

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16245

研究課題名（和文）腸管系病原菌が形成するIV型線毛を利用した分泌タンパク質の放出機構解明

研究課題名（英文）Studies on the elucidation of the transport mechanism of the soluble colonization factor using the type IV pilus formed by enteric pathogens

研究代表者

沖 大也 (Oki, Hiroya)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員（常勤）

研究者番号：30845285

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：コレラ菌の感染において、ヒトの腸内へのコロニー形成は最も重要なステップである。コロニー形成には、IV型線毛であるTCPだけでなく菌体外に分泌されるタンパク質TcpFを必要とするが、TcpFの分泌機構は不明であった。私は、相互作用解析によって、TcpFがTCPの先端部に存在するマイナーピリンTcpBと結合することを明らかにした。また、結晶構造解析の結果、TcpFのN末端領域がTcpBに結合し、TCPの伸長にもなって菌体外に分泌されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレラはヒトの腸管にコロニー形成し、激しい下痢症を引き起こす疾患であり、発展途上国を中心に甚大な被害を出している。今回、コレラ菌の病原性に重要なTCPと呼ばれる糸状構造物の機能の一端が解明された。TCPは、コレラ菌のコロニー形成に重要となる花弁のようなかたちの定着因子3分子と結合し、菌の外へ輸送する仕組みを結晶構造解析法により解明した。今回の研究成果から、定着因子の分泌を阻害し、コレラ菌の腸内でのコロニー形成を阻害するような薬剤の開発が可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Colonization in the human intestine is the most important step in *V. cholerae* infection and requires not only TCP, a type IV pilus, but also TcpF, a protein secreted outside the bacteria. By interaction analysis, I showed that TcpF binds to the minor pilin TcpB present at the tip of TCP. Crystal structure analysis also revealed that the N-terminal region of TcpF binds to TcpB and TcpF is transported by TCP elongation.

研究分野：構造生物学

キーワード：腸管病原体 IV型線毛 マイナーピリン 定着因子 コレラ菌

1. 研究開始当初の背景

コレラ菌に代表される腸管系病原菌は汚染水を介して消化管内に侵入し、産生した毒素の働きによって重篤な下痢症を引き起こす。近年においても年間約 300 万人が発症し、10 億人以上の人々が感染のリスクに曝されている感染症の原因菌である (1)。2019 年現在、コレラに対する経口ワクチンが開発されているが、重症化しやすい子供に対しては効果が薄く、特に死亡率の高い乳幼児には適用外であることが喫緊の課題となっている。現状では対症療法や抗生物質の投与による治療が主であるが、いずれも乳幼児や高齢者に対しては効果的ではなく、抗生物質の乱用による耐性菌出現や腸内細菌叢の攪乱も問題となっている。コレラ菌を始めとする腸管系病原菌は、病原性発現のために腸管に付着する必要があり、そのための定着因子を保有している。コレラ菌は定着因子として IV 型線毛を形成する TCP (toxin co-regulated pilus) を有しており、付着・定着過程において重要であることから有望な創薬標的であると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは未だ研究が進んでおらず、予防・治療薬の開発には至っていない。

報告者は、コレラ菌と同様に IV 型線毛を保有する腸管毒素原性大腸菌 (ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli*) の定着機構に関する一連の研究から (2, 3)、IV 型線毛は、線毛先端部のみ位置するマイナーピリンと称される線毛構成タンパク質三量体と分泌タンパク質との相互作用を介して腸上皮細胞に付着する、という新規の腸管付着モデルを提案している。また、分泌タンパク質に対する抗体は ETEC の細胞への付着を顕著に阻害したことから、分泌タンパク質は ETEC の治療における標的分子となり得ることが示唆された (発明の名称: 『病原性細菌の定着を阻害するペプチド及びそれを含む定着阻害剤』)。これは、同様の IV 型線毛を持つコレラ菌にも適用できると考えられ、コレラ菌の分泌タンパク質の輸送機構に興味を持たれた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IV 型線毛がどのようにして腸管付着の要となる分泌タンパク質を菌体外に放出し腸管定着を達成しているのか解明することである。

3. 研究の方法

本研究は以下の手法を用いて行った。

(1) 線毛構成タンパク質と分泌タンパク質との相互作用解析は、等温滴定型熱量計と結晶構造解析によりおこなった。

(2) 溶液中の分泌タンパク質と線毛構成タンパク質との相互作用解析は、超遠心分析法と Native 質量分析により行った

(3) 線毛 TCP モデルの構築は分子動力学シミュレーションによりおこなった。

4. 研究成果

(1) 線毛構成タンパク質と分泌タンパク質との相互作用解析

本課題では、まず、コレラ菌の IV 型線毛の大部分を構成タンパク質であるメジャーピリン TcpA と先端部にのみ存在する TcpB のいずれに分泌タンパク質である TcpF が結合するのか明らかとするために、等温滴定型熱量計 (ITC) を用いた相互作用解析を実施した。その結果、TcpF は、TcpA には全く結合せず、TcpB に解離定数 $K_d=0.11 \mu\text{M}$ で結合した。

TcpB と TcpF の詳細な相互作用情報を得るために、両者の複合体構造を結晶構造解析により、最高分解能 4.1 \AA で決定した。TcpB はドメイン 1、ドメイン 2、ドメイン 3 の 3 つのドメインからなり、ホモ三量体を形成していた。TcpB のドメイン 3 の上部に TcpF が 3 分子位置していた。TcpF は N 末端ドメイン、C 末端ドメインからなっており、N 末端ドメインどうしが相互作用することで、三弁花の花弁のようなホモ三量体構造を形成していた。三量体形成に関わるアミノ酸残基は、臨床コレラ菌株の TcpF に高度に保存されていることから、この TcpF の三量体構造がコレラ菌の病原性発現の鍵である可能性が示唆された。過去の報告から、TcpF の C 末端ドメインの一部のアミノ酸残基を変異させると、小腸へのコロニー形成効率が低下することが分かっている。当該残基を TcpF 三量体構造にマッピングすると、花弁の内側に位置していた。このため、TcpF は三量体構造を形成し、標的分子を三量体構造の内側で認識すると考えられる。

このように TcpB と TcpF は、互いに三量体を形成した状態で結合するヘテロ六量体構造をとっていたが、過去に決定した ETEC の IV 型線毛ではホモ三量体のマイナーピリンに一分子の分泌タンパク質が結合したヘテロ四量体として存在しており、菌種によって異なることが分かった。

(2) TcpF の N 末端領域と TcpB との相互作用解析

(1) で決定した複合体構造をさらに観察すると、TcpF の N 末端領域が TcpB 三量体のドメイン 3 に結合するような電子密度が存在していた。しかしながら、分解能が低いためにモデル構築には至らなかった。そこで、高分解能の結晶構造を得るために、TcpF の N 末端領域のペプチドと TcpB との共結晶化を行った。その結果、最高分解能 2.3 Å で決定することに成功した。

TcpF の N 末端領域は、Phe1-Tyr5 ペアの π - π スタッキングによって安定化された I 型 β ターン構造をとるユニークなフック状構造をとっており、TcpB 三量体の境界部に結合していた。このコンパクトなターン構造を形成する際、嵩高い芳香族アミノ酸対は、Phe1 アミン基 (TcpF) と Ser373 と Ser388 (TcpB) の側鎖間の水素結合相互作用を介して TcpB と結合し、境界部の底にある結合ポケットに収まっていた (図 1 A)。Asp3 (TcpF) と Arg408 (TcpB) の間に静電相互作用、および Tyr5 (TcpF) と His366 (TcpB) の間にスタッキング相互作用が形成されていた。Ser6 から Val11 までの残基は、広範な水素結合のネットワークによって、TcpB と結合していた。この構造を用いて、TcpB-TcpF ヘテロ六量体構造を構築した (図 1 B)。

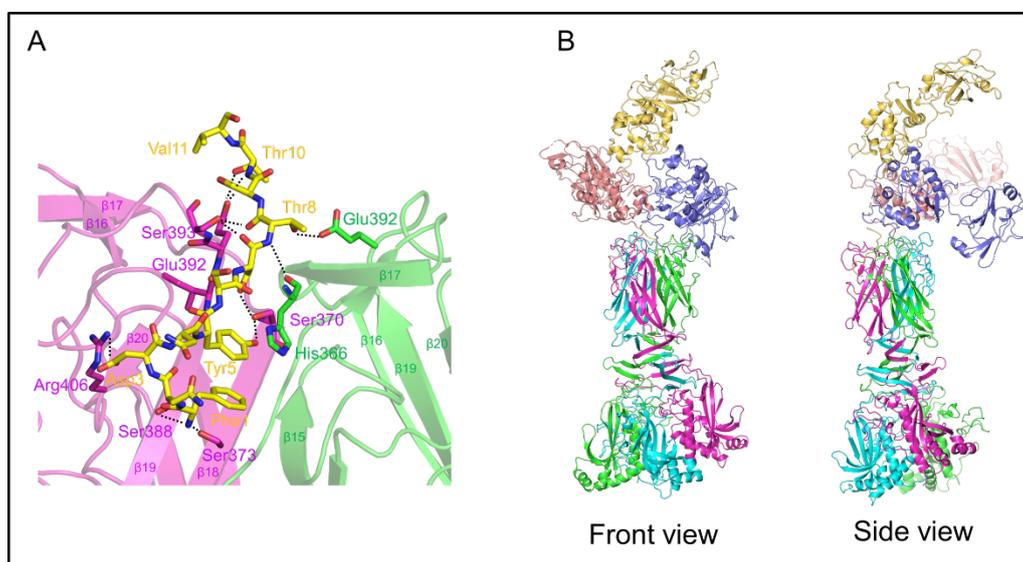


図 1. A: TcpF の N 末端領域 (黄色) と TcpB (マゼンタ、緑) の複合体構造における相互作用部位の拡大図。B: TcpB-TcpF 複合体の結晶構造。

(3) 溶液中における TcpB と TcpF の相互作用解析

TcpB と TcpF は溶液中でも結晶構造と同様の複合体を形成するか確かめるために、超遠心分析法とネイティブ質量分析法による解析を行った。解析の結果、TcpB と TcpF は溶液中においても六量体を形成することが分かった。また、興味深いことに、TcpB は単体でもホモ三量体を形成していたが、TcpF は濃度を上げて単量体であり、TcpB と混合して初めてホモ三量体となることが明らかとなった。前述したように、TcpF の三量体構造がコレラ菌の病原性に強く影響を与えている点を考慮すると、TcpF は線毛 TCP の先端部に位置する TcpB に結合した状態で標的となる分子を認識するものと考えられる。

(4) TCP 全長モデルの構築

線毛の大部分を構成するメジャーピリン TcpA を含む線毛 TCP モデルの構築を分子動力学シミュレーションによりおこなった。まず、既報の TcpA の結晶構造と TCP 電子顕微鏡密度マップを当てはめて、メジャーピリン TcpA フィラメントのモデリングを行った。次に、らせん状に配置された先端の 3 つの TcpA 分子を 3 つの TcpB ピリン様ドメイン (ドメイン 1) で置き換えた。TcpB ドメイン 1 は、線毛先端で TcpA フィラメントと相互作用している。N 末端の正電荷を持つアミンと 2 本の N 末端ヘリックスの Glu5 との相互作用に加えて、TcpB-TcpA 相互作用は、球状

ドメインの形状と電荷の相補性によって促進されると推定される。最後に、TCP フィラメントモデルの先端に TcpB-TcpF 六量体結晶構造の残りの部分を連結することで、TcpF-TCP フィラメントモデルを構築した。得られたモデルをエネルギー最小化することで、安定な TCP の全長構造を得ることができた。

(5) TCP による分泌タンパク質 TcpF の菌体外への輸送機構

(1) から (4) までの実験で得られた知見に基づき、TCP による TcpF 分泌モデルを提案する (図 2)。TcpF が TcpB に結合すると、TcpA が集合して ATPase の働きで線毛が伸長する。伸長に伴って TcpF は運ばれ、セクレチンリング (TcpC) に到達する。セクレチンが形成するリングの大きさは TcpF 三量体よりも小さいことが示唆されている。三量体のまま通過するのであれば、TcpF の 2 つのドメインが一時的に相対的な配置を変え、結果としてコンパクト構造変化を起こす可能性が考えられる。その後、TcpF は TcpB 三量体から解離し、腸管内に放出される。この分泌モデルは、定着因子 TcpF を標的とする阻害剤、ひいてはコレラ菌の腸管定着阻害剤の創出に貢献することが期待される。この研究成果は、Science Advances 誌に発表した。

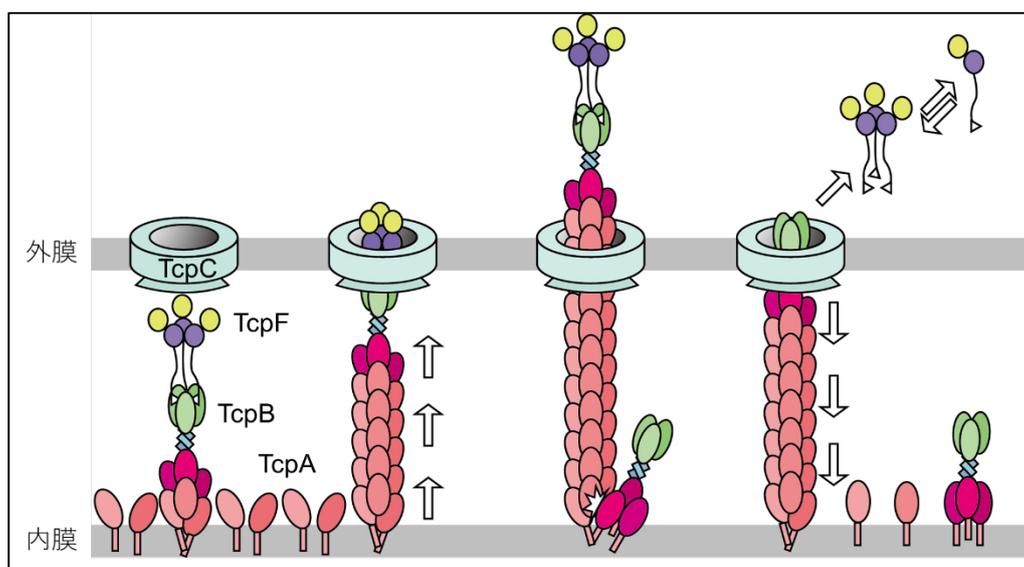


図 2. コレラ菌が形成する IV 型線毛 TCP による可溶性定着因子 TcpF の分泌機構の模式図

引用文献

- ① Ali M, Lopez AL, You YA, Kim YE, Sah B, Maskery B, Clemens J. The global burden of cholera. *Bull World Health Organ.* 2012 Mar 1;90(3):209-218A.
- ② Oki H, Kawahara K, Maruno T, Imai T, Muroga Y, Fukakusa S, Iwashita T, Kobayashi Y, Matsuda S, Kodama T, Iida T, Yoshida T, Ohkubo T, Nakamura S. Interplay of a secreted protein with type IVb pilus for efficient enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jul 10;115(28):7422-7427.
- ③ Kawahara K, Oki H, Fukakusa S, Yoshida T, Imai T, Maruno T, Kobayashi Y, Motooka D, Iida T, Ohkubo T, Nakamura S. Homo-trimeric Structure of the Type IVb Minor Pilin CofB Suggests Mechanism of CFA/III Pilus Assembly in Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 2016 Mar 27;428(6):1209-1226.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Imori Minato, Imoto Yuka, Nishiumi Haruka, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Muroga Yuki, Yoshida Akihiro, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Matsuda Shigeaki, Iida Tetsuya, Nakamura Shota	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis for the toxin-coregulated pilus-dependent secretion of <i>Vibrio cholerae</i> colonization factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1,11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abo3013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 沖大也、河原一樹、飯森 南斗、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、中村昇太
2. 発表標題 コレラ菌が形成するIV型線毛TCPの構造解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯森 南斗、沖大也、河原一樹、松田重輝、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 コレラ菌が産生する分泌タンパク質とIV型線毛の相互作用解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroya Oki, Kawahara Kazuki, Imori Minato, Nishiumi Haruka, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Matsuda Shigeaki, Iida Tetsuya, Nakamura Shota
2. 発表標題 Structural basis for type IVb pilus-dependent secretion of the colonization factor from <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖大也、飯森南斗、西海遥夏、丸野孝浩、内山進、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、河原一樹、中村昇太
2. 発表標題 コレラ菌が形成するIVb型線毛TCPを介した定着因子の分泌機構
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖大也、飯森南斗、西海遥夏、丸野孝浩、内山進、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、河原一樹、中村昇太
2. 発表標題 腸管系病原菌が形成するIVb型線毛を介した定着因子の分泌機構
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------