

令和元年6月3日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14048

研究課題名(和文)分子スイッチ能を有する毒素を利用した新規なセシウムイオン捕捉剤の作製

研究課題名(英文)Structural studies of a new cesium ion scavenger using a toxin having molecular switch ability

研究代表者

北所 健悟 (Kengo, Kitadokoro)

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：60283587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射性セシウムの効率的な除去は急務な課題である。タンパク質がセシウムイオンと結合する性質を利用した除去剤の開発例は未だにない。申請者が構造解析したウエルシュ菌毒素(CPE)の構造は、3量体の中心に2つの金属イオン結合部位を持つ。立体構造解明により、3量体の分子中央に負の電荷をもつグルタミン酸が3個ずつ集まってできたグルタミン酸クラスターが2つあることを見出した。このクラスターに金属イオンがそれぞれ配位することがわかった。本研究では、この毒素の特徴を利用して、セシウムイオンを捕捉する分子ピンセットの作製を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

データ測定の結果、いずれの変異体CPEにおいても約2.3 分解能の回折データを収集出来た。今回、9種類の変異体帯を作成し、すべての変異体について結晶化を行い、構造決定し、構造精密化を行った。CPE-E94D(不活型含む)及びCPE-D48A-E110D(不活型のみ)については、結晶構造解析ならびにXAFS解析の両方でセシウムの結合を確認できた。XAFS解析の結果、結合している分子がセシウムであると確認できた。また、クラスター部分のアミノ酸が結合する金属イオンが、変異体の種類によって変化する可能性があることが示唆された

研究成果の概要(英文)：The effective removal of the radio cesium is the problem that is urgent issues. There is not yet the development example of the remover using the property that protein couples with a cesium ion. The structure of the bacteria toxin (CPE) that an applicant analyzed structure has two metal ions binding sites in the center of the trimer. It was found that there were two glutamate clusters which have negative electric charge gathered in the molecular center of the trimer by 3D structure determination. It was revealed that these clusters have ability of various metal ions binding. It was suggested that this glutamate cluster is available to removing the cesium ion, and in this study, by using quick change methods of PCR, it was succeeded to make various mutant proteins for increasing the cesium binding property, and it was proved that some mutants can bind the cesium ion in this cluster.

研究分野：構造生物化学

キーワード：毒素 セシウム結合タンパク質 X線構造解析 XSAFS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

東京電力福島第一原子力発電所事故によって放出された放射性セシウムを分離し、汚染水を軽減することは社会的に重要で急務なテーマである。また学術的に放射性セシウムの生物への影響を究明するために、タンパク質とセシウムイオンの原子レベルでの相互作用を解明することは必須である。

申請者らは食中毒の病原因子であるウェルシュ菌腸管毒素の立体構造を世界で初めて解明した。(Crystal Structure of *Clostridium perfringens* Enterotoxin Displays Features of {beta}-Pore-forming Toxins. Kitadokoro K. et al., *J. Biol. Chem.*, 286, 19549, (2011)).

この毒素は4 量体として存在する。立体構造解明により、3量体の分子中央に負の電荷をもつグルタミン酸が3個ずつ集まってできたグルタミン酸クラスターが2つあることを見出した。このクラスターに金属イオンがそれぞれ配位することがわかった。

食中毒の原因菌であるウェルシュ菌は、人や動物の腸管、土壌、水中など自然界に広く分布している。この細菌が産生する食中毒病原因子がウェルシュ菌エンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin : CPE) である。CPE は、アミノ酸 319 残基、分子量約 35 kDa のタンパク質で、N 末端側の細胞障害領域と C 末端側の受容体結合領域からなる。CPE の全長の立体構造は、本研究室で構造解析により既に解明されており、結晶中で3量体構造を形成している。3量体中心には2つの金属結合サイトがあり、それぞれ三つのグルタミン酸で構成されたグルタミン酸クラスターであり、種々の金属イオンが結合することを確認している。本研究では、PCR を用いたクイックチェンジ法により、部位特異的変異を導入し、クラスター部分の Glu94 と Glu110 を Asp や Gly に置換した変異体、また毒素活性に最も重要な残基であることが知られている Asp48 を Ala に置換した不活型変異体を作製した。この不活型変異体 CPE の内、クラスター部位の Asp 変異体が、セシウムイオンと特異的に結合することを、X 線結晶構造解析及び XAFS (X 線吸収微細構造) 解析で確認した。これにより、不活型毒素を使ったセシウムイオン捕捉剤の創製を研究の目的とした。

### 2. 研究の目的

放射性セシウムの効率的な除去は急務な課題である。タンパク質がセシウムイオンと結合する性質を利用した除去剤の開発例は未だにない。申請者は、世界で初めてウェルシュ菌由来腸管毒素の立体構造を決定した。この毒素は4 量体を形成し、その構造から3量体の中心に2つの金属イオン結合部位を持つことを発見した。本研究では、この毒素の特徴を利用して、セシウムイオンを捕捉する分子ピンセットの作製を目的とする。このためウェルシュ菌毒素とセシウムイオンの結合様式を、X 線構造解析並びに X 線吸収微細構造(XAFS)の手法を用いて解明する。更にこの毒素タンパク質にアミノ酸変異を導入することで、よりセシウム除去能が高いセシウム結合タンパク質の創製を試みる。

### 3. 研究の方法

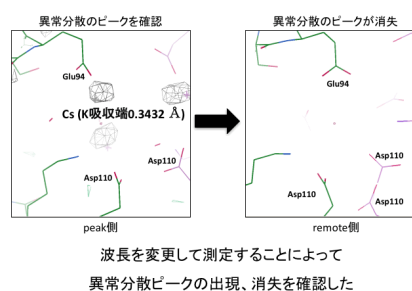
この計画研究では、ウェルシュ菌毒素とセシウムイオンとの結合様式を明らかとするために、X 線構造解析と XAFS の手法を使って解明する。研究計画の進め方として、ウェルシュ菌毒素の結晶化を行い、浸透法によりセシウムイオンを結合させる。セシウムとの複合体の結晶の X 線回折データを測定し、電子密度を確認する。SPring-8 で XAFS を測定する。波長が 0.35 Å 付近なので高エネルギーモードで測定する。

ウエルシュ菌毒素変異体を作製し、よりセシウムイオン結合能の高い毒素を創製する。

#### 4. 研究成果

本研究では、PCRを用いたクイックチェンジ法により、CPEに部位特異的変異を導入し、クラスター部分のGlu94とGlu110をAspやGlyに置換した変異体、また毒素活性に最も重要な残基であることが知られているAsp48をAlaに置換したCPEの不活型変異体を作製した。この不活型変異体CPEの内、クラスター部位のAsp変異体が、セシウムイオンと特異的に結合することを、X線結晶構造解析及びXAFS(X線吸収微細構造)解析で確認した。これにより、不活型毒素を使ったセシウムイオン捕捉剤を創製することができた。データ測定の結果、いずれの変異体CPEにおいても約2.3 Å分解能の回折データを収集出来た。CPE-E94D(不活型含む)及びCPE-D48A-E110D(不活型のみ)については、結晶構造解析ならびにXAFS解析の両方でセシウムの結合を確認できた。XAFS解析のedge部分を挟んで左のpeak側と右のremote側の両側の波長で、回折データ測定をした結果、peak側でセシウムの異常分散ピークを確認でき、remote側で異常分散ピークが消えていることから、結合している分子がセシウムであることを証明できた。また、クラスター部分のアミノ酸が結合する金属イオンが、変異体の種類によって変化する可能性があることが示唆された。

#### CPE-D48A-E110Dの異常分散ピーク



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1) Structural insights into the unique polylactate-degrading mechanism of *Thermobifida alba* cutinase.

**Kitadokoro K**, Kakara M, Matsui S, Osokoshi R, Thumarat U, Kawai F, Kamitani S.

*FEBS J.* 2019 Feb 14. doi: 10.1111/febs.14781.

2) Significance of a histone-like protein with its native structure for the diagnosis of asymptomatic tuberculosis.

Ohara Y, Ozeki Y, Tateishi Y, Mashima T, Arisaka F, Tsunaka Y, Fujiwara Y, Nishiyama A, Yoshida Y, **Kitadokoro K**, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawa I, Maekura R, Yamamoto S, Katahira M, Matsumoto S. *PLoS One.*, 13, :e0204160 (2018). doi: 10.1371/journal.pone.0204160. eCollection 2018.

3) *Staphylococcus aureus* lipase: purification, kinetic characterization, crystallization and crystallographic study.

Tanaka M, Kamitani S, **Kitadokoro K**. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 74, pp. 567-570. (2018) doi: 10.1107/S2053230X18010506.

4) Expression, purification and and crystallization of thermostable mutant of cutinase Est1 from *Thermobifida alba*. **Kitadokoro K**, Matsui S, Osokoshi R, Nakata K, Kamitani S. *Adv. Biosci. Biotech.* 9, PP. 215-223 (2018)

10.4236/abb.2018.95015

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。