

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770101

研究課題名（和文） 腐性ブドウ球菌に存在する唯一の接着因子 UafA の構造機能解析

研究課題名（英文） Structural and functional analysis of Uro-adherence factor A (UafA) from *Staphylococcus saprophyticus*

研究代表者

田中 良和 (TANAKA YOSHIKAZU)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：20374225

研究成果の概要（和文）：病原性細菌は宿主細胞に感染するための様々な接着因子を持つが、若年女性の尿路感染症の主要な原因菌の一つである腐性ブドウ球菌は UafA という 1 種類しか接着因子を持たない。本研究では、UafA の機能ドメインの結晶構造を 1.5Å の高分解能で決定した。他の生物由来の接着因子との構造比較から、B ドメインを用いた、新たなリガンド認識機構が提案された。

研究成果の概要（英文）：Pathogenic bacteria express several cell wall-anchored proteins to adhere to the surface of host cell, whereas *Staphylococcus saprophyticus*, a uropathogen involved in urinary tract infection of young females, possesses a unique cell wall-anchored protein, UafA. In this study, we investigated the adhesion mechanism of UafA by structure analysis and biochemical assay.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：接着因子，結晶構造解析，腐性ブドウ球菌

## 1. 研究開始当初の背景

腐性ブドウ球菌は尿路感染症の主要な原因菌であり、若年女性の尿路感染症の 15% 程度が腐性ブドウ球菌により引き起こされている。『女性の 60% 以上が一生に 1 回以上尿路感染症を発症する』という統計を考慮すると、腐性ブドウ球菌に関する基礎研究は社会的要請の高いものであるといえる。現在のところ、薬剤耐性型の腐性ブドウ球菌は確認されておらず、治療には抗生物質が有効であるが、腐性ブドウ球菌は、薬剤耐性株の出現により

社会問題となっている黄色ブドウ球菌の類縁菌であり、加えて、黄色ブドウ球菌と同様に他の生物の遺伝子を取り込む能力に長けていることを考えると、薬剤耐性株が出現する可能性は十分に考えられる。耐性菌がアウトブレイクする前に感染機構についての詳細な知見を得ることは、極めて重要な課題である。

病原性細菌が感染する際、宿主細胞への接着は感染の成否を決定する重要な過程となる。ブドウ球菌属の細菌は、細胞表面に存

在する種々の接着因子蛋白質を用いて宿主細胞に定着する。接着因子蛋白質はいずれも C 末端に LPXTG というモチーフ配列を持つが、この配列を有する蛋白質は sortase という蛋白質の働きにより細胞壁に共有結合されて細胞表面に提示される。黄色ブドウ球菌などの他のブドウ球菌はこのような接着因子を 20 種程度有するのに対し、ゲノム解析の結果、腐性ブドウ球菌には 1 種類の接着因子 (uro-adherence factor A; UafA と略) しか存在しないことが明らかになった。これは、尿路という激しく尿が流動する過酷な環境下において、腐性ブドウ球菌が UafA のみを用いて宿主細胞に定着することを示唆する。

欠損株を用いた実験から、UafA が宿主細胞への接着に必須であることが示されていたが、その分子機構についての報告はなかった。申請者らのグループは、UafA が宿主細胞のみならず赤血球にも結合することを見出していた。UafA は N 末端からシグナルペプチド、機能ドメイン (N1, N2, N3, B), ランダム構造領域、LPXTG モチーフという多数のドメインから構成されるが、種々のドメイン蛋白質の赤血球結合活性の比較から、N2, N3, B ドメインが結合に必須であることがわかってきた。また、N2-N3-B ドメインの低分解能の立体構造はわかっていたが、ディスオーダーしている領域が多く、特に B ドメインについては、半分程度がトレースできていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、赤血球への結合に必須な UafA の N2-N3-B ドメインに着目し、その立体構造を高分解能で決定することにより、腐性ブドウ球菌の尿路への感染機構を詳細に解析することを目指した。そして、UafA によって達成される腐性ブドウ球菌の尿路への接着機構を官能基レベルで解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

N2-N3-B ドメインを大腸菌発現系により、可溶性分子として大量発現させ、種々のクロマトグラフィーにより精製した。結晶化条件は市販のスクリーニングキットを用いて行い、X 線回折データは大型放射光施設で収集した。結晶構造解析は分子置換法により行った。また、ドメイン分割蛋白質を調製し、その赤血球結合活性を評価した。

## 4. 研究成果

N 末端のフレキシブルな領域を欠失させることにより、N2-N3-B ドメインの立体構造を 1.5 Å の分解能で決定することに成功した。これにより、UafA の機能ドメインのすべての領

域の構造が明らかになった (図 1)。複数の空間群で成長した結晶の構造を比較した結果、N3-B ドメイン間のリンカーが柔軟性に富み、B ドメインの相対配置が異なることがわかった。また、B ドメインの構造は他の接着因子と類似した構造を有していることがわかった。他の接着因子との比較を行ったところ、有意な構造の差異が認められ、この部分は、N2-N3 ドメインと反対側に位置していた。また、この部分には、カリウムイオンが結合していた。ドメイン欠失変異体を用いた解析からは、B ドメインが赤血球結合活性に重要な役割を担うことがわかった。以上の結果を考え合わせ、UafA が、N2-N3 ドメインの間で、N3-B のリンカーを用いてリガンドと結合した後、B ドメインを用いて、2 つ目のリガンド分子と結合するという 2 段階のリガンド認識モデルが提案された (図 2)。



図 1. UafA-N2-N3-B ドメインの構造

(緑 : N2, オレンジ : N3, 赤 : B ドメイン)

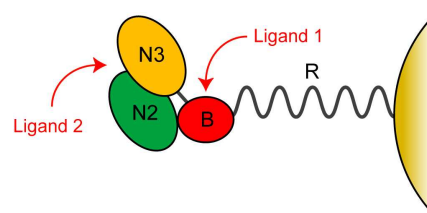


図 2. 提案されたリガンド認識機構

## 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 11 件)

1. Keitaro Yamashita, Yuka Kawai, Yoshikazu Tanaka, Nagisa Hirano, Jun Kaneko, Noriko Tomita, Makoto Ohta, Yoshiyuki Kamio, Min Yao, and Isao

- Tanaka, Crystal Structure of the Octameric Pore of Staphylococcal  $\gamma$ -hemolysin Reveals the  $\beta$ -barrel Pore Formation Mechanism by Two Components, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 査読有, 108, 2011, 17314-17319
2. Futao Yu, Yoshikazu Tanaka, Keitaro Yamashita, Takeo Suzuki, Akiyoshi Nakamura, Nagisa Hirano, Tsutomu Suzuki, Min Yao, and Isao Tanaka, Molecular basis of dihydrouridine formation on tRNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有 108, 2011, 19593-19598
  3. Eriko Matsuoka, Yoshikazu Tanaka, Makoto Kuroda, Yuko Shouji, Toshiko Ohta, Isao Tanaka, and Min Yao, Crystal structure of the functional region of Uro-adherence factor A (UafA) from Staphylococcus saprophyticus reveals participation of the B domain in ligand binding. Protein Science 査読有, 20, 2011, 406-416
  4. Nuemket Nipawan, Yoshikazu Tanaka, Kentaro Tsukamoto, Takao Tsuji, Keiji Nakamura, Shunji Kozaki, Min Yao, and Isao Tanaka, Structural and Mutational Analyses of the Receptor Binding Domain of Botulinum D/C Mosaic Neurotoxin: Insight into the Ganglioside Binding Mechanism. Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有 411, 2011, 433-439
  5. Futao Yu, Yoshikazu Tanaka, Shiho Yamamoto, Akiyoshi Nakamura, Shunsuke Kita, Nagisa Hirano, Isao Tanaka, and Min Yao, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of dihydrouridine synthase from Thermus thermophilus and its complex with tRNA. Acta Crystallographica Section F 査読有 F67, 2011, 685-688
  6. Yoshikazu Tanaka, Nagisa Hirano, Jun Kaneko, Yoshiyuki Kamio, Min Yao, and Isao Tanaka, 2-Methyl-2,4-pentanediol induces spontaneous assembly of staphylococcal alpha-hemolysin into heptameric pore structure, Potein Science 査読有 20, 2011, 448-456
- [学会発表] (計 12 件)
1. Yoshikazu Tanaka, Keitaro Yamashita, Yuka Kawai, Jun Kaneko, Noriko Tomita, Makato Ohta, Yoshiyuki Kamio, Min Yao, and Isao Tanaka, Crystal structure of pore-forming toxin from Staphylococcus aureus - An example of the utility of crystal structure analysis -, Japan-Australia Symposium on Plant Sciences for Agriculture (JAS2012), 2012年1月20日, 北海道大学 (札幌市)
  2. Yoshikazu Tanaka, Keitaro Yamashita, Yuka Kawai, Nagisa Hirano, Jun Kaneko, Noriko Tomita, Makato Ohta, Yoshiyuki Kamio, Min Yao, and Isao Tanaka, Crystal Structure of the Octameric Pore of Staphylococcal gamma-hemolysin, The Eighth International Conference on Flow Dynamics (ICFD2011), 2011年11月10日, ホテルメトロポリタン仙台 (仙台市)
  3. 田中良和, 黄色ブドウ球菌由来巨大蛋白質 Ehb の全体構造に関する研究, 日本化学会東北支部化学系学協会東北大会, 2011年9月17日, 東北大学 (仙台市)
  4. Yoshikazu Tanaka, Futao Yu, Keitaro Yamashita, Akiyoshi Nakamura, Takeo Suzuki, Tsutomu Suzuki, Min Yao, and Isao Tanaka, Crystal structure of dihydrouridine synthase in complex with RNA reveals its tRNA recognition and reaction mechanisms, The 16th Annual Meeting of the RNA Society (Kyoto), 2011年6月17日, 国立京都国際会館 (京都府)
  5. Yoshikazu Tanaka, Shiori Yamagata, Yu Kitago, Yoko Yamada, Sarin Chimnaronk, Min Yao, and Isao Tanaka, RNA binding mechanism of ThiI deduced from structural and binding analyses of a minimal RNA ligand, Asian Crystallographic Association, 2010年10月31日-11月3日, Busan, Korea

6. 田中良和 部分 RNA の結晶構造解析から推察された tRNA チオ化修飾酵素 ThiI の tRNA 認識機構, 九州シンポジウム, 2010年9月9-11日, 玄海ロイヤルホテル (宗像市)

[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:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

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

[その他]

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 良和 (TANAKA YOSHIKAZU)  
北海道大学・創成研究機構・特任助教  
研究者番号: 20374225

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし