

S-SAD 法による毒素原性大腸菌 (ETEC) 由来 線毛構成蛋白質 CofA の立体構造決定

大阪大学大学院 薬学研究科

河原 一樹、深草 俊輔、大久保 忠恭
大阪大学 微生物病研究所

中村 昇太

Abstract

毒素原性大腸菌 (ETEC) はその病原性を発揮するために、菌体表面上に線毛などを形成し、腸管上皮に定着する必要がある。CofA は、ETEC の腸管への定着に関わる CFA/III と呼ばれる定着因子の主要線毛構成蛋白質である。本研究において、我々は SPring-8 のビームライン BL38B1 を使用した放射光実験を行い、蛋白質に内在する硫黄原子の異常分散効果を利用した S-SAD 法を適用することで、CofA の結晶構造を 0.9 Å の高分解能で解明した。さらに、結晶構造解析で得られた CofA の立体構造情報を基に、分子動力学シミュレーション法を用いて CFA/III 線毛モデルの構築を行い、その特徴的な表面構造を明らかにした^[1]。

1. はじめに

発展途上国における旅行者や乳幼児の間で深刻な問題となっている毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*:ETEC) は、飲食物を介してヒトの腸管内に到達、増殖し、産生する腸管毒素エンテロトキシンによってコレラ様の下痢を引き起こす^[2]。ETEC の病原性発現には腸上皮細胞への定着が必須であり、腸管定着因子として、現在までに CFA/I、CFA/II、CFA/III などの因子群が発見され^[3]、それぞれの作用機序の解明と定着阻害法の開発が盛んに進められている。

ETEC の腸管定着因子の多くは、菌体表面上に発現される蛋白質の性質に依存した様々な定着機構を有しており、それらは線毛を形成するものと非線毛性のものに大別される^[3]。我々が研究対象としている CFA/III は、線毛の形態や構成蛋白質のアミノ酸配列情報から IV 型に分類される線毛を形成する^[4]。この IV 型線毛は、その主要線毛構成蛋白質の分子量の違いなどからさらに IVa 型線毛と IVb 型線毛に分類され、CFA/III 線毛は IVb 型線毛に属している^[5]。これまでの研究から CFA/III を構成する 14 個の遺伝子群からなる *cof* オペロンの内、線毛の主要な構成蛋白質を発現する遺伝子として *cofA* が同定されており、CFA/III 線毛の形成の際には、その主要線毛構成蛋白質 CofA の N 末端側に存在するシグナル配列がプレピリンペプチダーゼ (CofP) に

よって切断される必要があることが明らかになっている。

IVb 型線毛に分類される線毛には、CFA/III 線毛の他に、コレラ菌の TCP 線毛や、腸管病原性大腸菌に発現する BFP 線毛が知られており、それぞれ線毛の構造や形成機構、そして定着機構に関して詳細な研究例があるが^[6]、CFA/III 線毛に関しては腸管側の受容体の同定も含めて未だ機能解析が進んでいない。そのため、本研究では、X 線結晶構造解析を用いて CFA/III 線毛の主要な構成蛋白質である CofA の立体構造を明らかにし、得られる構造を基にして、線毛のフィラメントモデルを構築することで、ETEC の腸管付着に関わる CFA/III 線毛の性質を明らかにすることを試みた。

2. 硫黄原子を用いた S-SAD 法による CofA の結晶構造決定

一般的に、IV 型線毛の構成蛋白質は、N 末端側に配列相同性の高い疎水性領域を保持しており難溶性である。そこで、溶解度を改善する目的で、他の IVb 型線毛構成蛋白質の配列情報を参考に、N 末端側の疎水性部分 (約 28 残基) を除いた CofA の大腸菌を用いた大量発現系を構築し、精製及び結晶化を行った。蒸気拡散法により得られた CofA の単結晶は、SPring-8 のビームライン BL38B1 で回折実験を行ったところ、測定波長 0.9 Å において最高分解

能0.9 Åの極めて良質な回折像を示した。回折実験に関わる統計値を表1に示している。

構造決定にあたり、まず立体構造が現在報告されているIVb型線毛構成蛋白質の中で最も配列相同性の高い(相同性約28%)TCP線毛の主要構成蛋白質であるTcpA(PDBID:1oqw)の立体構造を用いた分子置換法を試みたが、有意な解を得ることはできなかった。そのため、初期位相の決定は、蛋白質内に存在する硫黄原子を用いた単波長異常分散(S-SAD)法の適用を試みた。

今回、結晶化に用いたCofAは、全体で182残基からなる分子中に硫黄原子が5個存在し、予想される異常分散強度($\langle \Delta F^2 \rangle / \langle F \rangle$)が測定波長1.5 Åにおいて0.54%と計算され、S-SAD法の限界値といわれる0.48%より若干であるが大きい値を示した^[7]。S-SAD法は蛋白質中に含まれる硫黄原子を用いて構造決定を行うため、従来から頻りに用いられているSAD法や多波長異常分散(MAD)法とは異なり、水銀(Hg)化合物や白金(Pt)化合物のような重原子試薬を用いた結晶中への重原子の導入や、蛋白

表1 CofAのX線結晶構造解析に関わる統計値

| データセット | Native | S-SAD |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 結晶学的データとデータ測定に関わる統計値 | | |
| ビームライン | BL38B1 (SPring-8) | BL38B1 (SPring-8) |
| 検出器 | ADSC Quantum 315 | ADSC Quantum 315 |
| 振動角 (°) | 1.0 | 1.0 |
| X線の波長 (Å) | 0.9000 | 1.5000 |
| 分解能 (最外殻) (Å) | 30.86-0.90 (0.95-0.90) | 47.64-1.38 (1.42-1.38) |
| 独立な反射数 | 91809 | 51931 |
| 多重度 (最外殻) | 3.6 (3.5) | 6.8 (4.7) |
| 反射の完全性 (最外殻) | 96.4 (94.9) | 99.5 (99.6) |
| 結晶空間群 | $P2_1$ | $P2_1$ |
| 格子定数 | | |
| a, b, c (Å) | $a = 33.82, b = 47.71, c = 42.45$ | $a = 33.82, b = 47.64, c = 42.53$ |
| β (°) | 107.52 | 107.57 |
| R_{merge} (最外殻) (%) | 0.050 (0.170) | 0.041 (0.226) |
| $\langle I / \sigma(I) \rangle$ (最外殻) | 18.6 (7.1) | 32.1 (6.3) |
| 位相決定に関わる統計値 | | |
| 硫黄原子のサイト数 | | 5 |
| Figure of merit (FOM) | | 0.833 |
| 精密化に関わる統計値 | | |
| 分解能 (最外殻) (Å) | 30.86-0.90 (0.91-0.90) | |
| 反射数 | 91733 | |
| R_{work} (最外殻) (%) | 0.120 (0.146) | |
| R_{free} (最外殻) (%) | 0.130 (0.158) | |
| 温度因子 (Å ²) | 4.5 | |
| 原子数 (非対称単位) | | |
| 蛋白質 | 3,189 | |
| 水 | 237 | |
| R.m.s.d. | | |
| 結合距離 (Å) | 0.01 | |
| 結合角 (°) | 1.54 | |
| ラムチャンドラプロット (%) | | |
| 推奨範囲内 | 97.7 | |
| 許容範囲内 | 2.3 | |

質中のメチオニンをセレノメチオニンに置換した誘導体などの調製をする必要がなく、新規構造の迅速で簡便な決定法として期待を集める手法である。しかしながら、硫黄原子の異常分散シグナルの虚数項 (f'') が極大となる波長 (ピーク波長) は 5.1 \AA 付近であり、現在、実験室系や放射光施設で一般的に利用可能な波長域 ($0.7 \sim 2.5 \text{ \AA}$ 程度) では、硫黄原子の異常分散効果が著しく微弱であるため構造解析例は少ない^[8,9]。この点に関して、HASYLAB (ドイツ) など海外の放射光施設では 3.0 \AA 以上の波長を利用できる構造生物学用のビームラインの開発も進められているが、長波長での測定ほど異常分散効果は大きくなるものの、空気や溶媒の吸収効果による影響が大きくなり、測定誤差が大きくなる問題も抱えている。さらに、測定の多重度を上げ、シグナルノイズ比を改善するために放射光を照射続けることにより生じる結晶の損傷も無視できない問題として挙げられる。これらの様々な要因が S-SAD 法の一般的な普及を難しくしているといえる。

これまでに、SPRING-8 の BL38B1 では、X 線ビームの安定性やフラックスの向上、コリメータやビームストップなどの最適化によるバックグラウンド信号の低減に加えて、長波長での測定において更に高分解能の回折データ収集が可能となる従来に比べて面積の大きい検出器 (Quantum 315 CCD 検出器、ADSC 社製) の使用など、精密な測定が必要とされる S-SAD 法に適した実験環境の整備が行われてきた。今回、この測定環境において、CofA の単結晶の回折データを 0.9 \AA から 1.7 \AA まで波長を変えて収集したところ、波長が 1.5 \AA の場合に測定された回折データが有意な異常分散差強度を与えることを

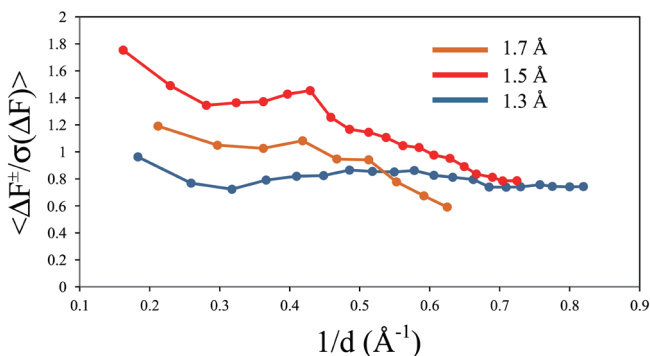


図1 SPRING-8 BL38B1 で実施した各測定波長で得られた回折データの異常分散差強度の分解能の逆数に対するプロット

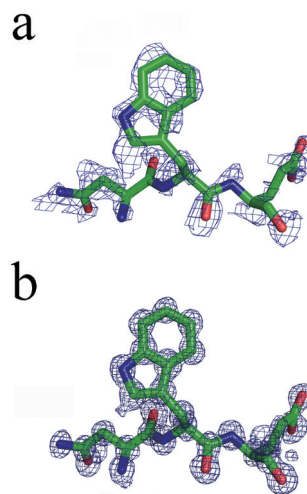


図2 プログラム SHELXE による位相改良後の電子密度マップ (2Fo-Fc)

(a) S-SAD 法による初期位相決定直後、
(b) 高分解能の回折データにより分解能を拡張した後
に得られる電子密度マップ。それぞれのマップの
Trp117 付近の領域を拡大して示す (1.5σ)。

確認することができた。すなわち、精密に調整された放射光のビームラインを利用し、適切な波長を選ぶことで、S-SAD 用のデータセットの取得が充分可能であることが示された (図1)。得られたデータセットについてプログラム SHELXD による重原子位置の探索を行ったところ、CofA 中の硫黄原子5個すべてが発見された。しかしながら、続けてプログラム SHELXE による位相決定及び数種のプログラムを用いた電子密度の改良を行ったところ、解釈可能な電子密度マップを得ることができなかった。これは結晶の溶媒含有率が29%と低く、溶媒平滑化などによる位相改良が難しいことが原因と考えられた。そこで位相誤差を減少させるため、プログラム SHELXE による電子密度の改良時に 0.9 \AA の高分解能データによる分解能の拡張を行ったところ解釈可能な電子密度マップを得ることに成功した (図2)。

得られた CofA の結晶構造は5本の α ヘリックス、8本の β ストランド、そして2本の 3_{10} ヘリックスから構成され、Cys132 - Cys196 間にジスルフィド結合を形成していた。また、他の IV 型線毛構成蛋白質と同様に、全体として $\alpha\beta$ フォールドを形成していた^[5]。CofA の構造は、主に構造コア、 $\alpha\beta$ ループ領域、D 領域と呼ばれる3領域に分けることができ、中心部の疎水性相互作用により安定化されている

る構造コアを取り囲むように、 $\alpha\beta$ ループ領域、D領域が存在し、構造表面に露出していた。この為、これらの表面に露出している領域は、線毛の他のサブユニットとの相互作用に深く関わる領域であることが示唆された。

3. CFA/III 線毛モデルの構築

CofA の類似構造を探索した結果、アミノ酸配列の相同性は低いものの CofA の立体構造はコレラ菌由来の TcpA に類似しており、構造コア部分で重ね合わせた場合の C α 原子間の根二乗平均距離は約 2.16 Å であった (図 3)。IVb 型線毛において、TcpA はもっともよく研究されている蛋白質の一つであり、X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、水素 / 重水素交換質量分析の結果から構築された TcpA のフィラメントモデルが提案されている^[10]。報告されたフィラメントモデルにおいて、N 末端の疎水性領域間、そして $\alpha\beta$ ループ領域と D 領域の間に形成される 2 種類のサブユニット間相互作用が線毛の安定性に重要であり、Met1, Glu5, Arg26, Leu76, Glu83 の 5 残基が安定性の維持に必須であることが変異実験の結果と併せて明らかにされている。CofA においても N 末端の疎水性領域に Met1, Glu5, Arg26 が存在し、TcpA の Leu76 および Glu83 と立体構造上で同じ位置に、対応する残基 (図中で TcpA の Leu76 が CofA の Leu86 に相当し、TcpA の Glu83 が CofA の Glu93 に相当する) が存在する (図 3)。

そこで、これらの知見を参考に、TCP 線毛のモデルとしてすでに報告されている TcpA フィラメントモデル (PDBID:1orq) の各サブユニットの構造に、

結晶構造から得られた CofA の構造を重ね合わせることで CofA フィラメントモデルの構築を行った。また、結晶化の際の溶解度向上のために除いた、N 末端部分の 28 残基からなる疎水性領域は、IVa 型線毛に関して以前に全長の立体構造が報告されている PAK Pilin の結晶構造 (PDBID:1oqw) の N 末端の α ヘリックスを基に構築した。この様に作製したモデルの妥当性を検証するためにサブユニット間の相互作用領域における原子間距離の評価をおこなったところ多数の原子が衝突することが明らかになり、これは TcpA と CofA の溶媒露出領域 ($\alpha\beta$ ループ領域と D 領域) の構造の違いに起因することが明らかであった。そこで、プログラム MODELLER によるシミュレーテッドアニーリング法によるエネルギー最少化と分子動力学シミュレーションプログラム GROMACS を用いたエネルギー最少化を併用し、モデル構造の最適化を行った。最終的に構築された CofA のフィラメントモデルのサブユニット間相互作用について評価を行ったところ原子の明らかな衝突は見られなかった。

得られた CofA のフィラメントモデルは 1 巻き (360°) 当たり 6 個のサブユニットが左巻き螺旋状に並んだものが 3 本束なった形のいわゆる左巻き 3-start ヘリックス構造を形成しており、一周当たり 18 個 (6 個 \times 3 本) の CofA サブユニットから構成されていた (図 4)。またその直径は約 80 Å であり、以前に電子顕微鏡像から得られた CFA/III 線毛の直径の値 (約 70 Å) とほぼ同等であった^[11]。TCP 線毛のフィラメント形成に重要であった前述の残基について観察したところ、N 末端部においては Met1 の N 末端窒素と Glu5 の側鎖間に相互作用が

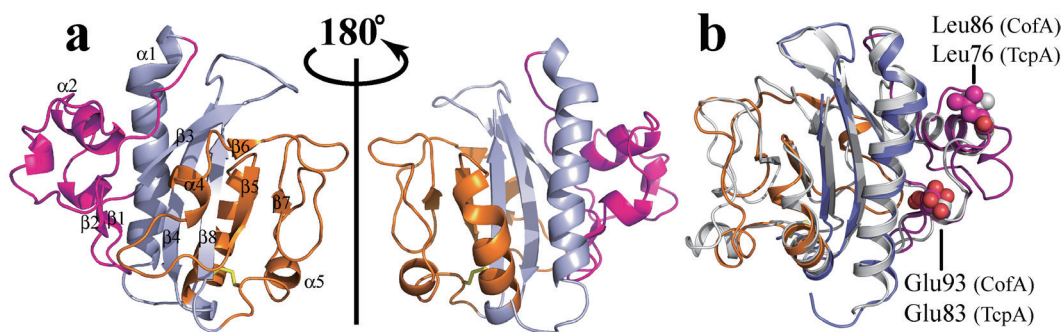


図 3. 0.9Å の分解能で決定された CofA の結晶構造

CofA の全体構造 (a) と CofA と TcpA の立体構造の重ね合わせ結果 (b)、CofA の全体構造において、構造コア部分を青色、 $\alpha\beta$ ループ領域はマゼンタ色、D 領域はオレンジ色、そして分子内に存在するジスルフィド結合は黄色で表示している。

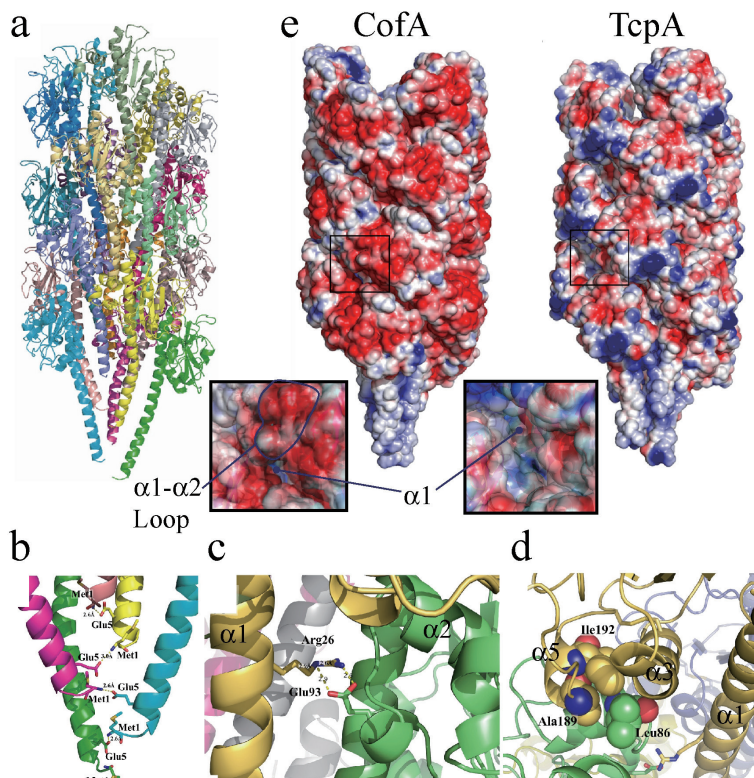


図4. CofAの結晶構造を基に構築したCFA/III線毛モデル

CFA/III線毛モデルの側面(a)、N末端部分におけるMet1とGlu5の相互作用(b)、 $\alpha\beta$ ループ領域のGlu93と $\alpha 1$ ヘリックスのArg26の相互作用(c)、 $\alpha\beta$ ループ領域のLeu86とD領域のAla189、Ile192の疎水性相互作用(d)、CFA/III線毛モデルとTCP線毛モデルの表面構造(e)、表面構造において正電荷を青色、負電荷領域を赤色で示す。CFA/III線毛とTCP線毛の $\alpha\beta$ ループ領域の拡大図を併せて示す。

見られ、また、 $\alpha\beta$ ループ領域のGlu93は $\alpha 1$ ヘリックスに存在するArg26と相互作用していた。同様に、 $\alpha\beta$ ループ領域のLeu86はD領域のAla189、Ile192と疎水性相互作用していることも明らかとなり、線毛形成の際におけるこれらのアミノ酸残基の重要性がモデル構造から示唆された(図4)。

4. CFA/III線毛モデルの表面構造

今回我々が構築したCofAの結晶構造情報に基づくCFA/III線毛のモデルと以前に報告されたTCP線毛のモデルの表面構造を比較することでCFA/III線毛の二つの特徴が明らかとなった。双方の線毛表面の静電ポテンシャル分布をプログラムAPBSを用いて計算し、比較したところ、TcpAフィラメントモデルにおいては線毛表面において、正、負に帯電する二つの領域が存在するのに対し、CofAフィラメントモデルの表面は全体的に負に帯電する領域に覆われていた(図4)。このことから、しばしば線

毛凝集が確認されるTCP線毛に比べて、CFA/III線毛は線毛同士が静電的反発によって凝集しにくくなっていると推察できる。また、TcpAフィラメントモデルにおいてはサブユニット間の隙間において、フィラメント内部に存在するN末端側の α ヘリックスの一部が露出しており、この部分がTcpAのD領域と相互作用することによりTCP線毛同士の相互作用に重要な役割を果たしていると考えられているが、CofAフィラメントモデルにおいてはこの隙間が $\alpha 1$ - $\alpha 2$ ヘリックス間に存在するTcpAの立体構造には存在しない23残基からなる長いループ構造で埋められており(図4)、N末端側の α ヘリックスが他のサブユニットと相互作用することを不可能にしている。すなわち、同じIVb型線毛に属しながらもCFA/III線毛とTCP線毛とは、その線毛の機能が大きく異なる可能性がフィラメントモデルの比較により明らかとなった。

この様な、CFA/III線毛の表面構造の特徴は、これまでに報告された腸管病原性大腸菌に発現するBFP線毛やサルモネラ菌が発現する線毛(主要構成蛋白質はPilS)などの他のIVb型線毛とも異なっており、際立った特徴といえる。そのため、現在は、本研究で構築した線毛モデルが提示する特徴的な表面構造をターゲットとした定着阻害物質の探索や、当該構造を抗原として認識する抗体の開発を通して、CFA/III線毛の腸管定着機構の更なる理解と効果的なワクチンの開発へ向けた研究を行っている。

5. おわりに

近年、放射光における実験環境の整備が飛躍的に進み、従来まで測定が困難であった蛋白質中に含まれる硫黄原子の微弱な異常分散効果を精度よく測定することが可能となり始めた。この様な精密測定へ向けた実験環境の高度化に加えて、適した測定波長を選定することにより、我々は放射光施設SPring-8のBL38B1における実験において、分子中の硫黄原子の異常分散効果が極めて微弱であると予想さ

れた ETEC 由来の線毛構成蛋白質 CofA の立体構造を、S-SAD 法を用いて初めて決定することが出来た。S-SAD 法は、重原子の結晶への導入や、蛋白質のセレノメチオニン誘導体を調製する必要がなく、蛋白質中に内在する硫黄原子の異常分散効果のみで立体構造決定が可能である強みがある。そのため、今後、単に新規構造を決定する手法としてだけではなく、蛋白質結晶構造解析のハイスループット化へ向けて、益々注目を集める手法になると予想される。

謝辞

本研究は、著者らと大阪大学薬学研究科の岩下丘樹氏、大阪大学大学院工学研究科の小林祐次特任教授、高輝度光科学研究センターの馬場清喜博士、大阪大学微生物病研究所の西村光広博士、本田武司名誉教授、飯田哲也特任教授、ならびに谷口暢特任准教授との共同研究の成果である。また本研究は文部科学省「新興・再興感染症研究拠点形成プログラム」から一部支援を受け、大型放射光施設 SPring-8 で測定（課題番号：2011B1259）で行われた。

参考文献

- [1] Fukakusa, S., Kawahara, K., Nakamura, S., Iwashita, T., Baba, S. *et al.*: Structure of the CFA/III major Pilin subunit CofA from human enterotoxigenic *Escherichia coli* determined at 0.90 resolution by sulfur-SAD phasing. *Acta Cryst.* **D68** (2012) 1418-1429.
- [2] Qadri, F., Svennerholm, A. M., Faruque, A. S., Sack, R. B.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev* **18** (2005) 465-483.
- [3] Gastra, W. & Svennerholm, A. M.: Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* **4** (1996) 444-452.
- [4] Dhakal, B. K., Bower, J. M., & Mulvey, M. A. : Pili, Fimbriae. *Encyclopedia of Microbiology*, edited by M. Schaechter (2009) 470-489. Oxford: Elsevier.
- [5] Taniguchi, T., Fujino, Y., Yamamoto, K., Miwatani, T., Honda, T.: Sequencing of the gene encoding the major pilin of pilus colonization factor antigen III (CFA/III) of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and evidence that CFA/III is related to type IV pili. *Infect. Immun.* **63** (1995) 724-728.
- [6] Craig, L., Pique, M. E., Tainer, J. A.: Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Rev. Microbiol.* **2** (2004) 363-378.
- [7] Wang, J., Dauter, M., Dauter, Z.: What can be done with a good crystal and an accurate beamline?. *Acta Cryst.* **D62** (2006) 1475-1483.
- [8] Liu, Q., Dahmane, T., Zhang, Z., Assur, Z., Brasch, J. *et al.*: Structures from Anomalous Diffraction of Native Biological Macromolecules. *Science* **336** (2012) 1033-1037.
- [9] Watanabe, N.: From phasing to structure refinement in-house: Cr/Cu dual wavelength system and an loopless free crystal mounting method. *Acta Cryst.* **D62** (2006) 891-896.
- [10] Li, J., Lim, M. S., Li, S., Brock, M., Pique, M. E. *et al.*: *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure* **16** (2008) 137-148.
- [11] Taniguchi, T., Akeda, Y., Haba, A., Yasuda, Y., Yamamoto, K. *et al.*: Gene cluster for assembly of pilus colonization factor antigen III of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **69** (2001) 5864-5873.

河原 一樹 KAWAHARA Kazuki

大阪大学大学院 薬学研究科 高分子化学分野
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6
TEL: 06-6879-8222
e-mail: kkkazuki@phs.osaka-u.ac.jp

深草 俊輔 FUKAKUSA Shunsuke

大阪大学大学院 薬学研究科 高分子化学分野
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6
TEL: 06-6879-8222
e-mail: s-fukakusa@phs.osaka-u.ac.jp

大久保 忠恭 OHKUBO Tadayasu

大阪大学大学院 薬学研究科 高分子化学分野
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6
TEL: 06-6879-8222
e-mail: ohkubo@phs.osaka-u.ac.jp

中村 昇太 NAKAMURA Shota

大阪大学 微生物病研究所 附属遺伝情報実験センター
ゲノム情報解析分野
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1
TEL: 06-6879-8365
e-mail: nshota@gen-info.osaka-u.ac.jp