

平成21年6月15日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370045
 研究課題名（和文） 病原性細菌由来オートトランスポーターの分泌機構と高次構造相関
 研究課題名（英文） Structure and function of autotransporter proteins from pathogenic bacteria
 研究代表者
 Jeremy R. H. Tame
 横浜市立大学・国際総合科学研究科・教授
 研究者番号：00336588

研究成果の概要：オートトランスポータータンパク質 Heme Binding Protein (HBP) のパッセンジャードメイン立体構造解析に成功した。HBP の外膜貫通領域βバレルドメインとオートシヤペロン部分の発現系構築に成功し、タンパク質の結晶化および立体構造解析に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：構造生物学、X線結晶構造解析、タンパク質、オートトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

オートトランスポーターとは病原性細菌が分泌するタンパク質グループの名称で、この中でもセリンプロテアーゼドメインを持つものが SPATE family と呼ばれる。SPATE family に属するタンパク質は、病原性細菌による腹膜炎や尿路感染症等の原因物質であり、この病気は発展途上国でいまだ多数の死者を出している。このため、病原性細菌によるオートトランスポータータンパク質、SPATE family の分泌メカニズムが医療の点から注目されている。

オートトランスポーターは3つの部分からできている。N末端のシグナルシーケンス

配列、中央のパッセンジャードメイン、C末端のベータバレルドメイン、である。オートトランスポーターの分泌メカニズムの特徴は、病原性細菌の外膜から分泌される際に、自身のC末端ベータバレルドメインがパッセンジャードメインを膜外に押し出すところにある。この分泌の際には他のタンパク質の助けは要らない、とされており、これが「オートトランスポーター」の名称の由来である。

2. 研究の目的

オートトランスポーターのパッセンジャードメインが、どのようなメカニズムでベ-

タバレルドメインによって細菌の膜外に分泌されるのかは全く解明されていない。我々は構造生物学的手法を用いて、この分泌メカニズム解明に挑む。分泌メカニズムが解明されれば、病原性細菌対策薬剤開発に結びつくと考えられる。

3. 研究の方法

以下の2つの手法を用いて研究を行う。

(1) 当研究室で高分解能構造決定をした SPATE family のひとつ、Hbp (Heme Binding Protein) の立体構造を基にして、置換するアミノ酸残基を決定し、ミュータント Hbp を作製する。我々が特に重要だと考えているのは、Hbp のC末端領域である「オートシャペロン部位」である。この部位は、Hbp の他の部位の立体構造形成を助けられているからである。バクテリアからミュータント Hbp が分泌されるかどうかを確認することにより、Hbp 分泌に重要なアミノ酸残基を特定し、Hbp 分泌メカニズムの構造情報を収集する。

(2) 分泌される前の段階のオートトランスポータータンパク質は、シグナルペプチド、パッセンジャードメイン、 β バレルドメインの3つの領域からなる。オートシャペロン部分と β バレルドメインからなるタンパク質部分の結晶構造解析を目指す。立体構造が明らかになれば、オートシャペロン部分と β バレルドメインがどのような相互作用を伴ってパッセンジャードメイン部分を膜外に分泌しているかが明らかになるであろう。

4. 研究成果

(1) 当研究室で詳細な立体構造を明らかにしたオートトランスポーター SPATE family, Heme Binding Protein (HBP) のパッセンジャードメインの立体構造を以下に挙げる。HBP の構造決定は、MAD (Multiple Anomalous Dispersion) 法を用いて行われ、精密化によって最終的に 2.2\AA の高い分解能で立体構造を決定することができた。もっとも目につく特徴は、やはりその巨大な β ヘリックス構造(図1中、青色部分)であろう。基本的に同じ方向を向いている多数の β ストランドがらせんを巻いて筒状構造を形成している。筒の内側には疎水性アミノ酸残基が多数パッキングを形成していることがわかった。この目立つ β ヘリックス構造に、他の小さなドメインが付属している。図1中赤色の Domain1、緑色の Domain2、水色のオートシャペロン部分、である。

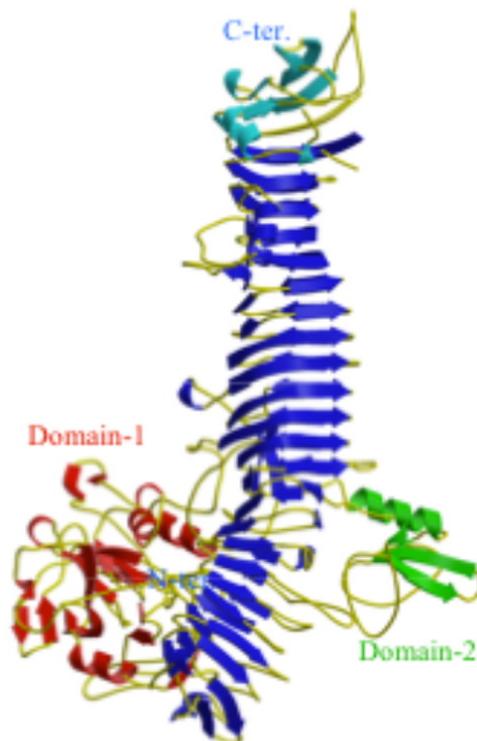


図1
Heme Binding Protein の結晶構造 (リボンモデル図)

この立体構造情報を基にして、オートシャペロン部分中の重要なアミノ酸残基を特定する実験を行った。ミュータント HBP を作成し、ミュータント Hbp が分泌されるかどうかを確認することにより、Hbp 分泌に重要なアミノ酸残基を特定し、Hbp 分泌メカニズムの構造情報を収集した。結果、Hbp のオートシャペロン部位で、アミノ酸置換を導入すると分泌が起こらない現象が起こる重要な残基を特定することに成功した。(論文準備中)

(2) HBP オートシャペロン部分と β バレルドメインからなるタンパク質の発現系構築に成功し、大量のタンパク質を得られるようになった。このタンパク質の結晶化を試みたところ、 2.0\AA 分解能までの反射を示す結晶を得ることに成功し、分子置換法を用いて立体構造を決定することに成功した。オートシャペロン部分と β バレルドメインの相互作用様式が明らかになった。(論文準備中)

5. 主な発表論文等

(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 13 件)

1. Watanabe, M., Heddle, J. G., Kikuchi, K., Unzai, S., Akashi, S., Park, S. Y. & Tame, J. R. (2009). The nature of the TRAP-Anti-TRAP complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2176-81. 査読有り
2. Sugiyama, K., Obayashi, E., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Tame, J. R., Nagata, K. & Park, S. Y. (2009). Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *Embo J.*, accepted 査読有り
3. Clarke, T., Kawai, F., Park, S. Y., Tame, J., Dowson, C. & Roper, D. (2009). Mutational Analysis of the Substrate Specificity of Escherichia coli Penicillin Binding Protein 4 (PBP4). *Biochemistry*, 48, 2675-2683. 査読有り
4. Akashi, S., Watanabe, M., Heddle, J. G., Unzai, S., Park, S. Y. & Tame, J. R. (2009). RNA and Protein Complexes of trp RNA-Binding Attenuation Protein Characterized by Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 81, 2218-2226. 査読有り
5. Watanabe, M., Mishima, Y., Yamashita, I., Park, S. Y., Tame, J. R. & Heddle, J. G. (2008). Intersubunit linker length as a modifier of protein stability: crystal structures and thermostability of mutant TRAP. *Protein Sci* 17, 518-26. 査読有り
6. Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J. R. & Park, S. Y. (2008). The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 454, 1127-31. 査読有り
7. Yoshizawa, K., Mishima, Y., Park, S. Y., Heddle, J. G., Tame, J. R., Iwahori, K., Kobayashi, M. & Yamashita, I. (2007). Effect of N-terminal residues on the structural stability of recombinant horse L-chain apoferritin in an acidic environment. *J Biochem* 142, 707-13. 査読有り
8. Jong, W. S., ten Hagen-Jongman, C. M., den Blaauwen, T., Slotboom, D. J., Tame, J. R., Wickstrom, D., de Gier, J. W., Otto, B. R. & Luirink, J. (2007). Limited tolerance towards folded elements during secretion of the autotransporter Hbp. *Mol Microbiol* 63, 1524-36. 査読有り
9. Izumi, A., Rea, D., Adachi, T., Unzai, S., Park, S. Y., Roper, D. I. & Tame, J. R. (2007). Structure and mechanism of HpcG, a hydratase in the homoprotocatechuate degradation pathway of Escherichia coli. *J Mol Biol* 370, 899-911. 査読有り
10. Hiraki, T., Shibayama, N., Yoon, Y. H., Yun, K. M., Hamamoto, T., Tame, J. R. & Park, S. Y. (2007). Crystallization and preliminary crystallographic studies of the metalloglycoprotein esterase A4 using a baculovirus expression system. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63, 734-6. 査読有り
11. Heddle, J. G., Okajima, T., Scott, D. J., Akashi, S., Park, S. Y. & Tame, J. R. (2007). Dynamic allostery in the ring protein TRAP. *J Mol Biol* 371, 154-67. 査読有り
12. Heddle, J. G., Fujiwara, I., Yamadaki, H., Yoshii, S., Nishio, K., Addy, C., Yamashita, I. & Tame, J. R. (2007). Using the ring-shaped protein TRAP to capture and confine gold nanodots on a surface. *Small* 3, 1950-6. 査読有り
13. Addy, C., Ohara, M., Kawai, F., Kidera, A., Ikeguchi, M., Fuchigami, S., Osawa, M., Shimada, I., Park, S. Y., Tame, J. R. & Heddle, J. G. (2007). Nickel binding to NikA: an additional binding site reconciles spectroscopy, calorimetry and crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 221-9. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

1. Kaoru Nishimura, Sam-Yong Park, Jeremy Tame: X-ray Crystallography of Autotransporters from Pathogenic Bacteria, Molecular Microbiology Young Microbiologists Minisymposium Prokaryotic Membranes, Paris, France, 2007.10.12
2. Takeshi Yokoyama, Satoru Unzai, Sam-Yong Park, Jeremy Tame : Haemoglobin as a drug target, The40th crystallographic meeting at Erice, Italy, 2008.5.29-6.8
3. Sam-Yong Park, Toshiyuki Chatake, Naoya Shibayama, Yukiko Morimoto : Protonation

states of buried histidine residues in human deoxyhemoglobin revealed by neutron crystallography, XVth International Conference on Oxygen Binding and Sensing Proteins, Aarhus, Denmark, 2008.8.17-21

4. 尾林 栄治, 吉田 尚史, 河合 文啓, 川口 敦史, 永田 恭介, **Jeremy Tame**, **朴 三用**: 「インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼにおけるサブユニット間相互作用」, 第81回日本生化学会大会, 神戸, 2008.12.9-12

〔図書〕(計 1 件)

Satoru Unzai, Kiyohiro Imai, **Sam-Yong Park**, Kiyoshi Nagai, and **Jeremy R.H. Tame** “Mutagenic studies on the Origins of the Root Effect” pp67-78.

Dioxygen Binding and Sensing Proteins: A Tribute to Beatrice and Jonathan Wittenberg.
編集: Martino Bolognesi, Guido Di Prisco, Cinzia Verde, 出版社: Springer, 2008
ISBN 8847008069, 9788847008069

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Jeremy R. H. Tame

横浜市立大学・国際総合科学研究科・教授

研究者番号: 00336588

(2) 研究分担者

朴 三用 (Park Sam-Yong)

横浜市立大学・国際総合科学研究科・准教授

研究者番号: 20291932

雲財 悟 (Unzai Satoru)

横浜市立大学・国際総合科学研究科・助教

研究者番号: 60336592

(3) 連携研究者

なし