

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570121

研究課題名（和文）モノADPリボシル化毒素と基質蛋白質複合体の結晶構造および反応機構の基盤解析

研究課題名（英文）Structural and functional basis of the complex of mono-ADP-ribosylating toxin and substrate protein

研究代表者

津下 英明 (TSUGE HIDEAKI)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：40299342

研究成果の概要（和文）：

ウェルシュ菌ADPリボシル化Iota毒素(Ia)とアクチン複合体の構造と機能を明らかにする目的で、apo-Ia-actin複合体、apo-Iaの結晶構造を明らかにした。これにより、一連のADPリボシル化反応に伴う構造変化を明らかにした。

ボツリヌス菌C3毒素は、低分子量GタンパクであるRhoAのAsn41をADPリボシル化する。C3毒素とその標的のタンパクであるRhoAの複合体の結晶構造解析を目的としてそれぞれタンパクの大量発現を行い、複合体での安定する結晶化条件の探索を行っている。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the structural and functional mechanism of *C. perfringens* iota toxin (Ia) and actin, we successfully crystallized and solved the structure of the apo-Ia-actin and apo-Ia. We revealed the structural change upon the ADP-ribosylation by comparing the structures together with NADH-Ia and  $\beta$ TAD-Ia-actin complex.

*C. Botulinum* C3 toxin ADP-ribosylates RhoA Asn41. For the structure analysis of C3-RhoA complex, RhoA was expressed in *E. coli* and the stable mutant of RhoAF25N was obtained using His-tag and GST-tag, independently. We are currently searching the crystallization condition for the complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：C3, RhoA, Ia, アクチン、モノADPリボシル化、結晶構造解析、特異性

## 1. 研究開始当初の背景

様々な病原微生物はADPリボシル化毒素(ADPRT)を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与

える。アクチン特異的ADPRT (*C. perfringens* のiota毒素Iaや*C. botulinum*のC2I)はアクチンのArg177をADPリボシル化し、その重合を妨げて、細胞骨格形成を阻害する。Ia

の結晶構造解析 (Tsuge et al. JMB, 2003) を含めて多くのグループが、いくつかのタイプの ADPRT の構造を明らかにしてきたが、そのアクチンとの複合体の構造は全くわかっていなかった。我々は 2008 年に Ia- $\beta$ TAD-アクチン複合体構造を明らかにした (Tsuge et al. PNAS 2008)。これにより ADP リボシル化反応を理解する分子基盤が得られた。

## 2. 研究の目的

ADP リボシル化毒素と基質タンパク質の特異的認識機構とその反応機構を知る事は、阻害剤の設計から創薬につながる。また C3 毒素が RhoA 下流のシグナル伝達を知る道具として使われてきたように、新たな特異的な ADP リボシル化酵素のデザインが可能になれば、その反応の生化学への応用につながると考えている。ADP リボシル化毒素はその基質特異性によりいくつかに分類できるが、特にアクチン特異的な毒素と RhoA 特異的な毒素ではその構造は非常に似ていてその反応機構も同じであると推測される。

この研究の目的は以下の 2 つである。

- (1) アクチン特異的な ADP リボシル化毒素の一連の構造解析から ADP リボシル化の普遍的な反応機構と基質特異性を明らかにする。
- (2) 異なる基質 small GTPase である RhoA を認識して ADP リボシル化する、*C. botulinum* の C3 毒素と RhoA 複合体の構造解析を進める。

## 3. 研究の方法

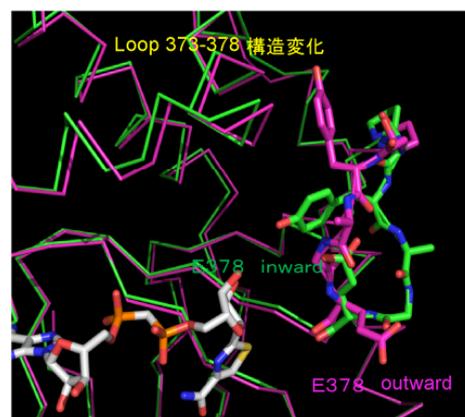
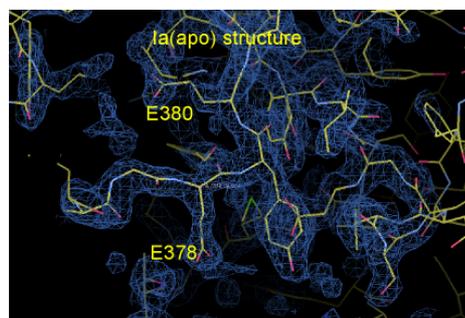
X 線結晶構造解析を複合体研究の主たる研究手段とする。インハウスの回折装置として徳島文理大学・健康科学研究所の FRE/RAXISVII および現所属・京都産業大学・総合生命科学部の RA-Micro7HF/RAXISVII を使用し、より高分解能のデータは高エネルギー物理学研究所のビームラインでの測定を行った。

## 4. 研究成果

(1) ADP リボシル化毒素と基質タンパク質複合体の結晶構造は 2008 年に我々が  $\beta$ TAD-Ia-actin 構造を発表したが、知る限り、現在もまだこのクラスで唯一の PDB 登録構造である (他のサブクラスで EF2 のヒスタミドを ADP リボシル化する Exotoxin の複合体構造はカナダのグループにより明らかにされている)。多くの研究者は毒素単体での構造研究を行っていることから、この複合体結晶はさらに様々な知見を生むと考えた。この系を用いて新たに NAD や  $\beta$ TAD を含まない、apo-Ia-actin 複合体で結晶が得られ 2.7 Å の結晶構造を明らかにした。また 2.0 Å で

apo-Ia の結晶構造が得られた。既に我々が構造を得ている NADH-Ia,  $\beta$ TAD-Ia-actin と合わせて詳細に構造変化検討することにより、一連の ADP リボシル化反応に伴う構造変化を明らかにした。

①Ia の EXE (378-380) loop は (1) オキソカルベニウムカチオン産生と (2) ADP リボースの転移に重要なモチーフである。Glu380 は特に ADP リボシル化反応の最初の段階、オキソカルベニウムカチオン産生に重要であるが、今までの結晶構造解析より N リボースの 2' OH と相互作用している事がわかっていた。一方 Glu378 は ADP リボースの転移に重要であるが、その役割はまだ良くわかっていない。今までの構造解析で、その側鎖は NAD 側 (In) に向いている事がわかっていた。今回 apo の Ia および apo-Ia-actin 複合体構造で、Glu380 の側鎖の構造に変化はないが、Glu378 はアクチン側 (out) を向いて異なっていた。この Glu378 の 2 つのコンフォメーションは NAD 側 (In) でオキソカルベニウムカチオン産生に働き、アクチン側 (out) で ADP リボースの転移に重要な働きをすると解釈できる。他のグループにより、Glu378 はアクチンの修飾アミノ酸 Arg177 の脱プロトン化に重要であると提唱されているが、現在の複合体での結晶構造解析では、アクチン側 (out) を向いても Arg177 には直接相互作用する距離にない事がわかった。今後、修飾アミノ酸 Arg の特異性がいかに生み出されているかにさらに研究が必要である。



②一連の結晶構造解析から、 $\beta$ TAD-Ia-actin構造のみアクティブサイトに続くヘリックスが動く事がわかってきた。ADP リボシル化酵素で一般に、反応遷移状態で、このヘリックスの動きがオキシカルベニウムカチオンの生成に重要であると考えられる。

(2)C3-RhoA複合体の結晶構造解析を目的として基質RhoAの大量発現を試みた。この結果、RhoAの安定化したF25Nの大量発現に成功し、C3毒素による活性化が見られた。HisタグおよびGSTタグでの発現し、精製をそれぞれ行い、複合体での安定する結晶化条件の探索を行っている。

#### 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 12 件)

(1) Imagawa T, Tsurumura T, Sugimoto Y, Aki K, Ishidoh K, Kuramitsu S, Tsuge H. : Structural basis of the free reduced flavin generation by flavin reductase from *Thermus thermophilus* HB8.

*J Biol Chem.* **286**(51):44078-85. (2011)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052907> 査読有

(2) Ohtomo H, Konuma T, Utsunomiya H, Tsuge H., Ikeguchi M. : Structure and stability of Gyuba,  $\beta$ -lactoglobulin chimera.

*Protein Sci.* **20**(11):1867-75. (2011)  
doi: 10.1002/pro.720. 査読有

(3) Yoshida T, Tsuge H., Konno H, Hisabori T, Sugano Y. : The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue.

*FEBS J.* **278**(13):2387-94. (2011)  
doi: 10.1111/j. 査読有

(4) Watanabe T, Tsuge H., Imagawa T, Kise D, Hirano K, Beppu M, Takahashi A, Yamaguchi K, Fujiki H, Suganuma M. : Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor- $\alpha$  inducing protein: a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*.

*J Cancer Res Clin Oncol.* **136**(6):911-21. (2010)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20049476> 査読有

(5) Kobayashi H, Tateishi A, Tsuge H., Takahashi E, Okamoto K, Yamanaka H. : The carboxy-terminal tail of *Aeromonas sobria* Serine Protease is associated with the chaperone.

*Microbiol Immunol.* **53**(12):647-57. (2009)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19954452> 査読有

(6) Kobayashi H, Utsunomiya H, Yamanaka H, Sei Y, Katunuma N, Okamoto K, Tsuge H. : Structural basis for the kexin-like serine protease from *Aeromonas sobria* as sepsis-causing factor.

*J Biol Chem.* **284**(40):27655-63. (2009)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19954452> 査読有

(7) Tsuge H., Tsurumura T, Utsunomiya H, Kise D, Kuzuhara T, Watanabe T, Fujiki H, Suganuma M. : Structural basis for the *Helicobacter pylori*-carcinogenic TNF- $\alpha$ -inducing protein.

*Biochem Biophys Res Commun.* **388**(2):193-8. (2009)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19643085> 査読有

(8) Kawakami R, Sakuraba H, Goda S, Tsuge H., Ohshima T. :

Refolding, characterization and crystal structure of (S)-malate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*.

*Biochim Biophys Acta.* **1794**(10):1496-504. (2009)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19555779> 査読有

(9) Kuzuhara T, Kise D, Yoshida H, Horita T, Murazaki Y, Utsunomiya H, Tsuge H. : Crystallization and X-ray diffraction analysis of the RNA

primer/promoter-binding domain of influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase PB2.

*Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **65**(Pt 2):144-6. (2009)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194006> 査読有

(10) Kuzuhara T, Kise D, Yoshida H, Horita T, Murazaki Y, Nishimura A, Echigo N, Utsunomiya H, Tsuge H. : Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the

pathogenicity-determinant lysine 627 residue.

*J Biol Chem.* **284**(11):6855-60. (2009)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144639> 査読有

(11) Tsukamoto S, Yamashita T, Yamada Y, Fujiwara K, Maki K, Kuwajima K, Matsumura Y, Kihara H, Tsuge H, Ikeguchi M.: Non-native alpha-helix formation is not necessary for folding of lipocalin: comparison of burst-phase folding between tear lipocalin and beta-lactoglobulin.

*Proteins.* **76**(1):226-36. Erratum in: *Proteins.* (2009)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137619> 査読有

(12) Nakaishi Y, Bando M, Shimizu H, Watanabe K, Goto F, Tsuge H, Kondo K, Komatsu M.: Structural analysis of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase, a key regulator in type 2 diabetes.

*FEBS Lett.* **583**(1):163-7. (2009)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059404> 査読有

[学会発表] (計 10 件)

(1) 津下英明 ADP リボシル化反応に伴う酵素の構造変化  
ビタミンB研究協議会, 京都国際交流会館,  
2012. 2. 4

(2) 津下英明: ADP リボシル化毒素構造研究の最前線  
シンポジウム「疾患治療に用いる天然有機化合物の生合成遺伝子の包括的理解」徳島文理大学、2011. 12. 22

(3) 津下英明: アクチン ADP リボシル化の構造基盤  
シンポジウム「ADP リボシル化によるシグナル伝達制御」  
生化学会、京都国際会館、2011. 9. 21

(4) 津下英明: 感染症因子とヒトタンパク質の相互作用を見る:  
X線の会、阪急グランドビル 26 階、2011. 9. 10

(5) Tsurumura T., Tsuge H. Structural basis for the Helicobacter pylori-carcinogenic TNF-alpha-inducing protein  
国際結晶学会 Madrid, 2011. 8. 25-26

(6) Tsurumura T., Tsuge H. Crystal structure of Ia-Actin complex with novel

ligand 国際結晶学会 Madrid,

2011. 8. 25-26

(7) 鶴村俊治、津下英明 ADP リボシル化毒素によるアクチン認識の特異性解析 日本蛋白質科学会、大阪府吹田市、2011. 6. 7-9

(8) 今川貴仁、津下英明: 高度好熱菌 HB8 由来のフラビン還元酵素の構造機能解析  
ビタミンB研究委員会 第422回研究協議会  
京都市、2010. 11. 27

(9) 津下英明: モノ ADP リボシル化毒素とその標的タンパク質アクチンとの複合体の X 線結晶構造解析: 国立がんセンター研究所、2010, 2. 22

(10) 津下英明: 細菌およびウイルス感染症の構造生物学  
第4回学術フロンティアシンポジウム「X線結晶構造解析と質量分析による生理活性蛋白質の構造機能相関の研究」徳島文理大学、2010. 1. 30

[その他]

ホームページ等

[http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~tsuge/Home\\_Japanese.html](http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~tsuge/Home_Japanese.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津下 英明 (TSUGE HIDEAKI)  
京都産業大学・総合生命科学部・教授  
研究者番号: 40299342

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

櫻井 純 (SAKURAI JUN)  
徳島文理大学・薬学部・教授  
(H21 年度末まで)  
研究者番号: 80029800

永浜 政博 (NAGAHAMA MASAHIRO)  
研究者番号: 40164462  
徳島文理大学・薬学部・教授

小田 真隆 (ODA MASATAKA)  
徳島文理大学・薬学部・講師  
研究者番号: 00412403

(4)研究協力者

鶴村 俊治 (TSURUMURA TOSHIHARU)

京都産業大学・総合生命科学部・

プロジェクト助教

研究者番号：50450250