

機関番号：14401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006 年 ～ 2010 年

課題番号：18073012

研究課題名（和文）

壊死毒ファミリー毒素の構造機能相関と細菌感染における役割の解析

研究課題名（英文） The structure-function relationship of the dermonecrosis-inducing toxins and their roles in the bacterial infections.

研究代表者

堀口 安彦 (HORIGUCHI YASUHIKO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00183939

研究成果の概要（和文）：壊死毒ファミリー毒素に分類されるパスツレラ毒素の立体構造を決定し、その結果から本毒素の酵素活性を推定した。また、ドメイン構造を解析して当研究グループが命名した C1 ドメインに毒素分子を細胞膜に局在させる機能が存在することを明らかにした。さらに、本毒素の作用を *in vitro* および *in situ* で検出するために、毒素の酵素作用産物を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製した。

研究成果の概要（英文）：We determined the crystal structure of *Pasteurella multocida* toxin, a member of the dermonecrosis-inducing toxin, from which an enzyme activity of the toxin was predicted. In addition, by analyzing the domain-structure organization, we found that C1 domain of the toxin was involved in its localization to the plasma membrane. Rat monoclonal antibodies against a product of the enzymic action of the toxin were also developed. These antibodies were considered useful for detection of the toxin action both *in vitro* and *in situ*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	17,800,000	0	17,800,000
2007 年度	17,800,000	0	17,800,000
2008 年度	17,800,000	0	17,800,000
2009 年度	17,800,000	0	17,800,000
2010 年度	17,800,000	0	17,800,000
総計	89,000,000	0	89,000,000

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：パスツレラ毒素、結晶構造

1. 研究開始当初の背景

百日咳菌およびパスツレラ、壊死毒産生性大腸菌の産生する壊死毒は、相互に相同性領域をモザイク状に共有することから、1 群の壊死毒ファミリーとして分類することが提唱されている。この壊死毒ファミリーの遺伝

子は、その他複数の病原細菌によって共通に維持されていることから、壊死毒が細菌の病原性発現に重要な役割を果たしていると考えられるが、それぞれの毒素の機能や構造が全て明らかになっているわけではなく、またそのために感染病態との関係は明らかでは

なかった。一方、これまでに研究代表者らは、百日咳菌壊死毒の分子作用機構と機能ドメイン構造を明らかにし、またパストツレラ壊死毒の作用研究にも着手してきた。これらの成果をさらに展開させ、壊死毒ファミリー毒素において未解決な点（それぞれの毒素受容体、パストツレラ壊死毒の作用機序、さらにそれぞれの全立体構造など）を明らかにするため、本研究課題を提案した。

2. 研究の目的

壊死毒素ファミリー毒素のうちで、分子構造や作用機構についてほとんど知見が得られていなかったパストツレラ毒素に着目して、集中的に機能構造解析を進めることとした。特に多くの研究グループによる生化学的アプローチではパストツレラ毒素作用機構が明らかにできていなかったため、毒素タンパク質の構造解析の側面から研究を進めることとした。これらの知見をもって、パストツレラ感染症における本毒素の役割の理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) パストツレラ毒素の結晶構造解析

PMT の C 末領域の組換えタンパク (569-1285 残基、以下 C-PMT) を作製した。精製 C-PMT を HVJ リポソームに封入して標的細胞内に導入し、PMT 活性（細胞内ホスホリパーゼ C 活性、DNA 合成活性）が維持されていることを確認し、結晶化に供した。

C-PMT の結晶化条件を検索し、0.1M MES 緩衝液 pH6.5-1.6M リン酸アンモニウムを沈殿剤溶液に用いたシッティングドロップ・蒸気拡散法で最良の結晶を得た。本結晶の X 線回折データを SPring8 の BL38B1 および BL44XU ビームラインで収集した。

(2) C1 ドメインの機能解析

立体構造相同性検索ソフト DALI を用いて C-PMT の各ドメインの相同性検索を行った。PMT の毒素作用のシグナル経路の下流にある SRF と NFAT の転写因子の活性化を指標としたルシフェラーゼリポーターアッセイシステムを構築し、PMT の毒素作用を定量した。種々の毒素断片の細胞内局在は免疫蛍光染色の手法を用いて解析した。毒素断片と脂質との相互作用は表面プラズモン共鳴法を用いて検出した。

(3) 毒素の酵素作用産物に対するモノクローナル抗体の作製とその利用

ラット腸骨リンパ節法により、脱アミド化 Gαq を特異的に検出するラットモノクローナル抗体の作製を行った。抗原には Gαq のスイッチ 2 領域に相同で、PMT の標的残基である 209 位のグルタミンをグルタミン酸に置換した合成ペプチドを用いた。抗体を用いたウェスタンブロッティングや免疫蛍光染

色は既報に従った。

4. 研究成果

(1) パストツレラ毒素の立体構造解析

C-PMT の結晶を用いて 1.90 Å の分解能の回折データを得た。C-PMT は約 87 x 84 x 30 Å の分子サイズで、N 末端側から C1、C2、C3 の 3 ドメインを有し、33 個のヘリックスと 16 個の β 構造からなることが分かった (図 1)。立体構造相同性検索ソフト DALI を用

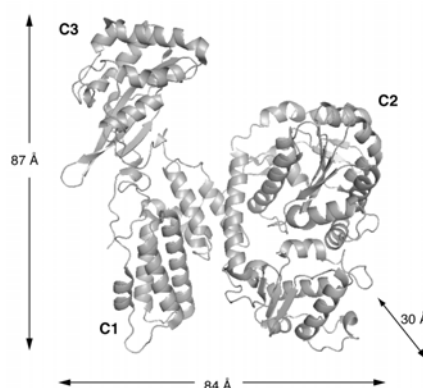


図 1 : C-PMT 立体構造のリボンイメージ

いて相同性検索をしたところ、C1 ドメインに、*Clostridium difficile* toxin B と相同性のある領域が認められた。この立体構造相同性領域をもとに、一次構造配列の相同性検索を行ったところ、C-PMT と toxin B 等の clostridial large toxins の 80-85 アミノ酸残基の領域で 20 - 25% の相同性(identity)が認められた。toxin B のこの領域はリン脂質へのターゲティングシグナルを有することが報告されている。そこで、C1 ドメインにも類似の機能があるかどうか検討した。C-PMT を HEK293T 細胞に発現させ、その局在を調べたところ、C-PMT が細胞膜に特異的に局在することがわかった。さらに緑色蛍光タンパク質 EGFP に C1 ドメインの toxin B 相同領域を付加した組換えタンパク質を同様に HEK293T 細胞に発現させたところ、本来細胞質と核に拡散して存在する EGFP が、C1 ドメインを付加することによって細胞膜に移行することがわかった。

C2 ドメインは 2 つの α/β バレルを持ち、C1 ドメインと C3 ドメインを結んで C-PMT の全体構造を維持するのに重要な役割を持っていると考えられたが、生化学的な機能に関する情報は立体構造からは得ることが出来なかった。

C3 ドメインは α/β hydrolase 構造を有し、特徴的な cleft 空間に水素結合した His-Asp の dyad 構造が認められた。そこで、cleft 空間に側鎖を接するいくつかのアミノ酸残基に注目し、それぞれをアミノ酸置換した変異

型 PMT を作製してその毒素活性を調べた。その結果、1165 位の Cys と 1225 位の Gln をそれぞれ別のアミノ酸に置換した変異 PMT は毒素活性が失われていることを見出した。Cys1165 は Cys1159 とジスルフィド結合で結ばれているが、Cys1159 を変異させた PMT の活性は保持されていた。このことから Cys1165 の側鎖が毒素活性に関与している可能性が考えられたため、それぞれの Cys を Ser に置換した変異 C-PMT (それぞれ C1159S, C1165S) の結晶構造をさらに解析した。

C1159S と C1165S の結晶からそれぞれ 2.6 Å と 2.4 Å の回折データを収集し、分子置換法によりその構造を解析した。その結果、1159 位と 1165 位の Cys を結ぶジスルフィド結合が切断されたときに、1165 位のアミノ酸 (C1159S では Cys、C1165S では Ser) が位置を変えてその側鎖を His-Asp の dyad に向かわせることがわかった。その際の Cys1165 の側鎖チオール基と His のイミダゾールの間に水素結合が形成されていることも認められ、その結果、Cys-His-Asp のシステインプロテアーゼ様の triad が C3 ドメイン中で形成されることが推察できた。

以上の結果から、C-PMT は N 末端側から C1, C2, C3 の 3 つのドメインから構成されており、C1 ドメインには C-PMT を標的細胞の内側から細胞膜に局在させるシグナルが存在することがわかった。さらに C3 ドメインにはドメイン内のジスルフィド結合が切断されたときにのみ形成される Cys-His-Asp のシステインプロテアーゼ様の catalytic triad が存在することがわかった。Cys-His-Asp の触媒残基を持つ酵素にはシステインプロテアーゼやアシルトランスフェラーゼがある。すなわち、PMT がどちらかの酵素活性を有する酵素型毒素であることが強く示唆された。また、PMT は標的細胞の細胞質膜近傍に存在する分子を標的とすることも推察された。

(2) C1 ドメインの機能解析

C-PMT の C1 ドメインの最初の 4 つのヘリックスからなる立体構造 (590-670 残基) は、clostridial large toxin ファミリーの 1 つである Clostridium difficile のトキシン B の N 末端 (1-100 残基) の立体構造と高い相同性が認められた (図 2)。この立体構造相同性領域をもとに一次構造配列の相同性検索を行うとトキシン B を含む clostridial large toxin ファミリーの N 末端の 80-85 アミノ酸残基の領域で 20-25% の相同性 (identity) が認められた。トキシン B のこの領域はリン脂質へのターゲティング能を有することが報告されている (4)。そこで、C1 ドメインにも同様の活性があるかどうかを HEK293 細

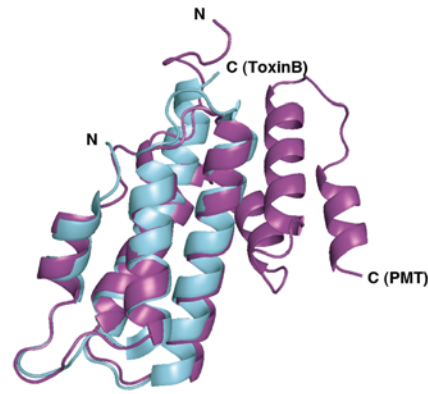


図 2 :

C1 ドメインとトキシン B の立体相同性

胞内で C-PMT を発現させ、その局在を調べると細胞膜への局在が観察された。さらに、C1 ドメインの 4 つのヘリックスの部分欠失体 [ΔC1(4H)] の細胞内局在を調べたところ、ΔC1(4H) は細胞膜への局在が見られなかった。また C1 ドメインとトキシン B の相同領域を EGFP に付加した組換えタンパク質 [C1(4H)-EGFP および TcdB(N4H)-EGFP] をそれぞれ HEK293 細胞に発現させると、どちらの場合でも本来細胞質と核に拡散して存在する EGFP タンパクが細胞膜に局在した (図 2)。このことより、C-PMT の C1 ドメインと Clostridial Large Toxin ファミリーの N 末端に共通の構造は細胞膜への局在化シグナルとしてはたらくことが明らかになった。さらにこの 4 つのヘリックスについてどのヘリックスが膜局在化に必須であるかどうかを C1 ドメインの各ヘリックスの欠失体を作製して HEK293 細胞で発現させ細胞内局在を解析した。その結果、C1 ドメインの 4 つのヘリックスのどのヘリックスを欠失しても膜局在化能が失われることが分かった。このことより、C1 ドメインの膜局在化には 4 つのヘリックスからなるいわゆる「4ヘリックスバンドル構造」が必須であることがわかった。

C1 ドメインの膜局在化能と PMT 毒素活性の関連についてリポーターアッセイで調べた。C-PMT あるいは ΔC1(4H) を細胞で発現させて毒素活性を調べたところ、ΔC1(4H) を発現させた場合には全く活性が認められなかった。しかし、膜局在化モチーフである src 遺伝子のミリストイル化シグナル配列を ΔC1(4H) の N 末端に導入して膜局在化能を回復した場合には PMT 活性も回復が認められた。さらに大腸菌で発現精製した C-PMT あるいは ΔC1(4H) の組換えタンパクを HVJ リポソーム法により Swiss3T3 細胞の細胞質に導入して PLC 活性を調べたところ、ΔC1(4H) では全く活性を示さなかった。こ

のことより、C1ドメインの膜局在化シグナルは、細胞内でのPMTの毒素作用発揮に必須であることが明らかになった。

(3) 毒素の酵素作用産物に対するモノクローナル抗体の作製とその利用

本研究課題の進行中に、PMTの酵素作用本態がアシルトランスフェラーゼのひとつであるデアミダーゼで、標的細胞のGqあるいはGiのヘテロ三量体のαサブユニットのグルタミンを脱アミド化してGタンパクを恒常的に活性化することによって毒性を發揮することが報告された。このことから、パストツレラ感染におけるPMT作用の影響を考察することが理論的に可能になった。しかし、脱アミド化反応は一般的に検出が難しいため、簡便な検出方法の創出が今後の研究展開には必須であると考えられる。そこで、研究代表者らは、Gqのαサブユニット(Gαq)の脱アミド化を特異的に認識するラットモノクローナル抗体を作製し、これを用いてPMT特異的な脱アミド化を検出するin vitro assay法を開発することを試みた。

図3に示すGαqの209番目のグルタミン(Q)

	194	200	210	220
Gα _{ε1}	F	SFKDLNFRMF	DVGGQ	SERKKWIHC
Gα _{ε2}	F	SVKDLNFRMF	DVGGQ	SERKKWIHC
Gα _{ε11}	F	TFKDLHF	KMF	DVGGQ
Gα _{ε13}	F	TFKEL	YFKMF	DVGGQ
Gα _{ε12}	F	TFKDLHF	KMF	DVGGQ
Gα _{ε01}	F	TFKDLHF	RFL	DVGGQ
Gα _{ε02}	F	TFKDLHF	RFL	DVGGQ
Gα _{ε2}	F	TFKEL	TFKMF	DVGGQ
Gα _{ε5}	F	QVDKVN	FHMF	DVGGQ
Gα _{εs2}	F	QVDKVN	FHMF	DVGGQ
Gα _{εsol1f1}	F	QVDKVN	FHMF	DVGGQ
Gα _{εsol1f2}	F	QVDKVN	FHMF	DVGGQ
Gα _{ε11}	F	DLQSV	IFRMVDVGGQ	SERRKWIHC
Gα _{εq}	F	DLQSV	IFRMVDVGGQ	SERRKWIHC
Gα _{ε14}	F	DLQSV	IFRMVDVGGQ	SERRKWIHC
Gα _{ε15}	F	SVKKT	KLRI	DVGGQ
Gα _{ε12}	F	VIKKI	PFKMF	DVGGQ
Gα _{ε13}	F	EIKNV	PFKMF	DVGGQ
	*	...	:::..*****	:::..*..*..*

WT Gq peptide IFRMVDVGGQ**S**ERRKWIHC
MUT Gq peptide IFRMVDVGG**E**SERRKWIHC

図3: 抗体作製に用いた合成ペプチド(MUT Gq)と、種々のGαの相同性領域のアミノ酸配列

をグルタミン酸に(E)置換したGq MUTペプチドを化学合成し、ラットに免疫した後、腸骨リンパ節法により2種のモノクローナル抗体を得た。これらの抗体はGαq及びGα11を欠損したMouse Embryonic fibroblast (MEF)細胞に野生型GαqとQ209E変異型Gαqをそれぞれ発現させたところ、これらの抗体はQ209E変異型Gαqのみを認識することが確認できた(図4)。また、これらの抗体はPMTを作用させた細胞内のGαqの脱アミド化を特

異的に認識することがわかった。このことから、これらの抗体がin vitro および in situ でのPMT作用を特異的に検出できる有用なプローブとなることがわかった。今後、このプローブを利用してパストツレラ感染におけるPMTの影響の及ぶ時空間的範囲を解析する予定である。

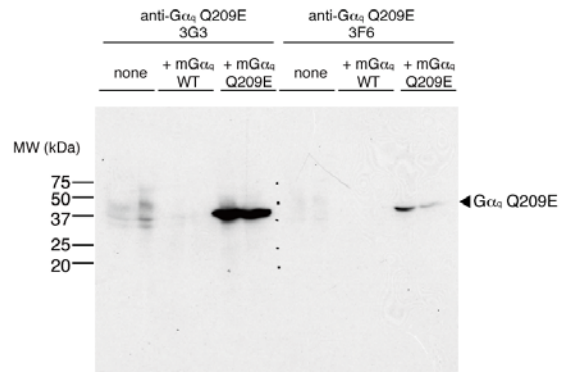


図4: 作製した抗体(3G3と3F6)は脱アミド化型Gαq(Q209E)を特異的に認識した

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17件)

1. Fukui-Miyazaki, A., S. Ohnishi, S. Kamitani, H. Abe, and Y. Horiguchi. 2011. Bordetella dermonecrotic toxin binds to target cells via the N-terminal 30 amino acids. *Microbiol. Immunol.* 55:154-159. (査読有)
2. Kimura, J., H. Abe, S. Kamitani, H. Toshima, A. Fukui, Miyake, M. Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, Y. Horiguchi. 2010. Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *The Journal of biological chemistry* 285:401-408. (査読有)
3. Kamitani, S., K. Kitadokoro, M. Miyazawa, H. Toshima, A. Fukui, H. Abe, M. Miyake, and Y. Horiguchi. 2010. Characterization of the membrane-targeting C1 domain in Pasteurella multocida toxin. *The Journal of biological chemistry* 285:25467-25475. (査読有)

4. Fukui-Miyazaki, A., S. Kamitani, M. Miyake, and Y. Horiguchi. 2010. Association of Bordetella dermonecrotic toxin with the extracellular matrix. *BMC microbiology* 10:247. (査読有)
5. Saeki, R., M. Kondoh, H. Kakutani, S. Tsunoda, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Tsutsumi, Y. Horiguchi, and K. Yagi. 2009. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76:918-926. (査読有)
6. Isegawa, Y., J. Hara, K. Amo, Y. Osugi, M. Takemoto, K. Yamanishi, R. Fukunaga, M. Shibata, , and A. Ohshima, Y. Horiguchi, N. Sugimoto, 2009. Human herpesvirus 6 ganciclovir-resistant strain with amino acid substitutions associated with the death of an allogeneic stem cell transplant recipient. *J Clin Virol* 44:15-19. (査読有)
7. Takahashi, A., E. Komiya, H. Kakutani, T. Yoshida, M. Fujii, Y. Horiguchi, H. Mizuguchi, Y. Tsutsumi, S. Tsunoda, N. Koizumi, K. Isoda, K. Yagi, Y. Watanabe, and M. Kondoh. 2008. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem Pharmacol* 75:1639-1648. (査読有)
8. Ohnishi, H., M. Miyake, S. Kamitani, and Y. Horiguchi. 2008. The morphological changes in cultured cells caused by Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *FEMS Microbiol Lett* 279:174-179. (査読有)
9. Miyake, M., S. Sakane, C. Kobayashi, M. Hanajima-Ozawa, A. Fukui, S. Kamitani, and Y. Horiguchi. 2008. A colorimetric assay for studying effector secretion through the bacterial type III secretion system. *FEMS Microbiol Lett* 278:36-42. (査読有)
10. Isegawa, Y., Y. Miyamoto, Y. Yasuda, K. Semi, K. Tsujimura, R. Fukunaga, A. Ohshima, Y. Horiguchi, Y. Yoneda, and N. Sugimoto. 2008. Characterization of the human herpesvirus 6 U69 gene product and identification of its nuclear localization signal. *J Virol* 82:710-718. (査読有)
11. Kitadokoro, K., S. Kamitani, M. Miyazawa, M. Hanajima-Ozawa, A. Fukui, M. Miyake, and Y. Horiguchi. 2007. Crystal structures reveal a thiol protease-like catalytic triad in the C-terminal region of Pasteurella multocida toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5139-5144. (査読有)
12. Harada, M., M. Kondoh, C. Ebihara, A. Takahashi, E. Komiya, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi, and Y. Watanabe. 2007. Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin(*Biochem Pharmacol* 73:206-214. (査読有)
13. Hanajima-Ozawa, M., T. Matsuzawa, A. Fukui, S. Kamitani, H. Ohnishi, A. Abe, Y. Horiguchi, and M. Miyake. 2007. Enteropathogenic Escherichia coli, Shigella flexneri, and Listeria monocytogenes recruit a junctional protein, zonula occludens-1, to actin tails and pedestals. *Infect Immun* 75:565-573. (査読有)
14. Ebihara, C., M. Kondoh, M. Harada, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi, and Y. Watanabe. 2007. Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem Pharmacol* 73:824-830. (査読有)
15. Miyazawa, M., K. Kitadokoro, S. Kamitani, H. Shime, and Y. Horiguchi. 2006. Crystallization and preliminary crystallographic studies of the Pasteurella multocida toxin catalytic domain. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62:906-908. (査読有)
16. Fukui, A., and Y. Horiguchi. 2006. Dermonecrotic toxin: The old but new virulence factor produced by Bordetella spp. *Toxin Rev.* 25:125-135. (査読有)
17. Ebihara, C., M. Kondoh, N. Hasuike, M. Harada, H. Mizuguchi, Y. Horiguchi, M. Fujii, and Y. Watanabe. 2006. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 316:255-260. (査読有)

〔学会発表〕（計 9 件）

1. 木村淳, 安倍裕順, 神谷重樹, 戸嶋ひろ野, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2009. 3. 12. ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構の解析. 日本細菌学会. 名古屋市 名古屋国際会議場.
2. 木村淳, 安倍裕順, 神谷重樹, 戸嶋ひろ野, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2008. 12. 9. ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構の解析. 分子生物学会. 横浜市 パシフィコ横浜.
3. 神谷重樹, 北所健悟, 戸嶋ひろ野, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2008. 3. 24. パスツレラ毒素C1ドメインの膜局在化能の機能解析. 日本細菌学会. 京都市 国立京都国際会館
4. 福井理, 神谷重樹, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2007. 12. 11. Bordetella皮膚壊死毒素の細胞外マトリクスへの付着. 日本分子生物学会日本生化学会合同大会. 横浜市 パシフィコ横浜
5. 木村淳, 神谷重樹, 戸嶋ひろ野, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2007. 12. 11. ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体認識機構の解析. 日本分子生物学会 日本生化学会合同大会. 横浜市 パシフィコ横浜.
6. 神谷重樹, 北所健悟, 宮澤雅之, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2007. 3. 26. Pasteurella multocida toxinに存在するシステインプロテアーゼ様活性中心. 日本細菌学会. 大阪市 アジア太平洋トレードセンター.
7. 北所健悟, 神谷重樹, 宮澤雅之, 福井理, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2007. 3. 26. Pasteurella multocida toxin(PMT)の活性ドメインの全体構造. 日本細菌学会. 大阪市 アジア太平洋トレードセンター.
9. 木村淳, 福井理, 神谷重樹, 三宅眞実, and 堀口安彦. 2006. 3. 29. Bordetella属細菌の菌体遊離型壊死毒の検出. 日本細菌学会. 金沢市観光会館.
10. 坂根貞嗣, 花嶋美幸, 堀口安彦, and 三宅眞実. 2006. 3. 29. 腸管病原性大腸菌3型分泌装置により分泌されるエフェクターの宿主細胞内移行検出系の開発. 日本細菌学会. 金沢市観光会館.

〔その他〕

ホームページ等

<http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 安彦(HORIGUCHI YASUHIKO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00183939