

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82118

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18506

研究課題名(和文) 異物認識レセプターの病原菌外膜タンパク質認識機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of outer membrane protein recognition mechanisms by human pathogen recognition receptors

研究代表者

田辺 幹雄 (Tanabe, Mikio)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任准教授

研究者番号：00716871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性菌の外膜に存在するポリンは、バレル状構造のタンパク質で、細菌の生命活動に必須な基質を輸送だけでなく、ヒト異物認識受容体Toll-like受容体(TLR)を介し免疫誘導にも重要な役割を果たす。本研究は生化学の手法を用いて、1)TLRによるポリンの認識機構と2)ポリン自身の菌体での役割の解明を目指した。1)については髄膜炎菌由来のポリンとTLR2をそれぞれ精製し、その複合体を分離精製し解析を行った。2)に関しては髄膜炎菌ポリンの構造解析、電気生理学や分子動力学のシミュレーションを行い、ラクタム系抗生物質の基質輸送機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Porin is a β -barrel fold structure, located in the outer membrane of Gram-negative bacteria, and responsible for which not only transports substrates essential for the biological activity of bacteria but also induces immunity via the foreign body recognition receptor Toll-like receptor (TLR). Also play an important role. This research aimed at elucidating the role of the recognition mechanism of porins by TLR, and 2) the role of the porins themselves in the microbial cells, using biochemical techniques. 1), Porin from *N.meningitidis*, and the extracellular domain of TLR2 were purified and their complex formation were biochemically analyzed. 2), structural analysis of meningococcal porin, simulation of electrophysiology and molecular dynamics, and clarified substrate transport mechanism of β -lactam antibiotics.

研究分野：生化学

キーワード：外膜タンパク質 ヒト異物認識受容体 X線結晶構造 感染症 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(研究の背景) グラム陰性菌の外膜にはβバレル状の構造をもつ分子篩チャンネルである外膜ポリンが存在し、細菌の生命活動に必要な一定分子量以下のイオン、糖などを取り込むと共に、菌自身の防御のために有毒となる抗生物質の排出や発現量を調節することでその侵入の制限を行っている。薬剤排出を含む物質輸送の機構について、これまでタンパク質の構造レベルまで掘り下げた研究はほとんど見られなかったが、複数の基質との共結晶構造の解析などにより、一見単純そうに見えるタンパク内でも基質により複数の異なる輸送経路が存在することが分かってきた。(Tanabe et al. PNAS, 2010, Katter et al. 2013)。

またポリンは細菌上での膜輸送に加え、病原性への関連やヒトの免疫獲得においても重要な影響を及ぼす事が明らかになってきている。その一つにある特定のポリンはヒト自然免疫において異物認識に中心的役割を果たすTLRにより認識される事が挙げられる。自然免疫は、貪食細胞などに発現する異物認識レセプターが病原体やワクチンを含む外来異物に対して迅速に対応し、排除に働く生体防御システムである。またT細胞やB細胞を介した強力で特異的な獲得免疫を取得するためには、TLRなど主要異物認識レセプターがリガンドにより刺激される事による細胞内シグナル伝達経路の活性化が重要である。TLRは病原体に特徴的な分子構造(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)を認識する。特に病原菌の外膜構造は多様で、糖や脂質の修飾、DNAなどの相違はそれぞれワクチンの開発等にも用られる。ポリンはグラム陰性菌に存在する外膜タンパク質で外膜に共通の機構の一つであるが、ある特定ポリンのみはTLR2活性化リガンドとしてTLR2-MyD88に依存するシグナル経路を活性化させる事が明らかにされてきた(Wetzler, *Future Microbiol.* 2010)。

TLRの発見以来、その細胞内シグナル経路、自然免疫と獲得免疫の研究は我々の生体防御システムへの理解を飛躍的に向上させてきた(Kawai & Akira, *Nat. Immunol.* 2010)。しかしながらTLRによるタンパク質、特にポリンの認識機構と膜を挟んだシグナル伝達機構の理解はほとんど進んでいない(Botos et al., *Structure* 2011)。これまでTLRと低分子リガンド(リポペプチド(Jin et al., *Cell* 2007)、リポ多糖(Park et al., *Nature* 2009)など)、や核酸(Liu et al., *Science* 2008)の共結晶構造は決定されてきたが、ポリンはそれらのリガンドとは異なり、外膜に埋まっており、タンパク質自身もPAMPsとして目印になる脂質や糖鎖の目立った修飾等もされていない。またDNA分子状に疎水性でもない事から、ポリンがどのようにTLRに認識されるかへの理解は明らかでない。異物によるTLRシグナル経路の誘導は一連の免疫反

応を開始する最重要ステップであり、誘導レベルを細胞外反応のリガンドによって制御する事は、この経路を将来的な医療に活用できるのか可能性を探る上で非常に重要である。

2. 研究の目的

グラム陰性菌に存在する外膜ポリンタンパク質は細菌の生命活動に必要な基質を輸送するだけでなく、ヒト異物認識受容体Toll-Like受容体(TLR)を介し、免疫誘導・獲得にも重要な役割を果たす。外膜には同様のβバレル状タンパク質が存在するが、なぜ特定のポリンのみがTLRに認識されるのかはわかっていない。そのため本研究はTLRのポリンの認識、シグナル開始機構の解明を目指す。生化学、構造生物学の手法を用い1)TLRシグナル経路を活性化するポリンの構造を決定し共通の特徴を探る。また2)TLR-ポリン複合体を単離し、3)その複合体構造を電子顕微鏡を用い解析すると共に、4)細胞生物学実験を通しTLRを介したサイトカイン生産を定量し、リガンドとの相関を得る事を目標とした。

また当初より検討していたが、ポリンとTLRの研究において、精製タンパクを用いた分子レベルでの研究の知見は乏しいため、進行が思ったより進まない場合も考えられ、その場合は電子顕微鏡を用いた解析より*in vivo*なアッセイ(後述テーマ4)や、ポリン自身の輸送機構に関する(後述テーマ1)により研究の焦点をシフトし研究を遂行することとした。

3. 研究の方法

テーマ1: TLRのリガンドであるポリンのX線構造を決定する。TLRリガンドとして同定された病原菌ポリンの構造をX線結晶構造解析の手法を用いて決定し、モチーフ、ループ構造、表面電荷の比較よりTLRとの結合に必要な構造、特徴を考察する。*N. meningitidis* PorBとその変異体に加え*Chlamydia trachomatis*由来のMOMP、*Fusobacterium nucleatum*由来のFomA、*N. lactamica*由来のPorBまた非TLRリガンドのポリンとして大腸菌由来のOmpFのX線構造解析も進めている。これらは組み換えタンパク質として大腸菌に発現させ、確立したリフォールディング法を用い精製した。蒸気拡散法だけでなく、脂質キュービック法、バイセル法も用いて結晶を作成、構造決定を目指した。

テーマ2: TLR2を精製単離し、ポリンとの複合体を同定する。TLR2細胞外領域(exTLR2)を酵母*P. pastoris*に発現させ、精製を行なった。PorBを始めテーマ1でそれぞれ精製されたポリンをそれぞれ単離・精製したポリンとexTLR2をインキュベートし、サイズ排除クロマトグラフィー利用し、安定な複合体を獲得する事を目指した。

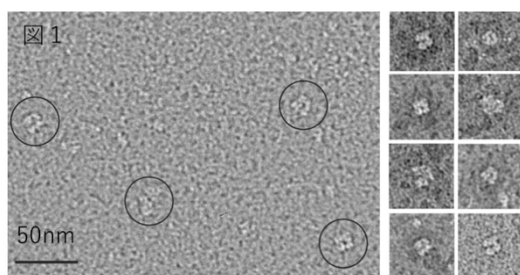
テーマ3: 電子顕微鏡(EM)を用いて、TLR-

ポリンの複合体の構造の全体像を解析する。テーマ2で同定した TLR-ポリン複合体の構造を EM を用いて観察する。電子顕微鏡下での観察は共同研究を行なっている E. Berhmann(Caesar 研究所)との間で行なった。ネガティブ染色の単粒子解析を中心に行う。

テーマ 4: 細胞生物学実験によるポリンと TLR を介したサイトカイン生産の関係を考察する。 細胞生物学手法により TLR リガンドとサイトカインの生産を調べる。B 群 PorB では複数の変異体において TLR を介した IL-8 生産レベルが低下する事が知られている(共同研究者 P. Massari(タフツ大学ら)。この確立された実験系を用い、テーマ1で得られるポリンの構造を基に、リガンドやその変異体によるサイトカイン生産の相関を調べ、申請者は生化学、構造物学分野を担当する。

4. 研究成果

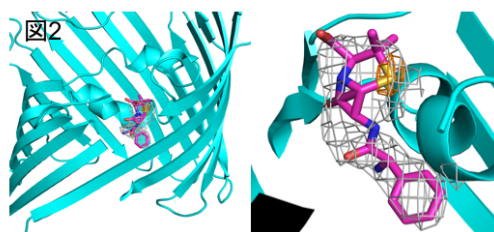
テーマ 2), 3) である Porin と TLR 複合体の解析を得ることを第一の目標として研究を遂行した。PorB と TLR 2 細胞外領域(exTLR2)をそれぞれ精製して、複合体を再構成することを試みた。精製 PorB, exTLR2 を 1:2 の割合で混合し、その後ゲル濾過カラムを用いて 400kDa 超にあたる分子量である PorB-exTLR2 にあたる画分を得た。共同研究先である Ohi この精製画分を酢酸ウランを用いてネガティブ染色し FEI Tecnai F20 を用いて分子像を得た(図 1 左)。当初これらの像は非常にバックグラウンドが高く、画像解析を用いて分子構築は難しいとの共同研究者である専門家の意見を得た。そこでバックグラウンドの改善とさらなる精製を重ね解析を行うと、精製 exTLR2 が安定でないことが明らかになった。膜タンパク質である PorB を行う際に含まれる界面活性剤が悪影響を及ぼしている可能性が高く、数時間後には複合体は沈殿をしてしまうことが分かった。そこで実験条件改善のため、精製直後のサンプルを直接ネガティブ染色した。ここ掲載した画像もそのよ



うに行なった。図 1 より 400kDa 以上の分子サイズに相当する分子(図 1 左の円内を拡大した図、また同様に見える分子の拡大図を右に示した)は 4 分子より構成されていると思われるような染色像が観察できた。PorB-TLR2 の複合体の形成は transient であることは示唆されている。ただし生化学的な解析にも、これまで得られた複合体が正しく

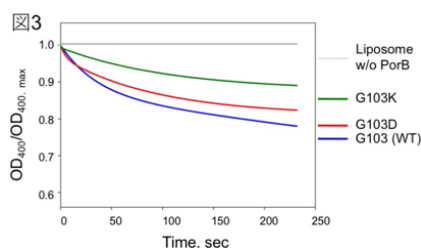
生物学的な現象を反映できているか現時点で証明する手段が難しいため、本研究については、より安定な複合体ならびに exTLR2 を精製することが必要であることが明らかになり、Drosophira 由来の S2 細胞を用いた exTLR2 タンパク質の発現系に切り換える事を開始したところである。その後電子顕微鏡を用いての性状解析は現時点で行なっていないが、安定した複合体が得られた折には、2018 年度、高エネ機構に導入された Cryo 電顕を用いて解析を行うことも視野に入れている。

テーマ 1) に関しては PorB は TLR2 のリガンドとしての役割だけでなく、外膜上において細胞の生育に必須な基質の輸送だけでなく、抗生物質の排出にも関連していることが示唆されてきた。特にアンピシリンやテトラサイクリンの排出に関して PorB の関与が報告さ



れているため、同時に抗生物質との複合体との構造解析を行った。また抗生物質への感受性が低下する変異体 A103K, A103D の変異体の構造解析も行った。またアンピシリンと A103D 変異体の構造解析にも成功した(図 2)。また輸送活性をリポソームを用いた再構成実験を用いて行ったところ変異体においては輸送活性が落ちていることが明らかになり(図 3)、この結果は抗生剤の排出よりも外部からの流入を防ぐことにより

を得ているのではないかと考えた。さらにこの輸送機構を明らかにするため、一分子計測を行うチャネルタンパク質の専門家である Steinam グループ(Göttingen 大学、ドイツ)、分子動力学(MD)シミュレーション計算の専門家である Zachariae グループ(Dundee 大学、英国)と共同研究を行った。電気生理学の実験より、PorB がアンピシリンを含む β -ラクタム系抗生物質を輸送する際に、複数のステップの待ち時間や PorB との弱い結合を繰り返し輸送していくことが明らかになった。この知見に関してはこれまで 2 度(Biophysical J., J. PhysChem Lett)に投稿したが、いずれも査読を通しての掲載には至らず、現時点で掲載は決定されていない。現

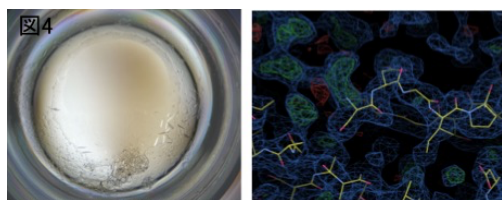


在はタンパク構造部分を少し簡略化し、より分子動力学計算と電気生理を中心にした論文を投稿している。

Bartsch A, Llabrés S, Pein F, Kattner C, Schön M, Diehn M, **Tanabe M**, Munk A, Zachariae U, Steinem C. High-resolution experimental and computational electrophysiology reveals weak β -lactam binding events in the porin PorB” Sci. Rep. Submitted (2018)

本論文の掲載が決定されたら、構造に関する論文も投稿する事を開始する予定である。

また FomA に関しては結晶を得ることができたが、これまでのところ 5Å 以上の分解能の構造を得ることができていない(図 4)。また 2.7Å の分解能の構造を得ることができたが、構造解析を進めていくと FomA にない配列が現れ(図 4 右)、再度解析した結果夾雑タンパク質の OmpF が予測に反して結晶化されたことがモデル構築後に明らかになった。



再度精製手法を変えて結晶化に取り組む予定である。

テーマ 4) に関しては、大きな成果を得ることができなかつた。グラミジア由来のポリンの構造やそのキメラ体に関して結晶化に成功することができなかつたためモデリングにより構造予測を行なつた。共同研究者らはループを改変した *N. Lactamica* 由来のポリンにグラミジアのポリンのループを結合させたキメラ体を解析して、サイトカインの解析を行った。特にループのアミノ酸配列が多種多様なループ領域は、TLR を介した免疫応答に重要なことが明らかになってきた。ただし構造情報との相関のとれた解釈が難しく、当初予定されたような貢献はできなかつた。

また補足だが、関連プロジェクトとして PorB に関して イタリアの共同研究者により、髄膜炎感染者より単離された PorB の配列と病原性についての関連についての相関を得た。本研究に関しては科研費申請中(受諾前)に結果をまとめることができた。

Stefanelli P, Neri A, **Tanabe M**, Fazio C and Massari. Typing and surface charges of variable loop regions of PorB from *Neisseria meningitidis* (IUBMB Life, 2016)

総括すると、論文掲載に至っていないものも多いが、研究全体の方向としては正しい方向に進んでいると確信している。また共同研究者の異動もあったため、今後の展開も考えていく上でまず科研費予算の終了にあたり現在進行形で進んでいるプロジェクトも、一度取り纏める方向で調整している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 幹雄 (TANABE, Mikio) 大学

共同利用機関法人高エネルギー加速器研究
機構・物質構造科学研究所

研究者番号：00716871

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

STEINAM Claudia

Georg-August-University Göttingen,
Göttingen Graduate School for
Neurosciences(ドイツ)

Zachariae Ulrich

University of Dundee, School of Life
Sciences(英国)

Bahrman Elmar

Max plunck Society, Research Cenger Caesar
(ドイツ)

Paola Massari

Tufts University, School of Medicine (米
国)

Stefanelli Paola

Istituto Superiore Di Sanità Department of
Infectious, Parasitic & Immuno-Mediated
Diseases, (イタリア)