

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K06170

研究課題名(和文) クライオ電子顕微鏡とX線結晶構造解析による二成分毒素トランスロコンの構造機能解析

研究課題名(英文) Structural and Functional Study of Binary Toxin Translocon by Cryo-EM and X-ray Crystallography

研究代表者

津下 英明 (TSUGE, Hideaki)

京都産業大学・生命科学部・教授

研究者番号：40299342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌の二成分毒素はアクチンをADPリボシル化する酵素成分のIaと、Iaを膜を介して細胞内に透過させる膜結合成分Ibからなる。cryo-EMを用いた単粒子解析により、Ib膜孔およびIaが結合したIb膜孔の高分解能の構造を明らかにした。この結果、Ib膜孔は酵素成分Iaが通過する直径6オングストロームしかない部分(クランプ)を持ち、透過のためIaのN末端は解けていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウェルシュ菌の二成分毒素はアクチンをADPリボシル化する酵素成分のIaと、Iaを膜を介して細胞内に透過させる膜結合成分Ibからなる。Ibは中央に孔を持つIb膜孔を形成し、Iaがこの中を通過する。この二成分毒素複合体の構造を明らかにした。このことより、タンパク質膜透過の仕組みの一端を明らかにした。似た二成分毒素はデオフィシル菌(ヒト感染症)や炭疽菌でもみられ、膜孔の阻害剤創薬の重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The iota toxin produced by *Clostridium perfringens* type E is a binary toxin comprising two independent polypeptides: Ia, an ADP-ribosyltransferase, and Ib, which is involved in cell binding and translocation of Ia across the cell membrane. Here we report cryo-EM structures of the translocation channel Ib-pore and its complex with Ia. The high-resolution Ib-pore structure demonstrates a similar structural framework to that of the catalytic phi-clamp of the anthrax protective antigen pore. However, the Ia-bound Ib-pore structure shows a unique binding mode of Ia: one Ia binds to the Ib-pore, and the Ia amino-terminal domain forms multiple weak interactions with two additional Ib-pore constriction sites. Furthermore, Ib-binding induces tilting and partial unfolding of the Ia N-terminal α -helix, permitting its extension to the phi-clamp gate. This new mechanism of N-terminal unfolding is crucial for protein translocation.

研究分野：構造生物学、生物物理学、生化学、細菌学、タンパク質科学

キーワード：ウェルシュ菌 二成分毒素 タンパク質膜透過 ADPリボシル化 デオフィシル菌 クライオ電子顕微鏡
単粒子解析 超分子複合体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

ウェルシュ菌イオタ毒素は二成分毒素であり、宿主細胞内でアクチンのADPリボシル化を行う酵素ユニットIaと酵素成分を細胞内に輸送するトランスロコンIbからなる。Ibは約500KDaのオリゴマーを形成しプレ膜孔を形成、さらに大きな構造変化をおこし膜に結合、膜上で機能的な膜孔を形成すると考えられる。エンドソームの酸性条件下でこの膜孔を介したIaの細胞内への透過が起こると考えられている(図1)。しかしながら、その構造についての詳細はわかっておらず、Iaの膜透過の機構についても不明であった。

一方、二成分毒素で最も研究が進んでいるのは炭疽菌の酵素成分LF,EFとトランスロコンPAである。トランスロコンであるIbとPAは約50%程度の類似性を持つが、酵素成分のIaはアクチン特異的ADPリボシル

化酵素でありLF(メタルプロテアーゼ)、EF(カルモジュリン特異的アデニル酸シクラーゼ)とは構造機能ともに全く異なる。

PAのプレ膜孔、膜孔の構造は明らかになっているが、この膜孔の構造に酵素成分LFが結合した高分解能構造はわかっていない。

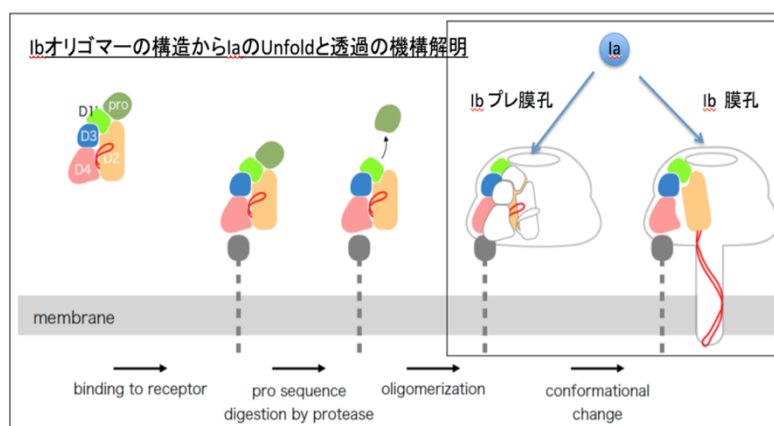


図1：此の研究の目標—右黒枠の構造を明らかにする

2. 研究の目的

Ibトランスロコンの構造とIa透過機構を明らかにする。この研究によりIb膜孔の構造を明らかにする。さらに、Iaの結合したIb膜孔の構造を明らかにする。このIb膜孔タンパク質透過装置と基質タンパクIaの構造解析から、タンパク質膜透過の理解をすすめる。

3. 研究の方法

構造を決める手法は、主に2つある。従来のX線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡による単粒子解析である。Ib膜孔の精製には、問題点が2つあり、in vitroでIb単量体からオリゴマーへの変換効率が低いことがあった。このため、得られるIb膜孔の量が少ない、また得られたIb膜孔はプレ膜孔か膜孔か、あるいは混在したものなのか不明であった。このため、X線結晶構造解析でなく、クライオ電子顕微鏡での解析を選択した。クライオ電子顕微鏡選択のもう一つの理由は、全体で500KDaと巨大複合体であり、クライオ電子顕微鏡には最適な大きさであることも選択の理由である。Ib膜孔の超遠心による精製と、クライオ電子顕微鏡による構造解析が研究の主な手法である。

4. 研究成果

目的のIbの構造解析を成功させるためには、安定なプレ膜孔あるいは膜孔の精製が不可欠であった。Ibにはプレシーケンスが存在し、これが細胞内プロテアーゼで切断されると細胞内ではオリゴマー化することが知られていた。しかしながら、in vitroでは、効率よくオリゴマー化しない。我々は、10%のエタノールと0.03%のLMNG(非イオン性界面活性剤)で安定なオリゴマ

一が効率良くできることを見出し、さらに密度勾配遠心法により Ib オリゴマーを精製した。この方法の獲得により、その後の研究が大きく進展した (図 2)。

cryo-EM での構造解析は、次の 2 つの段階を経て進んだ。最初に **Ib** の膜孔(**Ib-pore**)の構造決定を行った(図 3 a : cryo-EM 電子密度)。このオリゴマーは可溶性のプレ膜孔でなく、膜に貫通する β バレル構造のステム部分が形成した膜孔であることがわかった。**Ib** は 7 量体の膜孔 (**Ib-pore**)を形成していた。その全体構造と最狭部位である 7 つの Phe からなる ϕ -clamp の構造は、すでに構造が明らかになっている PA 膜孔に似ている。最終的な解析を行った粒子数は 38,433 であり、全体構造のマップ分解能は 2.9 Å であった。中心部分においては 2.5 Å と非常に高い分解能での構造が得られた。しかしながら、外側に位置する受容体結合部位のドメイン 4 は分解能が低くモデル構造を置いていない。またステム部分は全長は見えておらず先の部分のマップは見えていなかった (後述 : short stem と呼ぶ)。

此の構造解析の結果をうけて更に **Ib-pore** に **Ia** を加えたサンプルを調整して、**Ia** の結合した膜孔(**Ia-bound Ib-pore**)の高分解能構造解析に成功した (図 3 bc : cryo-EM 電子密度)。

此のサンプルでは 2 つの状態を観察できステム部分が短いもの (short stem:40 Å) と長いもの (long stem:100 Å) のものを含んでいた。最終的な解析を行った粒子数は、short stem と long stem で 135,359 と 62,940

であり、それぞれのマップの分解能は short stem で 2.8 Å、long stem で 2.9 Å と高い分解能であった。どちらも同じように **Ia** は結合している。

前述したように **Ib-pore** の構造は PA 膜孔とほぼ変わらなかったが、**Ia-bound Ib-pore** 構造は以下の点がユニークであった。

(1) 1 分子の **Ia** (黄色) が N 末端ドメインで **Ib** 膜孔と相互作用する。(2) その結合は 2 箇所の膜孔のボトルネックである Ca-edge (2 つのカルシウム結合部位) と NSQ-loop を介した、弱い相互作用である (図 4 上 : **Ib-pore** および図 4 下 : **Ia-bound Ib-pore** 構造と断面 (long stem))。 (3) **Ia** の N 末端ヘリックスはほどけ、この N 末端は **Ib** 膜孔チャネルの最狭部位 (直径 6 Å) ϕ -clamp に続いていた。これらの知見は全く新しいものであった (すでに LF-PA プレ膜孔構造はあるが、LF-PA 膜孔の高分解能構造はない。また LF-PA プレ膜孔構造から LF-PA 膜孔構造とはまったく異なる新しい知見であった)。

この **Ia-bound Ib-pore** 複合体構造からタンパク質膜透過機構について以下のことを提唱した。

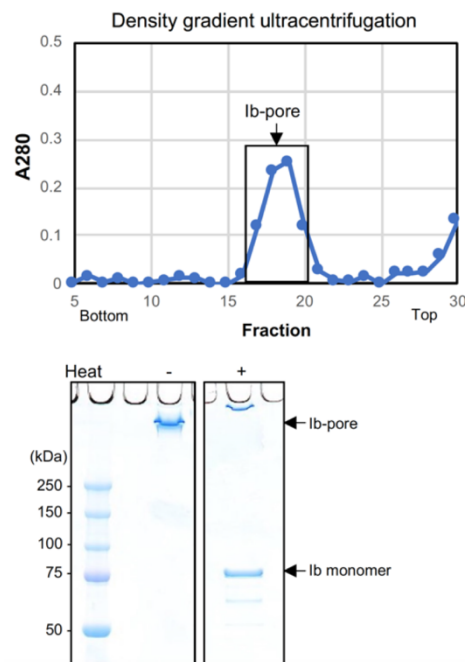


図 2 : 密度勾配遠心による **Ib** 膜孔の精製

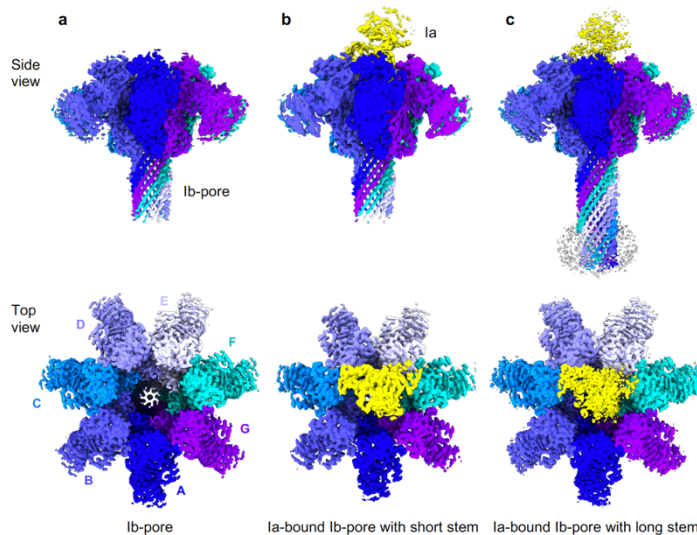


図 3 : cryo-EM 電子密度マップ **Ib-pore** 及び **Ia-bound Ib-pore**

(1) Ia は N 末端からほどけ透過していく (2) 最狭部位を通過するために、その透過機構は、ほどけたペプチドチェーンがブラウニアン・ラチェット機構で透過するであろう (図 5 : 現在考えている Ib 膜孔を介した Ia の透過機構モデル。現在得られた Ia-bound Ib-pore 複

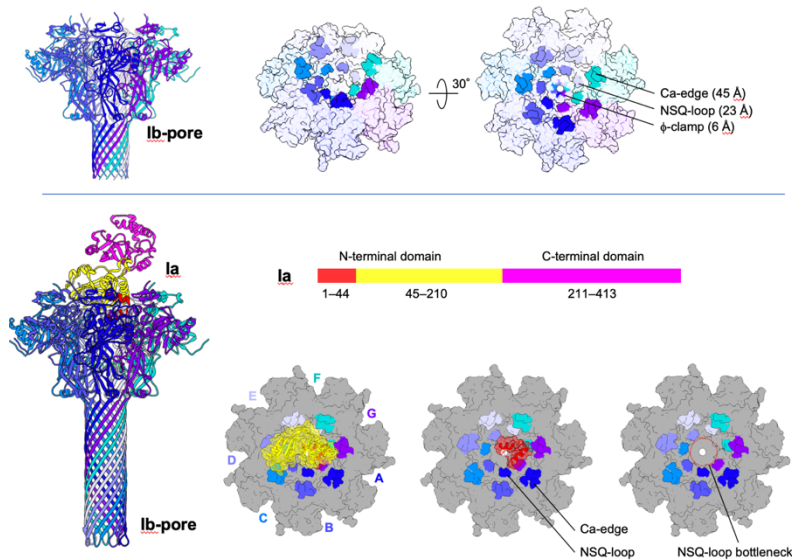


図 4 : 上 : Ib-pore 構造 及び 下 : Ia-bound Ib-pore 構造

合体構造は b 図)。変異解析から Ia の N 末端ドメインが相互作用すること、また Ib の N 末端の Ca-edge との相互作用はある程度予想されたが、その 1:1 (Ia: Ib 膜孔) との化学量論と弱い相互作用、および N 末端のほどけた様子 (アンフォールド) は思いもかけない結果であった。この得られた構造は「Ia の Ib 膜孔チャネルの膜透過の直前の姿」と考えている。

今後の研究の展望 : (1) 「Ia の Ib 膜孔チャネルの膜透過の直前の姿」から「Ia の Ib 膜孔チャネルの膜透過中の姿」を捉え、さらに細胞内シャペロン Hsp70 との相互作用を cryo-EM を用いて解明したいと考えている。これはタンパク質透過膜孔チャネルの一般的なモデルとなる。(2) タンパク質毒素として、その膜孔の毒性発現機構にまだ不明な点があり、似た膜孔毒素を比較することにより、毒性発現機構を明らかにしたいと考えている。

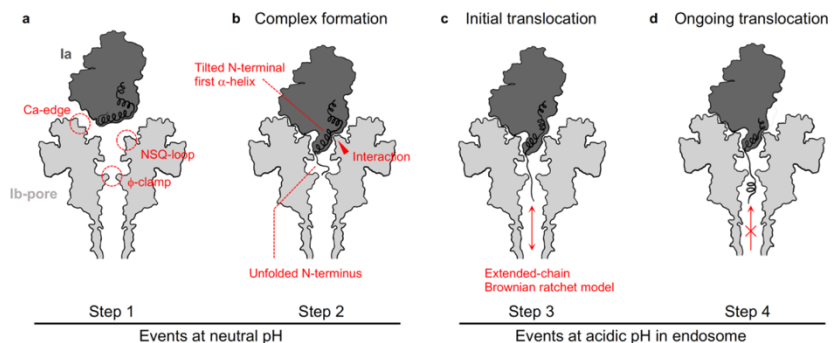


図 5 : Ia の Ib-pore を介した透過モデル (得られた複合体構造は b)

結果の公開 :

(1)

以上の得られた結果はプレプリントサーバ bioRxiv で公開した。

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/721969v1>

(2)

本論文は *Nat Struct & Mol Biol.* に採択された。

Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, Tsuge H. Cryo-EM structures reveal translocational unfolding in the clostridial binary iota toxin complex.

Nat Struct & Mol Biol. 27(3):288-296. doi: 10.1038/s41594-020-0388-6. (2020)

(3)

2019年6月の国際学会 European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX19)で筆頭著者の山田（修士1年）が口頭発表にセレクトされた。

(4)

11月に生理研で開催された研究会「クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子解析」みんなのクライオ電顕で招待講演（山田、津下）

(5)

Nature Research Microbiology Blog より招待され以下の記事を書いた。

「Posing just before protein translocation in bacterial binary toxin」(津下)

<https://naturemicrobiologycommunity.nature.com/users/352568-hideaki-tsuge/posts/61288-posing-just-before-protein-translocation-in-bacterial-binary-toxin>

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida T. and Tsuge H.	4. 巻 293(36)
2. 論文標題 Substrate N2 atom recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting, guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13768-13774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1074/jbc.AC118.004412	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 -

1. 著者名 Tomohito Yamada 1, Toru Yoshida, Akihiro Kawamoto, Kaoru Mitsuoka, Kenji Iwasaki, Hideaki Tsuge	4. 巻 27(3)
2. 論文標題 Cryo-EM Structures Reveal Translocational Unfolding in the Clostridial Binary Iota Toxin Complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Struct Mol Biol .	6. 最初と最後の頁 288-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41594-020-0388-6.	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 -

1. 著者名 Hideaki Tsuge	4. 巻 295(26)
2. 論文標題 A Myelin Sheath Protein Forming Its Lattice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem .	6. 最初と最後の頁 8706-8707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1074/jbc.H120.014273.	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yoshida T, Yamada T, and Tsuge H
2. 発表標題 Membrane transport and ADP-ribosylation mechanism of binary toxin <i>C. perfringens</i> iota toxin
3. 学会等名 International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida T, and Tsuge H
2. 発表標題 Substrate recognition and reaction mechanism of DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase
3. 学会等名 International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada T, Yoshida T, and Tsuge H
2. 発表標題 Cryo-EM single particle analysis of C. perfringens binary toxin
3. 学会等名 International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津下英明
2. 発表標題 DNAを標的としたADPリボシル化酵素の基質認識機構
3. 学会等名 第453回ビタミンB 研究協議会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津下英明
2. 発表標題 From Protein to DNA Modification: Substrate recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP
3. 学会等名 日本分子生物学会 ワークショップADP-ribosylation in intra- & extracellular communication and diseases
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津下英明
2. 発表標題 Clostridium Binary Toxin: 膜孔形成タンパク質トロンスロコンの作用機構について
3. 学会等名 京都薬科大学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada T, Yoshida T, Kawamoto A, Mitsuoka K, Iwasaki K, and Tsuge H
2. 発表標題 Cryo-EM structure of clostridial binary toxin translocon Ib-pore, European Workshops on Bacterial Protein Toxins
3. 学会等名 European Workshops on Bacterial Protein Toxins - ETOX19
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Monma C, Saiki D, Shimojima Y, Suzuki J, Sadamasu K, Yamada T, Tsuge H, Kamata Y
2. 発表標題 Diarrheagenic activity of each component of CPiLE as a new enterotoxin produced by Clostridium perfringens isolated from foodborne outbreaks
3. 学会等名 CLOSPATH 11
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田等仁、津下英明
2. 発表標題 ウェルシュ菌 2 成分毒素 膜孔複合体の単粒子解析
3. 学会等名 生理研研究会クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析 ~ みんなのクライオ電顕 ~
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田徹、津下英明
2. 発表標題 DNAを基質とするADPリボシル基転移酵素の基質認識機構
3. 学会等名 酵素補酵素研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 半田達也、津下英明
2. 発表標題 病原菌由来モノADPリボシル基転移酵素の基質認識機構に関する研究
3. 学会等名 酵素補酵素研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津下英明
2. 発表標題 タンパク質膜透過チャンネルの単粒子構造解析
3. 学会等名 第453回ビタミンB 研究協議会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田等仁、吉田徹、川本暁大、光岡薫、岩崎憲司、津下英明
2. 発表標題 Cryo-EM structure of clostridial binary toxin translocation channel Ib-pore
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Nature Research Microbiology Community Blog 「Posing just before protein translocation in bacterial binary toxin」(津下)

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
研究分担者	吉田 徹 (YOSHIDA Toru) (30724546)	京都産業大学・総合生命科学部・研究員 (34304)	