

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570134

研究課題名(和文)食中毒を引き起こす細菌毒素タンパク質の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Crystal Structure of Clostridium perfringens Enterotoxin.

研究代表者

北所 健悟 (Kitadokoro, Kengo)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・准教授

研究者番号：60283587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ウエルシュ菌は食中毒の原因菌で、腸管内でタンパク毒素であるウエルシュ菌エンテロトキシン(CPE)を産生する。CPEは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毒性がある。

申請者は、CPEを結晶化し、X線結晶構造解析法により、その立体構造を決定した。CPE分子は細長い全体像を呈しており、D1～D3に相当する三つの機能ドメインから構成された。D1ドメインには、腸管上皮細胞膜にあるClaudinという受容体に結合するドメインがあり、D2、D3ドメインには細胞膜に孔をあけると思われるシート構造が存在し、これにより細胞膜に孔がかけられるポア形成メカニズムがあることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) is a cause of human food poisoning and considered to be a pore-forming toxin, which is supported by several lines of indirect evidence. The structure of CPE was determined by X-ray crystallography at 2.0 Å resolution.

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：構造生物学 食中毒 毒素タンパク質 ウエルシュ菌 結晶化

1. 研究開始当初の背景

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、クロストリジウム属に分類されるグラム陽性の嫌気性桿菌で土壤中など広く自然界に分布している。ウェルシュ菌はヒトに対して、ガス壊疽、出血性腸炎、腸内毒素血症などの様々な感染症を引き起こすが、本菌が最も多く引き起こす感染症は、給食等で発生する大量食中毒である。ウェルシュ菌による食中毒の1件あたりの患者数は、他の細菌性食中毒と比べて圧倒的に多いのが特徴である。ウェルシュ菌は耐熱性の芽胞を形成するため、食品の加熱処理により他の菌が死滅しても、生き残ることができる。未処理で残ったウェルシュ菌は、腸管内で菌の増殖と共に耐熱性の芽胞を形成し、同時にウェルシュ菌エンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin: 以下、CPE と略す) という毒素タンパク質を産出する。CPE は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。

CPE がヒトに対して食中毒を発生させる機構は、①標的細胞への取り付け、②細胞膜上での多量体化、③細胞膜への孔形成、という三段階で構成されていると考えられている。CPE はまず、標的となる腸管上皮細胞上に存在する細胞間接着分子である Claudin の細胞外第二ループと特異的に結合する事により、標的細胞に取り付く。細胞に取り付いた CPE は、次に細胞膜上で多量体を形成する。多量体形成後、CPE は細胞膜に孔を形成し、細胞内に Ca^{2+} を流し込む事により、標的細胞の細胞死を誘発する。CPE の受容体である Claudin は様々な細胞で発現しており、そのため CPE は Drug delivery system (DDS) への応用が検討されている。また、Claudin は特定のガン細胞上で発現量が増加しており、この事から CPE は抗がん剤への応用も期待されている。これらの理由から、CPE に関する基礎研究は数多く行われてきた。しかし、全長 CPE の立体構造は解明されていなかったため、分子レベルでの詳細な作用機構はまだ解明されていなかった。

2. 研究の目的

食中毒の原因菌であるウェルシュ菌が産生するエンテロトキシン (CPE) は、標的細胞の細胞膜に孔をあけて細胞を破壊する膜孔形成毒素である。この毒素は 319 残基からなる蛋白質で、N 末端側の 116 残基からなる毒性を示す細胞障害ドメインと、C 末側の受容体結合ドメインからなる。ウェルシュ菌エンテロトキシンの作用機構は、細胞表面への結合と、その後の膜孔形成による細胞の形態変化の 2 段階に分けられる。多くの膜孔形成性毒素が、細胞膜に存在するコレステロールなどの脂質を受容体とし、比較的広範囲の細胞種に対して作用するのに対して、本毒素は、腸管、腎臓、肝臓などに由来する上皮

系細胞に対してのみ作用することが知られている。

一方、この毒素蛋白質が標的とし、結合する受容体は、上皮系細胞の細胞膜上にあるタイトジャンクションを形成する Claudin ファミリーであることがわかっている。Claudin は、月田らが発見した、細胞接着に必要な 22kDa からなる膜 4 回貫通型蛋白質で、4 つの膜貫通領域と 2 つの細胞外ドメインを有する。この細胞外ドメインは、54 残基の第 1 ループと 23 残基の第 2 ループからなる。堀口らのグループは、CPE 毒素が Claudin-3 の第 2 ループに直接結合し、細胞膜内へ侵入することを見出した (*FEBS*, **476,258-261**, 2000)。受容体を介して細胞表面に結合した後、エンテロトキシンは、細胞膜内へ進入し、分子量 200kDa 内外の SDS 不溶性の複合体を形成する。この複合体こそが膜孔そのものであることがわかっており、膜孔形成のためにはエンテロトキシンとレセプターが必要であることがわかっている (*J. Cell. Biol.*, **136**, 1239-1247 1997)。

このエンテロトキシンの立体構造についても、また Claudin ファミリーの立体構造についても、全く明らかとされていない。このように、全長 CPE の立体構造は解明されていないため、分子レベルでの詳細な膜孔形成の作用機構はまだ解明されていない。そこで、本研究では、全長の CPE の立体構造を決定し、CPE の膜孔形成メカニズムを解明することを目的として X 線構造解析の手法を用いて立体構造の決定を行った。これによって、細菌毒素の膜孔形成のメカニズムに対して構造生物学的なアプローチでの解明を目的とする。

3. 研究の方法

CPE の結晶化は蒸気拡散法で行った。種々の条件検討の結果、PEG3350 で得られた結晶化条件が分解能の向上を導くものであった。このコンストラクトは N 末端側に His タグをつけたものであったが、構造解析した後で解析すると N 末端の 35 残基は電子密度が全く見られていなく、これが分解能低下を引き起こす要因であったと思われる。結局、C 末端側に His タグを導入した時に、PEG3350 で得られた三角形の結晶を用いて、2.0Å 分解能の回折データを収集することが出来た。得られた回折データを用いて X 線構造解析の手法で、CPE 全長の立体構造を決定した。

4. 研究成果

大腸菌で発現させた CPE タンパク質を結晶化し、Sm を用いた SAD 法と分子置換法を組み合わせる事により全体構造を決定した。その結果、CPE は、モノマー構造をとり、3 量体の対称構造をとっていた (Fig. 1)。モノマー構造は、引き伸ばされたような細長い構造をしており、17 本の β -strand と 5 本の

α -helix を含む 3 つのドメインで構成されていた (Fig. 1)。模式的に示すと、CPE 分子はイモムシ様の全体像を呈しており、それぞれ頭部 (D1)、体躯 (D2)、尻尾 (D3) に相当す

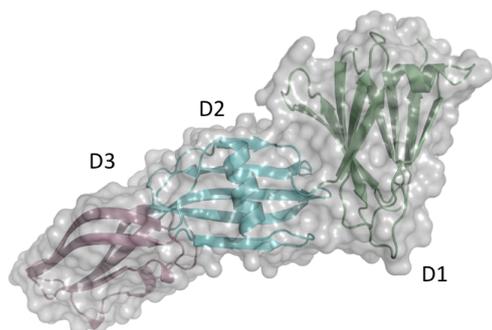


Fig. 1 CPEの全体構造

る三つの機能ドメインから構成されていることがわかった (Fig. 1)。D1 には、腸管上皮細胞膜にある Claudin 受容体に結合するドメインがあり、この受容体に結合するアミノ酸残基が外側を向いていることがわかった。さらに、D2、D3 ドメインには細胞膜に孔をあけると思われる β シート構造が存在し、これにより細胞膜に孔があけられる β ポア形成メカニズムがあること、つまり毒素分子の凝集によって D2 ドメインの構造が大きく変化して細胞膜に孔をあける膜孔が形成されることを見出した。また、CPE で見出された β ポア形成メカニズムは他の β ポアを形成する毒素と立体構造のトポロジーが一致していた。これらのことから、CPE が β -Pore Forming Toxin (β -PFT) のファミリーに属することが示唆された。

また、CPE は結晶中で 3 量体を形成し、その大きさは横幅 90 Å、高さ 52 Å となっていた。三量体の中心には、3 個の Glu94 と 3 個の Glu110 の計 6 個のグルタミン酸によるクラスターが存在した。このグルタミン酸クラスターは先の重原子結合サイトであり、そのグルタミン酸クラスターの中心にカルシウムと考えられる電子密度が存在した。

このように、今回得られた CPE の構造と既存の膜孔形成毒素との構造比較から、CPE 分子の構造自体が孔形成活性の制御に関わっていること、CPE が宿主の細胞膜表面で構造変化して作用していることが示唆された。今後、界面活性剤やリポソームなどの共存下で、膜に孔を形成した状態である活性型コンフォメーションを形成し、この活性型 CPE の結晶化を行い、構造解明することで、毒素による膜孔形成のメカニズムへの解明が完結すると期待される。

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 8 件)

- ① Amatsu S, Sugawara Y, Matsumura T, Kitadokoro K. (他 1 名、4 番目、査読有) Crystal structure of *Clostridium botulinum* whole hemagglutinin reveals a huge triskelion-shaped molecular complex. *J. Biol. Chem.*, **288**, 35617-35625. (2013). doi:10.1074/jbc.M113.521179/
- ② Karatani H, Namikawa Y, Mori N, Nishikawa Y, Imai S, Ihara Y, Kinoshita A, Kitadokoro K. (他 1 名、8 番目、査読有) Visualization of mitochondria in living cells with a genetically encoded yellow fluorescent protein originating from a yellow-emitting luminous bacterium. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **12**, 944-956. (2013)
- ③ 北所健悟, (他 3 名、1 番目、査読有) 食中毒を引き起こすウェルシュ菌エンテロトキシン CPE の構造生物学的研究. *日本結晶学会誌*. **55**, 223-229. (2013)
- ④ Kitadokoro K. (他 6 名、1 番目、査読有) Crystal structure of cutinase Est119 from *Thermobifida alba* AHK119 that can degrade modified polyethylene terephthalate at 1.7 Å resolution. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 771-775. (2012)
- ⑤ Kitadokoro K. (他 10 名、1 番目、査読有) Crystal Structure of *Clostridium perfringens* Enterotoxin Displays Features of β -Pore-forming Toxins. *J. Biol. Chem.*, **286**, 19549-19555. (2011)
- ⑥ Kamitani S, Ao S, Toshima H, Tachibana T, Hashimoto M, Kitadokoro K. (他 3 名、6 番目、査読有) Enzymatic actions of *Pasteurella multocida* toxin detected by monoclonal antibodies recognizing the deamidated α subunit of the heterotrimeric GTPase Gq. *FEBS J.* **278**, 2702-2712. (2011)
- ⑦ Takatsuka M, Osada-Oka M, Satoh EF, Kitadokoro K. (他 10 名、4 番目、査読有) A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. *PLoS One.*, **66**, e20985. (2011)
- ⑧ Nishimura K, Kitadokoro K. (他 5 名、2 番目、査読有) Crystallization and preliminary crystallographic studies on the HA3 subcomponent of type B botulinum neurotoxin complex. *Acta Cryst. F.*, **67**, 1244-1246. (2011).

[学会発表] (計 7 件)

- ① 阿松翔, 菅原庸, 松村拓大, 藤永由佳子, 北所健悟, 「B 型ボツリヌス菌由来へマグルチニンの X 線結晶構造解析」第 36 回日本分子生物学会・2013 年 12 月 3 日, 神戸
- ② 阿松翔, 菅原庸, 松村拓大, 藤永由佳子,

北所健悟、「B型ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンのX線結晶構造解析」第66回日本細菌学会関西支部・2013年11月16日,大阪

③阿松翔,菅原庸,松村拓大,藤永由佳子,北所健悟、「A型ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンのX線結晶構造解析」第13回日本蛋白質科学会・2013年6月13日,鳥取

④浜谷俊平,神谷重樹,高橋梓,堀口安彦,北所健悟、「*Clostridium perfringens* enterotoxin 不活性型変異体D48AのX線結晶構造解析」第13回日本蛋白質科学会・2013年6月13日,鳥取

⑤阿松翔,菅原庸,松村拓大,柄谷肇,藤永由佳子,北所健悟、「B型ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンのX線結晶構造解析」第59回毒素シンポジウム・2012年8月30日,北海道

⑥阿松翔,菅原庸,松村拓大,柄谷肇,藤永由佳子,北所健悟、「B型ボツリヌス菌由来ヘマグルチニンのX線結晶構造解析」第12回日本蛋白質科学会・2012年6月20日,名古屋

⑦西村昂亮,神谷重樹,福井理,戸嶋ひろ野,安倍裕順,鎌田洋一,小西良子,山本茂貴,柄谷肇,堀口安彦,北所健悟、「ウェルシュ菌の産生する食中毒病原因子CPEの構造および機能解析」日本結晶学会・平成23年度年会および総会 2011年11月24日北海道

[その他]

ホームページ等

プレス発表

①「食中毒原因菌、タンパク質の構造解明 京都工繊大准教授ら」2011年4月19日 京都新聞 25面

<http://www.kyoto-np.co.jp/education/article/20110419000021>

②「毒素の一部の立体構造解明」2013年11月13日 京都新聞 25面

③「京都工芸繊維大・阪大、ボツリヌス菌発生関与たんぱく質の3D構造解明」2013年11月14日 日刊工業新聞 19面

<http://www.nikkan.co.jp/news/nkx102013114eaag.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北所 健悟 (KENGO KITADOKORO)

京都工芸繊維大・工芸科学研究科・准教授
研究者番号：60283587

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし