

令和 7 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H02557・23K23821

研究課題名（和文）クライオ電顕を用いた時分割構造解析による破傷風毒素の膜侵入機構解明

研究課題名（英文）Time-resolved structural analysis of tetanus toxin by Cryo-EM to elucidate the mechanism of membrane penetration

研究代表者

井上 豪（Inoue, Tsuyoshi）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20263204

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：破傷風毒素（TeNT）は中枢神経系に特異的に作用する強力な神経毒であり、その活性化機構の解明が求められている。本研究では、膜透過に際してTeNTが還元状態へ移行し、S-S結合の乖離に伴う膜通過時の構造変化に着目し、クライオ電顕による解析を試みた。膜上での構造は多様であったものの、対応するサンプル調製技術と観察条件の蓄積が進み、今後の高分解能解析での解析に繋がる成果を得た。一方、蛍光変異体による可視化系の構築や、抗体複合体の解析により、TeNT活性化の抑制機構の一端を明らかにした。これらは、TeNTの中枢神経特異的活性化機構解明のみならず、中和抗体の開発に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

破傷風毒素（TeNT）は中枢神経特異的に作用する強力な神経毒である。本研究では、S-S結合の乖離を伴う膜透過時の構造変化に注目し、クライオ電顕での解析を進めた。膜上構造の多様性に対応する技術的基盤を整備し、今後の高分解能解析に繋がる成果を得た。さらに、蛍光変異体による局在可視化系の構築や、抗体複合体解析により活性化阻害機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Tetanus toxin (TeNT) is a potent neurotoxin that selectively targets the central nervous system, and elucidating its activation mechanism remains an important challenge. This study focused on the structural changes during membrane translocation, particularly the transition to a reduced state and the dissociation of disulfide bonds, and employed cryo-electron microscopy (cryo-EM) for analysis. Although the membrane-associated structures were diverse, the accumulation of sample preparation techniques and imaging conditions led to promising groundwork for future high-resolution studies. In parallel, the development of a visualization system using fluorescently labeled mutants and analysis of antibody-toxin complexes revealed part of the mechanism by which TeNT activation is suppressed. These findings are expected to contribute not only to the understanding of the CNS-specific activation mechanism of TeNT, but also to the development of effective neutralizing antibodies.

研究分野：構造生物学

キーワード：破傷風毒素 クライオ電顕 ダイナミクス 抗体複合体 時分割解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

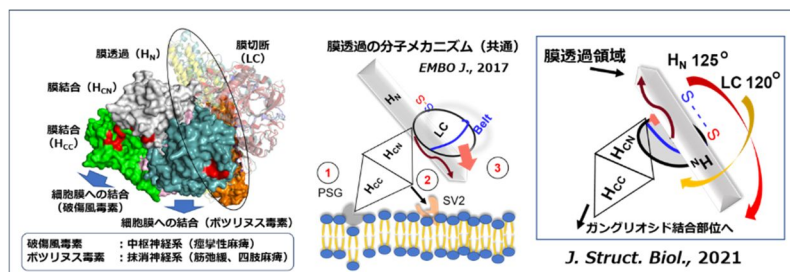
1. 研究開始当初の背景

破傷風毒素 (TeNT) はごく微量で致死的な作用を示す最強クラスの神経毒であり、ボツリヌス毒素と同様に Clostridium 属に由来するが、中枢神経系に特異的に作用する点で異なる。この特異性の分子機構は未解明であり、特に細胞膜透過の際の酸化還元状態の変化や構造再編成が鍵を握ると考えられていた。

破傷風毒素 (TeNT) が中枢神経系の細胞でのみ作用する膜透過の分子機構について還元状態から S-S 結合の形成に伴って膜透過ドメイン(Hn) が回転し、TeNT が活性型に変化する様子について、クライオ電顕を用いた低温トラップ法による時分割構造解析によって明らかとすることを目的としている。また、ヒト由来の機能性抗体のエピトープも解析して、活性化メカニズムと抗体による不活化機構との相関を明らかとし、細胞膜侵入の分子機構解明を行う。

2. 研究の目的

膜結合、膜透過、膜切断の3つのドメインから成る破傷風毒素 (TeNT) の細胞膜透過の分子機構の詳細を構造化学的に明らかとし、TeNT が中枢神経系で、BoNT が末梢神経系で作用するという特異性の違いについて解明することを目的としている。本研究では、TeNT が還元状態から酸化状態へと変化する際に、膜透過ドメイン (Hn) が大きく回転し、S-S 結合の形成とともに活性型へと変化するという仮説のもと、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いた「時分割構造解析」により、活性化機構を構造レベルで解明することを目的とした。また、取得済みのヒト由来機能性抗体との複合体解析を通じて、抗体がどのようにTeNTの活性化を阻害するかの構造的基盤を明らかにし、中和抗体設計への応用を目指した。



3. 研究の方法

破傷風毒素 (TeNT) とボツリヌス毒素は膜透過の分子機構が共通であるにも関わらず、TeNT は中枢神経系、ボツリヌス毒素は全身の末梢神経系で作用することが知られており、作用する神経細胞の特異性については未解明な部分が多い。我々は破傷風毒素 (TeNT) が中枢神経系の細胞でのみ機能する理由について、還元体の TeNT の構造解析に成功して、膜透過ドメイン (Hn) の回転と S-S 結合の形成によって TeNT が活性型に変化するからではないかと考察していた (J. Struct. Biol., 2021)。

そこで本申請では、特異性の違いを酸化-還元に伴う膜透過ドメイン (Hn) の大きな回転と S-S 結合の形成にあるとの仮説を実証することを目的として、クライオ電顕を用いた「時分割構造解析」によって検証する。また、既に取得しているヒト由来の機能性抗体のエピトープを解析して、活性化を抑制する抗体の機能の詳細を明らかとし、細胞膜侵入の分子機構の完全理解を目指すことを目的とする。

4. 研究成果

本研究の遂行には、中核となるクライオ電子顕微鏡の安定稼働が不可欠であった。しかし、導入当初より原因不明のトラブルが断続的に発生し、測定装置の制御装置の部品交換や、カメラとその制御ボードの総入れ替えなど、約3年間を装置の調整と安定化に費やした。このため、当初計画していた破傷風毒素の構造変化を詳細に追うという主要な研究課題は、残念ながら大きく遅れることとなった。

しかし、装置の安定稼働がようやく実現したことで、CryoARM200®を用いた本研究の本格的な着手が可能となった。pH 条件や酸化還元状態を精密に制御した凍結試料の作製系を確立し、タンパク質の効率的な固定化条件についても最適化を進めることができた。

限られた時間ではあったが、この期間に、既に取得済みのヒト由来機能性抗体と TeNT の複合体について、抗原結合による構造変化を解析した。これにより、抗体が TeNT の活性化を阻害する分子機構の一端を明らかにすることができた。また、膜透過ドメインの一部を蛍光プローブで

置換した変異体を作製し、酸化条件下での局在変化を可視化する実験系の確立にも着手している。これらの初期的な知見は、TeNT が中枢神経特異的に活性化される構造的理由について、酸化によるドメイン再編成や抗体による構造拘束の観点から新たな仮説を提示する可能性を示唆しており、今後の研究の重要な足がかりとなる。

なお、主要課題の進捗が困難な中でも、並行してクライオ電顕用の新規グラフェングリッド「EG-Grid® (Epoxidized Graphene grid)」の開発については大きな成果が得られた。これは、グラフェンに気相反応で酸素官能基を導入する革新的な酸化反応を利用し、ヒドロキシ基とその後のエポキシ基導入によって実現したものである。EG-Grid®を用いることで、グラフェン膜上に様々なタンパク質を効率よく固定化し、クライオ電顕でのデータ収集におけるサンプル調製時間を大幅に短縮できることを実証し、この成果は欧文雑誌 (Fujita, J. et al., Scientific Reports, 2023) に発表しているが、これをさらに改良し、His タグやマルトース結合タンパク質を認識する次世代型 EG-Grid の開発にも成功している。

これらのグリッド技術は、今後の TeNT の低温トラップ実験における効率的なタンパク質固定化に大きく貢献すると期待される。また、導入したヒドロキシ基への化学修飾による脂質膜形成実験では、エポキシ基のみを導入した場合とは異なる粒子の形を反映した TEM 画像が得られることも実証し、日本薬学会での学生優秀発表賞を初め、高い評価を得ている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 I. Anzai, J. Fujita, C. Ono, Y. Kosaka, Y. Miyamoto, S. Shichinohe, K. Takada, S. Torii, S. Taguwa, K. Suzuki, F. Makino, T. Kajita, T. Inoue, K. Namba, T. Watanabe, Y. Matsuura	4. 巻 12(4)
2. 論文標題 Characterization of a neutralizing antibody that recognizes a loop region adjacent to the receptor-binding interface of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e03655-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.03655-23	査読の有無 無
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 Fujita J., Amesaka H., Yoshizawa T., Hibino, K., Kamimura, N., Kuroda, N., Konishi, T., Kato, Y., Hara, M., Inoue, T., Namba, K., Tanaka, S., Matsumura, H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Structures of a FtsZ single protofilament and a double-helical tube in complex with a monobody	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-39807-5	査読の有無 無
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 K. Yamamoto, H. Asahara, K. Harada, Y. Itabashi, K. Ohkubo, T. Inoue	4. 巻 11
2. 論文標題 One-step antibacterial modification of polypropylene non-woven fabrics via oxidation using photo-activated chlorine dioxide radicals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 5101-5107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3TB00586K	査読の有無 無
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 Fujita Junso, Makino Fumiaki, Asahara Haruyasu, Moriguchi Maiko, Kumano Shota, Anzai Itsuki, Kishikawa Jun-ichi, Matsuura Yoshiharu, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Epoxidized graphene grid for highly efficient high-resolution cryoEM structural analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29396-0	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 Yamamoto Keita, Asahara Haruyasu, Moriguchi Maiko, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Immobilization of α -cyclodextrin onto polypropylene nonwoven fabric based on photooxidative surface modification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 599-605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-022-00751-8	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 Maeda R., Fujita J., Konishi Y., Kazuma Y., Yamazaki H., Anzai I., Watanabe T., Yamaguchi K., Kasai K., Nagata K., Yamaoka Y., Miyakawa K., Ryo A., Shirakawa K., Sato K., Makino F., Matsuura Y., Inoue T., Imura A., Namba K., Takaori-Kondo A.	4. 巻 5
2. 論文標題 A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03630-3	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 Asahara Haruyasu, Takao Nozomi, Moriguchi Maiko, Inoue Tsuyoshi, Ohkubo Kei	4. 巻 58
2. 論文標題 Visible-light-induced phosgenation of amines by chloroform oxygenation using chlorine dioxide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6176 ~ 6179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc01336c	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 Otsubo Ryota, Minamitani Takeharu, Kobiyama Kouji, Fujita Junso, Ito Toshihiro, Ueno Shiori, Anzai Itsuki, Tanino Hiroki, Aoyama Hiroshi, Matsuura Yoshiharu, Namba Keiichi, Imadome Ken-ichi, Ishii Ken J., Tsumoto Kouhei, Kamitani Wataru, Yasui Teruhito	4. 巻 12
2. 論文標題 Human antibody recognition and neutralization mode on the NTD and RBD domains of SARS-CoV-2 spike protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24730-4	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上豪
2. 発表標題 除菌・消臭剤MA-Tの酸化制御技術を活用したクライオ電顕のツールの開発
3. 学会等名 第3回ファーマラボEXPO東京（東京ビッグサイト）（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 井上豪
2. 発表標題 除菌消臭剤MA-Tのメカニズム解明に基づく酸化制御技術の開発とその応用
3. 学会等名 R022量子構造生物学委員会・第6回研究会（ミーティングスペースAP日本橋）（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 難波 啓一、加藤 貴之、牧野 文信	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 クライオ電子顕微鏡ハンドブック	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 グラフェングリッド、グラフェングリッドの製造方法、構造解析対象物質の構造解析方法	発明者 井上豪（筆頭）ほか 7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、米国18/042430	出願年 2022年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 グラフェングリッド、グラフェングリッドの製造方法、構造解析対象物質の構造解析方法	発明者 井上豪（筆頭）ほか 7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、中国 202180050861.9	出願年 2022年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 グラフェングリッド、グラフェングリッドの製造方法、構造解析対象物質の構造解析方法	発明者 井上豪（筆頭）ほか 7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、欧州 21858394.6	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 グラフェングリッド、グラフェングリッドの製造方法、構造解析対象物質の構造解析方法	発明者 井上豪（筆頭）ほか 7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/030519	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	安居 輝人 (Yasui Teruhito) (60283074)	北海道大学・遺伝子病制御研究所・博士研究員 (10101)	

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
---------	---------