

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23866

研究課題名（和文）コレラ菌が形成するIV型線毛を介した腸管定着機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of intestinal colonization by type IV pilus from *Vibrio cholerae*

研究代表者

沖 大也 (Oki, Hiroya)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員（常勤）

研究者番号：30845285

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、コレラ菌が形成するIV型線毛にわずかに含まれるマイナーピリンと呼ばれる線毛構成タンパク質の結晶化をおこなった。得られた結晶を大型放射光施設SPring-8において回折測定を実施した結果、最高分解能2.3 Åで構造決定した。さらに得られた構造をもとに、コレラ菌のIV型線毛全体のモデル構造の構築をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレラ菌が形成するIV型線毛を利用した腸管定着過程は、有望な創薬標的であると考えられる。定着過程を標的とする阻害剤は、既存のワクチンなどと異なる新規アプローチであり、宿主側の免疫機構の成熟度の影響を受けづらいと予測され、ワクチン効果が薄い乳幼児に対しても効果的であると考えられる。また、抗生物質と異なり、細菌を死滅させないことから耐性菌を生じさせづらいという大きな利点もある。すなわち、既存のワクチンや抗生物質に替わる次世代の治療法・感染症予防となる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：In this study, a minor pilin TcpB, which is one of constituent proteins of the type IV pilus from *Vibrio cholerae* and is present in small amount, was crystalized. The obtained crystals were subjected to diffraction experiments, and the crystal structure of the minor pilin TcpB was determined at 2.3 Å. Based on the determined structure, furthermore, I constructed a model structure of an entire type IV pilus of *Vibrio cholerae*.

研究分野：細菌学

キーワード：コレラ菌 IV型線毛 結晶構造解析 マイナーピリン

1. 研究開始当初の背景

コレラ菌は汚染水を介して消化管内に侵入し、産生したコレラ毒素の働きによって重篤な下痢症を引き起こす。現在においても年間約 300 万人が発症し、10 億人以上の人々が感染のリスクに曝されている感染症の原因菌である (*Bull World Health Organ.* 2012)。2021 年現在、コレラに対する経口ワクチンが開発されているが、重症化しやすい子供に対しては効果が薄く、さらに特に死亡率の高い乳幼児には適用外であることが喫緊の課題となっている (*Qadri et al. N Engl J Med.* 2016)。従って、現状では対症療法や抗生物質の投与による治療が主であるが、いずれも乳幼児や高齢者に対しては効果的ではなく、抗生物質の乱用による耐性菌出現や腸内細菌叢の攪乱も問題となっている。

コレラ菌を始めとする腸管系病原菌は、病原性発現のために腸管に付着する必要があり、定着因子を保有している。コレラ菌は定着因子として IV 型線毛を形成する TCP (toxin co-regulated pilus) を有しており付着・定着過程において重要であることから有望な創薬標的であると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは未だ研究が進んでおらず、予防・治療薬の開発には至っていない。

研究代表者はこれまでに、コレラ菌と同様に IV 型線毛を保有する腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の定着機構に関する一連の研究から (*Kawahara, Oki et al. J. Mol. Biol.* 2016; *Oki et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 2018 など) IV 型線毛が線毛先端部のみに位置するマイナーピリンと称される線毛構成タンパク質三量体と、分泌タンパク質との相互作用を介して腸上皮細胞に付着するという新規のモデルを提案した。さらに、遺伝学的解析からコレラ菌を含む多くの病原性細菌がマイナーピリンと分泌タンパク質を持つことが明らかとなったが、各細菌間において分泌タンパク質のアミノ酸配列保存度は著しく低いという興味深い知見が得られた。実際にコレラ菌の有する分泌タンパク質の構造は ETEC のそれとは全く異なっており、定着過程における機能やマイナーピリンとの相互作用、細胞上の標的分子の違いをもたらしていると考えられるが、その理解は全く進んでいない。そのため、本研究課題では、「コレラ菌は菌体外に産生する分泌タンパク質と IV 型線毛をどのように利用して付着・定着過程を達成しているのか」という問いを中心的な研究課題とし、得られる情報から、コレラ菌の付着・定着過程の包括的な理解と阻害剤の設計開発を達成することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、分泌タンパク質がどのように IV 型線毛と相互作用をすることで、菌体外への分泌と、コレラ菌の腸管定着を達成しているのか明らかとし、定着過程に着目した阻害剤を開発することである。X 線結晶構造解析により立体構造が明らかとなっている分泌タンパク質と異なり、相互作用する線毛構成タンパク質のマイナーピリン TcpB は構造が明らかとなっていなかった。本研究では、このマイナーピリン TcpB の構造決定を第一の目的とした。本研究が目指す感染過程の阻害剤は、既存のワクチンなど異なる新規アプローチであり、その阻害過程は宿主側の免疫機構の成熟度の影響を受けづらいと予測されることから、ワクチンの効果が薄い乳幼児に対しても効果的であると考えられる。また、抗生物質と異なり、細菌を死滅させないことから耐性菌を生じさせづらいという大きな利点もある。すなわち、既存のワクチンや抗生物質に替わる次世代の治療法・感染症予防となる可能性を有している。

3. 研究の方法

本研究はまず、コレラ菌のマイナーピリン TcpB の立体構造を X 線結晶構造解析により決定することとした。IV 型線毛を構成するピリントタンパク質は、N 末端に 50 残基ほどの長い α ヘリックスを有することが知られている。この α ヘリックスの前半部分は膜に挿入される領域であることから疎水性であると予想された。タンパク質の結晶化には mg オーダーの大量のタンパク質を用意する必要があるが、疎水性ヘリックスの存在は、タンパク質の不溶化を招き収量の低下につながる。また一般的に、膜タンパク質のような疎水性ヘリックスを有するタンパク質の結晶化は困難であり、得られる結晶構造の最高分解能も低いことが多い。これらの理由から、N 末端の疎水性ヘリックス部分を除いたコンストラクトを用いることとした。大腸菌発現系により大量発現させた TcpB タンパク質を、アフィニティカラム、イオン交換カラム、ゲル濾過クロマトグラフィーなどで順次精製し、結晶化に必要な量のタンパク質を得られた。

次に、得られた TcpB を用いて結晶化を試みた。数千条件に及び結晶化条件の中で、唯一、リザーバーに硫酸リチウムを含む条件においてダイヤモンド型の結晶が得られた。TcpB は新規構造であるため、位相決定のためにセレノメチオニン誘導体の結晶を、野生型結晶を種としてヘテロミクロシーディング法によって作成した。得られた結晶は、大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL26B1 において回折測定を実施した。得られたデータをもとに、位相決定を行い、初期構造を決定した。野生型結晶の高分解能データを用いて構造精密化を行い、最終的に最高分解能 2.3Å で構造決定した。

得られた構造を用いてコレラ菌が菌体表面に形成する IV 型線毛 TCP の全体構造のモデリングを試みた。まず、線毛の主要構成因子であるメジャーピリン TcpA のフィラメントモデルを構築することとした。研究代表者が過去に構築した、腸管毒素原性大腸菌 ETEC のメジャーピリン CofA のフィラメントモデルを使用し、モデリングを行った。得られたモデルは、過去に報告された TCP の電子顕微鏡による電子密度マップによくフィットした。次に今回構造決定した TcpB をこの TcpA フィラメントモデルに組み込むこととした。TcpB は 3 つのドメインから構成され、三量体を形成していたが、そのうちの N 末端のドメイン 1 は、TcpA と同様の典型的なピリンドメイン構造を形成していた。三量体を形成する 3 つのドメイン 1 を、TcpA フィラメントモデルの先端部分と置換し、エネルギー最小化を行った。その結果、立体障害を起こすことのない、TcpA フィラメントモデルの先端に TcpB 三量体が位置するモデルの構築に成功した。

4. 研究成果

これまでの研究で、コレラ菌が形成する IV 型線毛 TCP のマイナーピリン TcpB は、線毛の形成開始、線毛のリトラクション（収縮）、CTX ϕ の取り込みなど、様々な機能を有するタンパク質であることが知られていたが、その全体構造は未決定であった。本研究では、初めて TcpB の全体構造を解明した。TcpB は非対称単位中に 3 分子存在し、3 つのドメイン（ドメイン 1:29-230、ドメイン 2:246-285、ドメイン 3:287-423）と 2 本のリンカーから構成され、特にドメイン 1 とドメイン 2 間のリンカー部分は長く、グリシンや親水性残基が多く存在することからフレキシブルな状態であると考えられた。実際、ドメイン 2 とドメイン 3 の C α 炭素で重ね合わせると、C α 原子間距離の根平均二乗偏差(R.M.S.D.)は 0.08~0.29Å とよく重なったが、長いリンカーでつながれた N 末端のドメイン 1 は様々な配向で存在していた。また、研究代表者が過去に明らかとした ETEC のマイナーピリン CofB と同様に、ドメイン 2 を構成する β シートが各 TcpB 分子間で交換され、三量体構造を形成していた。

ドメイン 1 は 202 残基(29-230)からなり、6 本の α ヘリックスと 8 本の β ストランドから構成され、そのうち 6 本の β ストランドは 1 枚のねじれた逆平行 β シート($\beta 1 \rightarrow \beta 2 \rightarrow \beta 3 \rightarrow \beta 7 \rightarrow \beta 5 \rightarrow \beta 6$)を形成しており、他の Type IV pilin と類似の $\alpha\beta$ フォールドを形成していた。TCP におけるメジャーピリン TcpA、CFA/III におけるマイナーピリン CofB のドメイン 1 とのアミノ酸配列相関性は低いにもかかわらず、 $\alpha\beta$ フォールドを形成する構造のコア部分については比較的よく重なった。TcpB はこのピリンドメインのドメイン 1 を用いて線毛に組み込まれると予想される。

ドメイン 2 は β ストランドのみから構成されており、ドメイン 2 が持つ逆平行 β シートを中心に TcpB 三量体のサブユニット間で相互作用し、大きな一枚の β シートを形成する β ストランド交換が見られた。この β ストランドの交換と、シート内に形成されるジスルフィド結合が、TcpB の三量体構造の形成に大きく寄与していると考えられる。

ドメイン 3 も同様に β ストランドのみから構成されており、構造の大部分は 2 枚の β シートから形成される β サンドイッチ構造をとっており、この構造の上下に小さな 2 枚の逆平行 β シートを有している。また CofB と同様に、C 末端部位がジスルフィド結合によって β シート内で架橋されており、構造が安定化されていた。

前述したように、TcpB のドメイン 1 はピリンドメインであったことから、この部分で線毛に組み込まれると考えられる。過去の電子顕微鏡を使った研究から、TcpB は線毛先端部に位置することが示唆されており、巨大な三量体を形成するという特徴もそれを裏付けている。実際に、今回構築した TcpA フィラメントの先端部に TcpB 三量体が位置するという TCP モデルは、立体障害なく構築することができた。また、この構造中には変異実験から機能に重要であるいくつかのアミノ酸残基が、サブユニット間で相互作用する様子も捉えられていた。得られた TcpB の全体構造および TCP 全長モデルは新規構造であり、いくつかの興味深い知見が得られていることから、これらの研究成果をもとに令和 3 年度中の論文投稿を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 KAWAHARA Kazuki, OKI Hiroya, NAKAMURA Shota	4. 巻 62
2. 論文標題 Structural Study of Bacterial Pili for Development of the Anti-Adhesive Agent	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nihon Kessho Gakkaishi	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 無
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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

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 Kengo Ueda, Kazuki Kawahara, Shinya Yonogi, Hiroya Oki, Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, Shota Nakamura
2. 発表標題 Structural analysis of the ADP-ribosylating component of binary enterotoxin of Clostridium perfringens
3. 学会等名 ASM Microbe2019 (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 (P P F 2 0 1 9)
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, 中村 昇太
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 井本祐佳, 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 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 Hiroya Oki, Kazuki Kawahara, Takahiro Maruno, Tomoya Imai, Yuki Muroga, Shunsuke Fukakusa, Takaki Iwashita, Yuji Kobayashi, Shigeaki Matsuda, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, and Shota Nakamura
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 Microbe2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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