

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07110

研究課題名(和文) 腸管系病原菌が保有するIV型線毛の分泌タンパク質を介した付着機構解明

研究課題名(英文) Interplay of a secreted protein with type IV pilus for efficient adhesion of enteric pathogens

研究代表者

河原 一樹 (Kawahara, Kazuki)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：60585058

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)：腸管系病原菌は、宿主細胞表面に付着し、定着するために、数多くのオルガネラを進化させてきたが、線毛はその最も顕著な例である。本研究では、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)のオペロンにコードされたIV型線毛の一種である定着因子抗原III(CFA/III)の新規腸管付着機構を提案する。CFA/IIIは、宿主細胞表面に付着するために、線毛の先端部において分泌タンパク質であるCofJとの相互作用を必要とする。CofJには、脂質膜との結合に関与する芳香族アミノ酸残基のクラスターが存在することから、ETECの感染過程において、分泌タンパク質が宿主細胞表面とIV型線毛を橋渡しする役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、腸管系病原菌の感染過程の理解に繋がるだけでなく、定着阻害剤等の開発への応用が可能である。定着阻害剤は、細菌を死滅させる抗生物質とは異なり、耐性菌を生じさせないことから、薬剤耐性菌問題の解決に向けた新規の感染症予防・治療アプローチとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：For efficient attachment and subsequent colonization of the host-cell surface, enteric pathogens have evolved numerous surface organelles, with filamentous protein polymers termed pili being the most prominent. In this study, the structural model and adhesion mechanisms of colonization factor antigen/III (CFA/III), an operon encoded type IV pilus of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC), are proposed. To attach to the target cell surface, CFA/III requires additional interaction with a secreted protein CofJ at its pilus-tip. Since CofJ possesses a cluster of aromatic residues that interacts with a target lipid membrane, it is suggested that the secreted protein serves as an anchor, bridging the host-cell surface and the pilus tip of type IV pilus during the process of ETEC infection.

研究分野：構造生物学

キーワード：腸管系病原菌 定着 ETEC IV型線毛 X線単結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌問題が深刻化する中、抗生物質や抗菌薬に代わる新たな治療薬の開発が喫緊の課題となっている。その中でも、細菌の生育を直接阻害する抗生物質や抗菌薬とは異なり、細菌が産生する病原因子の働きを阻害する薬剤の開発が注目を集めている。多数存在する病原因子のうち、宿主への付着と定着に關与する線毛は、魅力的な創薬標的であり、その働きを阻害する薬剤は、病原菌を死滅させずに宿主外に排出することが可能であるため、耐性菌を生じさせない長所がある。しかしながら、未だ多くの病原菌において、巨大な繊維状タンパク質重合体である線毛の立体構造や機能の詳細についての理解が不十分であり、効果的な薬剤の開発は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、発展途上国や旅行者を中心に世界中で年間約4億人が感染し、約40万人の死亡が報告されている腸管毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*: ETEC) について、その宿主腸管上皮への付着および定着機構を解明し、定着阻害剤の開発に向けた基盤情報を得ることを目的とする。

ETEC は、腸管上皮への付着と定着を達成するために、複数の線毛性定着因子 (Colonization Factors: CFs) を保有している。線毛性 CFs は、シャペロン・アッシャー (Chaperone-Usher: CU) 経路または IV 型線毛システムにより合成される二種類の線毛に大別され、いずれもピリン (pilin) と呼ばれる線毛構成タンパク質が螺旋状に重合することで形成される。それぞれの線毛の先端部には、少数のみ発現するマイナーピリンが存在することが多く、ピリン様ドメインに加えて、アドヘシン (adhesin) と呼ばれる付着に關与するドメインを持つことが多い。現在までに報告されている約20種類の線毛性 CFs の大部分 (17種類) が CU 線毛であることから、これまでの研究の多くは CU 線毛について実施されており、それらの多くが宿主組織表面の糖鎖を認識することが報告されている。しかしながら、CU 線毛に比べてより複雑な分子マシナリーによって形成される IV 型線毛については、その立体構造や付着および定着における役割が明らかになっていない。

我々は、ETEC が保有する IV 型線毛性 CFs の1種である定着因子抗原 III (Colonization factor antigen/III: CFA/III) について研究を行い、X線単結晶構造解析や分子モデリングの結果から、メジャーピリン CofA とマイナーピリン CofB からなる CFA/III の線毛モデルの構築に成功した。さらに、*cof* オペロンと名付けられた CFA/III の産生に關わる一連の遺伝子中にコードされた分泌タンパク質 CofJ が、線毛先端部に位置するマイナーピリン CofB と相互作用することで、ETEC の腸管付着に關与する予想外の知見を得た。そこで、本研究では、我々が提案する分泌タンパク質 CofJ を介した ETEC の新規腸管付着機構に關して、その構造学的基盤を解明することを研究の出発点とした。

3. 研究の方法

本研究では、ETEC の分泌タンパク質を介した IV 型線毛による腸管付着および定着機構を解明するため、構造生物学、生化学、分子生物学、計算科学の各手法を組み合わせることで、特に、(1) CFA/III の先端に存在するマイナーピリン CofB と分泌タンパク質 CofJ との相互作用および複合体立体構造解析、(2) 分泌タンパク質 CofJ の宿主標的分子の探索、の2項目を中心に実験を進めた。

(1) に関しては、大腸菌発現系を用いて対象タンパク質を調製し、大型放射光施設 SPring-8 の放射光源を利用した X 線単結晶構造解析を行うほか、等温滴定型熱量計 (Isothermal titration calorimetry: ITC) を用いた相互作用解析、超遠心分析による会合状態の推定を実施した。X 線単結晶構造解析では、CofB-CofJ 複合体の結晶化に取り組むほか、ITC による相互作用解析から推定された CofJ の CofB 結合領域 (N 末端の1から24残基) からなるペプチド CofJ(1-24) を合成し、CofB-CofJ(1-24) ペプチド複合体の結晶化も行った。得られた情報に基づき、分子モデリングにより、CofJ-CFA/III 線毛モデルを構築した。

(2) の CofJ の宿主標的分子の探索に關しては、糖鎖アレイ、脂質アレイキットを用いたアッセイを行うほか、様々な糖、脂質化合物と CofJ との相互作用を ITC により評価した。また、脂質組成の異なるリポソームを調製し、超遠心分析器を用いた共沈実験や透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy: TEM) 観察により、脂質二重膜との結合評価も実施した。

4. 研究成果

ETEC が保有する IV 型線毛の一種である CFA/III の先端部に位置するマイナーピリン CofB と分泌タンパク質 CofJ の結合様式を解明するため、先ず CofB-CofJ 複合体の結晶化を試みたが、X 線単結晶構造解析に適した結晶が得られなかった。そこで、ITC を用いた相互作用解析から、CofB との結合領域と推定された CofJ の N 末端の 1 から 24 残基の領域からなるペプチド (CofJ(1-24)ペプチド) を合成し、CofB との共結晶化を実施した。その結果、3.52Å の分解能で、CofB-CofJ(1-24)ペプチド複合体の結晶構造を決定することに成功した (図 1)。得られた結晶は、非対称単位中に 3 分子の CofB と 3 分子の CofJ(1-24)ペプチドを含んでおり、各 CofJ(1-24)ペプチドは、ホモ 3 量体構造を形成する CofB の H 型レクチン様ドメインに結合していた (図 1a)。一般的に、ディスコイジン I などの H 型レクチンは、ホモ三量体構造を形成し、分子境界において N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) と特異的に結合することが知られているが、興味深いことに、CofB は相当する領域において GalNAc ではなく CofJ(1-24)ペプチドの 5 から 15 残基の配列を認識することが明らかになった (図 1)。

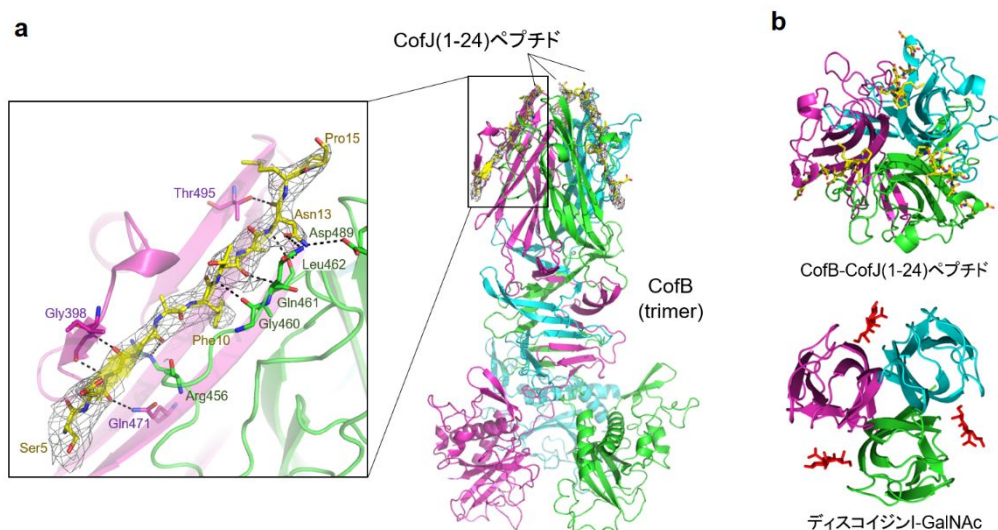


図 1 マイナーピリン CofB と CofJ(1-24)ペプチド複合体の結晶構造 (a) 及び CofB の H 型レクチン様ドメインとディスコイジン I の H 型レクチンドメインの比較 (b)。

CofB-CofJ(1-24)ペプチド複合体の結晶中において、CofJ(1-24)ペプチドは、CofB ホモ 3 量体に 3 か所存在する等価な分子境界の全てに結合していたが、溶液中における全長 CofJ と CofB の沈降速度法を用いた超遠心分析の結果から、球状ドメインの立体障害のため、CofJ は CofB に存在する 3 か所の等価な結合部位のうち、いずれか 1 か所にしか結合できないことが明らかになった。これらの結果に基づき、線毛先端部に 1 分子の分泌タンパク質 CofJ が結合する CFA/III の線毛モデルを構築した (図 2a)。

CFA/III 産生大腸菌株を用いたヒト結腸癌由来 Caco2 細胞への付着アッセイの結果、*cofJ* 欠損株は野生株と比較して顕著に細胞付着能が減少することが明らかになり、その減少は、リコンビナントの CofJ を加えることで回復するが、N 末端の 1 から 24 残基を欠損させた CofJ (Δ N24-CofJ) を加えた場合には、回復しないことも明らかになった (図 2b)。これらの実験結果から、CofJ と CFA/III の相互作用は、ETEC の腸管への付着過程において重要な働きを担うことが示唆された。

CofJ は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の α -ヘモリシン等の膜孔形成毒素と構造類似性があり、また分子表面にチロシン等の芳香族アミノ酸に富む領域を有していることから (図 2a)、脂質膜認識に関与することが示唆されている。脂質アレイキット等を用いた実験から特定の脂質分子との相互作用は確認されていないが、ブタ脳抽出脂質混合

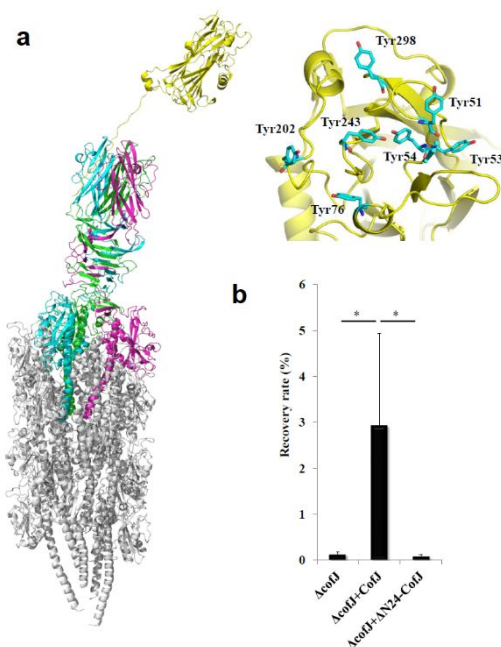


図 2 CofJ が先端に結合した CFA/III の線毛モデル (a) 及び CFA/III 産生大腸菌株を用いた細胞付着アッセイの結果 (b)。

物からなるリポソーム (Brain polar lipid liposome: BPL) との共沈実験において相互作用が確認され、また、透過型電子顕微鏡 (TEM) 撮影により、CofJ の濃度依存的に BPL の表面構造の変化が生じることから (図 3)、芳香族アミノ酸クラスターが脂質二重膜に挿入されることで、標的膜に結合していることが考えられた。

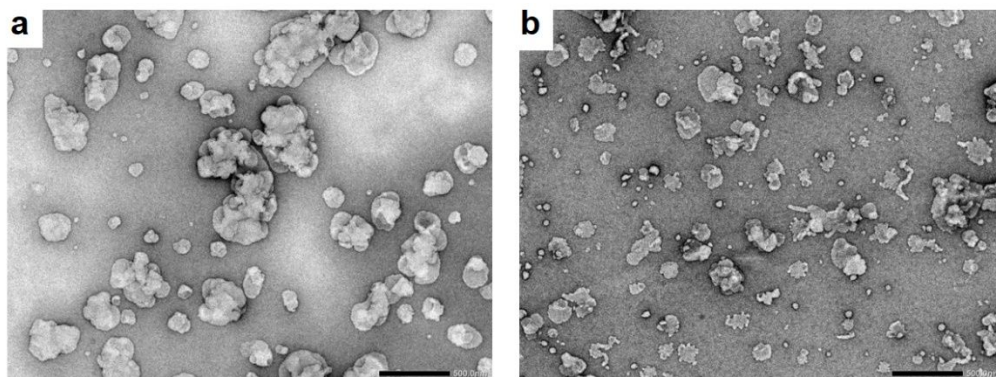


図 3 BPL の TEM 画像 (a) および BPL に対して脂質とタンパク質の濃度比が 1200 対 1 になるように CofJ を加えて撮影した TEM 画像 (b) .

以上の一連の結果から、ETEC の感染過程において、分泌タンパク質が IV 型線毛と宿主腸管上皮を橋渡すことで、付着と定着に関与することが示唆された。腸管への付着と定着は、腸管系病原菌の感染において最も重要な過程であるため、本研究で得られた知見は、今後、定着阻害剤を含む薬剤開発に向けた情報基盤となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 河原一樹、沖大也、中村昇太	4. 巻 62
2. 論文標題 抗付着剤開発に向けた細菌線毛の立体構造解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本結晶学会誌	6. 最初と最後の頁 139-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5940/jcrsj.62.139	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 Kawahara Kazuki, Oki Hiroya, Nakamura Shota	4. 巻 2019
2. 論文標題 Structural basis of type IVb pilus-mediated bacterial adhesion to the intestinal epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA Research Frontiers 2018	6. 最初と最後の頁 9-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Maruno Takahiro, Imai Tomoya, Muroga Yuki, Fukakusa Shunsuke, Iwashita Takaki, Kobayashi Yuji, Matsuda Shigeaki, Kodama Toshio, Iida Tetsuya, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Nakamura Shota	4. 巻 115
2. 論文標題 Interplay of a secreted protein with type IVb pilus for efficient enterotoxigenic Escherichia colicolonization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7422 ~ 7427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1805671115	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 Zheng Yang, Shimamoto Shigeru, Maruno Takahiro, Kobayashi Yuji, Matsuura Yoshiharu, Kawahara Kazuki, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu	4. 巻 509
2. 論文標題 N-terminal HCV core protein fragment decreases 20S proteasome activity in the presence of PA28	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 590 ~ 595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.12.167	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 Suka Asako, Oki Hiroya, Kato Yuki, Kawahara Kazuki, Ohkubo Tadayasu, Maruno Takahiro, Kobayashi Yuji, Fujii Sotaro, Wakai Satoshi, Lisdiana Lisa, Sambongi Yoshihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Stability of cytochromes c from psychrophilic and piezophilic Shewanella species: implications for complex multiple adaptation to low temperature and high hydrostatic pressure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Extremophiles	6. 最初と最後の頁 239 - 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00792-019-01077-9	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 上田賢吾, 余野木伸哉, 木本成美, 河原一樹, 沖大也, 元岡大祐, 松田重輝, 吉田卓也, 大久保忠恭, 中村昇太, 飯田哲也
2. 発表標題 二成分毒素遺伝子bec 保有ウェルシュ菌の遺伝学的解析
3. 学会等名 第73回細菌学会関西支部総会
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 沖大也, 河原一樹, 丸野孝浩, 今井友也, 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 腸管毒素原性大腸菌が形成するIV型線毛と分泌タンパク質を介した腸管付着機構
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 Ueda Kengo, Kawahara Kazuki, Yonogi Shinya, Oki Hiroya, Matsuda Shigeaki, Kodama Toshio, Iida Tetsuya, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Nakamura Shota
2. 発表標題 Structural analysis of the ADP-ribosylating component of binary enterotoxin of Clostridium perfringens
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Maruno Takahiro, Imai Tomoya, Muroga Yuki, Fukakusa Shunsuke, Iwashita Takaki, Kobayashi Yuji, Matsuda Shigeaki, Kodama Toshio, Iida Tetsuya, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Nakamura Shota
2. 発表標題 Structural basis of a secreted protein recognition by type IVb pilus of enterotoxigenic Escherichia coli
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田明弘, 河原一樹, 沖大也, 室賀優希, 井本裕佳, 大嶋恵子, 折田将輝, 深草俊輔, 飯田哲也, 吉田卓也, 大久保忠恭, 中村昇太
2. 発表標題 腸管系病原菌の定着を制御する分泌タンパク質の立体構造解析
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2019)
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
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 吉田明弘, 河原一樹, 沖大也, 室賀優希, 井本裕佳, 大嶋恵子, 折田将輝, 深草俊輔, 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 腸管系病原菌の定着に関わる分泌タンパク質とIV型線毛の相互作用
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 井本裕佳, 沖大也, 河原一樹, 今井友也, 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 分泌タンパク質の脂質認識を介した腸管毒素原性大腸菌の腸管定着
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okii Hiroya, Kawahara Kazuki, Maruno Takahiro, Imai Tomoya, Muroga Yuki, Fukakusa Shunsuke, Iwashita Takaki, Kobayashi Yuji, Matsuda Shigeaki, Kodama Toshio, iida Tetsuya, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, and Nakamura Shota
2. 発表標題 The Interplay of secreted protein CofJ with type IVb pilus for an efficient human enterotoxigenic Escherichia coli colonization
3. 学会等名 ASM Microbe 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖大也, 河原一樹, 丸野孝浩, 今井友也, 室賀優希, 深草俊輔, 岩下丘樹, 小林祐次, 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 腸管毒素原性大腸菌の分泌タンパク質を介したIV型線毛による腸管付着機構
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関夏未、丸野孝浩、沖大也、松村久美子、望月雅允、西内祐二、河原一樹、吉田卓也、大久保忠恭、小林祐次
2. 発表標題 LAIRファミリーのIII型コラーゲン認識機構の解明
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖大也、河原一樹、丸野孝浩、今井友也、室賀優希、深草俊輔、小林祐次、松田重輝、児五年央、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌のIV型線毛と分泌タンパク質を介した付着機構
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原一樹、沖大也、丸野孝浩、今井友也、室賀優希、深草俊輔、小林祐次、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌由来IV型線毛と分泌タンパク質複合体の構造
3. 学会等名 日本結晶学会平成30年度年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 室賀優希、沖大也、河原一樹、丸野孝浩、今井友也、深草俊輔、小林祐次、松田重輝、児五年央、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌のIV型線毛と分泌タンパク質を介した腸管付着メカニズム
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野 http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b001/
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------