerae* の **TcpB** は含まれていないが、比較のために組み入れた。

第三章 腸管毒素原性大腸菌の定着阻害ペプチドの設計

第一節 背景

前章で明らかとしたように、CofJ は ETEC の定着過程において、ヒト宿主細胞表面と CFA/III 線毛先端の両方を架橋するアンカーの役割を果たしていた。この腸管定着モデルにおいて、CofB と CofJ あるいは CofJ と細胞の間の相互作用は必要不可欠であったため、これらの結合を阻害することができれば ETEC の腸管定着を妨げることが可能ではないかと予想した。

定着因子 CFA/III (CS8) は最初に日本で同定されて以降、アメリカ、バングラデシュ、タンザニア、ケニアなどの広範な地域で見出され、遺伝学的解析の結果、CofJ のバリエントは Cluster Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb から構成されていた (図 46) (34)。

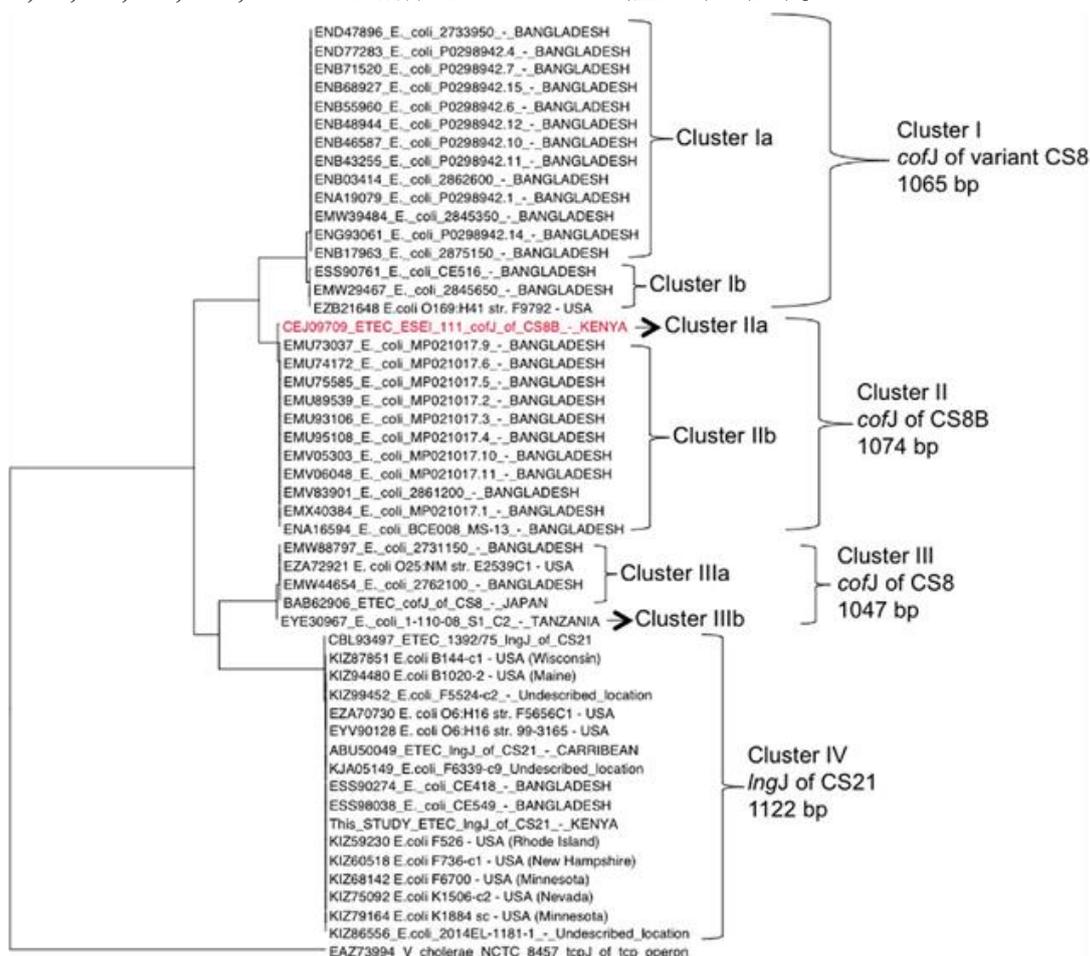


図 46 CofJ のバリエントの系統樹

CofJ のバリエントの系統樹。参考文献 (31) の図を改変した。

これらバリエーションの N 末端配列のマルチプルアライメントを実施したところ、Phe10 を中心として CofB との結合領域の保存度が非常に高かった (図 47)。一方、付着過程において重要であると考えられた構造の上部に位置するチロシンクラスター周辺の保存度を調べるために、ConSurf server (35) によって保存度の色分けを行った。その結果、この領域はループ構造の挿入や欠失が多く、アミノ酸配列の保存度は非常に低かった (図 48)。このため、変異の入りやすいチロシンクラスターを介した CofJ-宿主細胞間ではなく、アミノ酸保存度の高い N 末端領域を介した CofJ-CofB 間の相互作用を阻害することを試み、これまでに得られた複合体結晶構造やストイキオメトリーの情報を駆使して定着阻害剤の開発と阻害効率の検証を行った。

CofJ (本研究対象)	SPSS- <u>SEGG</u> AFTVNMPKTSTVDDIR
Ia_1	TSSTSADGKAFTVNKPKVSSSENLV
Ia_2	TSSTSADGKAFTVNKPKVSSSENLV
Ib_1	FSSTSVDGKAFTVNKAKVSSSENLV
Ib_2	FSSTSVDGKAFTVNKAKVSSSENLV
IIa	SPSS-SEGG AFTVNMPKVSTVDDTK
IIb_1	SPSS-SEGG AFTVNMPKVSTVDDTK
IIb_2	SPSS-SEGG AFTVNMPKTSTVDDIR
IIIa_1	SPSS-SEGG AFTVNMPKTSTVDDIR
IIIa_2	SPSS-SEGG AFTVNMPKTSTVDDIR
IIIb	SPSS-SEGG AFTVNMPKTSTVDDIR
	. : : : * * * * * . * * : : : :

図 47 CofJ のバリエーションの N 末端配列のアライメント

本研究で扱う CofJ と他の CofJ バリエーションの内、代表的なものを含めた N 末端領域のアライメント。黒の下線部は CofB との相互作用領域。

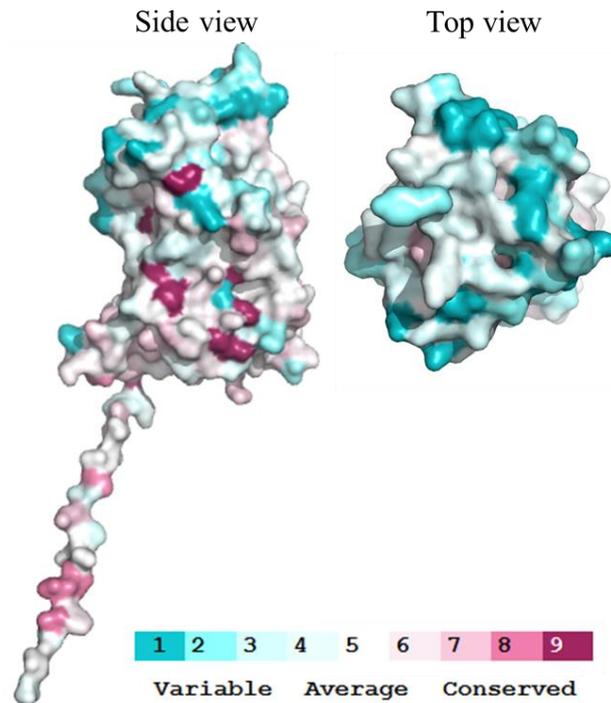


図 48 CofJ のバリエーション間のアミノ酸配列の保存度

ConSurf server を用いて計算した CofJ のバリエーション間でのアミノ酸配列の保存度。
赤色の表面は配列の保存度が高く、青色の表面は保存度が低い。

第二節 結果と考察

第一項 プルダウンアッセイによる CofJ-CofB 結合阻害実験

複合体構造を得ることに成功した CofJ(1-24)は、CofJ と比較して結合力は弱いながらも CofB の 3 箇所結合サイトに結合していた (第一章)。このことから、CofJ と CofB の結合を競合的に阻害することで ETEC の腸管細胞への付着を妨げることができるのではないかと考え、その結合阻害能を明らかにすべくプルダウンアッセイを行った。

プルダウンアッセイの結果、予め CofJ(1-24)を CofJ の 1000 倍量ほど CofB とインキュベートしておいたにも関わらず、His タグ付きの CofB と CofJ が共溶出されたことから(図 49)、CofJ-CofB 複合体の形成を阻害することは殆ど出来なかった。この理由としては、第一章の超遠心分析の結果から明らかなように、全長の CofJ は 3 箇所存在する結合サイトのいずれかに結合すれば付着能を発揮するのに対し、CofJ(1-24)は 3 箇所全ての結合サイトを占有する必要があるためであると考えられる。

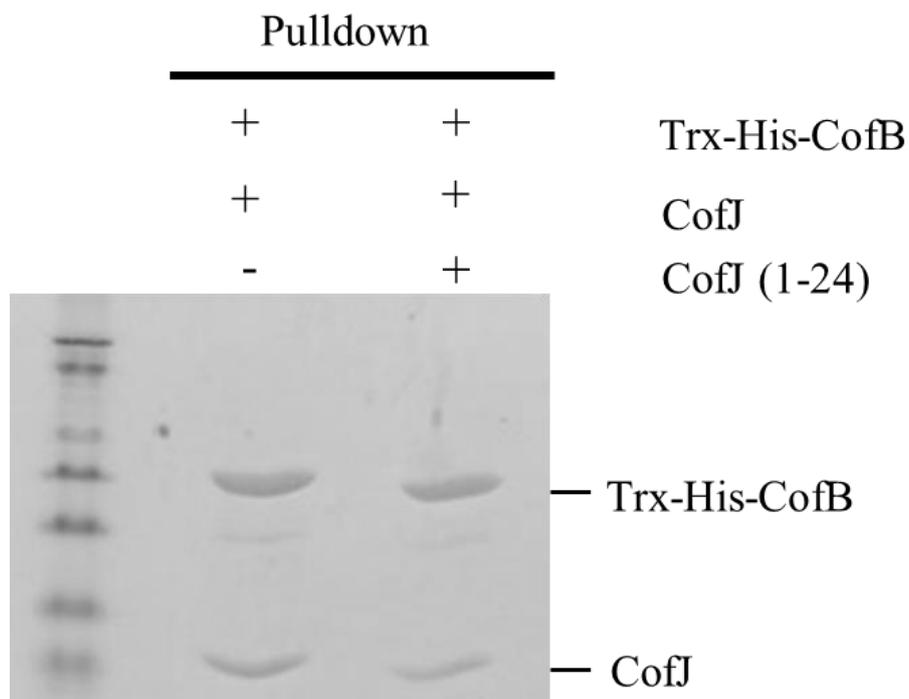


図 49 CofJ (1-24)による CofJ-CofB 結合阻害実験の結果。

CofJ(1-24)ペプチドでは CofB と CofJ の結合を阻害することができない問題点を、CofJ(1-24)を三量体化することにより解決することを試みた。三量体化するにあたっては、ロイシンジッパーの一種である転写因子 GCN4 をタグとして用いることにした。GCN4 は二量体として機能するため、GCN4 三量体を形成する変異体を採用した (図 50) (PDB code: 1GCM) (36)。

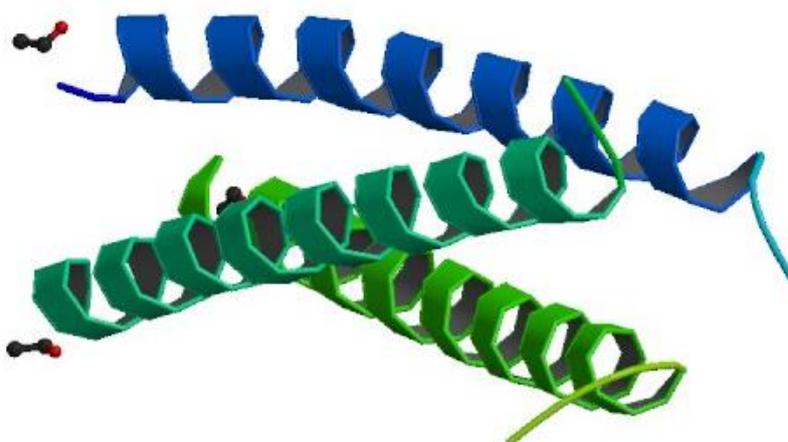


図 50 GCN4 変異体の三量体構造

CofJ(1-24)ペプチドの三量体化タグとして採用した GCN4 変異体の結晶構造。
(PDB code: 1GCM)

CofJ(1-24)のC末端側にリンカーとなるTSGGGの5残基とGCN4三量体タグを付加したタンパク質(CofJ(1-24)-GCN4)を大腸菌発現系により精製し(図51)、前記したプルダウンアッセイに用いたところ、CofJ(1-24)-GCN4の濃度上昇に伴いCofJのバンドの濃さが減少した(図52)。CofJ(1-24)では物質量比で1000倍となる1000 μ Mの濃度においても十分な阻害能を持たなかったが、CofJ(1-24)-GCN4はCofJと同濃度の1 μ M程度で高いCofJ-CofB結合阻害能を有することが明らかとなった。GCN4タグによる三量体化はCofJ-CofB複合体形成の阻害に非常に大きく寄与したものと考えられる。

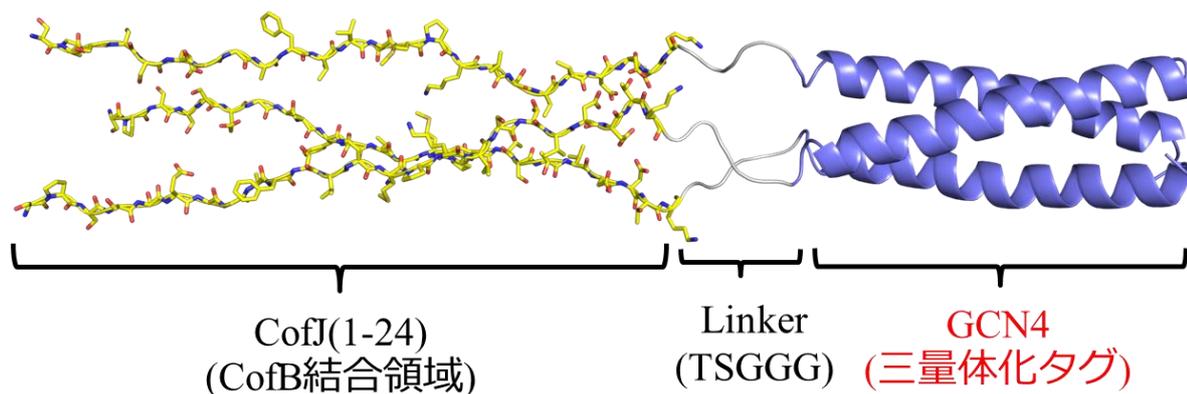


図51 CofJ(1-24)-GCN4の構造の模式図。

CofJ(1-24)部分を黄色、TSGGGからなるリンカーを灰色、GCN4タグを紺色で表示している。

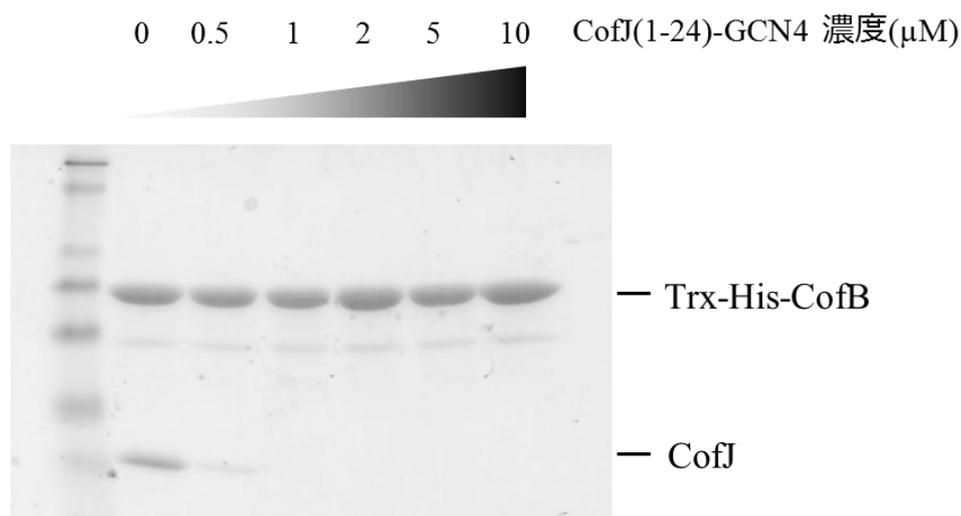


図52 CofJ(1-24)-GCN4によるCofJ-CofB結合阻害実験の結果。

次に、第一章で確かめられた最小の認識配列であるCofJ(4-16)を同様にGCN4タグで三量体化させたCofJ(4-16)-GCN4がCofBとCofの結合を阻害可能かどうかプルダウンアッセ

イによって確かめた。実験の結果、CofJ(4-16)-GCN4 は CofJ(1-24)-GCN4 と同様に濃度依存的に CofB と CofJ の結合を阻害することが明らかとなった (図 53)。

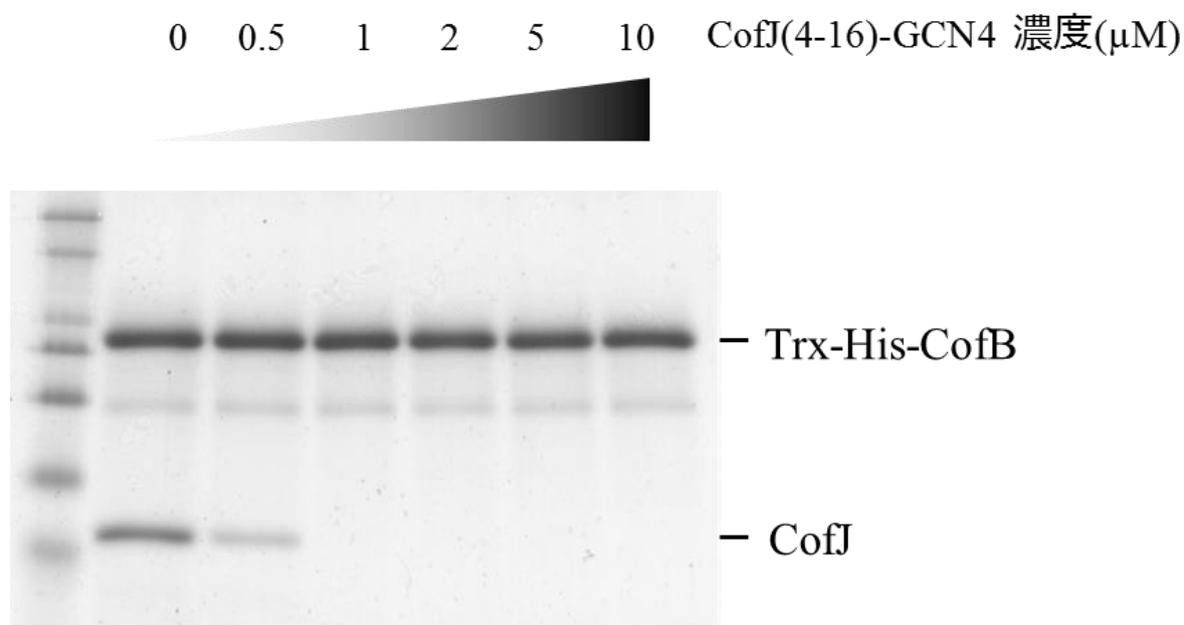


図 53 CofJ (4-16)-GCN4 による CofJ-CofB 結合阻害実験の結果。

第二項 等温滴定型熱量測定による CofJ ペプチド-GCN4 と CofB の相互作用解析

前項において CofJ の N 末端ペプチドを三量体化させたタンパク質は CofB と CofJ の結合を阻害することができた。次に、等温滴定型熱量計によって、これらの三量体化ペプチドと CofB との親和性を確かめた。ITC 測定の結果、CofJ(1-24)-GCN4 は解離定数 $K_d=43.5$ nM、CofJ(4-16)-GCN4 は解離定数 $K_d=80.5$ nM で CofB と結合しており、全長の CofJ よりも ($K_d=140$ nM) 強く結合していた (図 54)。

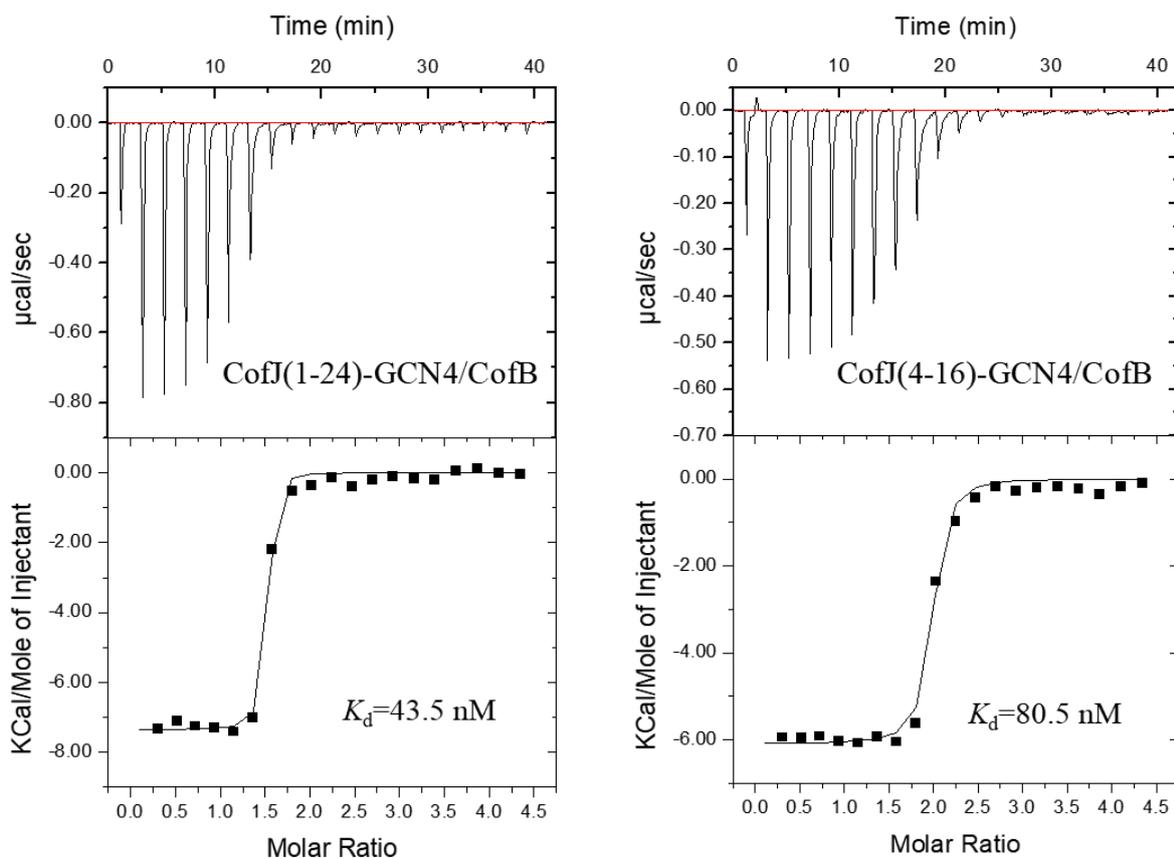


図 54 CofB と CofJ(1-24)-GCN4 もしくは CofJ(4-16)-GCN4 との ITC プロファイル。
 上段：観測されたサーモグラム。中段：熱量変化プロットとフィッティング結果(実線)。

第三項 CofJ ペプチド-GCN4 を用いた付着阻害実験

CofJ ペプチド-GCN4 は CofB と強く結合し、CofB と CofJ の結合を阻害したことから、ETEC の Caco-2 細胞への阻害が可能であると考え、付着阻害実験を実施した。その結果、CofJ (1-24)-GCN4 の濃度が 0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と上昇するにつれ、cof+株の付着率は、 $2.45 \pm 0.32\%$, $1.19 \pm 0.58\%$, $0.45 \pm 0.06\%$, $0.01 \pm 0.01\%$ と減少した (図 55, 56)。同様に、CofJ(4-16)-GCN4 とインキュベートした cof+株の付着率は、CofJ(4-16)-GCN4 の濃度が 0, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と上昇するにつれ、 $3.78 \pm 1.62\%$, $1.37 \pm 0.70\%$, $0.54 \pm 0.42\%$, $0.02 \pm 0.01\%$ と減少した (図 57, 58)。

以上の実験結果から、複合体結晶構造に基づき設計した CofJ ペプチド-GCN4 は、全長の CofJ よりも強く CofB 三量体に結合することが明らかとなり、さらに定着因子 CFA/III 発現株の Caco-2 細胞への付着を効果的に阻害することを示した。

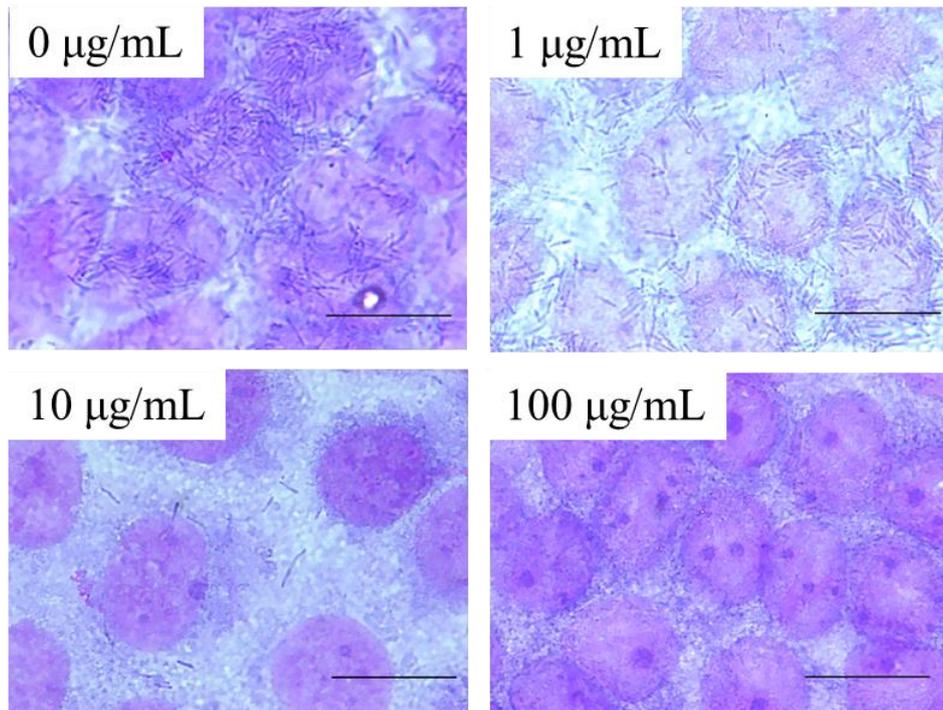


図 55 CofJ(1-24)-GCN4 を用いた付着阻害実験後の細胞写真。
 cof+株と表記した各濃度の CofJ(1-24)-GCN4 を混合し付着阻害実験を行った。スケールバーは 20 μm 。

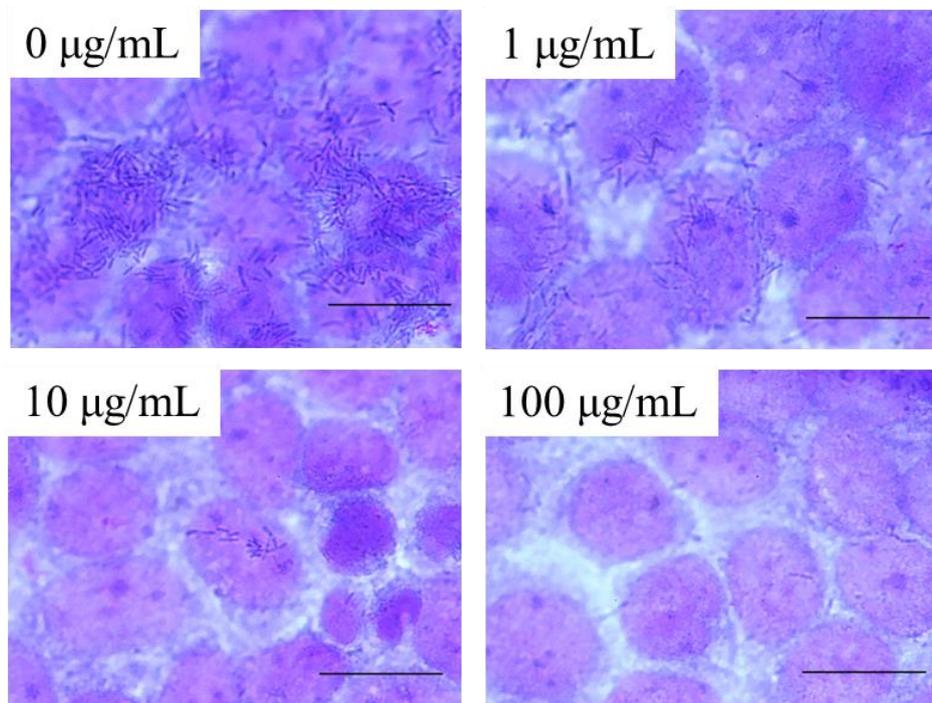


図 56 CofJ(4-16)-GCN4 を用いた付着阻害実験後の細胞写真。
 cof+株と表記の各濃度の CofJ(4-16)-GCN4 を混合し付着阻害実験を行った。スケールバーは 20 μm 。

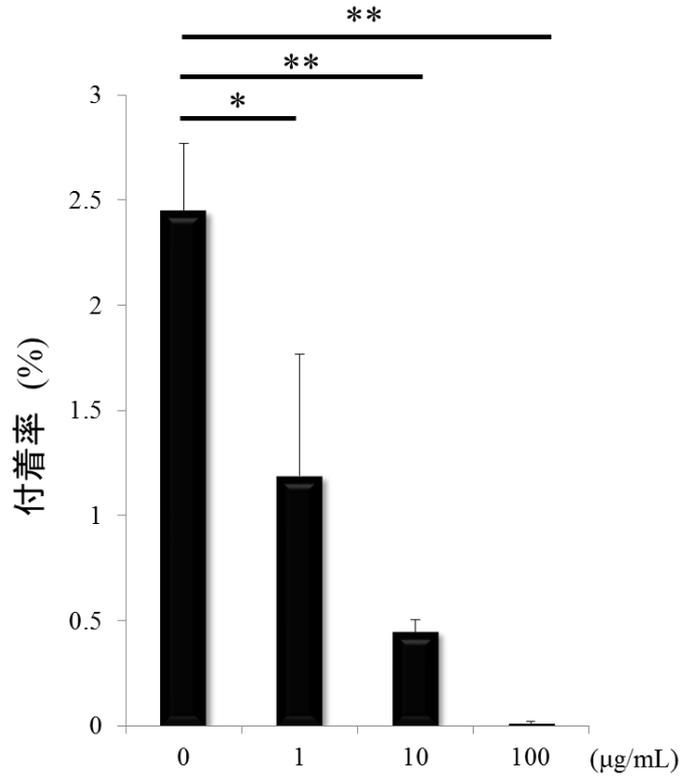


図 57 CofJ(1-24)-GCN4 を加えた場合の cof+株の Caco-2 細胞への付着率。

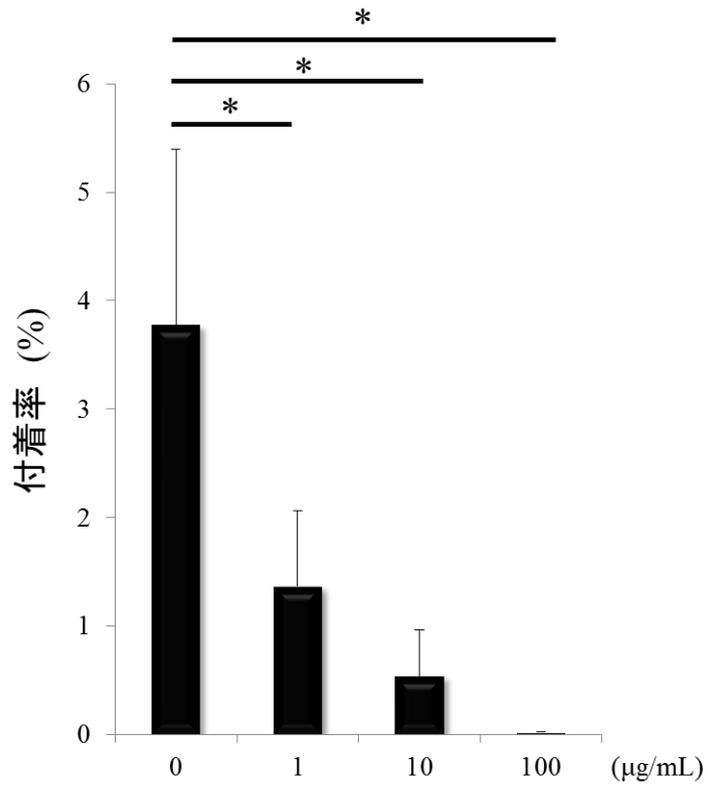


図 58 CofJ(4-16)-GCN4 を加えた場合の cof+株の Caco-2 細胞への付着率。

この実験結果は、CofJ ペプチド-GCN4 は ETEC に対する有望な定着阻害剤候補であるといえるだけでなく、ETEC の腸管細胞への定着は第二章の第三項で示したように、CofA から形成される線毛の先端部に存在する三量体 CofB と CofJ が相互作用することにより成立しているという仮説を補強するものであり、CofJ ペプチド-GCN4 はこれらの結合を阻害することで、定着阻害能を発揮していると考えられる（図 59）。

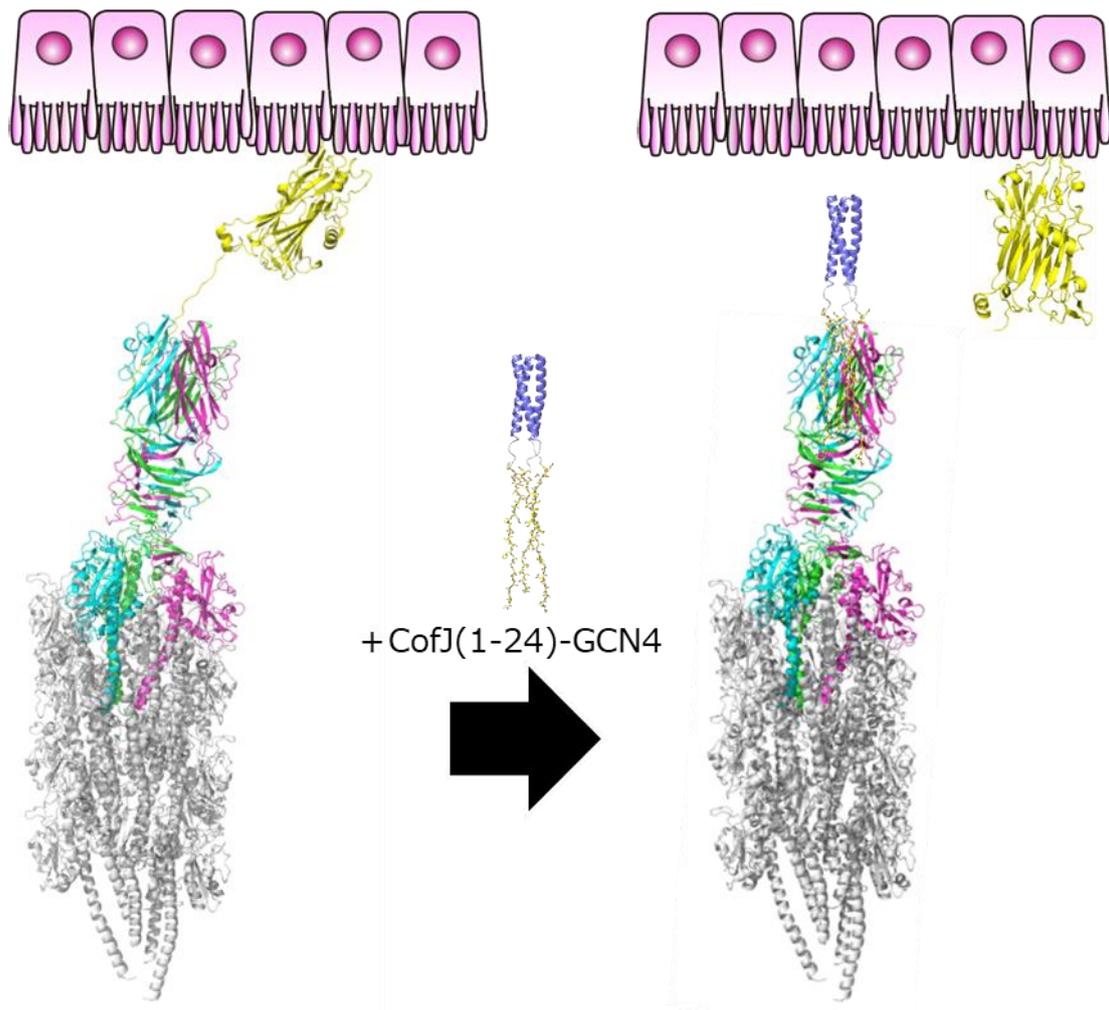


図 59 CofJ ペプチド-GCN4 を用いた ETEC の付着阻害機構のモデル図。

CofJ ペプチド-GCN4 が ETEC の線毛先端部の CofB の 3 箇所結合サイトに同時に結合することで、CofJ と CofB の結合を阻害し、ETEC の腸上皮細胞への付着を阻害する。

結語

現時点で、広範に適用可能な ETEC ワクチンは開発されていない (3)。これは、少なくとも 25 種類以上の定着因子 (CFs) や、感染の異なる段階で機能すると考えられている他の分泌型非 CF タンパク質を含む病原細菌の高度かつ複雑な定着機構が存在するためであると考えられている (4)。

CU 経路により形成される比較的短いクラス 5 型線毛 (1~5 μm) の CF は標的細胞表面と強力に結合することが知られているが (37、38)、その本格的な定着に先立ち、腸管系病原細菌は厚さ約 15~30 μm の内粘液層を潜り抜けて、標的細胞に付着する必要がある。従って、そのための特定の異なる機構が必要だと考えられている (39)。そのような機構を担うタンパク質のうちの 1 つが、近年明らかにされた ETEC の非 CF タンパク質 EtpA である。EtpA は菌体外に分泌され、典型的な長さが 10-15 μm の繊維状タンパク質である鞭毛の先端部と標的細胞を架橋する分子として機能することが報告されている (40、41)。鞭毛は細菌の運動性に関与することが幅広く知られているが、細菌への定着にも関与することは、驚くべき知見である。野生型 CFA/III 株は鞭毛を形成しない非運動性の ETEC 株であり、CFA/III と実質的な構造相同性を有し、ETEC 臨床分離株の中で最も一般的な CF の 1 つである Longus を有するいくつかの ETEC 株も鞭毛非形成株であることが知られている (42、43)。第一章および第二章で明らかにした CofJ の機能モデルは、興味深いことに、EtpA の場合と同様に、分泌タンパク質が繊維状タンパク質と宿主細胞間の橋渡しとして働くことを示した。したがって、分泌タンパク質と鞭毛および IVb 型線毛のような比較的長い (5~15 μm またはそれ以上の長さ) 繊維状タンパク質 (41) との間の相互作用は、粘液層を回避し初期付着を達成するための ETEC の共通の戦略であることが推測される。

最近の研究において、EtpA を標的としたワクチンが有効であることが示されており (44)、本研究から抗 CofJ ポリクローナル抗体の Fab 断片が大腸菌 CFA/III 産生株の腸上皮細胞への付着を顕著に阻害することも示された。以上の知見に加えて、第三章の結果から、CofJ の CFA/III 線毛との相互作用領域を含む三量体化ペプチドが、CFA/III 発現大腸菌株の付着を有意に阻害することも示された。

細菌の初期付着がすべての腸内病原体に共通の重要な段階であることを考えると、本論文で示した分泌タンパク質と IVb 型線毛間の相互作用は、ETEC 感染に対するワクチン、または抗付着剤等の魅力的な新規創薬標的となる可能性を秘めている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始に渡りご指導賜りました大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野 大久保忠恭教授、吉田卓也准教授、河原一樹助教、並びに大阪大学微生物病研究所ゲノム情報解析分野 中村昇太特任准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言ならびに御激励を賜りました大阪大学大学院工学研究科高分子バイオテクノロジー領域 小林祐次招へい教授、並びに大阪大学微生物病研究所細菌感染分野 飯田哲也教授、児玉年央准教授、松田重輝助教に深く感謝いたします。

本論文の審査をしていただきました大阪大学大学院薬学研究科 小比賀聡教授、ならびに大阪大学産業科学研究所 西野邦彦教授に深く感謝いたします。

等温滴定型熱量測定、超遠心分析を中心に研究全般に渡り広くご指導いただきました大阪大学大学院工学研究科高分子バイオテクノロジー領域 丸野孝浩研究員に心より感謝致します。また、透過型電子顕微鏡像の撮影に際して、種々御便宜を図っていただき、御助言ならびにご指導を賜りました京都大学生存圏研究所バイオマス形態情報分野 今井友也准教授に深く感謝致します。さらに、X線結晶構造解析を中心に研究全般に渡り広くご指導いただきました大阪大学微生物病研究所ゲノム情報解析分野 元岡大祐特任助教、並びに株式会社ビケンバイオミクス 深草俊輔博士に心より感謝致します。

博士課程において科学研究費補助金並びに研究奨励金を賜りました日本学術振興会に感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり、終始支えてくださいました家族と友人、大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野の皆様にご深く感謝致します。

実験の部

第一章の実験

定着因子 CFA/III 発現株と変異株の作製

cof 遺伝子クラスターの塩基配列解析により、定着因子 CFA/III のクローニングに有用な制限酵素部位 (*KpnI* および *StuI*) が見出された。*KpnI* (GenBank accession number : AB049751 の 1 番目) および *StuI* (13790 番目) の部位は、それぞれ *cof* 遺伝子の推定プロモーター配列の上流および *cof* 遺伝子クラスターの最後の遺伝子である *cofP* の下流に位置する。*cof* 遺伝子クラスターを含む pSH1134 (19) を *StuI* (New England Biolabs) で切断し、リン酸化 *KpnI* リンカー (Takara) に連結し、続いて *KpnI* (New England Biolabs) で切断した。得られた 13.8kbp の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で単離し、pSC101 由来低コピー数プラスミドベクターである pMW119 (Nippon Gene) の *KpnI* 部位に挿入した。このように作製された組換えプラスミドを pTT240 と名付けた。完全長の *cof* 遺伝子クラスターを含む組換えプラスミド pTT240 を含む大腸菌 K-12 株由来 HB101 (TaKaRa Bio) を CFA/III の機能解析に使用した。定着因子 CFA/III を産生し、Caco2 細胞に付着する CFA/III 陽性大腸菌 HB101 (*cof*+株) および野生型大腸菌 31-10 の能力は同様であった (19)。

cofJ 遺伝子欠損プラスミド構築のために、プラスミド pTT240 をテンプレートとして使用した。*cofJ* 遺伝子のオープンリーディングフレーム (11769-12382) を制限酵素 *NcoI* (New England Biolabs) で切断した。酵素処理産物をアガロースゲルで精製し、Ligation High Ver.2 キット (Toyobo) を用いてセルフライゲーションした。連結したプラスミド (Δ *cofJ*) で大腸菌 HB101 (Δ *cofJ* 株) を形質転換した。

ΔcofB プラスミドは以前に報告されたように構築した (21)。*cofB* 遺伝子のオープンリーディングフレーム (3766-4676) を *NgoMIV* (New England Biolabs) および *NheI*-HF (New England Biolabs) で切断した。酵素処理産物は Ligation High Ver.2 キットを用いて制限酵素 *XhoI* の認識配列を含むアダプター (5'-CCGGCTCGAGGCTAAG-3' および 5'-CTAGCTTCCGCTCGAG-3') と連結した。連結プラスミド (Δ *cofB*) を大腸菌 HB101 (Δ *cofB* 株) に形質転換した。

cofA 遺伝子欠損プラスミド構築のために、プラスミド pTT240 をテンプレートとして利用した。*cofA* 遺伝子のオープンリーディングフレーム (3373 番目) および pMW119 ベクターの *SpeI* 認識部位を制限酵素 *SpeI*-HF (New England Biolabs) で切断した。酵素処理産物は、NEBuilder HiFi DNA Assembly master mix (New England Biolabs) を使用して終止コドン TAA を含むアダプター (5'-TACAGATACCCACAACCTCAAAGGAAAAGGACTAGTAATTATCATTGACTAGCCCATCTCAATTG-3'、5'-GTGATAACTGGGAGTATGTGGCAGTTGGTACTCTCGAGTAATCCTTCTGGTTCTTATGATGCTCTGTCTG C-3') と連結した。調製したプラスミド (Δ *cofA*) を大腸菌 HB101 に形質転換した (Δ *cofA* 株)。

cofD 遺伝子欠損プラスミド構築のために、*cofD* 遺伝子のオープンリーディングフレーム (6318 番目) および pMW119 ベクターの *AatII* 部位を制限酵素 *AatII* (New England Biolabs) で切断した。酵素処理産物は、NEBuilder HiFi DNA Assembly master mix (New England Biolabs) を使用して終止コドン TAA を含むア

ダ プ タ ー (5'-CGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACC-3'、5'-TAAAAGACGTATCTGTTCTTGCATTTATTGGACTCGAGTAACCGTCAGAATATCGTATGCTTGATAATGTAC-3') と連結した。調製したプラスミド (*ΔcofD*) を大腸菌 HB101 に形質転換した (*ΔcofD* 株)。

CofA、CofB、CofJ の大量発現及び精製

ピリンの N 末端部には疎水性の α -ヘリックスが存在しているため難溶性であり、精製が困難であった。CofA の溶解度を改善するため、N 末端の Met1 から Phe28 までの 28 残基を除外することとした。クローニング、発現及び精製は過去に報告した論文の通りに行った。以下に手順を簡潔に示す。CofA の N 末端部を除いた *cofA* 遺伝子を含む DNA 断片はプラスミド pTT240 をテンプレートとし、Forward primer : 5'-ACGAGGATCCGACTCACGTACTGTTTCTGAATTG-3' と Reverse primer : 5'-ACCTGTATAAGCTTATCTTATTAACGGCTCGCCAAAG-3' を使用して PCR で増幅した。制限酵素 *Bam*HI と *Hind*III により処理したのち同様の処理を行った PET32b 改変ベクターにライゲーションしたプラスミドを発現用ベクターとして CofA 蛋白質発現に使用した。

発現ベクターを導入した *Origami B*(DE3)は、大量発現のためアンピシリン (終濃度 100 μ g/ml) を加えた LB 培地で培養し、終濃度 0.1 mM の IPTG を加えることで発現誘導を行った。遠心分離で回収した菌体を PBS に懸濁し、終濃度 0.2 mg/ml のリゾチーム、終濃度 0.1%の Tritone-X100 を加えた。菌体は超音波により破碎し、遠心分離(35000g,40 min)により上清を回収した。得られた上清は Ni^{2+} を結合し、PBS で平衡化した Ni カラム(Hitrap chelating 5ml, GE Healthcare Biosciences)に加えた。10 mM Imidazole を加えた PBS で洗浄したのち、Histag 付きの CofA は Imidazole グラジエントで溶出した。CofA を含む画分は PBS で透析(277 K, 12 hr)したのちスロンビンを加え 20°Cで 3 日間放置しタグを切断した。タグを切断した CofA は平衡化した Ni カラムを通過させることでタグと分離し、20 mM Tris-HCl pH 7.5 で平衡化したゲルろ過カラム(Superdex75 26/60, GE Healthcare Biosciences)を用いてさらに精製した。精製した CofA は SDS-PAGE により精製度を確認した。

CofB 蛋白質の精製にあたって溶解度を改善するため、CofA と同様に N 末端側の疎水性部分 28 残基を切断した大腸菌発現系を構築した。詳細なクローニング、発現精製に関しては過去に報告した論文の手法に従った。発現ベクターを導入した *Shuffle T7 Express LysY*(DE3) (NEB)は、カナマイシン(20 μ g/ml)とクロラムフェニコール(10 μ g/ml)を加えた LB 培地で培養し、終濃度 0.1mM の IPTG を加えることで発現誘導を行った。菌体は遠心分離で回収し、50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl に懸濁後、終濃度 1 %(v/v)となるように Triton-X100 を加えた。20 分の氷上での攪拌後、懸濁液を超音波破碎し可溶性蛋白質を含む上清は遠心分離により回収した。

得られた上清は、 Ni^{2+} イオンを結合させ緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl, 0.1% Triton-X100) で平衡化したカラム(Hitrap chelating 5ml, GE Healthcare Biosciences)に加えた。10 mM Imidazole を加えた緩衝液で洗浄したのち、Histag 付きの CofB は Imidazole グラジエントで溶出した。CofB を含む画分は 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl で透析(4°C, 12hr)したのち HRV3C protease (Novagen) を加え 20°Cで 3 日間放置しタグを切断した後、20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10mM Imidazole で平衡化したカラム

(Hitrap chelating 5ml)を通過させタグを分離した。得られた蛋白質溶液は 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl で平衡化したイオン交換カラム (Hitrap Q HP, GE Healthcare Biosciences) に吸着させ、0~2M の NaCl グラジエントで分離溶出した。さらに 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl で平衡化したゲルろ過カラム (Superdex200 26/60, GE Healthcare Biosciences) を用いて最終精製を行った。精製した CofB は SDS-PAGE により精製度を確認した。

CofJ 大量発現用プラスミドは、pTT240 プラスミド。詳細なクローニング、発現精製に関しては過去に報告した論文の手法に従った。発現ベクターを導入した Shuffle T7 Express LysY(DE3) (NEB) は、カナマイシン(20 µg/ml)とクロラムフェニコール(10 µg/ml)を加えた LB 培地で培養し、終濃度 0.1 mM の IPTG を加えることで発現誘導を行った。菌体は遠心分離で回収し、50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl に懸濁後、終濃度 1%(v/v)となるように Triton-X100 を加えた。氷上で 20 分間攪拌後、懸濁液を超音波破碎し可溶性蛋白質を含む上清は遠心分離により回収した。

得られた上清は、Ni²⁺イオンを結合させ緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl, 0.1% Triton-X 100) で平衡化したカラム(Hitrap chelating 5ml, GE Healthcare Biosciences) に加えた。10mM Imidazole を加えた緩衝液で洗浄したのち、Histag 付きの CofB は Imidazole グラジエントで溶出した。CofB を含む画分は 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl で透析(4°C, 12hr)したのち HRV3C protease (Novagen) を加え 20°C で 3 日間放置しタグを切断した後、20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl 10mM Imidazole で平衡化したカラム (Hitrap chelating 5ml)を通過させタグを分離した。得られた蛋白質溶液は 20 mM Tris-HCl pH 8.0 150 mM NaCl で平衡化したイオン交換カラム (Hitrap Q HP, GE Healthcare Biosciences) に吸着させ、0~2M の NaCl グラジエントで分離溶出した。さらに 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl で平衡化したゲルろ過カラム (Superdex200 26/60, GE Healthcare Biosciences) を用いて最終精製を行った。精製した CofB は SDS-PAGE により精製度を確認した。

cofJ 遺伝子をコードしている DNA 配列を 2 本のプライマー 5'-GCGCCCGGGTCGCCATCCTCTTCAGAAGG-3'、5'-CAAGAATTCTTATTAATCAAGGCCACAAGCCTTC-3'をプラスミド pTT240 から増幅した。CofJ 発現プラスミドは、PCR 産物を *Sma*I および *Eco*RI で切断し pET48b ベクターに連結した。N 末端欠損型 CofJ (Δ N24-CofJ) の DNA 配列は、2 本のプライマー (5'-CAAAGGTTTCAACCCGTTGG-3'および 5'-GAGAAAGTCCCTGGGCCAGACCCA-3')を使用した逆 PCR 反応によって CofJ 発現プラスミドから増幅し、セルフライゲーションによって連結した。完全長 CofJ および Δ N24-CofJ を含むこれらのプラスミドで大腸菌発現株 Shuffle T7 Express LysY を形質転換した。

大腸菌をカナマイシン (35µg/ mL) を含む LB 培地中で OD₆₀₀ が約 0.6 になるまで培養した後に、0.2 mM の IPTG を添加し 20°C で 18 時間誘導発現させた。菌体は遠心分離で回収し、50 mM Tris-HCl pH 8.0 1M NaCl に懸濁後、終濃度 0.1%(v/v)となるように Triton-X100 を加えた。氷上で 10 分間攪拌後、懸濁液を超音波破碎し可溶性蛋白質を含む上清は 4°C で 1 時間、24,000×g の遠心分離により回収した。得られた上清は、Ni²⁺イオンを結合させ緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl, 0.1% Triton-X100) で平衡化したカラム(Hitrap chelating 5ml, GE Healthcare Biosciences) に加えた。15 mM Imidazole を加えた緩衝液で洗浄したのち、Histag 付きの CofJ は Imidazole グラジエントで溶出した。Histag 付きの CofJ を含む画分は Turbo3C プロテアーゼ (Accelagen) を 30U 加えることで切断し、緩衝液 (50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 15mM Imidazole) に対して 10°C で一晩透析し、ニッケルキレートカラムを用いてタグを分離した。

得られた蛋白質溶液は 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl で平衡化したゲルろ過カラム (Superdex200 26/60, GE Healthcare Biosciences) を用いて最終精製を行った。精製した CofJ は SDS-PAGE により精製度を確認した。また、精製した CofJ の一部を 4°C で 2 ヶ月間放置することで、プルダウン解析に使用する分解 CofJ を調製した。

Caco-2 細胞を用いた付着実験

pTT240、*ΔcofB* および *ΔcofJ* を有する大腸菌株をアンピシリン (100 μg/mL) が含有する LB 培地で 25°C、一晚培養した後、CFA agar (1% カザミノ酸、0.15% 酵母抽出物、0.005% MgSO₄、0.0005% MnCl₂、および 2% アガロース) に塗布し、37°C で 24 時間 CFA/III 発現を誘導した。CFA agar 上で培養した菌体を PBS で溶解回収し、1.0×10⁹ 個/mL となるように懸濁液を調製した。

Caco-2 細胞を 50 μg/mL ゲンタマイシンおよび 10 % ウシ胎仔血清を含有するダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中、37°C、5% CO₂ で継代培養した。Caco-2 細胞を、6 ウェル組織培養プレート中のカバーガラス上に播種した。この培養細胞を 2 週間分化培養したものを付着実験に使用した。分化細胞は PBS で 2 回洗浄し、1% D-マンノースおよび 100 μg/mL アンピシリンを含む 2 mL の DMEM を添加した。次に、200 μL の細菌懸濁液を添加し、37°C、5 % CO₂ で 3 時間インキュベートした。インキュベート後に各ウェルを PBS で 3 回洗浄し、メタノールで 5 分間固定した。固定後 10 分間乾燥させた後に 20 % ギムザ溶液で 30 分間染色した。染色後に蒸留水で 3 回洗浄しイソプロパノールで余分なギムザ溶液を除去後、キシレンでカバーガラスを洗浄した。細菌の細胞への付着の様子を光学顕微鏡で観察した。

付着数の定量分析のために Caco-2 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、2 週間分化培養した。付着実験の前に Caco-2 細胞を PBS で 2 回洗浄し、1% D-マンノースおよび 100 μg/mL アンピシリンを含む 500 μL の DMEM を添加した。50 μL の細菌懸濁液を添加し、37°C、5% CO₂ で 3 時間インキュベートした。インキュベート後に PBS で 3 回洗浄し、500 μL の 0.1 % (v/v) Triton-X100 を含む PBS で細胞を溶解回収した。回収したサンプルを段階希釈し、100 μg/mL のアンピシリンを含む LB 寒天プレート上に塗布し 37°C で培養することで CFU (Colony Forming Unit) を計数した。付着率は、計数した CFU の数を接種した菌数で割って計算した。統計的解析は、両側のウェルチの t 検定によって行った (n=5)。 ** *p*<0.005。 * *p*<0.05。

ウエスタンブロットティング

各菌株は CFA/III 線毛発現のために CFA agar 上で培養した。PBS に再懸濁し、OD₆₆₀ に基づいて標準化した (WCC : 全細胞画分)。WCC を 20,000×g で 10 分間遠心分離し、上清を 0.22 μm のフィルター処理した (Sup)。これらのサンプルは、SDS サンプル緩衝液中で 95°C で 10 分間インキュベートすることによって変性させた。各サンプルは SDS-PAGE で分離し、セミドライブロットティング装置を用いて PVDF 膜 (Amersham) に転写した。

PVDF 膜を 5% スキムミルクを含有した PBS-T (0.05% Tween-20 を含む PBS) で 1 時間ブロッキング後、PBS-T で 3 回洗浄した。抗 CofJ ウサギ血清 (1 : 20,000 希釈) と抗 DnaK 抗体 (Abcam) と共に 1 時間インキュベートした後に PBS-T で 3 回洗浄した。1 : 2,000 に希釈した Western BLoT Rapid Detect v2.0 (TaKaRa-Bio) と Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 と 1 時間インキュベートした。観察

は LAS4000 (Fujifilm) により行い、Western BLoT Chemiluminescence HRP Substrate (TaKaRa-Bio) による化学発光で検出した。

透過型電子顕微鏡像の撮影

各菌株をアンピシリン (100 μ g/mL) を含む LB 培地で 25 $^{\circ}$ C で 20 時間培養した後、アンピシリン (100 μ g/mL) を含む CFA agar 上に塗布し 37 $^{\circ}$ C で 28 時間培養することで CFA/III 線毛を発現誘導させた。グロー放電した炭素被覆銅グリッドを寒天上の大腸菌を接触させることによりに移し、5 滴の緩衝液 (40mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl) でグリッドを洗浄した後に 2% 酢酸ウラニルでネガティブ染色した。作製したメッシュを 120kV の加速電圧で動作する JEM-1400 (JEOL Ltd.) を用いて観察し、内蔵の CCD カメラを用いて記録した。

プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイのサンプルとしては精製済みの CofJ、分解した CofJ、 Δ N-CofJ と His タグ付き CofA、CofB を 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl にバッファー交換したものを使用した。

プルダウンアッセイのカラムについては約 0.2 ml のベッド体積になるよう Ni イオンをキレートさせた Chelating Sepharose Fast Flow 樹脂 (GE Healthcare Biosciences) をオープンカラムに詰めたものを使用した。各サンプル濃度は His タグ付き CofA、CofB は終濃度 10 μ M、CofJ、分解した CofJ、 Δ N-CofJ は終濃度 20 μ M となるよう調製し、プルダウンアッセイのための混合サンプルとして CofJ のみ、CofJ+His タグ付き CofA、CofJ+His タグ付き CofB、分解した CofJ+His タグ付き CofB、 Δ N-CofJ+His タグ付き CofB の各サンプルを 1 mL ずつ作成し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間放置した。その後、緩衝液で平衡化した前述のカラムに対しアプライし、緩衝液 6 ml、緩衝液+ 15mM Imidazole 6 ml 洗浄した後、緩衝液+ 500mM Imidazole 1 ml をカラムに添加し溶出画分とした。カラム添加前の画分、溶出液はそれぞれ SDS-PAGE により含まれる蛋白質を検出した。

等温滴定熱量測定 (ITC)

ITC 測定は iTC200 (GE Healthcare Biosciences) を用いて行った。全てのサンプルは、20mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl を含む緩衝液に溶解した。CofJ/CofB および Δ N24-CofJ/CofB 実験では、CofB 溶液 (三量体として 9.7 μ M) をセルに充填し、CofJ または Δ N24-CofJ 溶液をシリンジ (197 μ M) に充填した。CofJ (1-24) /CofB 実験では、CofB 溶液 (モノマーとして 29 μ M) をセルに充填し、CofJ (1-24) ペプチド溶液をシリンジ (570 μ M) に充填した。CofJ/CofA 実験では、CofA (モノマーとして 29 μ M) および CofJ 溶液をセルまたはシリンジ (197 μ M) にそれぞれ充填した。GalNAc/CofB 実験では、CofB 溶液 (モノマーとして 29 μ M) をセルに充填し、GalNAc 溶液をシリンジ (570 μ M) に充填した。すべての滴定は、37 $^{\circ}$ C で 120 または 180 秒の間隔でシリンジ溶液を用いて、最初の 1 μ L およびすべてのその後の滴定点について 2 μ L を連続滴定することによって行った。サーモグラムを NITPIC プログラム (45) で分析し、得られた熱量変化プロットに対し SEDPHAT プログラム (46) を用いて $A+B \rightleftharpoons AB$ 相互作用モデルを用いて

解析を行った。解離定数およびその標準偏差を3回の測定から算出した。

CofJ(1-24)-CofB の共結晶化

精製した CofB を 20mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl で 5 mg/mL に希釈し、共結晶化のために 1 : 5 の物質量比で CofJ (1-24) ペプチドと混合した。CofJ(1-24)-CofB 複合体の結晶化は、20°Cでシットドロップ蒸気拡散法により行った。回折実験に使用可能な結晶は、タンパク質溶液 (5mg/mL) と 100mM CAPS pH 10.5、20%PEG8000、および 200mM の NaCl を等量混合した 1.6μL のドロップから得られた (図 18)。結晶は-173°Cの窒素気流中で急速冷凍した。X 線回折データは、Saturn A200 CCD 検出器を使用して、SPRING-8 のビームライン BL26B1 において収集し、HKL2000 (47) を使用して処理をした。回折写真の一例を図 19 に、統計値を表 2 に示す。

初期位相は、プログラム PHENIX (48) の PHASER を用いた分子置換法によって計算した。検索モデルとして、当研究室で構造決定に成功した CofB のドメイン 1 の単量体 (29-255) とドメイン 2 およびドメイン 3 三量体構造 (270-518) を用いた (PDB code : 5AX6)。位相決定の結果、非対称単位中に CofB のドメイン 1 が 3 分子とドメイン 2 およびドメイン 3 の三量体を 1 分子含んでいる初期モデル構造が得られた。ドメイン 1 とドメイン 2 (256-269) の間のリンカーは、分子モデリングツール Coot (49) を用いてモデル化した。構造精密化に phenix.refine を使用した結果、解釈可能な電子密度マップが得られ、CofB 三量体の 2 つの分子間の界面に明瞭な電子密度が観察された。CofJ (1-24) ペプチドに含まれる嵩高い Phe10 電子密度は、1 つの CofB モノマー中の Ala469、Thr484、Val497 および別の CofB モノマー中の Val435 および Leu462 によって形成された疎水性ポケットに観察された。CofJ (1-24) ペプチドはこの Phe10 残基を起点として Coot を用いてモデル構築した。CofJ(1-24)-CofB モデルは、phenix.refine と Coot を用いてさらに構造精密化し、最終的に R_{work} 値と R_{free} 値がそれぞれ 0.192 と 0.232 の最終モデルを構築した。得られた CofJ(1-24)-CofB 複合体構造は MolProbity (50) で評価した。表 2 に構造決定時の統計値を示した。

CofJ-CofB 複合体の精製

CofJ-CofB 複合体の形成のため、精製した CofJ と精製した CofB を混合し、氷上で 1 時間放置した。次いで 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl で予め平衡化した Superdex 200 (16/600) を用いて精製し、SDS-PAGE により精製度を確認した。

超遠心分析法による CofJ-CofB の溶液中会合状態の解析

CofJ-CofB の溶液中での会合状態の解析のため、超遠心分析の沈降速度法と沈降平衡法の測定を行った。測定には精製後の CofJ-CofB を使用した。測定はセル長 12 mm のエポキシ製ダブルセクターセルを石英のウィンドウで挟み込んだ測定セルを使用し、ローターに An60 Ti を備えた Beckman Optima XL-1 (Beckman Coulter) 分析用超遠心分離機を用いて行った。

沈降速度法のデータは測定波長 280nm、回転数 42,000rpm で収集した。プログラム SEDFIT (51) の $c(s)$

法を用いて沈降係数の分布を解析した。フィッティングした沈降係数の範囲は0~15Sであり、プログラム SEDNTERP によって計算された緩衝液密度および粘度は、それぞれ 1.00500 g/mL および 1.0214cP であった。

沈降平衡法の実験は、セル長 12mm のエポキシ製 6 セクターセルを石英のウィンドウで挟み込んだ測定セルを使用し、20°Cで 4 穴 An60 Ti ローターを備えた Beckman Optima XL-I 分析用超遠心機を用いて行った。ローター速度は、それぞれ 5000,8,000,10,000rpm に設定した。沈降平衡に達した後、0.001cm 間隔で 4 回の走査の平均としてデータを収集し、SEDPHAT (46) を用いて解析した。

第二章の実験

チロシンクラスターの変異体株の作製

CofJ における受容体認識部位を同定するために、結合に重要であると予想されるチロシンクラスターをアラニン残基に置換することとした。しかしながら、*cof* オペロン全長を含むプラスミド pTT240 は鎖長が 18kbp 以上あることから点変異を導入する過程で他の *cof* 遺伝子への変異導入の可能性が高いと考えられた。そこで、一旦 *cofJ* 遺伝子を別のベクター(pUC19)に移し替え、そのプラスミドを鋳型に変異を加えた後に再度元のベクター(pMW119)に組み込むことで前述の問題の解決を図った。

cofJ 遺伝子を切り出すにあたり制限酵素サイトとして、BstEII(10536)及び PmlI(13297)を選択した(*cofJ* gene: 11508-12554)。pUC19 ベクターにはこれらの制限酵素サイトが存在しないため、クローニングサイトの *KpnI* と *BamHI* の間にリンカーライゲーションによって両認識配列を組み込むこととした。リンカーには 5'-GGTTACCGAGCACGTGG-3'及び 5'-GATCCCACGTGCTCGGTAACCGGTAC-3'を用いた。制限酵素 *KpnI* と *BamHI* 処理した pUC19 と混合後、Ligation high ver2 によってライゲーション反応を行い、pUC19-linker を作製した。次に、pUC19-linker に pTT240 から切り出した *cofJ* 遺伝子を含むフラグメントを組み込むこととした。pUC19-linker、pTT240 をそれぞれ制限酵素 *BstEII*-HF、*PmlI* で切断後、精製した後に Ligation high ver2 によってライゲーションを行い、pUC19-*cofJ* プラスミドを作製した。

プラスミド pUC19-*cofJ* に Quick change 法による変異導入を行った。使用したプライマーを表 5 に示す。PCR 後の反応溶液に制限酵素 *Dpn I* をそれぞれ 0.6 μ L 加え、37°Cで 2 時間インキュベート後、コンピテントセル NEB Turbo の形質転換を行った。得られたコロニーを培養し、抽出したプラスミドをシーケンス解析した結果、7 種類の変異体全てを得ることに成功した。

次に、変異導入された *cofJ* 遺伝子を *cof* オペロン全長を含むプラスミド pTT240 に組み込みなおすことを試みた。プラスミド pTT240 を制限酵素 *BstE II*、*PmlI*、変異導入したプラスミドを制限酵素 *BstE II*、*PmlI*、*ApaLI* で切断後、アガロース電気泳動による遺伝子断片の精製を行った。精製した変異導入された *cofJ* 遺伝子断片を pTT240 遺伝子断片とそれぞれ混合し、Ligation high ve2 によるライゲーション反応処理によって、7 種類のチロシンクラスター変異体株を作製した。

表 5. 変異導入に使用したプライマー一覧

変異導入する残基	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')
Tyr51	J_Y51A_F	GTAAAGAAAATGGTTCAACAGCGTTTTACTATGATGGCTGGC
	J_Y51A_R	GCCAGCCATCATAGTAAAACGCTGTTGAACCATTTTCTTTAC
Tyr53	J_Y53A_F	GGTTCAACATATTTTGCATGATGGCTGGCG
	J_Y53A_R	CGCCAGCCATCATACGCAAATATGTTGAACC
Tyr54	J_Y54A_F	GTTCAACATATTTTACGCGGATGGCTGGCGGGGAG
	J_Y54A_R	CTCCCCGCCAGCCATCCGCGTAAAAATATGTTGAAC
Tyr76	J_Y76A_F	GTGTTGGATAACCATAAAGCGGCAGCTACAGAACATGAG
	J_Y76A_R	CTCATGTTCTGTAGCTGCCGCTTTATGGTTATCCAACAC
Tyr202	J_Y202A_F	CTGAATGAACAGTTAAGTACTGCGGTACATGATGATGGTACTGACTC
	J_Y202A_R	GAGTCAGTACCATCATCATGTACCGCAGTACTTAACTGTTTCATTCAG
Tyr243	J_Y243A_F	GGCGTAAATCTTGGTGCCTGGGCTCAAG
	J_Y243A_R	CTTGAGCCCACGCACCAAGATTTACGCC
Tyr298	J_Y298A_F	GGATAATAATCGAATGGCGGCGGGTTCTACTGGTAC
	J_Y298A_R	GTACCAGTAGAACCCGCCCATTCGATTATTATCC

抗 CofJ 抗体の Fab 断片作製

ウサギ血清から抗 CofJ 抗体を硫酸アンモニウム沈殿および Hitrap rProtein A FF カラム (GE Healthcare Biosciences) を用い、製品マニュアルに従って精製した。精製した抗 CofJ 抗体を PBS に対して透析した。Fab 断片を精製するために、2 mg/mL の精製抗体を PBS および 20 mM のシステインを含有する緩衝液中、37°C で 3 時間、0.02 mg/mL のパパイン (Nacalai Tesque) で切断した。混合液を Hitrap rProtein A FF カラムに通して未切断の IgG および Fc 断片を除去した。Superdex200(16/600)カラムを使用して Fab 断片をさらに精製し、SDS-PAGE でチェックした。

変異体株、CofJ タンパク質、抗 CofJ 抗体の Fab 断片を用いた付着実験

第一章で前述した手順で各菌株、細胞を培養した。精製した CofJ および Δ N24-CofJ を最終濃度 100 μ g/mL となるように Δ cofJ 株と混合し、25°C で 1 時間放置した。抗 CofJ 抗体の Fab 断片を最終濃度 2.5, 5.0 および 10 mg/mL となるように cof+ 株と混合し、25°C で 1 時間放置した。Caco-2 細胞への付着実験、観察、CFU の計測は第一章の実験の通りに行った。

系統解析

他の細菌における IVb 型線毛のマイナーピリンの存在を調べるために、CofB において CofJ との結合

に関わるドメイン3のアミノ酸配列(354-518)を用いてBLASTP(52)分析を行った(表4)。CofBとアミノ酸配列のマルチプルアライメントのために、表4に示した異なる細菌由来のアミノ酸配列の中で *e-value* が 10^{-3} 以下の配列を使用した。マルチプルアライメントは、MEGA7(53)のMUSALE(54)を使用し系統樹を作製した(55, 56, 57)。*Vibrio cholerae* 由来のTcpBは比較のために含めた。

第三章の実験

CofJ(1-24)-GCN4、CofJ(4-16)-GCN4の発現と精製

CofJペプチドが多価でCofBに結合可能とするために、CofJのN末端ペプチドのC末端側に三量体化タグGCN4(36)を付加させることで、3箇所の結合サイトの全てに結合可能なコンストラクトCofJペプチド-GCN4を作製することとした。

まず、PCR反応によってオリゴDNAを連結しCofJ(1-24)-GCN4遺伝子を合成することにした。CJN-T-1,6(表6)が終濃度0.6uM、CJN-T-2,3,4,5(表6)が終濃度0.03uMとなるように混合調製し、PCRをおこなった。得られた増幅産物を制限酵素NdeIとXhoIで切断、精製し、同様の処理をしたpET30aベクターにライゲーションした。しかし、このプラスミドではCofJ(1-24)-GCN4が発現しなかったため、N末端にGSTタグを付加したベクターにより発現させることとした。プライマーとしてCJN-T-7、8、テンプレートに前述したプラスミドを用い、PCRをおこなった。得られた増幅産物を制限酵素BamHI/XhoIで切断、精製し、同様の処理をしたpGEX6P-1ベクターとライゲーションし、CofJ(1-24)-GCN4発現プラスミドを得た。

次に、CofJ(4-16)-GCN4のコンストラクトの作製をおこなった。CofJ(1-24)-GCN4遺伝子を含むDNAを制限酵素BamHI、SpeIで切断し、プライマーCJN-T-9,10から作製したアダプターとLigation high ver2によって連結することで、CofJ(4-16)-GCN4発現プラスミドを得た。

発現量の改善のためpGEXベクターだけでなくpETベクターでも発現系を構築することにした。まず、pET改変ベクターを2種類のプライマーCJN-T-11,12を用いてinverse PCRにより増幅した。さらにCofJ1-24-GCN4遺伝子をプライマーCJN-T-13,14、CofJ4-16-GCN4遺伝子をプライマーCJN-T-14,15を用いて増幅させた。増幅させた反応液を混合した後、等量のNEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mixを加え、DNA断片をアッセンブルすることでプラスミドpET-CofJ(1-24)-GCN4、pET-CofJ(4-16)-GCN4を作製した。

表 6. CofJ(1-24)-GCN4 および CofJ(4-16)-GCN4 発現プラスミドの作製に使用したプライマー

プライマー名	プライマー塩基配列 (5'-3')
CJN-T-1	GTTCCACATATGAGCCCGTCTTCCAGCGAAGGTGGTGCTTTCACCGTTAAC
CJN-T-2	GACCTCTACTGTTGACGATATCCGTAAGTGGTGGCGGTTCGTATGAAACAGATC
CJN-T-3	GATCGAGGAAATCCTGTCCAAGATCTACCACATCGAAAACGAGATCGCGC
CJN-T-4	GGATATCGTCAACAGTAGAGGTCTTCGGCATGTTAACGGTGAAAGCACCACC
CJN-T-5	CTTGGACAGGATTCCTCGATCTTGTCTTCGATCTGTTTCATACGACCGCC
CJN-T-6	CTAGCTCTCGAGTTAGATAAGCTTCTTGATACGCGCGATCTCGTTTTTCGATG
CJN-T-7	GTTCCAGGATCCCCGTCTTCCAGCGAAGGTG
CJN-T-8	GGTGCTCGAGTTAGATAAGCTTCTTG
CJN-T-9	GATCCAGCGAAGGTGGTGCTTTCACCGTTAACATGCCGAAGA
CJN-T-10	CTAGTCTTCGGCATGTTAACGGTGAAAGCACCACCTTCGCTG
CJN-T-11	GGGGATTATAAGGACGACGATG
CJN-T-12	CTGGAAGTACAGGTTTTCTTCCG
CJN-T-13	AAACCTGTAAGTCCAGTCCCCGTCTTCCAGCGAAG
CJN-T-14	CGTCGTCCTTATAATCCCCTTAGATAAGCTTCTTGATACGCGCGATC
CJN-T-15	GAAAACCTGTAAGTCCAGTCCAGCGAAGGTGGTGC

プラスミド pET-CofJ(1-24)-GCN4、pET-CofJ(4-16)-GCN4 で大腸菌株 BL21(DE3)を形質転換し、得られたコロニーをアンピシリンを終濃度 100 μ g/mL 含む LB 培地に添加し 37 $^{\circ}$ C で一晚培養後、本培養用の LB 培地に加えた。OD₆₆₀=0.60 となるまで 37 $^{\circ}$ C で培養した後、氷水で急冷し 20 $^{\circ}$ C で誘導した。その際、IPTG を終濃度 1 mM となるように添加した。

誘導後の菌体を遠心分離により回収し、lysis buffer(20 mM Tris-HCl pH8.0, 1 M NaCl)に溶解後、終濃度 0.2 mg/mL となるようにリゾチームを加え 15 分間氷上に置いた。その後、終濃度 0.2% となるように TritonX-100 を加え 15 分氷上に置いたのち、15 秒間超音波破碎、1 分休憩のサイクルを 15 回繰り返した。破碎液を 24000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 1 時間遠心し、上清を 0.8 μ m のフィルターで濾過した。濾過後のサンプルを lysis buffer で平衡化した Ni カラムにアプライした。Ni カラムを 5 mM イミダゾールを含む lysis buffer で洗浄後、20 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM イミダゾールで溶出した。溶出サンプルを Q カラムにアプライし、AKTA start により NaCl を 0 から 1 M まで塩濃度を上昇させ溶出させた。物質質量比で 1/20 の TEV プロテアーゼを加えタグの切断をした。切断後のサンプルを Ni カラムに再度添加し、素通り画分を回収した後、Superdex75(16/600)カラムで精製し、最終精製物とした。精製純度は SDS-PAGE で確認した。

プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイのサンプルとしては精製済みの CofJ、CofJ(1-24)ペプチド、CofJ(1-24)-GCN4、CofJ(4-16)-GCN4 と His タグ付き CofB を 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl にバッファー交換したものを使用した。

プルダウンアッセイのカラムについては約 0.2 ml のベッド体積になるよう Ni イオンをキレートさせた Chelating Sepharose Fast Flow 樹脂 (GE Healthcare Biosciences) をオープンカラムに詰めたものを使用した。His タグ付き CofB が終濃度 1 μ M、CofJ が終濃度 1 μ M となるように混合し氷上で一晩放置した。その後、CofJ(1-24)ペプチドは 1000 μ M、CofJ(1-24)-GCN4、CofJ(4-16)-GCN4 はそれぞれ 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 μ M となるように混合し、1 時間氷上でインキュベートした。その後、緩衝液で平衡化した前述のカラムに対しアプライし、緩衝液 6 ml、緩衝液+ 15mM Imidazole 6 ml 洗浄した後、緩衝液+ 500 mM Imidazole 1 ml をカラムに添加し溶出画分とした。カラム添加前の画分、溶出液はそれぞれ SDS-PAGE により含まれる蛋白質を検出した。

等温滴定熱量測定 (ITC)

第一章と同様の手法で MicroCal iTC200 を用いて、CofB と CofJ(1-24)-GCN4 もしくは CofJ(4-16)-GCN4 との ITC 測定を行った。測定温度は 25°C、緩衝液に 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl を使い、シリンジ側に 590 μ M の CofJ(1-24)-GCN4 もしくは CofJ(4-16)-GCN4、セル側に 28.5 μ M(モノマー換算)の CofB を入れ、滴定実験を行った。

付着阻害実験

第一章で前述した手法で cof+株と細胞を培養した。精製した CofJ(1-24)-GCN4 もしくは CofJ(4-16)-GCN4 を 0、10、100、1000 μ g/mL、cof+株を 1.0×10^9 cells/mL となるように混合調製後、25°Cで 1 時間静置したものを 50 μ L ずつ 500 μ L の培地に加え、各阻害剤が 0、1、10、100 μ g/mL、cof+株が 1.0×10^8 cells/mL となるようにした。Caco-2 細胞への付着実験、観察、CFU の計測は第一章の通りに行った。

参考文献

1. von Mentzer A, et al. (2014) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet* **46**: 1321–1326.
2. World Health Organization (1999) New frontiers in the development of vaccines against enterotoxigenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. *Wkly Epidemiol Rec* **13**: 98–100.
3. Qadri, F., Svennerholm, A. M., Faruque, A. S. & Sack, R. B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* **18**: 465–483.
4. Madhavan TP, Sakellaris H (2015) Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol* **90**:155–197.
5. Kirn, T. J., Lafferty, M. J., Sandoe, C. M. & Taylor, R. K. (2000). Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **35**: 896-910.
6. Gaastra, W. & Svennerholm, A. M. (1996) Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol.* **11**: 444–452.
7. Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* **5**:580–592
8. Wennerås C, Holmgren J, Svennerholm AM (1990) The binding of colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* to intestinal cell membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* **54**:107–112.
9. Madhavan TPV, Riches JD, Scanlon MJ, Ulett GC, Sakellaris H (2016) Binding of CFA/I pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* to Asialo-GM1 is mediated by the minor pilin CfaE. *Infect Immun* **84**:1642–1649.
10. De Greve H, Wyns L, Bouckaert J (2007) Combining sites of bacterial fimbriae. *Curr Opin Struct Biol* **17**:506–512.
11. Jansson L, et al. (2009) Sulfatide recognition by colonization factor antigen CS6 from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* **4**:e4487.
12. Li, Y.F., Poole, S., Nishio, K., Jang, K., Rasulovala, F., McVeigh, A., Savarino, S.J., Xia, D., Bullitt, E. (2009) Structure of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **26**: 10793-10798.
13. Lillington, J., Geibel, S., Waksman, G (2014) Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili. *Biochim Biophys Acta.* **1840**:2783-2793.
14. Ellison, C.K., Kan, J., Dillard, R.S., Kysela, D.T., Ducret, A., Berne, C., Hampton, C.M., Ke, Z., Wright, E.R., Biaias, N., Dalia, A.B., Brun, Y.V. (2017) Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing. *Science* **358**:535–538.

15. Gómez-Duarte, O.G., Ruiz-Tagle, A., Gómez, D.C., Viboud, G.I., Jarvis, K.G., Kaper, J.B., Girón, J.A. (1999) Identification of lngA, the structural gene of longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **145**:1809-1816.
16. Cleary, J., Lai, L.C., Shaw, R.K., Straatman-Iwanowska, A., Donnenberg, M.S., Frankel, G., Knutton, S. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology*. **150**:527-538.
17. Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A.S., Pique, M.E., Yeager, M., Egelman, E.H., Tainer, J.A. (2006) Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell*. **23**:651-662
18. Honda, T., Arita, M., Miwatani, T. (1984) Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: A possible new colonization factor. *Infect Immun* **43**:959–965.
19. Taniguchi, T., Akeda, Y., Haba, A., Yasuda, Y., Yamamoto, K., Honda, T., Tochikubo, K. (2001) Gene cluster for assembly of pilus colonization factor antigen III of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**:5864–5873.
20. Fukakusa, S., Kawahara, K., Nakamura, S., Iwashita, T., Baba, S., Nishimura, M., Kobayashi, Y., Honda, T., Iida, T., Taniguchi, T., Ohkubo, T. (2012) Structure of the CFA/III major pilin subunit CofA from human enterotoxigenic *Escherichia coli* determined at 0.90 Å resolution by sulfur-SAD phasing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**:1418–1429.
21. Kawahara, K., Ok,i H., Fukakusa, S., Yoshida, T., Imai, T., Maruno, T., Kobayashi, Y., Motooka, D., Iida, T., Ohkubo, T., Nakamura, S. (2016) Homo-trimeric structure of the type IVb minor pilin CofB suggests mechanism of CFA/III pilus assembly in human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **428**:1209–1226.
22. Giltner, C.L., Nguyen, Y., Burrows, L.L. (2012) Type IV pilin proteins: Versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**:740–772.
23. Yuen, A.S., Kolappan, S., Ng, D., Craig, L. (2013) Structure and secretion of CofJ, a putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **90**:898-918.
24. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:10037–10041.
25. Tanaka, K., Caaveiro, J.M., Morante, K., González-Mañas, J.M., Tsumoto, K. (2015) Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nat Commun*. **26**:6337.
26. Dal Peraro M, van der Goot FG (2016) Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev Microbiol* **14**:77–92.
27. Jayasinghe, L., Miles, G., Bayley, H. (2006) Role of the amino latch of staphylococcal alpha-hemolysin in pore formation: A co-operative interaction between the N terminus and position 217. *J Biol Chem* **281**:2195–2204.
28. Holm, L., Laakso, L.M. (2016) Dali server update. *Nucleic Acids Res*. **44**:W351-355.

29. Yamashita, D., Sugawara, T., Takeshita, M., Kaneko, J., Kamio, Y., Tanaka, I., Tanaka, Y., Yao, M. (2014) Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins. *Nat Commun.* **5**:4897.
30. Megli, C.J., Taylor, R.K. (2013) Secretion of TcpF by the *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus biogenesis apparatus requires an N-terminal determinant. *J Bacteriol* **195**:2718–2727
31. Nielsen, H. (2017) Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods Mol Biol.* **1611**:59-73.
32. Macdougall, C. (2011) Beyond Susceptible and Resistant, Part I: Treatment of Infections Due to Gram-Negative Organisms With Inducible β -Lactamases. *J Pediatr Pharmacol Ther.* **16**:23-30.
33. Willyard, C. (2017) The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature.* **543**:15.
34. Njoroge, S.M., Boinett, C.J., Madé, L.F., Ouko, T.T., Fèvre, E.M., Thomson, N.R., Kariuki, S. (2015) *Pathog Dis.* **73**. pii: ftv047.
35. Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., Ben-Tal, N. (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **44**:W344-50.
36. Harbury PB1, Kim PS, Alber T. (1994) Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer. *Nature.* **371**:80-83
37. Evans, D.G., Silver, R.P., Evans, D.J. Jr., Chase, D.G., Gorbach, S.L. (1975) Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect Immun* **12**:656–667.
38. Girón, J.A., Gómez-Duarte, O.G., Jarvis, K.G., Kaper, J.B. (1997) Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type-4 pili–A minireview. *Gene* **192**:39–43.
39. McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H. (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* **9**:265–278.
40. Roy, K., Hilliard, G.M., Hamilton, D.J., Luo, J., Ostmann, M.M., Fleckenstein, J.M. (2009) Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* **457**:594–598.
41. Kumar, P., Kuhlmann, F.M., Bhullar, K., Yang, H., Vallance, B.A., Xia, L., Luo, Q., Fleckenstein, J.M. (2016) Dynamic interactions of a conserved enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin with intestinal mucins govern epithelium engagement and toxin delivery. *Infect Immun* **84**:3608–3617.
42. Girón, J.A., Levine, M.M., Kaper, J.B. (1994) Longus: A long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **12**:71–82.
43. Girón, J.A., Viboud, G., Sperandio, V., Gómez-Duarte, O.G., Maneval, D.R., Albert, M.J., Levine, M.M., Kaper, J.B. (1995) Prevalence and association of the longus pilus structural gene (lngA) with colonization factor antigens, enterotoxin types, and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**:4195–4198.
44. Luo, Q., Vickers, T.J., Fleckenstein, J.M. (2016) Immunogenicity and protective efficacy against enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization following intradermal, sublingual, or oral vaccination with EtpA Adhesin. *Clin Vaccine Immunol* **23**:628–637.

45. Keller, S., Vargas, C., Zhao, H., Piszczek, G., Brautigam, C.A., Schuck, P. (2012) High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Analyt Chem* **84**:5066–5073.
46. Houtman, J.C., Brown, P.H., Bowden, B., Yamaguchi, H., Appella, E., Samelson, L.E., Schuck, P. (2007) Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling. *Prot Sci* **16**:30–42.
47. Otwinowski, Z., Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in enzymology* **276**:307–326.
48. Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:213–221.
49. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:486–501.
50. Williams, C.J., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Prisant, M.G., Videau, L.L., Deis, L.N., Verma, V., Keedy, D.A., Hintze, B.J., Chen, V.B., Jain, S., Lewis, S.M., Arendall, W.B. 3rd., Snoeyink, J., Adams, P.D., Lovell, S.C., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**(Pt 1):12–21.
51. Schuck, P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* **78**:1606–1619.
52. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403–410.
53. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**:1870–1874.
54. Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**:1792–1797.
55. Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406–425.
56. Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.
57. Zuckerkandl, E., Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J Theoret Biol* **8**:357–366.

主論文

1. “Interplay of a secreted protein with type IVb pilus for efficient enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization.”
Hiroya Oki, Kazuki Kawahara, Takahiro Maruno, Tomoya Imai, Yuki Muroga, Shunsuke Fukakusa, Takaki Iwashita, Yuji Kobayashi, Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, Shota Nakamura. (2018) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **115**: 7422-7427.
2. “Structure-guided design of a trimeric peptide inhibitor targeting the interaction between secreted protein and type IVb pilus from enterotoxigenic *Escherichia coli*.”
Hiroya Oki, Kazuki Kawahara, Takahiro Maruno, Tomoya Imai, Yuki Muroga, Shunsuke Fukakusa, Takaki Iwashita, Yuji Kobayashi, Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, Shota Nakamura. in preparation

参考論文

1. “Cloning, expression, purification, crystallization and X-ray crystallographic analysis of CofB, the minor pilin subunit of CFA/III from human enterotoxigenic *Escherichia coli*.”
Kazuki Kawahara, **Hiroya Oki**, Shunsuke Fukakusa, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi, Daisuke Motooka, Tooru Taniguchi, Takeshi Honda, Tetsuya Iida, Shota Nakamura, Tadayasu Ohkubo. (2015) *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*. **71**: 663-667.
2. “Homo-trimeric Structure of the Type IVb Minor Pilin CofB Suggests Mechanism of CFA/III Pilus Assembly in Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*.”
Kazuki Kawahara, **Hiroya Oki**, Shunsuke Fukakusa, Takuya Yoshida, Tomoya Imai, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi, Daisuke Motooka, Tetsuya Iida, Tadayasu Ohkubo, Shota Nakamura. (2016) *Journal of Molecular Biology*. **428**:1209-1226.