

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590524

研究課題名(和文) 病原細菌の新規フィブロネクチン結合タンパク質の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Study on structural biology of novel fibronectin-binding proteins of a pathogenic bacterium

研究代表者

片山 誠一 (KATAYAMA, Seiichi)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：70169473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌は、ヒトにガス壊疽や食中毒を引き起こす細菌である。感染初期には、傷口や腸管上皮に付着して感染巣を形成する。ウェルシュ菌は、ヒトの結合組織や血清中に存在するフィブロネクチン(Fn)に結合するタンパク質(FbpA, FbpB)をもち、Fnに結合して感染巣を形成すると考えられている。

本研究では、FbpAのC末端領域にFn結合部位が存在することが明らかとなった。さらに、FbpAの立体構造を決定するために、FbpAの大量精製法を確立した。またFbpAとFbpBは共に細菌菌体表面に結合することわかった。Fbpの構造と機能の研究は、将来ウェルシュ菌感染症の予防につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Clostridium perfringens is a pathogenic bacterium, causing gas gangrene and food poisoning in humans and animals. During the beginning of the infection, the bacteria formed colonies after the adhesion to wounds and epithelial cells of intestine. C. perfringens have proteins, FbpA (25 kDa, 220 aa) and FbpB (66 kDa, 575 aa) that bind to fibronectin in human. Therefore, this bacterium is thought to colonize after its Fn-binding.

In this study, we indicated that Fn molecules bound to the C-terminal region of FbpA. An improved method of purification of recombinant FbpA was established to get a great quantity of the protein for crystallization. In addition, we found that both FbpA and FbpB could bind to the surface of C. perfringens cell. The studies on the structures and functions of the Fbps might lead to the development of protection against C. perfringens infection in the future.

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：Clostridium perfringens fibronectin (Fn) Fn-binding protein

1. 研究開始当初の背景

フィブロネクチン (Fn) とは、ヒトを含む動物の血漿、細胞表層、結合組織に存在する 450 kDa の糖タンパク質で、細胞を接着・伸展させるうえで重要な役割を果たしている。このタンパク質には、コラーゲンやインテグリンなどの結合組織内タンパク質の他、多くの細菌が結合する。細菌の Fn への結合はフィブロネクチン結合タンパク質 (Fn-binding protein; Fbp) を介して行われる。病原細菌であるブドウ球菌やレンサ球菌の Fbp の研究では、感染巣の形成や細胞への侵襲性、宿主防御機構からの逃避にこのタンパク質が寄与していることが明らかになっている。研究開始当初までに見出されてきたこれらの Fbp は、Fn 分子の N 末端領域 (Type I モジュール) に結合することが知られており、Type I モジュール結合ドメインの立体構造もすでに明らかになっていた。

私たちは、ヒトにガス壊疽と食中毒を引き起こすウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 菌体に Fn が結合すること、複数の Fbp が、菌の粗細胞壁画分に存在することを明らかにしていた。(Katayama, S., et. al. *Acta Medica Okayama*. 2006 ; 60(6) : 351-355.) またウェルシュ菌ゲノム解析で見出された CPE0737 (*fbpA*, *Listeria monocytogenes* の Fbp とアミノ酸配列が 29% 一致。) と CPE1847 (*fbpB*, *Clostridium difficile* の Fbp とアミノ酸配列が 41% 一致。) の 2 つの *fbp* 遺伝子が、ウェルシュ菌内で構成的に発現していること、これらの遺伝子の組換え産物 { recombinant FbpA (rFbpA) と FbpB (rFbpB) } がヒト血清由来の Fn に結合することを示した (Katayama, S., et. al. *Anaerobe* 2009 ; 15(4) : 155-159.)。続いて、2 つの Fbp が Fn 分子のどこに結合するか調べたところ、面白いことに 2 つとも Type III モジュールの 1 番の C 末端領域 (I₁-C、図 1) に結合することが明らかになった (Yamasaki, T., et. al. *Micobiology and Immunology* 2010 ;

54(4) : 221-227.)。Fn 分子中の I₁-C 領域は、Fn 分子のコンフォーメーションを変化させる能力を持ち、結合組織内の Fn 分子を super-fibronectin (sFn) に変える。このような特殊な領域に結合しうる Fbp の病原因子としての機能を考える上で、その I₁-C 領域結合ドメインの決定と立体構造決定、Fn I₁-C 分子との分子間相互作用の解析は欠かせないと考え、本研究を立ち上げるに至った。

2. 研究の目的

多くの病原細菌は菌体表層に Fn 結合タンパク質 (Fbp) を表出させてヒトの組織に定着し、感染巣を形成する。病原細菌の一つであるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) の Fbp (FbpA, FbpB) は Fn 分子の I₁-C 領域に結合する。この領域に結合する Fbp は他の細菌には見出されていない。この新しいタイプの Fbp 分子内の I₁-C 領域結合ドメインを同定し、Fbp の立体構造決定を行ってその結合様式を明らかにするため研究を進めた。また、これらの Fbp の生物活性を明確にするための研究も進めた。

3. 研究の方法

1) Fn III₁-C 結合部位の同定 : His-タグを N 末端につけた truncated rFbpA と rFbpB をいくつか作成して、ピオチン化した Fn III₁-C を用いたりガンドプロットング法により、どの領域に Fn III₁-C 分子が結合するのか調べた。さらに、分子量の小さい FbpA については、30 aa の人工ペプチドを合成し、リガンドプロットング法により Fn III₁-C 結合部位がどのペプチド上にあるのかマッピングを試みた。

2) rFbpA の大量精製 : FbpA (220 aa) の全アミノ酸配列から大腸菌の codon usage に合わせて人工遺伝子を合成した。この遺伝子に

は、精製が容易になるように N 末端に His-タグをつけた。この遺伝子を、低温で大量発現が容易になる pColdII ベクターにクローニングした。その後、大腸菌内で、IPTG による誘導をかけ、大量に発現させた。rFbpA の大量精製は His-タグを利用したニッケルアフィニティーカラムにより行った。タンパク定量は、BSA を標準とした Bradford 法または蛍光法により行った。

3) ウェルシュ菌菌体への rFbpA, rFbpB の結合

マイクロタイタープレートのウェルに、フレッシュなウェルシュ菌(OD₆₀₀ = 0.1)を入れ、乾燥固化させる。その後、ピオチン化した rFbpA または、rFbpB を加え、rFbp のウェルシュ菌体への結合を発色で定量した。

4 . 研究成果

1) Fn III₁-C 結合部位の決定 : ウェルシュ菌の FbpA, FbpB の truncated rFbp を作成して、Fn III₁-C 領域との結合を調べたところ、FbpA (220 aa) については C 末端領域に Fn III₁-C との結合領域があることがわかった。さらに、30 aa の人工ペプチドを用いた研究により C 末端領域の 121 ~ 150 aa の領域に Fn III₁-C 結合部位が存在することが示唆された。FbpB に関しては、残念なことに、Fn III₁-C 分子が、すべての truncated FbpB に結合してしまった。そのことにより Fn III₁-C 結合部位の決定ができなかった。

2) FbpA の立体構造解析 : FbpA において、その機能ドメインが明らかになりつつあることから、立体構造解析のために FbpA の組換えタンパク質の大量精製を試みた。まず大腸菌の codon usage に合わせた FbpA をコードする遺伝子を人工合成し、適当な発現ベクターに挿入後、大腸菌を用いて FbpA

タンパク質の大量合成を行ったところ、500 ml 培養液から、10.5 mg の recombinant FbpA を得ることができた。これは従来のウェルシュ菌由来の遺伝子を用いた場合の約 2 倍の収量にあたる。これで結晶化に必要な 10 ~ 20 mg/ml のタンパク溶液が容易に得られるようになった。今後、FbpA の結晶化を進めて行く。

3) FbpA, FbpB の生物活性 : FbpA と FbpB はウェルシュ菌の菌体に結合し、菌体に Fn が結合することを阻害することが明確になった。この作用は他の細菌の Fbp には見られない。また、菌体表面に新たな Fn 結合タンパク質 (Fn レセプター) が存在することも示唆された (Histumoto, Y., *et al. Anaerobe* 2014; 25:67-71.)。現在、*AfbpA*, *AfbpB* 株を複製し、両 Fbp の病原性への関与を調べつつある。

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 1 件)

1. Yasuo Hitsumoto, Naomi Mrita, Ryosuke Yamazoe, Mika Tagomori, Tsutomu Yamasaki, Seiichi Katayama. Adhesive properties of *Clostridium perfringens* to extracellular matrix proteins collagens and fibronectin. *Anaerobe* 2014; **25**: 67-71. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. 加藤早苗、山崎勤、成谷宏文、檀本泰雄、片山誠一 ウェルシュ菌の菌体表層にみられたフィブロネクチン結合タンパク質をコードする遺伝子の同定 第87回日本細菌学会総会 2014.3.26. タワーホール船堀 (東京)

2 . 山崎 勤、勢家洋子、岡田真理子、片山誠一、榎本泰雄 *Clostridium perfringens*のfibronectin-binding proteinが認識するIII₁-Cを排出する血清フィブロネクチン 第24回生物試料分析学会年次学術集会 2014.3.1. 鈴鹿医療科学大学千代崎キャンパス (三重・鈴鹿市)

3 . Yasuo Hitsumoto, Naomi Morita, Ryusuke Yamazoe, Mika Tagomori, Hatsuo Yamashita, Tsutomu Yamasaki, Seiichi Katayama. 8th International Conference on the Molecular biology and Pathogenesis on the Clostridia. 2013. 10. 25. Sea Temple Spa & Resort (Palm Cove, Australia)

4 . Tsutomu Yamasaki, Yoko Seike, Hatsuo Yamashita, Seiichi Katayama, Yasuo Hitsumoto. Fibronectin (Fn)-binding proteins of *Clostridium perfringens* recognizes III₁-C-expressing serum Fn. 8th International Conference on the Molecular biology and Pathogenesis on the Clostridia. 2013. 10. 24. Sea Temple Spa & Resort (Palm Cove, Australia)

5 . Seiichi Katayama, Mika Tagomori, Hatsuo Yamashita, Tsutomu Yamasaki, Hirofumi Nariya, Mariko Okada, Mariko Watanabe, Yasuo Hitsumoto. Determination of binding site for *Clostridium perfringens* on fibronectin. 8th International Conference on the Molecular biology and Pathogenesis on the Clostridia. 2013. 10. 24. Sea Temple Spa & Resort (Palm Cove, Australia)

6 . 加藤早苗、山崎 勤、成谷宏文、榎本泰雄、片山誠一 ウェルシュ菌の菌体表層にみられる新規フィブロネクチン結合タンパク質 第66回日本細菌学会中国・四国支部総会 2013.10.12. 広島国際大学メディアホール (呉市)

7 . 岡田麻里、榎本泰雄、片山誠一 ウェルシュ菌フィブロネクチン (Fn) 結合タンパク質FbpAのFn III₁-C結合ドメインの探索 第86回日本細菌学会総会 2013.3.18. 幕張メッセ (千葉市)

8 . 中嶋一秋、山下初津雄、森田奈緒美、山崎 勤、片山誠一、榎本泰雄 *Clostridium perfringens*由来Fibronectin結合タンパク (Fbp) の好中球遊走抑制活性 第23回生物試料分析学会年次学術集会 2013.2.10. 新梅田研修センター (大阪市)

9 . 山下初津雄、山崎 勤、片山誠一、榎本泰雄 *Clostridium perfringens*由来フィブロネクチン結合タンパ

ク質FbpAの好中球遊走に与える影響 第8回生物試料分析学会中国四国支部学術集会 2013.9.7. 広島国際大学広島キャンパス (広島市)

10 . 田籠美華、森田奈緒美、山崎勤、片山誠一、榎本泰雄 *Clostridium perfringens*上フィブロネクチンレセプターの認識するフィブロネクチン分子エピトープの決定 第7回生物試料分析学会中国四国支部学術集会 2011.8.25. 島根大学医学部 (出雲市)

11 . 森田奈緒美、田籠美華、山崎勤、片山誠一、榎本泰雄 *Clostridium perfringens*由来フィブロネクチン結合タンパクFbpBの生物活性 第7回生物試料分析学会中国四国支部学術集会 2012.8.25. 島根大学医学部 (出雲市)

12 . 岡田 麻里、萬谷 悠太、片山 誠一、榎本 泰雄 ウェルシュ菌フィブロネクチン結合タンパク質FbpBのフィブロネクチン結合ドメインの探索 第85回日本細菌学会総会 2012.3.27. 長崎ブリックホール他 (長崎市)

13 . 萬谷 悠太、片山 誠一、榎本 泰雄 ウェルシュ菌フィブロネクチン (Fn)結合タンパク質FbpBのFn結合部位の探索 第64回日本細菌学会中国・四国支部総会 2011.10.22. 岡山大学 (岡山市)

14 . 洲脇 晃平, 中嶋 一秋, 森田 奈緒美, 片山 誠一, 榎本 泰雄 好中球走化性に対するヒトFibronectin (Fn)とウェルシュ菌由来Fn結合タンパク (Fbp) の影響 第6回生物試料分析学会中四国支部学術集会 2011.10.22. 岡山理科大学 (岡山市)

15 . 萬谷 悠太, 岡田 麻里, 片山 誠一, 森田 奈緒美, 田籠 美華, 榎本 泰雄 ウェルシュ菌フィブロネクチン (Fn)結合タンパク質のFn III₁-C領域への結合 . 第6回生物試料分析学会中四国支部学術集会 2011.10.22. 岡山理科大学 (岡山市)

16 . Yasuo Hitsumoto, Yusuke Nakamura, Ryusuke Yamazoe, Naomi Morita, Mika Tagomori, and Seiichi Katayama. Interaction of *Clostridium perfringens* with matrix proteins, fibronectin and collagen. 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2011.9.7. (Sapporo, Japan)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：特になし。

6．研究組織

(1)研究代表者

片山 誠一（KATAYAMA, Seiichi）

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：70169473

(2)研究分担者

櫃本 泰雄（HITSUMOTO, Yasuo）

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：90136333

(3)連携研究者 なし