

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006 ～ 2010

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）Analyses of structure-function relationship of dermonecrotizing toxin family

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

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：パストツレラ毒素 百日咳菌壊死毒 結晶構造

## 1. 研究計画の概要

(1) 種々の粘膜上皮組織に感染する百日咳菌、大腸菌、パストツレラは実験動物に皮膚壊死を起こす壊死毒を産生する。これらの毒素は作用と構造において相互に部分的に相同性を示すため、壊死毒ファミリーとして分類されている。壊死毒ファミリーの遺伝子が粘膜上皮感染性の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、壊死毒が感染成立に重要な役割を果たしていると考えられるが、それぞれの感染病態との関係は明らかではない。本研究課題では、壊死毒ファミリーにおいて未解決な点（受容体同定、パストツレラ壊死毒の作用機序解明、全分子立体構造など）の解明をおこない、それを基盤に各毒素産生菌の感染モデルにおける毒素の動態を解析し、感染過程における毒素の役割を解明する。

(2) 本研究は、以下の方法で行ない、その成果を総合して細菌感染における各毒素の役割を解明する。

### ①各毒素の立体構造の解析

百日咳菌壊死毒 (DNT) とパストツレラ壊死毒 (PMT) の全長、および大腸菌壊死毒 (CNF) の受容体結合領域について、該当の精製標品を結晶化し、X線回折法により立体構造を決定する。

### ②各毒素の受容体同定

DNT、PMT、CNFがRho依存性情報伝達系を共通に活性化することを利用して、Rho依存性のプロモーターによるレポーター遺伝子を作製し、これをcDNAライブラリーのスクリーニング系に用いて受容体遺伝子をクローニングする。

### ③PMTの作用機序の解明

これまでに、PMTの作用機序解析に格好の細胞株を見いだした。これらの細胞株にsiRNAライブラリーを導入し、PMT不応答となる細胞を選別し、PMT作用に関与する遺伝子をクローン化する。これらの遺伝子の性状解析をもとにPMTの作用機序を解析する。立体構造の類似性から作用が予想できる場合はそのデータも活用する。

### ④細菌感染過程における毒素動態の解析

細胞レベルおよび動物レベルでの適当な感染モデルを確立し、モデルにおける細菌感染時の各毒素あるいはその機能断片の作用、消長、存在局所等を免疫学的方法その他で検出し、毒素の動態を時空間的に解析する。この際、①、②、③の計画で得られたデータを十分に活用する。また、同時に欠失変異株を用いて野性株との感染病態の異同を検討する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) パストツレラ (*Pasteurella multocida*) の産生する毒素 (PMT) の結晶構造を試みた。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、PMT活性を確認したあと結晶化し、X線構造解析の手法を用いて、結晶構造を決定した。C-PMT分子は711残基のアミノ酸を有し、N末側からそれぞれ C1, C2, C3 と名付けた3つのドメインを有していることがわかった。そのうちのC3ドメインに、チオールプロテアーゼ様の触媒中心が存在することがわかった。またC1ドメインに、毒素分子を標的細胞の細胞膜

の細胞質側にリクルートする機能があることがわかった。C1ドメインを欠失させると毒素活性が消失するので、PMTの標的分子は、細胞質膜に存在することが推測された。またC1ドメインは、リン脂質の多くと非選択的に結合することがわかった。

(2) DNTは標的細胞のフィブロネクチンに富む細胞外マトリックスに親和性を持っており、周囲のDNT濃度が低下すると毒素活性を保持したまま細胞外マトリックスから遊離することがわかった。このことから実際の感染では、感染組織の細胞外マトリックスがDNTを一時繫留することで周囲のDNT濃度を一定に保っている可能性が考えられた。この細胞外マトリックスへのDNTの結合は、DNTの標的細胞への結合とは無関係であった。一方で、DNTの作用解析の過程で、DNTの標的細胞への特異的結合が、N-末端側の30アミノ酸領域に依存することを明らかにした。現在、この30アミノ酸領域をカバーする合成ペプチドを作製し、これをプローブにした受容体の単離方法を検討中である。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

(1) パスツレラ毒素の構造を決定したことは本研究課題におけるもっとも顕著な成果に挙げられる。この結果は、細菌毒素機能に関する研究領域に有用な情報を提供し、多大な影響を与えたことは間違いない。当初の研究目標と照らしても、第一に掲げた壊死毒ファミリー毒素の構造解析の目標に合致しているもので、確実性のないタンパク質の結晶化の成否に依存する結晶構造解析計画としては、非常に順調に研究が進展したと評価できる。

(2) 毒素受容体の同定については、これまでに同定方法の条件決定に時日を費やしたが、試行錯誤の結果ある程度方法論が確立したことと、研究の副産物としてDNTの細胞外マトリックスへの結合という発見に至ることができた。

(3) PMTの作用機序に関しては、研究を進めていたところであるが残念ながら、ドイツの研究グループが結果を発表し、その後塵を拝することになった。

(4) 細菌感染過程における毒素の役割解析においては、細胞レベルについては、日常的な毒素機能の解析でデータが蓄積されており、また、動物レベルにおいても平成21年度から感染実験がスタートしており、研究期間において必ず成果が上げられるものと確信する。

### 4. 今後の研究の推進方策

パスツレラ毒素の構造決定の成果をさらに発展させ、機能ドメインの詳細な役割を解析することによって、本毒素の感染における役割の理解を図る。一方、本毒素の作用機構解析研究は、他グループによって明らかにされたので中止する。毒素受容体同定と感染モデルにおける毒素の機能解析については計画通り進行させる。これらの計画を遂行するうえで特に大きな問題はない。

### 5. 代表的な研究成果

(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) Isegawa, Y., Hara, J., Amo, K., Osugi, Y., Takemoto, M., Yamanishi, K., Fukunaga, R., Shibata, M., Ohshima, A., Horiguchi, Y., Sugimoto, N. (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(1): 15-19 (査読有り)

(2) Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii, M., Horiguchi, Y., Mizuguchi, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y., Kondoh, M. (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(8):1639-1648(査読有り)

[学会発表] (計1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 堀口安彦 (2009) 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

[図書] (計1件)

(1) 堀口安彦 医薬ジャーナル社 化学療法の領域 No. 5, パスツレラ毒素の構造と機能(2009) 82-88

[その他]

ホームページ

[http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/Horiguchis\\_Lab\\_top.html](http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/Horiguchis_Lab_top.html)