

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04076

研究課題名(和文) 腸炎ビブリオVepAとウェルシュ菌BECの構造解析および活性発現機構の解明

研究課題名(英文) Structure and function of *V. parahaemolyticus* VepA and *C. perfringens* BEC

研究代表者

飯田 哲也 (Iida, Tetsuya)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：90221746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腸炎ビブリオおよびBEC産生性ウェルシュ菌の主要な病原因子であるVepA(腸炎ビブリオ)およびBEC(ウェルシュ菌)を研究対象とし、構造生物学的手法により活性発現機構の解析を行った。VepAについてはシャペロンであるVecAとの複合体の構造を決定することができた。BECについては酵素活性を有するBECaに関して、アポ型およびNADH複合体のX線結晶構造を得ることができ、基質認識機構を原子レベルで解明した。またBECbの標的細胞への作用について新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VepAのようにV-ATPaseに直接作用する病原因子というのはほとんど知られていない。この機構の解明は生化学的、細胞生物学的に興味あるテーマである。またV-ATPaseはがん細胞の転移など医学的に重要なさまざまな現象に関与しており、今後さらにVepAについての研究を進めることにより、疾患の治療などへの新しい示唆が得られる可能性がある。BECは、他の二成分毒素と異なり、標的細胞への結合に関与するb成分のみでも腸管毒性を有する毒素である。本研究により解明されたメカニズムを踏まえた新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the X-ray crystal structures of VepA and BEC, which are the major virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus* and BEC-producing *Clostridium perfringens*, respectively, were analyzed to understand the mechanism of activity expression by the effector/toxin. For VepA, the structure of the complex with the chaperone VecA could be determined. Regarding BEC, X-ray crystal structures of apo-type and NADH complex were obtained for BECa having enzymatic activity, and the substrate recognition mechanism was elucidated at the atomic level. In addition, we were able to obtain new knowledge about the action of BECb on target cells.

研究分野：細菌学

キーワード：腸炎ビブリオ ウェルシュ菌 毒素 結晶解析 レセプター

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、いくつかの下痢原性細菌の病原性について研究を行ってきた。それらのうち、腸炎ピブリオについては全ゲノム配列の解析を行い(Lancet 361:743-9,2003) 本菌が2種類の3型分泌装置を保有しており、そのうちのひとつ(T3SS2)が本菌による腸管毒性に重要な役割を果たしていることを示した(Infect. Immun. 72:6659-65, 2004)。またT3SS2が分泌するエフェクター蛋白のうち、VopVと名付けたエフェクターが腸炎ピブリオの腸管毒性に必須であることを明らかにした(Cell Host Microbe 10:401-9,2011)。さらに、VopVは標的細胞内のF-アクチンに特異的に結合し、この結合が腸管毒性に重要であること、またVopVには細胞内におけるG-アクチンとF-アクチン間の動的平衡を攪乱する活性があることをクライオ電子顕微鏡を用いた解析等によって明らかにした(Cell Host Microbe 10:401-9, 2011, Sci.Rep. 5: 10870,2015)。

このように、腸炎ピブリオによる腸管毒性に関しては詳細が明らかになりつつあるが、一方で腸炎ピブリオが様々な種類の真核細胞に対して示す強い細胞毒性についてはいまだ不明な点が残っている。研究代表者らは、腸炎ピブリオによる細胞毒性が本菌の保有するもうひとつの3型分泌装置 T3SS1 によるものであることを明らかにした(Infect. Immun.72:6659-65,2004)。さらにT3SS1により分泌されるエフェクターVepAがこの細胞毒性に必須であること、またVepAは宿主細胞に打ち込まれた後、液胞型H<sup>+</sup>-ATPase(V-ATPase)のcサブユニットとinteractionし、その結果、宿主細胞のリソソームにダメージを起し細胞死を引き起こすことを示した(PLoS Pathog.8:e1002803,2012)。VepAは幅広い種類の真核細胞に対して毒性を示すが、V-ATPaseは様々な生物が保有する細胞内マシナリーであり、上記の結果からVepAの幅広い細胞特異性が説明できる。このような幅広い特異性を有するエフェクターを保有するというのは、細菌の真核細胞とのinteractionのための有効な戦略のひとつであるといえる。現在のところVepAがV-ATPaseのcサブユニットとinteractした結果どのようにリソソーム膜を攪乱するかについては不明である。

また最近、研究代表者らは、集団食中毒の原因と推定されたにもかかわらず既知のエンテロトキシン(CPE)を産生しないウェルシュ菌が、新規エンテロトキシンを産生することを見出した(Infect. Immun. 82:2390-9,2014)。BEC(Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*)と名付けたこのエンテロトキシンは、ADPリボシル化二成分毒素に属していたが、ウェルシュ菌のイオタ毒素やボツリヌス菌のC2毒素等、他の二成分毒素がa成分とb成分の両分子があっではじめて生物活性を示すのと対照的に、標的細胞への結合に關与するb成分(BECb)のみで腸管毒性を有するというユニークな活性を示した。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がこれまで研究を行ってきた腸炎ピブリオおよびBEC産生性ウェルシュ菌の主要な病原因子であるVepA(腸炎ピブリオ)およびBEC(ウェルシュ菌)を研究対象とし、それらの活性発現機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、まず結晶構造解析により両者の三次元構造を明らかにする。次に明らかになった三次元構造をもとに、一連の変異体を作製して構造機能相関について解析を行い、活性部位等を明らかにする。また、得られた一連の変異体を用い、VepAについてはV-ATPaseのcサブユニットとinteractした結果どのようにリソソーム膜の攪乱を引き起こすかについて、BECに関してはBECbの腸管上皮細胞への作用がいかに関与しているかについて多方向から解析を行い、活性発現機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

腸炎ピブリオ VepA およびウェルシュ菌 BEC の活性発現機構を解明するために、以下の研究を行った。

VepA： VepA の結晶構造解析を試み、得られる三次元構造から活性および活性発現に重要な構造についての考察を行った。大量発現系により発現させた VepA を精製し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を試み、結晶のスクリーニングを行ったが、良質な結晶を得ることはできなかった。これは、N 末端の 100 残基以上におよぶシャペロン結合ドメインの可動性の高さや、生体膜への結合が予想される一部の疎水性領域に起因すると予測された。そこで VepA の安定性と、結晶化能を向上させるために、シャペロンである VecA との複合体の精製を行った。大量発現系により得られた VepA-VecA 複合体をシッティングドロップ蒸気拡散法によりスクリーニングした結果、複数の条件において良質な結晶を得ることに成功した。得られた高分解能の結晶について、大型放射光施設 Spring-8 において回折測定を行った。

BEC： BEC は二成分毒素であるが、BECb 単独で腸管毒性をもつことが示されている (Infect. Immun. 82:2390-9, 2014)。しかしながら標的細胞上のレセプターをはじめ、それ以外のことについてはいまだ不明な点が多い。そこで BECa および BECb とともに結晶構造解析を行い、得られる三次元構造から活性発現に重要な構造についての考察を行った。また、得られた三次元構造をもとに、site-directed mutagenesis によりさまざまな変異体を作製し、活性に重要なアミノ酸残基や構造についての検討を行った。さらに、Caco-2 等の培養細胞に対する BECb の結合様式について、蛍光標識した BECb を細胞に作用させ顕微鏡観察することにより検討した。また、monolayer の Caco-2 細胞に BECb を作用させた場合の、経上皮電気抵抗値 (TER) の変化について解析を行った。

#### 4. 研究成果

これまでの遺伝学的解析から、ウェルシュ菌由来新規毒素 binary enterotoxin of *Clostridium perfringens* (BEC) は、膜孔形成毒素ファミリーに属する *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) とは異なり、アクチン ADP リボシル化二成分毒素ファミリーに属することを明らかにしていたが、その活性発現機構の詳細は理解されていなかった。本研究では、BEC を構成する各成分 (BECa および BECb) のそれぞれについて X 線結晶構造解析に取り組み、立体構造情報から、活性発現機構の解明を試みた。その結果、酵素活性を有する成分 a (BECa) に関して、アポ型および NADH 複合体の X 線結晶構造解析を行い、BECa の立体構造とその基質認識機構を原子レベルで解明した。また、得られた複合体立体構造をアポ型の BECa 結晶構造と比較することで、基質近傍に位置する水分子の存在と、触媒活性残基 (Glu380) および ADP リボシル化毒素ファミリーに共通して存在する ADP-ribosylating turn-turn loop (ARTT ループ) の構造多形を観測した。これらの知見に基づいて、BECa の ARTT ループを構成する各アミノ酸の変異体をそれぞれ大腸菌発現系により調製し、X 線結晶構造解析、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた酵素活性測定、分子動力学シミュレーション、そして細胞毒性試験の結果を組み合わせることで、ARTT ループの芳香族アミノ酸を中心とした構造変化が、球状アクチンの認識と、標的とするアルギニン残基 (Arg177) の効率的な ADP リボシル化反応において重要な働きをすることが明らかになった。

酵素活性成分である BECa の細胞内への輸送に関わる成分 b (BECb) については、BECa と同様に大腸菌発現系を用いて調製し、X 線結晶構造解析に向けた結晶化を試みているが、現時点で単結晶を得ることができていない。一般的に、アクチン ADP リボシル化二成分毒素ファミリーの成分 b は、標的細胞膜受容体に結合した後、多量体を形成し、その後、構造変化を起こして

膜孔を形成する。そのため、受容体非結合時は、構造が不安定な可能性があり、結晶化を妨げている可能性がある。従って、立体構造決定のためには、標的細胞膜受容体を同定し、その受容体全長もしくは細胞外ドメインとの安定な複合体を形成させ、結晶化する必要がある。これまでに、BECbの標的細胞膜受容体は報告されていないため、今後は、標的受容体の同定を試みる予定である。site-directed mutagenesis や error-prone PCR を用いた構造機能相関についての実験は遅れているが、BECbの標的細胞への結合様式について新たな知見が得られた。また、BECbのmonolayerの細胞に作用させた場合の経上皮電気抵抗値(TER)の変化についての成績が得られたのは予想を上回る成果であった。BECbの培養細胞に対する作用に関しては、いくつかの興味ある知見が得られており、令和2年度中の論文投稿を目指している。

腸炎ビブリオが3型分泌装置を介して標的細胞内に分泌するエフェクターであるVepAに関しては、これまでの実験から、細胞内の液胞に局在するV-ATPaseを標的とすることで、細胞毒性を発揮することは明らかになっていたが(*PLoS Pathog.* 2012)、その立体構造や活性発現機構は不明であった。構造生物学的手法により活性発現機構を解析するため、これまでにVepA単体の結晶化を試みてきたが、良質な結晶を得ることはできていなかった。これは、N末端の100残基以上におよぶシャペロン結合ドメインの可動性の高さや、生体膜への結合が予想される一部の疎水性領域に起因すると予測された。そこでVepAの安定性と、結晶化能を向上させるために、シャペロンであるVecAとの複合体の精製を行った。大量発現系により得られたVepA-VecA複合体をシッティングドロップ蒸気拡散法によりスクリーニングした結果、複数の条件において良質な結晶を得ることに成功した。さらに、シャペロンVecA単体の結晶化にも成功したことから、まずVecA結晶を $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})^{2+}$ クラスター溶液に浸潤させることで、複合体にクラスター分子を付加した。得られた誘導体結晶は大型放射光施設SPring-8の放射光において回折測定を行い、Ta原子を利用した単波長異常散乱法(Ta-SAD)により構造決定に成功した。腸炎ビブリオ3型分泌装置のシャペロンの立体構造決定は世界初である。また、得られたVecA構造情報とSe原子の異常散乱効果を利用することで、VepA-VecA複合体の構造決定にも成功した。得られたVepA構造は既知のタンパク質にない全く新規の構造を採っており、いくつかの興味深い知見が得られていることから、令和2年度中の論文投稿を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okada R, Matsuda S, Iida T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Vibrio parahaemolyticus VtrA is a membrane-bound regulator and is activated via oligomerization.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0187846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0187846.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tandhavanant S, Matsuda S, Hiyoshi H, Iida T, Kodama T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Vibrio parahaemolyticus Senses Intracellular K <sup>+</sup> To Translocate Type III Secretion System 2 Effectors Effectively.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e01366-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01366-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda S, Okada R, Tandhavanant S, Hiyoshi H, Gotoh K, Iida T, Kodama T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Export of a Vibrio parahaemolyticus toxin by the Sec and type III secretion machineries in tandem.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Microbiol	6. 最初と最後の頁 781-788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41564-019-0368-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shinya Yonogi, Shigeaki Matsuda, Takao Kawai, Tomoko Yoda, Tetsuya Harada, Yuko Kumeda, Kazuyoshi Gotoh, Hirotaka Hiyoshi, Kazuki Kawahara, Ryota Munetomo, Hiroya Oki, Shota Nakamura, Toshio Kodama, Tetsuya Iida
2. 発表標題 BEC, a novel enterotoxin produced by non-CPE producing Type A Clostridium perfringens, is a cause of human gastroenteritis.
3. 学会等名 The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯田哲也
2. 発表標題 ゲノミクス・メタゲノミクスを用いた微生物研究
3. 学会等名 第29回微生物シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 沖大也,河原一樹,松田重輝,児玉年央,元岡大祐,吉田卓也,大久保忠恭、飯田哲也、中村昇太
2. 発表標題 腸炎ヒブリオ菌由来エフェクターVepAとシャペロンVecA複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯田哲也
2. 発表標題 ゲノミクス・メタゲノミクスを用いた微生物研究
3. 学会等名 第50回レンサ球菌研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田賢吾、河原一樹、余野木伸哉、沖大也、松田重輝、児玉年央、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 ウェルシュ菌由来新規ADPリボシル化毒素BECaの酵素反応機構
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田哲也
2. 発表標題 ゲノミクス・メタゲノミクスからのアプローチ
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田賢吾、河原一樹、余野木伸哉、沖大也、松田重輝、児玉年央、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 ウェルシュ菌由来二成分毒素BECのサブユニットa(BECa)の酵素反応機構
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木本成美、河原一樹、上田賢吾、余野木伸哉、沖大也、松田重輝、児玉年央、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 ウェルシュ菌由来ADPリボシル化毒素の酵素反応に重要なARTTループの構造多形
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kengo Ueda, Kazuki Kawahara, Shinya Yonogi, Hiroya Oki, Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, Shota Nakamura
2. 発表標題 Structural analysis of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of Clostridium perfringens
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中村 昇太  (Nakamura Shota)  (90432434)	大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)    (14401)	