

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790418

研究課題名 (和文) ウエルシュ菌エンテロトキシンのクローディンへの結合様式の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudin

研究代表者

戸嶋 ひろ野 (TOSHIMA HIRONO)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：10400532

研究成果の概要 (和文)：

本研究は、食中毒の原因となるウエルシュ菌エンテロトキシン(CPE)と、その受容体であるクローディン(Cldn)の認識結合機構を解析し、本毒素の細胞膜傷害機構を明らかにすることを目的とした。その結果、CPE感受性 Cldn の第二細胞外ループの C 末端側 12 アミノ酸領域が、CPE と結合するために必要な最小領域であることと、この領域と CPE との間の静電的引力が両者の相互作用に重要であることを明らかにした。さらに、CPE 全分子の結晶構造解析に成功し、 β 型孔形成毒素の構造学的特徴を見出すことができた。

研究成果の概要 (英文)：

Clostridium perfringens enterotoxin (CPE), a causative agent of food poisoning, is a pore-forming toxin. Claudin, a component of tight junctions, is a tetra-transmembrane protein and constitutes a large family of more than 20 members, not all of which serve as the receptor for CPE. The mechanism by which the toxin distinguishes the sensitive claudins is unknown. In this study, we localized the region of claudin responsible for interaction with CPE to the C-terminal 12 amino acids of the second extracellular loop and found that an electrostatic attraction between the basic claudin region and the acidic CPE cleft is involved in their interaction. Furthermore, we present the structure of CPE determined by X-ray crystallography at 2.0 Å. These structural features imply that CPE is a β pore-forming toxin.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：細菌毒素、ウエルシュ菌、クローディン

1. 研究開始当初の背景

ウエルシュ菌は仕出し弁当や給食など大量調理・大量供給された食品の喫食が原因で

生じる食中毒の主要な原因菌として知られている。本菌は芽胞形成性グラム陽性嫌気性菌で、食品とともに摂取された生菌が腸管内

で芽胞形成する際にタンパク毒素であるウエルシュ菌エンテロトキシン(Clostridium perfringens enterotoxin, CPE)を産生する。CPEは膜孔形成毒素であり、腸管上皮細胞の細胞膜に傷害を起こして細胞を死に至らしめる。これが食中毒時の下痢や腹痛の原因となると考えられている。

本毒素の受容体として、申請者らの研究室ではこれまでにタイトジャンクションを構成する4回膜貫通型タンパク質のクローディン(Cldn)を同定した。Cldnは24種類の亜分子から成る大きなファミリーを構成していること、生体内でそれぞれ種々の組織に異なる組み合わせで分布し、それぞれに特有の分子選択性を伴った細胞間バリア(タイトジャンクション)を形成することが知られている。これら24種類のCldnの中で、CPEの受容体として機能するのはその一部である。基本的に相同性の高いCldnファミリー分子を、CPEがどのように識別して受容体となるCldnだけに結合することができるのか、そのメカニズムや結合様式は明らかではない。また、CPEは古くから膜孔形成毒素と考えられているが、それを示す直接的な証拠はこれまで得られておらず、CPEの細胞膜傷害機構の詳細は不明である。

CPEのCldn認識領域断片(C-CPE)の結合によって細胞表面上ではタイトジャンクションストランドが消失して細胞間バリア機能が消失するという現象が明らかになっている。このことは、粘膜上皮(すなわち体外)から体内への高分子の薬物輸送にC-CPEが利用できる可能性を示している。CPEがタイトジャンクションを構成するCldn分子を選択的に認識することから、C-CPEとCldnの結合様式を解明し、アミノ酸配列の改変によって本来CPEに結合しない型のCldnにも選択的に結合できるC-CPEを作製することができれば、任意の組織の細胞間バリアを開口させてそこの薬物輸送を可能にすることができる。このように、タイトジャンクションを破壊する送薬システムとしてCPEの利用が報告されているなか、CPEのCldn認識結合機構の解明が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食中毒の原因となるCPEとその特異的受容体であるCldnの認識結合機構を解析することにある。Cldnの認識結合機構を解析することで細胞膜傷害毒素に関する新たな知見を提供するだけでなく、

Cldn選択性の詳細を明らかにすることでCPEによる毒素性中毒症の発症機序の理解に貢献できるものとする。さらに、標的組織選択的な薬物輸送を可能にするC-CPE製剤の将来的な開発のための情報を収集する。このような目的のために、本研究では(1)CPEとCldnの結合の必須要件の解析と(2)CPE-Cldn複合体の立体構造の解析を行う。

(1) CPEがCldnに結合するためには4回膜貫通型タンパクであるCldnの第2細胞外ループ(ループ2)が重要であることを申請者らのグループは明らかにしているが、さらに、ループ2を構成するどのアミノ酸がCPEとの結合に必須であるのか、その最小領域をアミノ酸単位で決定する。

(2) CPE-Cldn複合体の立体構造を解明するためには、まずそれぞれの分子の立体構造を解析することが必要となる。そこで各分子を結晶化し、X線回折像から立体構造の解明を行う。

最終的には(1)と(2)の結果を総合して、CPEのCldnへの認識および結合様式の解明とそれに続くCPE分子の構造変化を解き、本毒素の細胞膜傷害機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) CPEと結合するCldnの最小領域の決定

当研究室では既に、Cldnファミリーの中でCldn4とCldn7がCPEの受容体として機能すること、一方、Cldn5が受容体として機能しないことを、これらを発現する細胞を用いた感受性試験によって明らかにしている。そこで、CPE感受性受容体としてCldn4あるいはCldn7、CPE非感受性受容体としてCldn5を選択し、ループ2を構成するアミノ酸を任意に入れ替えた種々のキメラタンパクを作製した。このタンパクを、CPE受容体を持たないL929細胞に発現させてCPE感受性を測定することで、CPEとの結合に必要なCldnの最小領域と必須アミノ酸残基の決定を行った。

(2) CPEの立体構造の解析

CPEとCldnとの複合体について立体構造を明らかにするという最終目的のために、本研究ではCPE全分子単独での精製および高分解能解析が可能な結晶の作製を行った。全長のCPEをC末端及びN末端にHisタグを付加した組換えタンパクとして大腸菌で大量培養し、ニッケルアフィニティーカラムを用いて精製した。この精製標品について結晶化スクリーニングキットを用いて最適な結晶

化条件の検討を行い、常法により結晶化を行った。

得られた結晶は、大型放射光施設 SPring-8 のシンクロトロン放射光を利用して、高分解能の X 線解析データ収集を行った。同時に重電子誘導体結晶を用いてデータ測定をし、重原子同型装置置換法および多波長異常分散法で位相決定を行い、得られた電子密度を基に立体構造を決定した。

4. 研究成果

(1) Cldn の CPE 感受性を決定する領域を決定した

CPE 感受性とは感受性の Cldn1 との種々のキメラ Cldn を作製し、HEK293 細胞に発現させて細胞の CPE 感受性を検討した結果、Cldn4 の Asp149 から Met160 までの 12 アミノ酸残基の領域が、CPE に対する Cldn の感受性に影響を与えることがわかった。この領域を CPE と結合する Cldn の最小領域として、CPE-sensitivity related region, (CPE-SR) と名付けた。

種々の Cldn について CPE 感受性を調べたところ、細胞に発現させた場合に CPE に高感受性 ($EC_{50} < 1 \mu g/ml$) を付与するもの、低感受性 ($1 \mu g/ml \leq EC_{50} < 30 \mu g/ml$) を付与するもの、感受性を与えない耐性 ($30 \mu g/ml \leq EC_{50}$) の Cldn の、3 種に Cldn を大別することができた (表 1)。

表 1
種々の Cldn 発現細胞の CPE 感受性と、発現 Cldn の CPE-SR の等電点

Claudin	Sequence	pI	EC ₅₀
High sensitive			
CPE-SR			
ms Cldn4	NVIRDFYNPMVASGQKREMGAS	9.70	0.21
hu Cldn4	NLIQDFYNPLVASGQKREMGAS	9.70	0.083
ms Cldn3	TIIRDFYNPLVPEAQKREMGAG	6.53	0.20
ms Cldn7	QIVTDFYNPLTPMNVKYEFGPA	6.40	0.53
ms Cldn8	SIIRDFYNPLVDVALKRELGEA	6.49	0.69
Low sensitive			
ms Cldn14	DVVQNFYNPLLPSPGMKFEIGQA	6.41	4.7
ms Cldn2	GILRDFYSPLVPDSMKFEIGEA	4.18	4.4
ms Cldn1	GIVQEFYDPLTPINARIEFGQA	4.18	12
hu Cldn1	RIVQEFYDPMTPVNARIEFGQA	4.18	2.9
Insensitive			
ms Cldn5	IVVREFYDPTVPVSQKYELGAA	4.18	>30
hu Cldn5	IVVREFYDPSVPVSQKYELGAA	4.18	>30
ms Cldn10	KITTEFFDP-LYMEQKYELGAA	3.93	>30
hu Cldn10	KITTEFFDP-LFVEQKYELGAA	3.93	>30

CPE に感受性の認められないグループに分類される Cldn5 と感受性の Cldn4 あるいは Cldn7 を用いて、CPE-SR が他種の Cldn においても CPE 感受性を付与するかどうか検討した。その結果、耐性の Cldn5 の CPE-SR を Cldn4 あるいは Cldn7 の CPE-SR と入れ替えた場合 (Cldn 5-4-5, Cldn 5-7-5)、そのキメラは感受性となり、Cldn4 あるいは

Cldn7 の CPE-SR を Cldn5 のものと入れ替えた Cldn 4-5-4 および Cldn7-5-7 は非感受性となることがわかった。また、Cldn5-4-5 を発現する細胞には CPE は結合し、Cldn4-5-4 を発現する細胞には結合しないことを確認した。結合実験結果のスキッチャードプロット解析より算出された Cldn5-4-5 発現細胞の CPE 結合の Kd 値 ($1.91 \times 10^{-8} M$) は、これまでに報告された Cldn と CPE との結合の Kd 値の範囲内にあった。

CPE-SR が Cldn に CPE 感受性を付与することがわかったので、CPE-SR のどのような性状が CPE との相互作用に重要なのか知るために、種々の Cldn の CPE-SR のアミノ酸配列を比較したが、高感受性 Cldn、低感受性 Cldn、非感受性 Cldn のグループのいずれにおいても共通するモチーフやアミノ酸残基は認められなかった。さらに疎水性や荷電状態などを検討したところ、高感受性 Cldn の CPE-SR の計算 pI が、低感受性 Cldn や非感受性 Cldn の pI に比べて高い傾向にあることを見いだした。(表 1)

そこで、CPE 高感受性の Cldn4 の CPE-SR の pI (9.70) と非感受性である Cldn5 の CPE-SR の pI (4.18) を逆転させるべく、CPE-SR 内の 2 つのアミノ酸を相互に入れ替えた変異 Cldn、Cldn 5 DYNR と Cldn4NRDY を作製し、L929 細胞に発現させて CPE 感受性を調べた。その結果、CPE-SR の pI を Cldn4 型に高めた Cldn5DYNR は CPE に感受性になり、CPE-SR の pI を Cldn5 型に低めた Cldn4NRDY の感受性は、もとの Cldn4 に比べて 100 倍程度減弱した。それぞれの CPE の結合状態を調べたところ、Cldn5DYNR 発現細胞には CPE が結合し、Cldn4NRDY 発現細胞では CPE の結合が検出限界以下になっていることがわかった。

以上の結果から、Cldn の第二細胞外ループの 12 アミノ酸残基から成る CPE-SR の荷電状態が、CPE に対する Cldn の感受性を決める、少なくともひとつの要因であることがわかった (表 1)。CPE-SR の等電点が高ければ CPE 感受性が上昇し、低ければ感受性が低下する。

一方、CPE から見ると、CPE の C 末端側の 30 アミノ酸残基 (Cpe30) の領域が Cldn との相互作用に関与していることが示されている。この領域を含めた CPE 断片の立体構造がすでに明らかにされていたので、その情報を元に CPE 断片の分子表面モデルの荷電分布を調べた (図 1)。Cpe30 領域は立体構造上、分子相互作用に関わると見られるク

レフト構造を形成している。クレフト領域に存在する Tyr306, Tyr310, Tyr312 および Leu315 が Cldn との結合に重要であることが報告されていることから、このクレフトが Cldn との相互作用に重要であると推察できる。そのクレフトの分子表面は正に荷電していることがこの分子モデルからわかった。このことと、CPE-SR が負に荷電している場合、Cldn が CPE 感受性になることを考え合わせると、CPE と Cldn との相互作用には CPE のクレフトと Cldn の CPE-SR の静電的引力が重要である可能性が考えられた。

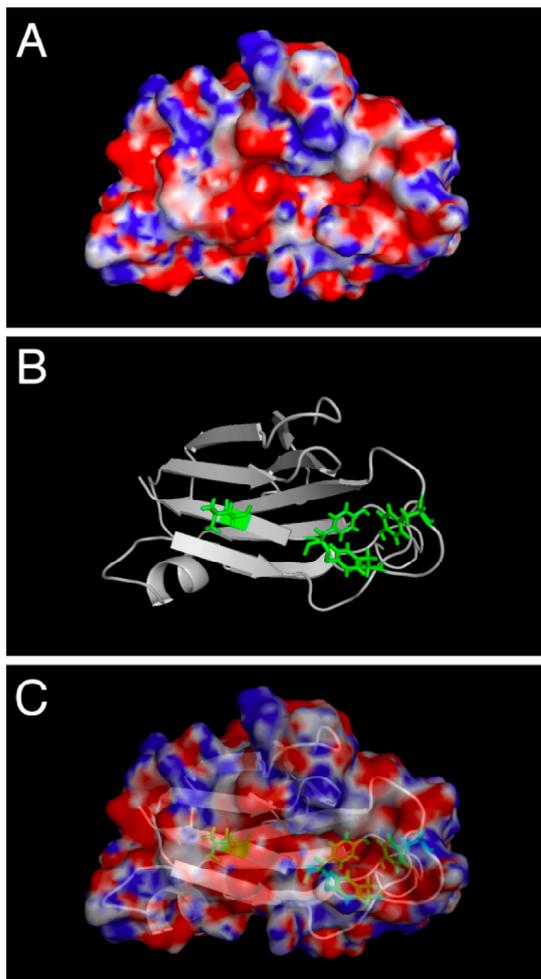


図 1 : CPE の Cldn 結合領域の立体構造。A: 分子表面の荷電分布モデル。円内は Cpe30 によって構成されるクレフト領域を示す。B: 同リボン構造モデル。緑色は Tyr306, Tyr310, Tyr312, Leu315 を示す。C: 荷電分布モデルとリボン構造モデルの重ね合わせイメージ。

(2) 種々の条件で作製した CPE の結晶から、最高 2.0Å の分解能の X 線回折データ

を得ることができた。その解析の結果、CPE は 95 x 42 x 32Å の伸展した分子構造をとり、3 種のドメインから構成されていることがわかった (図 2)。CPE の全長の構造については他の報告がなく、我々が初めてその構造を明らかにした。ドメイン I はこれまで C-CPE と呼ばれていた受容体結合ドメインで、ドメイン II および III は β ストランドが密接してひとつのモジュール構造をとっていた。3 種のドメインの位置関係やドメイン II と III の構造はアエロリジンやウエルシュ菌 ϵ 毒素などと類似した。先述のモジュール構造には長い 2 本のアンチパラレル β ストランドが存在し、これに垂下するように存在する α ヘリックスとそれに隣接する β ストランドは疎水性アミノ酸が 1 残基ごとに分布するアミノ酸配列様式を示した。以上の構造的特徴と、既報の孔形成毒素の解析結果とを併せて、CPE が β 型孔形成毒素に分類されることが考えられた。さらに CPE による膜貫通セグメントの形成メカニズムも推定することができた。

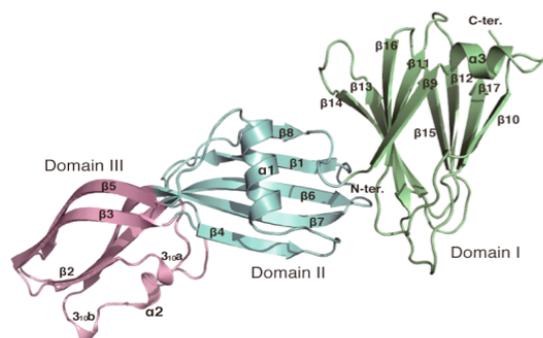


図 2 : CPE 全分子の立体構造。3 種のドメインから構成されている。

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 2 件)

- ① Kengo Kitadokoro, Kousuke Nishimura, Shigeki Kamitani, Aya Fukui-Miyazaki, Hirono Toshima, Hiroyuki Abe, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi, Shigeki Yamamoto, Hajime Karatani, and Yasuhiko Horiguchi, Crystal structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of β -pore-forming toxins. *J Biol Chem* doi:10.1074/jbc.M111/228478, 2011, 査読有り

②Jun Kimura, Hiroyuki Abe, Shigeki Kamitani, Hirono Toshima, Aya Fukui, Masami Miyake, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi, Shigeki Yamamoto , and Yasuhiko Horiguchi, *Clostridium perfringens* Enterotoxin Interacts with Claudins via Electrostatic Attraction.
J Biol Chem
VOL.285,NO.1,pp.401-408,2010, 査読有り

[その他]

本研究で明らかにした CPE 全分子の X 線結晶構造は蛋白質構造データベースに登録されている。

<http://www.pdb.org>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸嶋 ひろ野 (TOSHIMA HIRONO)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：10400532