OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure-function studies on the tetanus neurotoxin
Author(s)	張, 春明
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82186
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　（　張　春明　）	
論文題名	Structure-function studies on the tetanus neurotoxin (破傷風毒素の構造機能の研究)

論文内容の要旨

破傷風毒素（Tetanus neurotoxin: TeNT）は、あらゆる土壌に生息している嫌気性破傷風菌（*Clostridium tetani*）より産生される分子量約150 kDaの神経毒素である。TeNTは膜結合、膜貫通と基質切断の機能を持つ3つのドメインから構成されている。体内に侵入した破傷風菌によって産生されたTeNTは、基質切断ドメインを中枢神経細胞のシナプス小胞から細胞基質へ輸送し、シナプス融合関連膜蛋白質（Vesicle-associated membrane protein 2: VAMP2）を切断することで抑制性の神経回路を遮断し、重篤な痙攣を引き起こす。同じクロストリジウム属で、極めて毒性が強いボツリヌス毒素（Botulinum neurotoxins: BoNT）の毒作用は神経筋接合部（末梢神経）に限られるのに対して、TeNT はより上位の神経（中枢神経）に到達して作用する。TeNTは神経細胞内に取り込まれる際の各ドメインの協同作用に関して、まだ不明な点が多い。また、非天然型と思われる酸化型（non-reduced TeNT, nrTeNT)の全長構造が報告されたが、天然型と思われる還元型（reduced TeNT, rTeNT)の全長構造は未解明であった。構造生物学的アプローチを用いて破傷風毒素（TeNT）の膜侵入の分子メカニズムを解明することを目的としてＸ線回折法を用いたTeNTの各ドメインの構造解析、全長の還元型の構造解析を進めるとともに、Ｘ線小角散乱法を用いた溶液状態の全長およびH_Nの構造解析が行われた。過去の研究においてTeNTの各ドメイン：膜結合ドメイン(Receptor binding domain, C-terminal of heavy chain: H_C)、膜貫通ドメイン(Translocation domain, N-terminal of heavy chain: H_N)、および基質切断ドメイン(Catalytic domain, Light chain: LC)の結晶化が行われ、H_Nの溶液構造の解析も試みられてきたが、本研究ではこれらを踏まえ、rTeNTの全長の結晶構造及び溶液構造を解析すると共に、H_C、H_N、LCの各ドメインの結晶構造およびH_Nの溶液構造の解析が行われた。

先ず、rTeNTの全長の結晶構造が2.3 Åの高分解能（R_{work}(%)/R_{free}(%): 18.6/23.3）で解析された。既に報告されていたnrTeNTの結晶構造（2.6 Å, PDB ID: 5N0B）と比較し、ジスルフィド結合（Disulfide bond: C869-C1093）の切断によって、H_NとLCドメインが大きく回転していることが分かった。また、nrTeNTの結晶構造では見えていなかったToggle loop（residues 981-987)が観測された。そして、基質結合サイトにはrTeNTの精製に用いた緩衝液由来の4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)が結合していた。一方、放射光実験施設(Photo factory, PF)のBL15A2にてnrTeNTのX線小角散乱実験(small angle X-ray scattering, SAXS)も試みられたが、rTeNTと比較してnrTeNTの方が安定であるにも関わらず、微量ながら凝集によるノイズが観測され、構造解析が困難であったことからnrTeNTとrTeNTの溶液構造はSEC-SAXS（size exclusion chromatography combined with small angle X-ray scattering)を用いる必要があると考えられる。

次に、H_Cドメインの結晶構造が1.5 Åの高分解（R_{work}(%)/R_{free}(%): 12.2/16.3）で決定された。糖鎖結合サイトには、Na^+を介して、緩衝液由来のBis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane（Bis-Tris）分子が結合し、糖鎖認識を模したような状態が観察されたほか、高分解能で解析できたことからCys1093が酸化され、スルホキシドの状態になっていることも示された。

続いて、TeNTのH_Nドメインのみの結晶構造が2.3 Åの高分解能（R_{work}(%)/R_{free}(%): 20.9/25.3）で決定された。以前に報告されたnrTeNTのH_Nドメインの構造に類似して、2つの長いヘリックスといくつかの短いヘリックスから構成されていたが、698～700番目の膜貫通領域のC末端側にあるループがヘリックスに構造が変化したり、７番目のヘリックス構造にあるK736およびY739が逆時計回転で配置したり、762～769番目の*Cis*-loop構造が平行移動したりする違いが見られた。なお、最近になって*Cis*-loopがTeNTのLCドメインの膜貫通に関わっていることも報告されている。一方、H_NドメインのみとベルトなしのH_Nドメインの溶液構造の比較から、結晶構造解析では観察出来なかったベルト部分の構造が水溶液中で膜貫通領域の反対側に揺らいでいることも判明した。H_Nドメインのベルトについて溶液中における動的変化が初めて観察された。

最後に、LCドメインの結晶構造が1.5 Åの高分解能（R_{work}(%)/R_{free}(%): 14.0/17.8）で解析された。過去に報告さ

れていた2.3 Åの結晶構造では見えていなかった基質認識ループも観測されたが、その構造は全長構造の中の状態と比較して、オープン型からクローズ型に大きく変化していることも明らかとなった。

以上、これまでの研究結果から、LCドメインの膜貫通において、H_C、H_NとLCが協奏的に構造変化する可能性が示唆された。破傷風菌は嫌気性細菌であり、破傷風毒素は還元型として生産、分泌されると考えられる。還元型の破傷風毒素が膜に結合した後に、H_NとLCドメインの回転が起こり、C869とC1093が近接することによってジスルフィド結合が形成され、膜貫通に有利な酸化型の破傷風毒素になると考えられる。ｐHが低下すると、H_N、LCドメイン及び膜の構造変化が起こり、ドメイン間及びドメイン-脂質膜の相互作用が強まることでLCドメインを巻き付けているベルトがH_Nドメインの*Cis*-region側に再配置され、更にH_N、LCドメインと膜の相互作用が促進されると考えられた。最終的にLCドメインはH_Nドメインの侵入によってできた“Cleft”を通じて、シナプス小胞から細胞基質へ輸送されると予想された。

本研究において、結晶構造解析と小角散乱解析を駆使し、破傷風毒素に焦点を当てて、全長及び各ドメインの結晶構造が高分解能で決定されたほか、H_Nドメインの溶液中におけるベルト領域の動的変化が明らかとなり、世界最強の毒素の一つである破傷風毒素の生体内への膜結合・膜貫通・切断の３つの分子メカニズムについての総合的な理解が深まり、創薬のための重要な構造基盤科学となることが示された。一方、破傷風毒素の膜結合ドメインを中枢神経へのドラッグ・デリバリーシステムに応用する研究例も報告され、脳内に抗体医薬品を送達するような新たなバイオ医薬品開発への道が切り開かれようとしている。また、本研究の共同研究者らが既に機能性抗体の取得にまで研究を進めており、低分子阻害剤の開発なども合わせて進めば、破傷風を根絶することができるだけでなく、バイオテロ対策にも有効な医薬品の開発も進むことが期待され、幅広い展望と将来性を持った研究であることが示された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名（　張　春明　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	井　上　豪
	副 査　教授	小比賀　聡
	副 査　教授	大久保　忠恭

論文審査の結果の要旨

極めて毒性が強い破傷風毒素（Tetanus neurotoxin: TeNT）は、嫌気性破傷風菌より産生される神経毒素で、膜結合・膜貫通・基質切断の機能を持つ3つのドメインから構成されている。TeNTは基質切断ドメインを中枢神経細胞のシナプス小胞から細胞質基質へ輸送し、シナプス融合関連膜蛋白質が切断されるために抑制性の神経回路が遮断され、重篤な痙攣を引き起こす。これまでに解析された酸化型TeNTの全長構造を基に細胞質基質への膜輸送機構が考えられてきたが、嫌気性細菌によって産生される還元型TeNTの構造は未解明であり、また、基質切断ドメインが膜へ輸送される際の各ドメインの協奏的な構造変化についても不明な点が多い。そこで、申請者は、TeNTの基質切断ドメインの膜輸送機構を解明することを目的として、還元型TeNTの全長及び各ドメインのＸ線回折法による結晶構造解析を進めたほか、膜貫通ドメインのＸ線小角散乱法による溶液構造解析も行い、以下の成果を得た。

１つ目は、還元型TeNTの結晶構造を2.3 Åの高分解能（R_{work}(%)/R_{free}(%): 18.6/23.3）で決定した。既報の酸化型構造（2.6 Å, PDB ID: 5N0B）と比較し、ジスルフィド結合（C869-C1093）の切断によって、膜貫通ドメインと基質切断ドメインが大きく回転することを明らかとした。また、酸化型の構造では確認されなかったToggle loop (residues 981-987)を観測すると共に、基質結合サイトに精製に用いた緩衝液由来の4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)分子が結合しているのを確認した。２つ目は、膜結合ドメインの結晶構造を1.5 Å分解能（R_{work}(%)/R_{free}(%): 12.2/16.3）で解析し、受容体結合サイトNa^+を介して緩衝液由来のBis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane (Bis-Tris) 分子が結合し、糖鎖認識複合体を模した構造を決定した。３つ目は、膜貫通ドメインの結晶構造を2.3 Å分解能（R_{work}(%)/R_{free}(%): 20.9/25.3）で決定するとともに、溶液構造も解析した。膜との相互作用領域と予測されているC末端ヘリックスがループ構造に変化すると同時に、基質切断ドメインを巻き付けているベルトの構造が膜貫通領域とは反対側に大きく揺らぐことを明らかとした。４つ目は、基質切断ドメインの構造を1.5 Å分解能（R_{work}(%)/R_{free}(%): 14.0/17.8）で解析し、基質結合部位の周辺の基質認識ループがオープン型からクローズ型に大きく変化し、ドメインの柔軟性が高いことも明らかとした。

Ｘ線回折法やＸ線小角散乱法を駆使した一連の研究結果から、TeNTが毒素として機能する前に還元型構造として存在する成熟期があること、基質切断ドメインが膜輸送される際には、各ドメインが協奏的に構造変化する可能性を明らかとした。還元型TeNTが膜に結合した後、膜貫通と基質切断ドメインの回転が起こり、Cys869とCys1093が近接することによってジスルフィド結合が形成され、膜貫通に有利な酸化型TeNTへ成熟することを示した。続いて、膜貫通ドメインおよび基質切断ドメインが脂質膜との相互作用を強めることによって、ベルトの構造が膜貫通ドメインから遊離することで基質切断ドメインの膜輸送が促進される可能性を明らかとした。最終的には、基質切断ドメインは膜貫通ドメインと膜で作られた“Cleft”を通じて、シナプス小胞から細胞質基質へ輸送されることが予想され、破傷風毒素として機能を発揮するプロセスの理解が深まったと考えられる。

以上、破傷風毒の全長TeNT（還元型）及び各ドメインの構造を解析し、膜貫通における一連の構造変化を明らかすることによって膜貫通メカニズムの解明に迫り、機能性抗体や低分子阻害剤の開発などに資する創薬のための構造基盤科学を明らかとしたことにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。