

令和元年6月13日現在

機関番号：34401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15749

研究課題名(和文)結晶構造から探るS. mutans由来新規タンパク質による病原性獲得機構の解明

研究課題名(英文)Structural analysis of collagen-binding-proteins from Streptococcus mutans

研究代表者

平田 あずみ(Hirata, Azumi)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40263587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕原因菌Streptococcus mutansが感染性心内膜炎や脳血管疾患などさまざまな全身疾患に関与し、その病原性発揮には菌体表層に発現するコラーゲン結合タンパク質Cnm/Cbmの関連性が示唆されている。本研究ではCnm/Cbmのcollagen-binding-domain (CBD)について、大量発現系・精製法を構築し、獲得できた結晶の立体構造をX線結晶構造解析によって決定した。その結果、CBDを構成するN1、Latch、N2、Linkerの4つのドメインが形成する空間のN2部分にコラーゲンが結合することが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cnm/Cbmにおいて、本研究により明らかとなったコラーゲンとの相互作用に関わる領域は、既知のコラーゲン結合タンパク質Cnaの領域と共通しており、この部位はコラーゲン結合タンパク質においてコラーゲンとの結合に関わる最も重要な部位であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Collagen-binding-proteins of Streptococcus mutans, Cnm/Cbm, have been reported to be as risk factors associated with bacteremia, cardiovascular diseases, and hemorrhagic stroke. In this study, the crystal structure of collagen-binding-domain of Cnm, Cnm30-325, was determined by molecular replacement methods, using the Cna31-344 crystal structure as a search model. The structure of collagen-binding-domain of Cbm, Cbm31-330, was modeled by SWISS-MODEL using the structure of Cnm30-325. The crystal structure of Cnm30-325 exhibits two distinct domains called N1 and N2. The structure of Cbm31-330 is very similar to the structure of Cnm30-325. N1, N2 and Linker form the hole and multiple sites in this area are related to bind to collagen, suggesting that it may be collagen-binding site.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：コラーゲン結合タンパク質 Streptococcus mutans 構造解析 機能解析

1. 研究開始当初の背景

観血的な歯科治療が誘因となり、口腔細菌が病変部組織に定着し病原性を発揮することがある。このような疾患の一つとして感染性心内膜炎が挙げられるが、その病原メカニズムの詳細は明らかではない。2004年、血清型 *f* 型 *Streptococcus mutans* においてコラーゲン結合タンパク質 Cnm が同定され、感染性心内膜炎の病原因子の一つとして報告された。一方、研究分担者 野村らのグループでは新規血清型株 *k* 型 *S. mutans* を発見し、この菌株が非常に高い病原性を獲得していることを明らかにし (J Clin Microbiol, 2004)、*k* 型 *S. mutans* が Cnm を介して出血性脳卒中に関連することをも報告した (Nat Commun, 2011)。さらに、野村らは Cnm とは異なる新規コラーゲン結合タンパク質 Cbm が *k* 型株に存在することを発見し (Molecular Oral Microbiol, 2012)、*k* 型 *S. mutans* の Cbm 産生と潰瘍性大腸炎の発症リスクとの関連性を報告した (Sci Rep 2, 2012)。これらのことより、*S. mutans* が病変部に定着し病原性を発揮するためには、コラーゲン結合タンパク質が必須であることが推察されている。しかしながら、Cnm や Cbm の構造や機能、Cnm・Cbm とコラーゲンの結合を制御するメカニズムについては不明のままである。

2. 研究の目的

Cnm・Cbm の各機能ドメインや変異体のリコンビナントタンパク質を発現・精製・結晶化し、これらの構造機能解析を行い、Cnm・Cbm の機能やコラーゲンとの結合機構・相互作用に関する新たな知見を得ることを第一の目的とする。第二の目的として、得られたタンパク質の細胞組織内動態を解析するため、各タンパク質吸着ビーズをラット歯髄に埋入した *in vivo* モデルを作製・解析する。これらにより、コラーゲン結合タンパク質の化学的な性質とこのタンパク質が関わる生理現象とを結びつけ、病原性獲得のためのコラーゲン結合タンパク質の機能を構造生命科学的に解明することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

- (1) Cnm・Cbm の各機能ドメインあるいは変異体の発現・精製法の確立
- (2) 回収した各タンパク質の①結晶化②コラーゲンとの共結晶化③結晶の構造解析
- (3) collagen-binding assay による各タンパク質とコラーゲンとの結合能評価
- (4) Cnm・Cbm 吸着ビーズをラット歯髄に埋入した *in vivo* モデルの作製

4. 研究成果

- (1) Cnm・Cbm、各機能ドメインあるいは変異体の発現・精製

① *cnm*, *cbm* 遺伝子が挿入された pET28-a を鋳型とし、Cnm・Cbm それぞれの発現用プラスミドを PCR、ライゲーションにより構築した。作製した発現用プラスミドにより形質転換した大腸菌 BL21-codonPlus(DE3)-RIL あるいは BL21-codonPlus(DE3) を用い、各種目的タンパク質を大量発現した。

② 精製には Ni Sepharose6Fast Flow とゲルろ過クロマトグラフィーあるいは Glutathione Sepharose 4B カラムによるアフィニティークロマトグラフィーを用い、目的タンパク質を回収した。SDS-PAGE により Cnm および Cbm それぞれの単一バンドを得た (Fig. 1)。1L 培養から Cnm 11.4 mg、Cbm 18 mg の精製タンパク質を得ることに成功した。

- (2) 回収した各タンパク質の①結晶化②コラーゲンとの共結晶化③結晶の構造解析

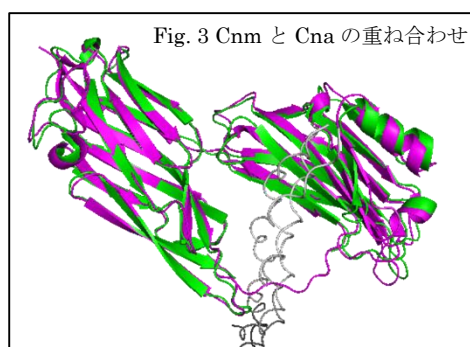
① 結晶化条件の探索：精製・濃縮した Cnm・Cbm を用いてシッティンゲドロップ蒸気拡散法により結晶化を行い、プレート

静置から 3 日目に回折に適した結晶を得た (Fig. 2)。

Fig. 1 SDS-PAGE

② コラーゲンとの共結晶化は今後の課題とした。

③ 結晶構造解析：SPRING-8 にて波長 1 Å で Fig. 2 の結晶の X 線回折データを収集した。*Staphylococcus aureus* 由来コラーゲン結合タンパク質 Cna (PDB code: 2F68) を鋳型に、MOLREP による分子



置換法により初期分子モデルを構築し、精密化を行った。データ収集および精密化の統計値は Table 1 および Table 2 に示す。タンパク質構造の図は PyMol を用いて作製した。

Cnm と Cna の重ね合わせ (Fig. 3)

から構造は非常に似ていることが明らかとなった (RMSD 値=1.213 Å)。

N1, N2 ドメインおよび Linker で囲まれたコラーゲンの配置部の空間は直径 20 Å であった。コラーゲン様ペプチドの幅径は約 10 Å であったので、この空間

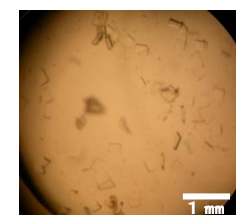
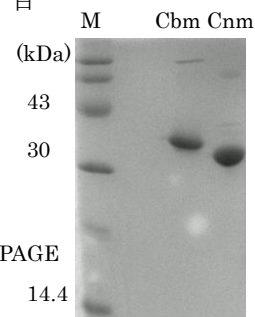


Fig. 2 Cnm の結晶

には 1 ないし 2 つのコラーゲンが入ることができると考えられた。

Table 1. data collection

Crystallographic data	
Beam line	BL41XU
Wavelength (Å)	1.0
Resolution (Å)	50.0-1.81
space group	P4
Unit-cell parameters (Å, °)	a = b = 40.91, c = 364.89 α = β = γ = 90
Completeness (%)	99.40
Mosaicity	0.29-0.51
R _{factor}	0.845

Table 2. Refinement statistics

	Cnm_N1-N2~	Cna_N1-N2~ (2F68)	Cna_N1-N2~collagen complex (2F6A)
space group	P4 ₁ 2 ₁ 1	P12 ₁ 1	C222 ₁
Unit-cell parameters (Å, °)	a = b = 40.91 c = 364.89 α = β = γ = 90°	a = 41.98, b = 116.44 c = 44.08 α = γ = 90, β = 116.44	a = 90.55, b = 193.82 c = 205.19 α = β = γ = 90
Resolution (Å)	45.81-1.81	52.00-1.95	50.00-3.29
Completeness (%)	99.4	95.8	94.3
R _{work}	0.209	0.195	0.252
R _{free}	0.257	0.253	0.308

また、Cnm と Cbm および Cna についてコラーゲンと相互作用しうる部位を各ドメインに見つけることができた。その一例を Fig. 4 に示す。この部位は Linker と N2 ドメインの境目にあたり、Y175 および F191 はそれぞれコラーゲン内の別のプロリンとスタッキングによって相互作用することが示唆されている。この領域において相互作用に関わる部位は Cna, Cnm, Cbm で共通しており、コラーゲン結合タンパク質において Y175 と F191 が結合に関わる最も重要な部位である可能性が高いと考えられた。

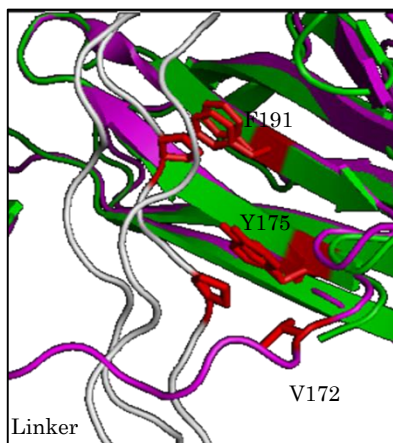


Fig. 4 Cnm, Cna とコラーゲンの相互作用部位

また、Linker 内の V172 も Y175 とともにコラーゲンのプロリンと相互作用しうる位置に存在し、かつ Cna, Cnm, Cbm で共通していることから、V172 も結合に関わると考えられた。

一方、IgG fold をとることが知られている Cbm の N1 ドメインと N2 ドメインを重ね合わせたところ、二次構造の位置はおおむね一致した (Fig. 5)。



Fig. 5 Cbm の N1 ドメイン (緑) と N2 ドメイン (黄) の重ね合わせ

(3) collagen-binding assay による Cnm・Cbm とコラーゲンの結合活性

ELISA 法により Cnm・Cbm と collagen type I との結合活性について検討した。フィッティングカーブの作成と K_D 値の算出は SigmaPlot にて行った (Fig. 6)。K_D 値の算出には次の計算式を用いた。

$$y = \frac{B_{max} \cdot x}{K_D + x}$$

なお、x: タンパク質濃度、y: Abs₄₅₀、B_{max}:最大プラトー値、K_D:平行解離定数と定義した。

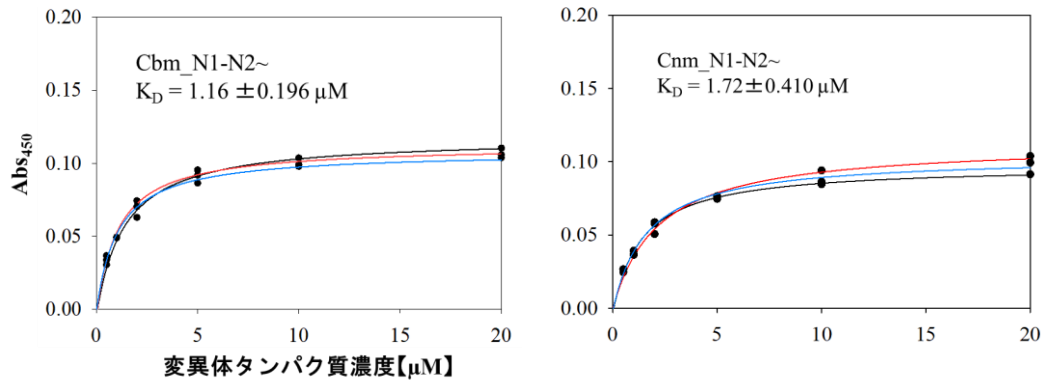


Fig. 6 Cbm・Cnm と collagen type I との結合活性および K_D 値

K_D 値の比較より、Cbm の方が Cnm よりもやや高い結合活性を示した。*S. mutans* 菌と collagen type I との結合能を比較した報告（阪大歯学誌, 2017）では、Cbm 陽性菌株が Cnm 陽性菌株に比して有意に高い結合能を示すとされており、この要因がコラーゲン結合タンパク質にある可能性が、本研究の結果より推察された。

(4) Cnm・Cbm 吸着ビーズをラット歯髄に埋入した in vivo モデルの作製

露髄させた第一臼歯歯髄腔にビーズを埋入後、経時的に歯髄・歯質・歯周組織について CT および組織学的検討を行った。ビーズ埋入後 28 日目までの CT 像では時間の経過とともに、歯髄腔内に不透過像を認めるようになった。Cnm・Cbm に先立ち、BIO を吸着させたビーズを第一臼歯歯髄腔に埋入後、経時的に歯髄の CT および組織学的観察を行った。CT 像では時間の経過とともに、歯髄腔中心部付近に不透過像を認めるようになった。組織学的所見としては、初期にはビーズは線維性結合組織内に観察され、14 日目ではビーズから少し離れた細胞に PCNA 陽性反応が確認され、さらに 28 日目には修復象牙質様の硬組織がビーズから離れた歯髄中心部領域に観察された。これらのことより、ビーズから徐放された BIO により歯髄腔内に存在する歯髄幹細胞の移動・増殖や、硬組織形成細胞への分化をコントロールした可能性が推察された (Fig. 7)。

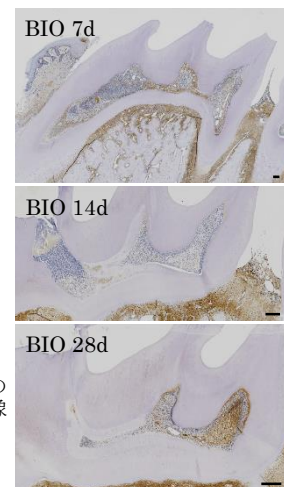


Fig. 7 BIO ビーズ埋入後のラット第一臼歯歯髄組織像 (Bar = 200 μ m)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Goldberg M, Hirata A. The Dental Pulp: Composition, Properties and Functions. JSM Dent. 2017; 5: e1079. 査読有.

https://pdfs.semanticscholar.org/4616/56a173f39384f1e925f763871ecfcb03a7b8.pdf?_ga=2.79770964.2111110843.1558572083-917252255.1557733358

[学会発表] (計 1 件)

① Goldberg M, Hirata A. Axial and lateral sliding of pulp stem cells: odontoblast migration and terminal differentiation. The 3rd International Conference on Dental and Craniofacial Stem Cells Paris, France, 26 October 2016.

[その他]

ホームページ等

<https://www.osaka-med.ac.jp/deps/an1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：野村 良太

ローマ字氏名：(NOMURA, Ryota)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：90437385

研究分担者氏名：高野 和文

ローマ字氏名：(TAKANO, Kazufumi)

所属研究機関名：京都府立大学

部局名：生命環境科学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：40346185

(2)研究協力者

海外共同研究者氏名：Goldberg, Michel

ローマ字氏名：(GOLDBERG, Michel)

所属研究機関名：Université Paris Descartes

部局名：INSERM UMR-S 1124・Biomédicale des Saints Pères

職名：Professeur Emerite

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。