

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06087

研究課題名(和文) X線構造に基づくウェルシュ菌表面タンパク質の細胞壁固定化および線毛形成機構の解明

研究課題名(英文) Structural study on the mechanisms of the attachment of surface proteins and the formation of pili in a gram-positive bacteria *Clostridium perfringens*

研究代表者

神鳥 成弘 (Kamitori, Shigehiro)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：00262246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は細胞周囲に細胞壁を持ち、そこには多くの表面タンパク質が固定化されている。表面タンパク質の一つである線毛は、繊維状のタンパク質で、Piliタンパク質が共有結合で重合することにより長いシャフト部分が形成され、感染に際して宿主細胞への接着およびコロニー形成の機能を担っていると考えられている。病原性細菌ウェルシュ菌が持つPiliタンパク質、および線毛の重合形成・細胞壁固定化を触媒する酵素クラスCソーテースの立体構造をX線結晶構造解析により決定し、線毛のダイナミックな構造変化および線毛形成機構に関して分子レベルで新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果により、病原性細菌ウェルシュ菌の宿主細胞への感染に関わる線毛はダイナミックなコンホメーション変化を起こしている可能性があること、線毛の重合・形成を触媒する酵素クラスCソーテースは活性部位とは別に基質結合サブサイトを持っていること等、学術的意義がある知見が得られた。ソーテースは、クラスにより様々な感染に関与する表面タンパク質を細胞壁に固定化することから、新たな抗菌薬のターゲットとしての可能性に注目が集まっている。これらの知見は、線毛およびソーテースをターゲットとした、感染防止薬・抗菌薬の開発に有用な情報を提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Gram-positive bacteria possess a thick cell wall, a mesh polymer of peptidoglycans, that surrounds their cytoplasmic membranes, and many surface proteins are covalently attached to the cell wall. Pili, a type of surface proteins, are flexible rod proteins associated with the bacterial cell surface, that play important roles in the initial adhesion of bacterial cells to host tissues and their colonization. The pilus shaft is formed by covalent polymerization of major pilins, which is catalyzed by class C sortase, a family of cysteine transpeptidases. X-ray structures of major pilins from *Clostridium perfringens* strain 13 and SM101, and class C sortase from SM101 were determined, providing new insights into structural variation of pilin with dynamic conformational change and sortase-mediated formation of pilin.

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析 細菌細胞壁 ソーテース 線毛 コンホメーション変化 Piliタンパク質 酵素触媒反応機構 ウェルシュ菌

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細菌は、シンプルな構造の原核細胞で、単細胞として生存していくために、細胞の周囲に細胞外構造物として細胞壁を構築している。特にグラム陽性菌は、約 250 Å の厚さの強固な細胞壁を持ち、細胞の形態を保持している。細菌細胞壁は、グルコサミンとムラミン酸からなるグリカン鎖を 8~12 アミノ酸のペプチドが架橋した網目構造のペプチドグリカンを主要骨格とし、そこに多くの表面タンパク質およびタイコ酸（糖リン酸）が固定化されている（図 1）。細菌細胞壁については、その構造・物性について数多くの研究がなされているが、まだ未解明な点が多い。

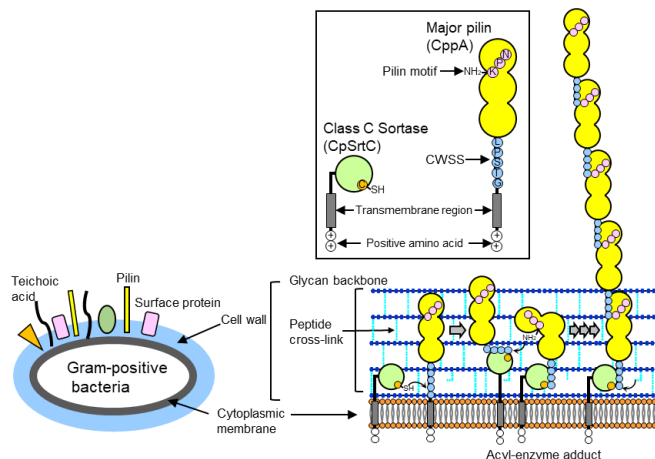
本研究課題では、細菌細胞壁における、表面タンパク質の一つである線毛（Pilin）とその細胞壁への固定化機構について研究を行った。グラム陽性菌の宿主細胞への感染は、細胞表面にある多種類の表面タンパク質が関与している。特に細菌の線毛は、感染に際して宿主細胞への接着およびコロニー形成の機能を担っていると考えられている。線毛は、フレキシブルな繊維状のタンパク質で、3~20 分子の Major pilin タンパク質が共有結合で重合することにより長いシャフト部分を形成し、先端に 1 分子の Minor pilin タンパク質が付加される。通常、表面タンパク質は、システイントランスペプチダーゼであるソーテース（Sortase, 以下 Srt）と呼ばれる酵素によって細胞壁のペプチドグリカンに共有結合で固定化される。Srt は、基質となる表面タンパク質（基質タンパク質）の C 末側にある 5 アミノ酸からなる Cell Wall Sorting Signal motifs (CWSS) を認識し、4 番目と 5 番目のアミノ酸の間のペプチド結合を切断する。その後、Srt は、基質タンパク質とアシル酵素中間体を形成して、ペプチドグリカン中にあるアミノ基（未架橋のペプチドの N 末端）と基質タンパク質との間でアミド結合を形成する。Srt は、アミノ酸配列と機能により A-F の 6 つのクラスに分けられ、近年、Srt は新たな抗菌薬のターゲットとしての可能性に注目が集まっている。クラス C (SrtC) は、線毛の Pili タンパク質を基質タンパク質とし、Pili タンパク質の重合と固定化の双方を触媒する。SrtC は、アシル酵素中間体の CWSS (LPSTG) 中の Thr 残基と、Major pilin タンパク質が持つピリンモチーフ (NPK) 中の Lys 残基側鎖のアミノ基との間でアミド結合を形成することを繰り返して Major pilin タンパク質を重合していき、最後に細胞壁に固定化する（図 1）。

2. 研究の目的

本研究課題で対象としたウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、クロストリジウム属のグラム陽性菌であり、ガス壊疽や食中毒の原因となる病原性細菌である。ウェルシュ菌は、線毛 Pili タンパク質 (*C. perfringens* pili, Cpp) として、シャフトを構成する Major pilin タンパク質 CppA と先端にある Minor pilin タンパク質 CppB を持っており、これらは、SrtC (CpSrtC) とともにゲノム上でオペロンを形成している。本研究の目的は、X 線結晶構造解析によりウェルシュ菌の CppA および CpSrtC の立体構造を決定し、線毛の重合構造に関する新たな知見を得ること、および Pili タンパク質の重合・線毛形成機構を分子レベルで解明することである（図 1）。

図 1. グラム陽性菌の模式図と線毛重合機構。

グラム陽性菌の細胞壁の模式図を示す（下）。予想される CpSrtC による細胞壁中の CppA の重合機構を示す（右）。CpSrtC および CppA の詳細についてはボックス内に示す。CpSrtC は活性触媒残基として Cys を持つ。CppA はピリンモチーフとして NPK を、CWSS として LPSTG を持つ。CpSrtC と CppA は、C 末側に膜貫通領域と正電荷のアミノ酸を持つ。



3. 研究の方法

(1) タンパク質の調製

ウェルシュ菌のゲノムから、あるいは受託合成により得た目的遺伝子を発現ベクター (pCold, Takara Bio Inc., Japan) にクローニングし、大腸菌 (BL21-CodonPlus-RIL, Agilent Technology, Inc., USA) に導入し、大量培養することにより目的量のタンパク質を得た。カラムクロマトグラフィにより精製した後、必要に応じて濃縮し、各種実験に用いた。

(2) ウェスタンブロット

培養したウェルシュ菌 (Strain 13, SM101, NCTC8237, CPN50, HN13 株) を溶菌後、細胞壁に結合しているタンパク質を抽出し、SDS 電気泳動および CppA 抗体を用いて CppA を検出した。

(3) X 線結晶構造解析

各種結晶化スクリーニングキットを用いて、293 K 下、リザーバー溶液と 1:1 で結晶化ドロップを作成し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。X 線データの収集は、100 K 下、リガク社製 R-AXIS VII イメージングプレートシステム/MicroMax 回転対陰極 X 線発生装置、および高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory にて行った。

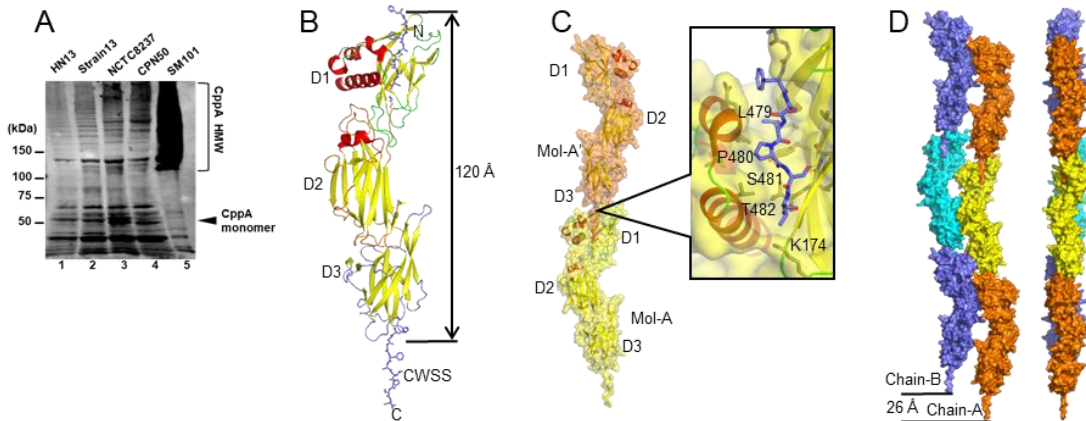
4. 研究成果

(1) ウェルシュ菌 CppA の X 線結晶構造解析

ウェルシュ菌の2種の株 (Strain 13 および SM101) の CppA (CppA-St13, CppA-SM101) の X 線結晶構造解析を行った。CppA-St13 と CppA-SM101 は、95%のアミノ酸配列上の同一性を持つ。これらの株に加えて NCTC8237, CPN50, HN13 株においても、細胞表面に CppA が発現していることを、CppA 抗体を用いたウェスタンブロットで確認した (図 2A)。

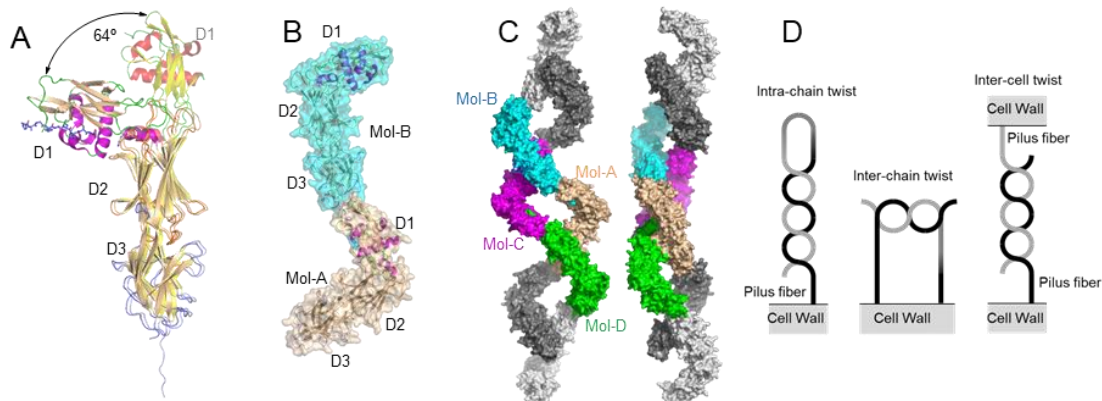
CppA-St13 の結晶においては、非対称単位中に2分子 (Mol-A, Mol-B) が存在しており、それらは、ほぼ同じ立体構造を持っていた。Mol-A の全体構造を図 2B に示す。CppA-St13 は、453 アミノ酸を持ち、Ig-like フォールドを持つ3つのドメイン、D1 (Met29-Pro173), D2 (Lys174-Tyr336), D3 (Thr337-Ala475) からなり、CWSS を含むループが D3 から突き出ている。3つのドメインは、ややアーク型の伸長した配置になっており、全体として 120 Å の長さを持つ。D1 には、β-構造とα-ヘリックスによって、CWSS 結合部位が形成されており、結晶中では、そこに他の分子の CWSS (Lue479-Pro480-Ser481-Thr482) が結合していた (図 2C)。ピリンモチーフ (Asn172-Pro173-Lys174) は D1 と D2 の間のループ領域にあり、結合している他の分子の CWSS 中の Thr482 は Lys174 と距離 4.3–5.3 Å で van der Waals 接触していた (図 2C ボックス内)。この2分子の関係は、結晶中 *c* 軸に沿って続いており、線毛重合状態に近いポリマー構造をとっていた (図 2D)。Mol-A, Mol-B によるポリマー (Chain-A, Chain-B) は緩い波型の構造をとっており、26 Å 離れた並進の関係で、ポリマー間では波型が一致するように相互作用している。

図 2. CppA-St13 の構造. (A) CppA 抗体によるウェスタンブロットを示す。すべての株において、モノマーから高分子量(HMW)に重合した CppA が検出されている。(B) CppA-St13 の全体構造を示す。(C) CWSS が他の分子に結合した構造を示す。ボックス内は結合部位の詳細を示す。(D) 結晶内に形成した線毛重合状態に近いポリマー構造を示す。



一方、CppA-SM101 では、D1 と D2 の間で 64° 折れ曲がった構造をとっていた (図 3A)。結晶中においては、非対称単位中に4分子 (Mol-A, Mol-B, Mol-C, Mol-D) が存在しており、Mol-B/Mol-D の CWSS が Mol-A/Mol-C のピリンモチーフにそれぞれ結合して、折れ曲り型 2 量体を2つ形成した (図 3B, C)。さらに2つの2量体は逆平行の左巻き 2 重らせん構造に会合していた (図 3C 中、着色した4分子)。モデリングにより、この会合状態は、分子間で衝突を起こすことなく2重らせん構造を保ったまま伸長できることが確かめられた (図 3C 中、濃淡グレーで示した分子)。このことは、線毛同士が2重らせん構造で会合する可能性を示しており、生体内では、①線毛が長く重合して自分自身で会合する、②隣接する線毛同士で会合する、③細胞間の線毛が会合する、3つの可能性が考えられる (図 3D)。

図 3. CppA-SM101 の構造. (A) CppA-SM101 が CppA-St13 と比べて折れ曲がり構造をとっていたことを示す。(B) CWSS が他の分子に結合した折れ曲り型 2 量体を示す。(C) 着色した4分子が会合して逆平行の左巻き 2 重らせん構造を形成していることを示す。モデリングによる濃淡グレーで示した分子を加えて、線毛同士が2重らせん構造で会合することができる。(D) 生体内で、線毛同士が2重らせん構造で会合する3つの可能性を示す。

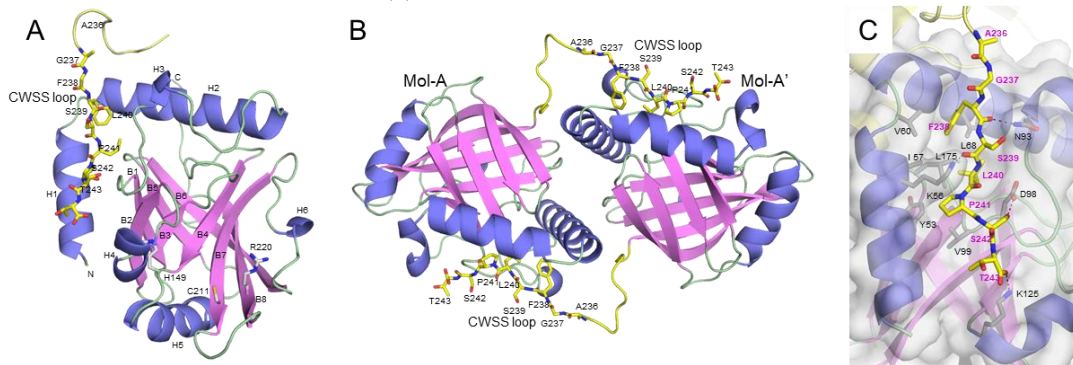


(2) CWSS を C 末端に持つ CpSrtC の X 線結晶構造解析

CpSrtC による CWSS の認識機構を解明するため、合成ペプチドと CpSrtC の共結晶化を試みたが、複合体結晶を得るには至らなかった。そこで、CpSrtC の C 末端に CWSS (LPST) を付加した CpSrtC 変異体 (CpSrtC-LPST) を調製し、2 つの異なる結晶系 (空間群 $P3_221$ および $C2$) において、X 線結晶構造解析に成功した。 $P3_221$ の結晶中では、非対称単位に 1 分子 (Mol-A) が、 $C2$ の結晶中では非対称単位に 2 分子 (Mol-B, Mol-C) が存在し、独立に 3 分子の CpSrtC-LPST の構造を決定することができた。

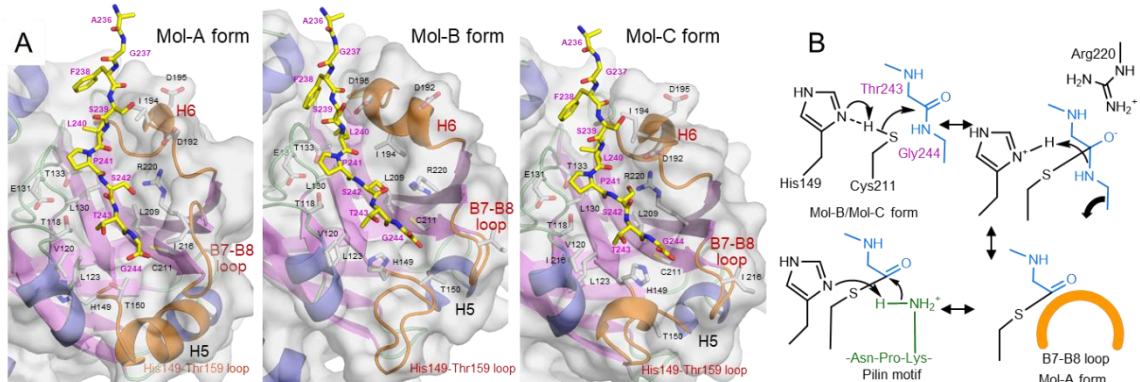
CpSrtC-LPST (Mol-A) の全体構造を図 4A に示す。CpSrtC-LPST は、中央に歪んだ β バレルを持ち、そのまわりをヘリックスとループ領域が取り囲んでいる。活性触媒残基の His149, Cys211, Arg220 は 3 本の β ストランド (B4, B7, B8) に沿った深い溝の中にあり、この溝が活性部位だと予想される。N 末端側には、2 本のヘリックス H1, H2 が 69° の角度をなして配置され、H3, H4 とともに分子表面に溝を形成している。 $P3_221$ の結晶中では、対象操作による 2 分子が互いの CWSS 部分を、H1, H2, H3, H4 によって形成される分子表面の溝に結合することにより分子間酵素・基質複合体を形成していた (図 4B)。CWSS は伸長したコンホメーションで溝にフィットし、水素結合・塩橋 (Phe(O)-Asn93(N δ), Ser239(O)-Lys56(N ζ), Thr243(O)-Lys125(N ζ)) および疎水相互作用によって認識されていた (図 4C)。この CWSS の認識様式は、前述の CppA-St13 における CWSS 認識様式とよく似ていた (図 2C)。また、CpSrtC の N 末端ヘリックス H1, H2 は、クラス C の特有で、他の細菌の SrtC にも保存されていることから、この溝は、重合反応を助けるための CWSS 結合サブサイトとして機能している可能性が考えられる。

図 4. CpSrtC-LPST の構造. (A) CpSrtC-LPST の全体の構造を示す。他の分子の CWSS を黄色で示す。(B) CpSrtC-LPST の分子間酵素・基質複合体の構造を示す。(C) CWSS 結合サブサイトの構造を示す。



Mol-A, Mol-B, Mol-C の 3 分子は、全体的によく似た構造を持つが、活性部位に構造の違いが見られた。この構造変化と反応触媒機構との関係について考察するために、活性部位に 9 アミノ酸の基質 (AGFSLPSTG) が結合したモデリングを行った (図 5A)。Mol-A の CWSS 結合部位においては、H5 が長く形成されることによって His149 は Cys211 から 10.8 \AA まで離れ、また、B7-B8 ループが C 末端 Gly244 と接触し、活性部位は行き止まり構造となる。Mol-B, Mol-C においては、H5 の半分がループに変化することにより His149 は Cys211 に水素結合距離まで近づき、また、B7-B8 ループが外側に向くことにより活性部位はオープン構造となる。Mol-B では H6 が長く形成されて基質とより多くの相互作用を形成する。これらの 3 つの構造から、以下のような反応触媒機構が考えられる。まず、基質が、Mol-B あるいは Mol-C の構造に結合し、His149 は Cys211 からプロトンを奪い活性化する。活性化した Cys211 がカルボニル炭素を求核攻撃し四面体中間体が形成され、Arg220 はこれを安定化する。His149 がプロトン Gly244 に与えてアミド結合が切断し、アシル-酵素中間体が形成する。この時、Mol-A の構造となり、B7-B8 ループがアシル-酵素中間体を覆うことにより水分子が求核攻撃するのを防ぐ。新たな CppA のピリンモチーフが結合して、逆反応により Thr243 と Lys の間にアミド結合を形成し、触媒反応が終わる。

図 5. CpSrtC-LPST の活性部位の構造と触媒反応機構. (A) CpSrtC-LPST の 3 つの活性部位に構造をモデリングした基質とともに示す。(B) 予想される CpSrtC の触媒反応機構を示す。



(3) まとめ

本研究課題により、ウェルシュ菌の2種の株の CppA-St13, CppA-SM101 の X 線結晶構造解析に成功し、CppA-St13 は伸長構造を、CppA-SM101 は D1-D2 間で折れ曲がった構造をとっていることを明らかにした。CppA-St13 と CppA-SM101 は、95%のアミノ酸配列上の同一性を持ち、D1 と D2 の界面にも顕著なアミノ酸残基の差異が見られないことから、両者とも伸長構造から折れ曲がり構造へとコンホメーション変化を起こすことができるものと考えられる。CppA-St13 の結晶においては、CWSS が分子間で認識された非共有結合性の重合構造が見られた。これは、生体内における線毛シャフト部の伸長重合構造モデルとして考えられる。CppA-SM101 の結晶中においては、CWSS の分子間認識による 2 量体が左巻き逆平行 2 重らせん構造に会合しており、モデリングにより、この逆平行 2 重らせん構造は伸長できることがわかった。この構造は、2 本の線毛によるツイスト構造モデルとして考えられる。CppA の線毛シャフト部分は、周囲の環境に応じて、D1 と D2 の間で大きなコンホメーション変化を起こし、伸長重合構造をとったり、ツイスト構造をとったりしているのかもしれない (図 6A)。宿主細胞への接着のためには伸長重合構造が適している。細胞間の線毛同士がツイスト構造を形成すれば、細菌のコロニー形成を促進する可能性がある (図 3D 右)。

CpSrtC-LPST の X 線結晶解析構造により、CpSrtC は、CWSS 結合サブサイトを持つ可能性を示した。現在、このことを確かめるために、サブサイトを形成する H1 と H2 を削除した変異体による研究に着手している。また、活性部位に 9 アミノ酸のペプチド (AGFSLPSTG) が結合したモデリングを行うことにより、活性部位の構造変化による触媒反応機構を提唱した。さらに進めて、CppA-St13 および CppA-SM101 の X 線構造を用いて CppA・CpSrtC 複合体のモデリングを試みた。その結果、CpSrtC は、折れ曲がり構造の CppA-SM101 と安定した複合体を形成する可能性が示された (図 6B)。CppA の D1 と D2 の間で大きなコンホメーション変化は、線毛全体の構造とともに、線毛重合過程における CpSrtC との相互作用にも関わっているのかもしれない。

本研究課題の成果により、病原性細菌の宿主細胞への感染に関わる線毛および、それを重合・形成する SrtC の構造と機能について、分子レベルでの新たな知見を得ることができた。これらの知見は、線毛や SrtC をターゲットとした、感染防止薬・抗菌薬の開発に有用な情報を提供できる可能性がある。なお、本研究課題の成果については、学術雑誌論文として報告している (doi: 10.1107/S2059798319009689. および doi: 10.1016/j.bbrc.2021.03.106.)。

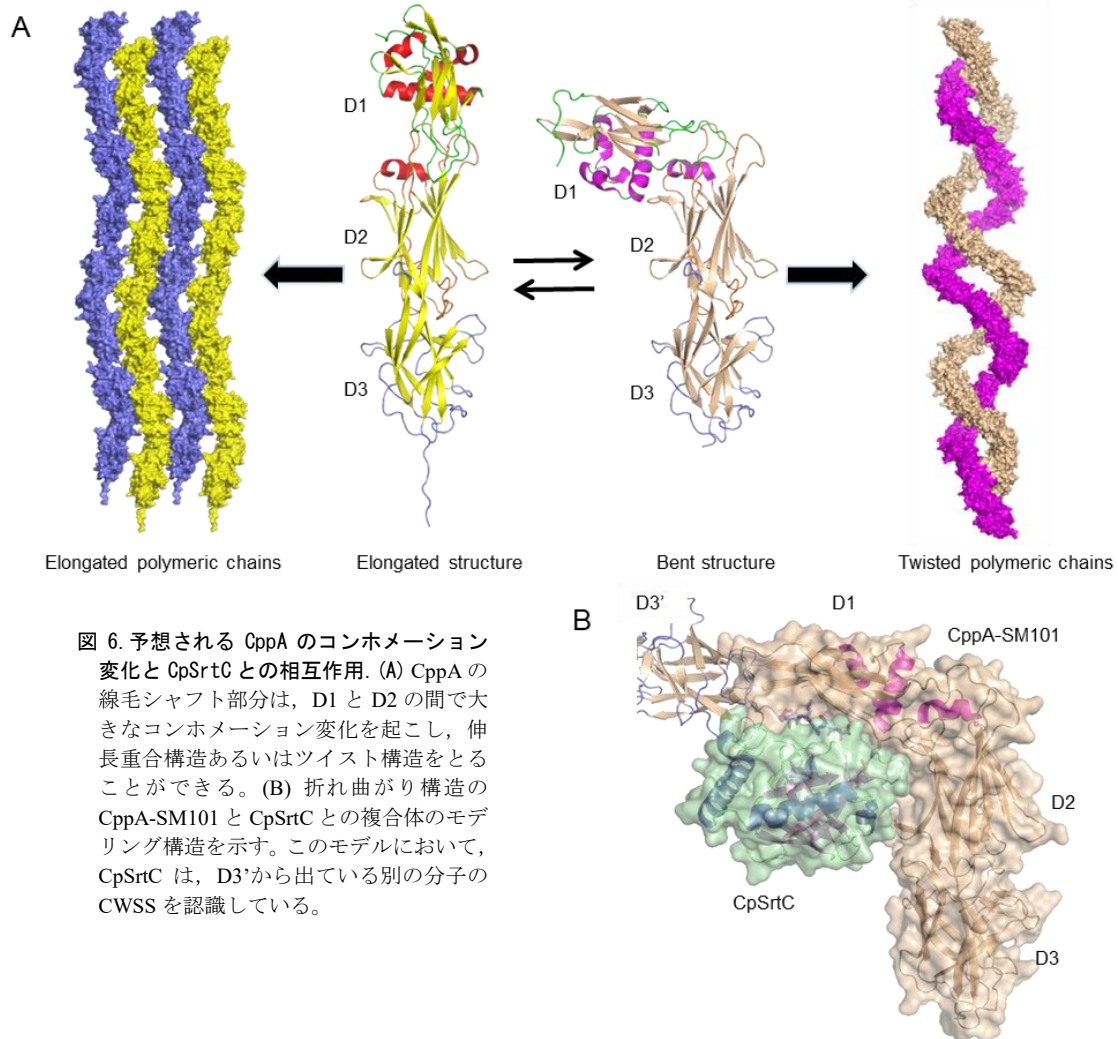


図 6. 予想される CppA のコンホメーション変化と CpSrtC との相互作用. (A) CppA の線毛シャフト部分は、D1 と D2 の間で大きなコンホメーション変化を起こし、伸長重合構造あるいはツイスト構造をとることができる。(B) 折れ曲がり構造の CppA-SM101 と CpSrtC との複合体のモデリング構造を示す。このモデルにおいて、CpSrtC は、D3'から出ている別の分子の CWSS を認識している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamai Eiji, Katayama Seiichi, Sekiya Hiroshi, Nariya Hirofumi, Kamitori Shigehiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Structures of major pilins in Clostridium perfringens demonstrate dynamic conformational change.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 718-732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2059798319009689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamai Eiji, Sekiya Hiroshi, Nariya Hirofumi, Katayama Seiichi, Kamitori Shigehiro	4. 巻 554
2. 論文標題 X-ray structures of Clostridium perfringens sortase C with C-terminal cell wall sorting motif of LPST demonstrate role of subsite for substrate-binding and structural variations of catalytic site.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 138-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekiya Hiroshi, Tamai Eiji, Kawasaki Jurina, Murakami Kaho, Kamitori Shigehiro	4. 巻 115
2. 論文標題 Structural and biochemical characterizations of the novel autolysin Acd24020 from Clostridioides difficile and its full-function catalytic domain as a lytic enzyme.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 684-698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14636.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神鳥成弘, 玉井栄治, 関谷洋志, 成谷宏文, 片山誠一
2. 発表標題 ウェルシュ菌線毛タンパク質CcpAとSortase CのX線結晶構造解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉井栄治, 神鳥成弘, 関谷洋志, 片山誠一, 成谷 宏文
2. 発表標題 ウエルシュ菌線毛の構造解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉井栄治, 神鳥成弘, 関谷洋志, 河崎樹里奈, 村上佳穂
2. 発表標題 ディフィシル菌のオートリシンCD24020 触媒ドメインの構造と機能解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神鳥 成弘, 玉井 栄治, 関谷 洋志, 牧 純, 成谷 宏文
2. 発表標題 X-ray structure of Clostridium perfringens CPE1138 catalytic domain hydrolyzing bacterial cell
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉井栄治, 神鳥成弘, 成谷宏文, 関谷洋志, 渡部あずさ, 牧 純
2. 発表標題 ウエルシュ菌細胞壁分解酵素CPE1138の生化学的解析とX線構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神鳥成弘, 関谷洋志, 玉井栄治
2. 発表標題 ディフィシル菌オートライシンCD24020触媒ドメインのX線結晶解析に基づく基質認識機構の検討
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

科学研究費補助金（神鳥・吉田） http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~xraylab/report/kaken/index.htm
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	玉井 栄治 (Tamai Eiji) (40333512)	松山大学・薬学部・教授 (36301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------