

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14897

研究課題名(和文)細胞特異的なバレル膜孔形成タンパク質性ナノツール設計の分子・構造基盤の確立

研究課題名(英文)Molecular and structural basis of beta-barrel membrane pore-forming proteins for design of cell-specific nanotools.

研究代表者

金子 淳 (Kaneko, Jun)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30221188

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)：黄色ブドウ球菌のバレル膜孔形成毒素の分子機構を追求した。細胞特異性では、2成分性ヘモリジンのHlg2成分、LukEDのLukE成分が膜孔形成時に標的細胞と接する4つのループ構造のうち、loop4が赤血球認識に重要であり、loop1と2が補助的に働くことを見出した。ヘモリジンのprestem解放には、LukFでprestemを保持に関わるcap領域のAspと、膜孔形成で隣接するHlg2cap部位の塩基性アミノ酸との相互作用が関わることを見出した。さらにstemの膜挿入に関わる残基の探索のため、ヘモリジンのcapとstemにCysを導入しprestem解放を調節できる評価系を構築した。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanism of beta-barrel membrane pore-forming toxin of *Staphylococcus aureus* was investigated. In target cell specificity, loop 4 of Hlg2 and LukE rim domain, which contacts with host cell surface, was essential to binding to human erythrocytes, and loop1 and 2 were found to be assisting the binding. We also found that the interaction between Asp in the cap region involved in the prestem retention in LukF and basic amino acids in the adjacent Hlg2 cap site by membrane pore formation involved in the prestem release of α -hemolysin. Furthermore, double cysteine mutant of α -hemolysin capable of regulating the release of prestem was constructed. Using this system, now the residues involved in the stem insertion are being analyzed.

研究分野：分子生物学・細菌学

キーワード：-PFTs 膜孔形成機構

1. 研究開始当初の背景

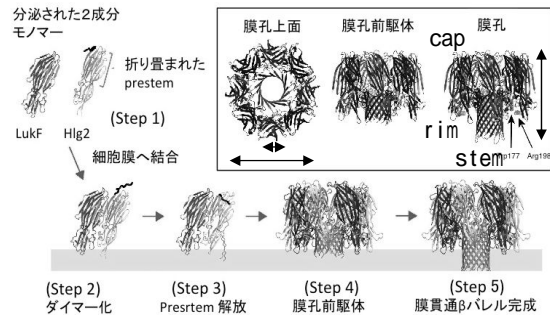
黄色ブドウ球菌は2種類のバレル膜孔形成毒素(-barrel pore forming toxin; -PFT)を産生する。1成分性のヘモリジン(HIa)は菌体から分泌された親水性の単一タンパク質が標的細胞膜を貫通する内径2-3 nmの7量体膜孔を形成する。一方申請者らは2成分性のヘモリジン(HIg)/ロイコシジン(Luk)はそれぞれ2成分が協調して作動して赤血球/白血球を特異的に認識し、細胞膜上に2成分を1:1で含む膜孔を形成することを解明してきた。黄色ブドウ球菌の2成分性-PFTのうち、HIgとLukはLukF成分(F成分)を共通成分とし、S成分として赤血球を認識できるHIg2成分とともに作用すると赤血球溶血活性を(HIg)赤血球を認識できないLukS成分とともに作用するとロイコシジン活性を發揮する(Luk)。また一部の株はHIg/Lukに加えて、Panton-Valentineロイコシジン(PVL; LukF-PVとLukS-PV)やLukED(LukEとLukD)などLukバリエーションを持つ。

-PFTモノマー(毒素成分)は細菌から可溶性タンパク質として分泌され、標的細胞膜上でマッシュルーム型の膜孔を形成する。すなわち標的細胞膜外には頂部(cap)と縁部(rim)でリング状複合体を形成して、rim底部で標的細胞膜に接している。そこからバレルの茎部(stem)が標的細胞膜を貫通している(図)。

これまでに我々はHIaが結晶化溶媒中において細胞膜非存在下で「自律的」に集合し膜孔を形成することを初めて証明し、同様にHIgの2成分の8量体バレル膜孔の構造を世界に先駆けて明らかにした。さらに、リング状膜孔前駆体を留まる変異体の構造を解析し、膜孔形成時にバレルが2段階に伸展して膜を貫通するモデルを提唱した。また、HIaでもこの2段階伸展を証明した。

2成分性であるHIgの膜孔形成機構は以下の5つのstepからなる(図参照)。(Step 1) LukF及びHIg2成分が標的細胞膜を認識して結合する。(Step 2) 標的膜上でF成分とS成分がヘテロダイマーを形成する。(Step 3) リング状複合体を形成する過程

で、モノマー上では折り畳まれて保持されているstem (prestem)を解放する。(Step 4) stemが標的細胞膜外でバレル形成を開始する。(Step 5) stem先端が細胞膜に挿入されバレルが完成する。



本研究の開始時点で、各stepに関わる毒素タンパク質側の因子について我々が得ていた情報は以下の通りである。

Step 1ではLukFのrimドメイン底部には細胞膜ホスファチジルコリン及びスフィンゴミエリンのコリン頭部に結合する領域や血球結合に関与する芳香属アミノ酸を含む、複数のループ構造が存在すること。Step 2では、両成分で細胞膜には結合できるが、標的膜上でヘテロダイマーを形成できない1アミノ酸変異体を取得していること。Step 3では、HIaのN-末端のamino-latchがstem解放に関わるに対し、HIgではLukFのN-末端の欠失やGSTとの融合は溶血活性に影響しないこと。Step 4ではLukFのW177/R198変異体はホスファチジルコリン結合能が低下し、膜孔が貫通しない中間体を形成すること、である。特にLukF W177/R198変異体がHIg2とともに形成するバレル形成が途中で(膜に侵入する前で)留まる、膜孔中間体の解析成功は、Step 5で形成される膜孔のLukFとHIg2それぞれ4分子が「交互」に並んだ8量体の膜孔構造の解明とともに、前述の膜孔形成モデル確立に大きく貢献した。

以上の事実は、-PFTのモノマータンパク質中にはこれらの過程をへて膜孔を形成するための情報がアミノ酸配列として全て備わっていることを示している。そこで、細菌が分泌した可溶性の-PFTモノマーが細胞選択に結合する機構、モノマーが集合してprestemを解放する機構、ダイナミックなコンフォメーション

変化を伴い stem を細胞膜に挿入してバレルを完成させるために必須な機構を解明することで、細胞選択的にナノサイズ膜孔を形成する毒素タンパク質の分子設計に応用できると発想した。

2. 研究の目的

本研究は黄色ブドウ球菌が産生する2成分性 α -PFT (Hlg/Luk) とそのバリエーションである LukED と PVL の成分、及び1成分性の Hla を駆使し、毒素の血球特異的な自律的 バレル形成機構を解明する。

膜孔毒素タンパク質が備えている、リング状前駆体形成、prestem の解放、バレルの二段階の伸展と細胞膜への挿入からなる膜孔形成能力の分子機構を解明する(Step2~4)。さらに毒素の細胞選択的認識機構の詳細の解析(step1)の成果と合わせて毒素タンパク質の分子設計に応用し、細胞選択的にナノサイズ膜孔を形成するナノツール/構造材料開発の基盤を構築する。

3. 研究の方法

目的では萌芽研究として新規度の高い順に実験を記載したが、以降は膜孔形成 step の順に記す。

(1) S 成分が標的細胞膜の認識機構の解明(Step 1)

ヒト赤血球を認識する Hlg2 成分と、ロイコシジンバリエーションのうちヒト赤血球崩壊活性の報告がある LukE 成分、及びヒト白血球特異的な PVL の LukS-PV の発現プラスミドをもとに、それぞれの rim ドメイン底部の4つのループ領域のアミノ酸を交換した種々の変異体をクイックチェンジ法で構築した。溶血活性はヒト赤血球を用いて測定し、ヒト赤血球への変異 S 成分の結合は特異抗体を用いたウエスタンブロットで定量化した。

一方で最近、S 成分の標的細胞側の相互作用因子として7回膜貫通型サイトカインレセプターが注目されている。それらのうち、LukE のヒトリンパ球レセプターとなる CCR5 を介した細胞障害性への各変異体の影響を、共同研究を行なって

いる小野薬品工業が保有するヒト CCR5 発現マウス培養細胞を用いて評価した。

(2) モノマーにおける折り畳まれている prestem の保持および標的膜上での prestem 解放に関わる分子内因子の解析 (Step 2~3)

Hla のモノマー分子では、折り畳まれた prestem は cap 部の Asp と stem の Tyr の水素結合がにより保持されている。モノマーにおける prestem 保持に関わる残基は LukF では D44-Y117 として、Hlg2 では D38-Y111 として保存されている。ここでは、LukF と Hlg2 モノマーにおける prestem 保持の水素結合の破壊に関わる因子として、膜孔形成時に隣接するプロトマーにおいて当該 D 残基と近接する残基に注目し、クイックチェンジで残基を置換した変異体を作成した。ヒト赤血球に対する溶血活性及び血球膜への結合の評価は(1)と同様に解析した。さらに バレルを形成した膜孔の存在は、4-20%のグラジエントゲルを用いた SDS-PAGE で分画後、特異抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。コントロールとして LukF の stem と cap に Cys を導入し、prestem を固定できる変異体を用いた。

(3) stem が二段階に伸展し、細胞膜に挿入されて バレル膜孔が形成するために必須な分子内因子の探索 (Step 4~5)

1 段目の短い バレルを持つ「膜孔中間体」を形成する LukF-WR 変異は HlaWR 変異でも同様に作動することから Hla を用いて解析を試みた。pET ベクターに C-末端に(His)₆ タグを融合する形で Hla 遺伝子を導入し、野生型 Hla の発現株を得た。これを鋳型として(1)と同様にクイックチェンジで変異を導入した。stem での変異のうち、(2)で示した stem 保持機構が破壊され、毒素成分の細胞膜への吸着に影響するのを防ぐため、LukF で開発した cap と stem の2箇所に Cys を導入して、stem 解放を人為的に制御できる「cap-stem 変異体」を用いた解析系を Hla に導入した。活性測定にはウサギ赤血球を用い、ステム解放にはメルカプトエタノール(20 mM)を添加した。

4. 研究成果

(1) S成分が標的細胞膜の認識機構の解明(Step 1)

2成分性 -PFTは、F成分とS成分が協調してバレル膜孔を形成する。HlgとLukではLukF(F成分)が共通成分であり、S成分であるHlg2及びLukSの標的赤血球への結合が赤血球認識に關与する。HlgではLukFの赤血球膜上への初発の結合がHlg2の結合を促す一方、LukではLukSはLukFの存在の有無に関わらず白血球に結合するという特徴が有る。

ロイコシジンバリエーションを含め、黄色ブドウ球菌の2成分性 -PFTのF成分間ではLukFのrimドメイン底部には細胞膜表層のコリン頭部結合部位などを構成する複数のループを含め、アミノ酸配列の全体に渡って保存性は高い。一方S成分間も70~80%の高いアミノ酸配列相同性があるが、rimドメイン底部の4つのループ領域の相同性は明らかに低かった。例えばHlg2ではloop1はLys 64-Tyr67間に、Loop2はAsn167-Gly168間に、Loop3はPro182-Ala187間に、Loop4はVal240-Arg244に相当した。さらにLukFで細胞膜結合に必須なTyr72とPhe260、Tyr261はそれぞれLukFのloop1とloop4に位置したことから、細胞特異性を担うS成分の細胞認識はrimドメイン底部に存在するループのアミノ酸配列の違いが關与していると考えた。

そこでまず、ヒト赤血球を認識できるHlg2と、ヒト白血球に特異的に作用し赤血球は認識できないPLVのS成分であるLukS-PVの各loop部位を置換した変異体を構築し、LukFと共に赤血球に作用させて溶血活性に与える影響を解析した。10⁸ cellsの赤血球に対してLukFとHlg2を等量(5 pmol)添加し、37℃で10分インキュベートすると完全溶血する。同条件でHlg2のloop4をLukS-PV型に置換した変異体では溶血活性は失われ、毒素濃度を上げて活性を示さなかった。さらにLoop4を構成する5残基うちRHRという塩基性アミノ酸クラスターが溶血活性に重要であることが明らかになった。一方Hlg2のloop1、loop2の置換では5 pmolでは溶血活性はそれぞれ50%、80%に減少

したが、毒素量を増やすことで完全溶血に達し、またloop1とloop2の二重変異体では5 pmolで約20%にまで減少した。これらの溶血活性の減少はHlg2の結合量の減少と關与していたことから、Hlg2の赤血球認識にはloop4の塩基性残基の存在が必須であり、loop1と2は補助的に作用することが明らかになった。Loop3には2つのProが含まれている。それらが失われる置換体はCDスペクトルが野生型と大きく変化して活性が失われたのに対し、Pro除いた残基を置換した変異体は結合能と溶血活性を保持していた。

一方、ヒト赤血球に対して弱い溶血活性を示すロイコシジンバリエーション LukEDも同様に解析した。10⁸ cellsの赤血球に対してLukD(F成分)とLukE(S成分)を各100 pmol添加し、37℃で1時間インキュベートすると約80%溶血に達した。この条件を基準として、LukEのrimドメインの4箇所のloopをLukS-PV型に置換した変異体の活性をLukDとともに解析した。その結果、やはりLoop4の置換で結合量が激減し、溶血活性を失った。Loop1、2の置換は単独でも赤血球への結合量が30%程度に減少し、溶血活性は10%程度にまで減少した。以上から、LukEでの赤血球結合にloop4が必須であること、loop1、2の働きは補助的だが、その關与がHlg2より強いことが示唆された。また、loop3の置換はHlg2と同様、結合量、活性とも影響しなかった。

ところで、共にヒト赤血球を認識するHlg2とLukEであるが、rimの各loopを構成するアミノ酸が異なっている。そこで両者のLoop4を交換した変異体を構築し、溶血活性を検討した。LukEのloop4をHlg2型に置換した変異体はLukDとともに作用させたところ赤血球への結合と溶血活性は失われたが、LukFと共に作用させると結合量が約30%に回復し、弱い溶血活性を示した。逆にHlg2のloop4をLukE型に置換した変異体をLukFとともに作用させた場合完全溶血に20 pmol/10⁸ cellsの濃度を要したが、LukDを用いた場合は80 pmolとさらに高濃度を要した。

以上の結果、Hlg2とLukEはともにヒ

ト赤血球認識に Loop4 が必須であるが、その働きは両者間では完全に互換ではないことが示唆された。両者は同じ赤血球膜上の DARC をレセプターとして認識するという報告があり、両成分の認識機構の違いを解明するためには、レセプタータンパク質との結合様式を立体構造レベルで解析する必要がある。さらに F 成分が血球特異的溶血活性に影響することも初めて明らかになり、今後の 2 成分性 -PFT の作用機構の全貌を解明する上で重要な研究課題となった。

本成果は J. Biochemistry で公表した。

(2) モノマーにおける折り畳まれている prestem の保持および標的膜上での prestem 解放に関わる分子内因子の解析 (Step 2~3)

我々は 1 成分性である ヘモリジンモノマーでは prestem が内部の Y118 と cap domain の D45 との水素結合で保持されていること、7 量体膜孔形成時に N-末端の Amino-latch と名付けた領域が、隣接したモノマーの D45-Y118 間の水素結合に割って入ることが伸長開始のスイッチとなることを見出した。一方、2 成分性の Hlg では、LukF の N-末端領域を 17 残基欠失しても、GST を融合させても溶血活性を保持しており、2 成分性 -PFT の prestem の解放機構は Hla とは異なると考えられた。折り畳まれた prestem の保持機構に関わる Asp 残基はすべての 2 成分性 -PFT でも保存されており、LukF では D44 が、Hlg2 では D38 が該当する。

本研究では、LukF と Hlg2 それぞれで prestem の保持に関わっていた Asp 残基と膜孔形成した時点で近接する隣のプロトマーの残基に注目し、stem 伸長のスイッチの特定を試みた。Hlg 膜孔中には 2 種の異なる境界面が存在するが、Interface 1 では LukF の D44, D48 と Hlg2 の K15, R16 が、Hlg2 の D38 は Interface 2 で LukF の K21 がそれぞれ近接しており、これらの Asp と残基と隣接成分の当該塩基性残基がイオン結合できる位置にある。これらの事実から、モノマー中で水素結合により prestem を固定している Asp 残基が、リング形成によって隣接した塩基

性残基とともにより強度の高い塩橋を形成することが Hlg の prestem 解放に関与するという作業仮説を立てた。

そこで、当該塩基性残基を Ala に置換した Hlg2 の K15A, R16A, K15A/R16A の各変異体を構築し、 10^8 cells のヒト赤血球に対して等量 (5 pmol) の LukF とともに添加し、37 °C で 10 分インキュベートして溶血活性に与える影響を検討した。K15A, R16A の各単独変異体は 5 pmol で 30% 程度の結合を保持していたが、溶血活性は見られなかった。毒素濃度を上げると結合量の増加に伴い溶血活性も回復した。ところが K15A/R16A 二重変異体は 50 pmol の毒素量では完全溶血時と同等の結合量を示したが、全く溶血活性を示さなかった。さらに各変異体の膜孔形成能を解析したところ、K15A, R16A では毒素量の増加に伴い膜孔複合体の量が増加し、溶血活性を示した。一方、K15A/R16A 二重変異体では 50 pmol でも膜孔複合体が検出できなかった。これら結果から、LukF の prestem を固定する D44 が隣接する Hlg2 の塩基性残基とイオン結合ができず、prestem が解放されないために、それが障害となり膜孔複合体が形成されないと考えた。そこで Cys を LukF の stem (T137C) と cap (V13C) に導入し、prestem を固定した変異体と比較した (LukF CS)。LukF CS はメルカプトエタノール非存在下では prestem が解放せず膜孔複合体を形成できないが、20 mMメルカプトエタノールの添加で prestem が解放され、膜孔を形成する。K15A/R16A 二重変異体の挙動は前者と一致していた。以上から、Hlg2 の K15, R16 の 2 つの残基が、隣接する LukF の prestem の保持に関わる D44 と近傍の D48 とイオン結合を形成することが LukF の stem 解放に関与することを示した。これは K15, R16 を含む cap のループの形状変化と stem 解放と関連するという予想とも合致した。一方、LukF K21A 変異体は WT と同等の性質を示したことから、Hlg2 の stem の解放が LukF と同調する機構が存在すると考えられる。

本成果は Toxicon に投稿し、4 月 25 日付で major revision と判定された。現在再投稿したところである。

(3) stem が2段階に伸展し、細胞膜に挿入されて バレル膜孔が形成するために必須な分子内因子の探索 (Step 4~5)

我々はLukFのrimに存在しコリン結合部位を形成する W177/R198 の変異体が膜への貫入直前で バレル形成が止まる膜孔中間体を形成すること、Hla の rim に存在する W179/R200 の変異も同様に影響することを見いだした。Hlg 及び HLa の膜孔構造から、LukF の W177(Hla の Y179) は部分的に伸長した一段目の バレルの先端近くに位置していることから、さらに複数の Gly 残基を含む柔軟な バレル先端が細胞膜に侵入する過程に、stem に近い当該 Trp 残基と stem 上の残基の間での相互作用が関わっていると推測した。

そこで本研究では HLa を用いて当該領域のアミノ酸変異体の溶血活性と膜への結合性を解析した。ところが当該領域には(2)で示した prestem の保持に関わる Y118 が存在し、その変異体のウサギ赤血球結合は著しく減少した。これは変異によって prestem が保持できなくなり、血球への結合に影響が出たものと考えた。それを解決するため、(2) の LukF CS 変異体の原理を HLa に応用し、Cys を cap (S16C)と stem (A138C) の二箇所を導入した評価系を構築した。現在 stem 貫入に関与する残基を探索中である。

-PFT がシャペロンなど他のタンパク質等の補助無しに自律的に膜貫通領域を細胞膜に挿入する機構は、従来のタンパク質の膜透過における常識とは異なる新奇の機構と考えられる。その解明により、

-PFT を細胞膜にナノサイズの膜孔を形成するナノツールやナノ構造材料としての応用する際の分子設計の基盤となる成果が得られる。さらに2成分性 -PFT の高い標的細胞選択の機構を導入することで、細胞特異的なドラッグデリバリーシステムなどへの応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

- 1) Z. Peng, M. Takeshita, N. Shibata, H. Tada, Y. Tanaka and J. Kaneko
Rim domain loops of staphylococcal

b-pore forming bi-component toxin S-components recognize target human erythrocytes in a coordinated manner. J. Biochem. (2018) 査読有り 2018 Feb 17. [Epub ahead of print]

doi: 10.1093/jb/mvy030.

[学会発表](計 4件)

- 1) 武田慶胤、田中良和、金子淳
Intermolecular switch for stem release in the staphylococcal bi-component toxin -hemolysin for -barrel pore assembly
日本農芸化学会 2018 年度大会
2018 年 3 月 15 日~3 月 18 日
名古屋市 名城大学 天白キャンパス
- 2) 武田慶胤、田中良和、金子淳
黄色ブドウ球菌における二成分性毒素 ヘモリジンの膜孔形成機構の解明
第 62 回ブドウ球菌研究会
2017 年 9 月 1 日~2017 年 9 月 2 日
十和田市 北里大学 獣医学部
- 3) 彭昭、金子淳
The regions involved in cell specificity of the S component of staphylococcal bi-component toxin LukED
第 90 回日本細菌学会
2017 年 3 月 19 日~2017 年 3 月 21 日
仙台市 仙台国際センター
- 4) 金子淳、田中良和
黄色ブドウ球菌の バレル膜孔形成毒素の膜孔形成及び遺伝子の伝播機構
第 63 回トキシシンポジウム(招待講演)
2016 年 7 月 14 日~7 月 16 日
天童市 ほほえみの宿 滝の湯

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 淳 (KANEKO JUN)

東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 30221188