〔生化学 第79巻 第4号



Cytolethal distending toxin の構造と機能と 安定性

1. はじめに

細菌毒素は、細菌によって産生され微量でも生体に重篤 な障害をもたらす毒素の総称である。細菌毒素は、菌体内 毒素(内毒素)と菌体外毒素(外毒素)に分類される.内 毒素はグラム陰性菌外膜の外層にあるリポ多糖 (LPS) が その本体であるのに対して,外毒素は細菌が産生する毒素 活性を示すタンパク質の総称であり、ほとんどは菌体外に 分泌される. 本稿で紹介する cytolethal distending toxin (CDT;細胞膨化致死因子)も外毒素のひとつである、CDT はその毒素活性が、1987年に Johnson と Lior によって病 原大腸菌において初めて報告され¹⁾,1994年にCDTを コードする cdt オペロンがクローニングされた^{2,3)}. cdt オ ペロンは3個の読み枠 cdtA, cdtB, cdtC 遺伝子で構成さ れており、これらの全ての読み枠は、①5′末端に推定の シグナル配列をコードする領域があり、②既存のタンパク 質と有意な相同性を示さない新規のタンパク質をコードし ており、③CDT の毒性発現に必須である、ということが 示された. 以降, CDT をコードする cdtA-cdtB-cdtC 遺伝 子は、赤痢菌 Shigella dysenteriae、カンピロバクター腸炎 の原因菌 Campylobacter jejuni, 軟性下疳菌 Haemophilus ducreyi, 歯周病原因菌Actinobacillus actinomycetemcomitans⁴⁾から次々とクローニングされた。また、CDT の毒性 機構の研究も多数報告され急速に進展した. 1997年, CDT は細胞周期チェックポイントを不可逆的に活性化し て G₂/M 期で停止させる毒素であることが示された⁵⁾. 2000年, CdtB タンパク質がデオキシリボヌクレアーゼ DNase Iと(非常に弱いながらも)相同性を有すること, cdtB 遺伝子を単独で強制発現させた細胞は核クロマチン が崩壊することが示され、CdtB が CDT の活性サブユニッ

トであること、その毒性発現機構は核クロマチンの障害によることが示された[®]. しかし一方、CDT の構造に関する報告は極めて少なかった. これは CDT 毒素タンパク質の精製が非常に困難であることが主な原因であると思われる.

2. 再構成した CDT の精製標品の生化学的解析

CDT 毒素の構造に関する最初の知見は2001年, A. actinomycetemcomitans の CDT (aCDT) の解析で初めて明 らかにされた⁷⁾. A. actinomycetemcomitans はグラム陰性の 通性嫌気性桿菌であり、健常なヒトの口腔内の常在菌であ る. しかし本菌は、限局性侵襲型歯周炎(限局性若年性歯 周炎)の主要な原因菌とも考えられており、また、感染性 心内膜炎、冠状動脈疾患、糸球体腎炎を引き起こすという 報告もなされている.本菌が CDT 様の活性を有すること は1982年に報告され⁸,この因子がCDTであることが 1998年に証明された4). 筆者らは aCDT のタンパク質構造 に興味を持ち、aCDT の精製を精力的に行ったが、通常の カラムクロマトグラフィーでは aCDT を精製することはで きなかった. しかし筆者らは aCDT が容易に再構成するこ とを見出し、再構成 aCDT の精製系を構築した⁷. まず, cdtB 遺伝子の 5′末端から推定のシグナル配列をコードす る領域を欠失させ、3[′]末端に intein-chitin binding domain (CBD) 遺伝子を融合させたキメラ cdtB-intein-CBD 遺伝子 を大腸菌で発現させた.次に、このキメラ CdtB-intein-CBD タンパク質が発現している細胞抽出液と、CdtA と CdtC タンパク質が発現している組換え大腸菌から調製し た細胞抽出液を氷上で緩やかに混合して複合体を再構成さ せた. 再構成標品をキチンビーズカラムに吸着させてカラ ムを洗浄後、ジチオトレイトールを含むバッファーでカラ ムを処理して CdtB タンパク質と Intein-CBD タンパク質を 解離させ、CdtB タンパク質とそれに特異的に結合したタ ンパク質をカラムから溶出させた(この過程で Intein-CBD タンパク質はカラムに結合したまま残り、溶出液には含ま れてこない). この溶出画分には強力な CDT 活性が見出さ れた. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法, 抗血清 を用いたウエスタンブロット法およびエドマン分解法によ るN末端配列解析の結果,この溶出画分にはCdtAタンパ ク質と CdtB タンパク質と CdtC タンパク質がおおよそ 1: 1:1のモル比で見出されること、CdtA タンパク質はN末 端領域に異なるプロセシングを受けたヘテロな分子種とし て混在することが明らかとなった. 従って CDT は CdtA タンパク質と CdtB タンパク質と CdtC タンパク質がおお

2007年 4月] 351

よそ1:1:1のモル比で結合した複合体であることが初めて示された"。同年,同様の結果が再構成されたカンピロバクター CDT においても報告された。。従って,CDT は三つのサブユニットからなるホロトキシンであることが示唆された。

3. 再構成してない組換え aCDT の完全精製

aCDT は安定性が極端に低く、容易に凝集して不活化し てしまう、しかし筆者らは、スクロースが aCDT の安定性 を劇的に向上させることを明らかにした¹⁰⁾. aCDT の活性 は、スクロースが無いバッファー中では4℃の保存によっ て1週間でおおよそ10%程度に減少し、また1回の凍 結・融解処理でほとんど消失する. しかし, スクロースを 含むバッファー中に溶解した aCDT の活性は 4℃ での保存 で少なくとも2カ月間は安定であり、10回以上の凍結・ 融解処理にも完全に安定化していることが明らかとなっ た. 但しスクロースは、通常のカラムクロマトグラフィー による aCDT の精製や aCDT の再生にはほとんど効果が無 かった¹⁰⁾. そこで筆者らは, cdtB の 3′端にヒスチジンタ グ遺伝子 (his) を導入した cdtA-cdtBhis-cdtC 遺伝子を作 製して大腸菌で発現させた. そして発現した aCDT を native なままスクロースを含むバッファーを用いて(前述し た再構成法ではなく) 完全に精製することに成功した100. しかし得られた野生型 CDT の精製標品 (wtCDT) には、 24.5kDa と 18kDa の CdtA タンパク質が毒素複合体のサブ ユニットとして結合しており、結晶化実験には適さないこ とが予想された(図1Bレーン1). そこで、CdtAタンパ ク質の推定シグナル配列を除いたN末端領域の欠失変異 体を5種類作製し、小さい分子量のCdtAタンパク質だけ を発現する欠失変異体の探索を行った. 解析の結果, Δ19-47 変異体 (CdtA タンパク質の19 番目のアスパラギン残 基から 47 番目のプロリン残基を欠失した変異体) が aCDT 活性を維持しつつ CdtA タンパク質のヘテロな発現が抑制 されるクローンとして同定された(図1レーン3). そこ でこの CdtA の Δ19-47 変異を前述の cdtA-cdtBhis-cdtC 遺 伝子に導入して大腸菌で発現させて同様に精製した (A△₁₉₋₄₇CDT). 2種の精製標品 wtCDT と A△₁₉₋₄₇CDT は共 に、CdtA タンパク質と CdtB タンパク質と CdtC タンパク 質がおおよそ1:1:1のモル比で結合した複合体であり (図1レーン1とレーン3),同程度の強力な毒素活性を示 した 10 . しかし、 $A\triangle_{19-47}$ CDT では CdtA タンパク質のヘテ 口な発現が消失していた {図 1-B(a)}. そこで A △19-47 CDT を結晶化実験に使用した.

4. CDT の結晶構造の解析

筆者らは、計 350 リットルの菌体培養液から約 70mg の A△19-47CDT を精製して、結晶化を行い、その結晶構造を 2.4Åの解像度で 2006 年に決定した¹¹⁾. 一方, Nešić らは 軟性下疳菌の再構成(8M 尿素中で完全変性後、尿素を除 いてリフォールドした) した CDT (rc-hCDT) の結晶構造 を 2.0 Åの解像度で 2004 年に決定した¹²⁾. aCDT と hCDT の CdtA, CdtB, CdtC タンパク質の一次構造はそれぞれ 91.5%, 97.0%, 93.5% という高い相同性を示すが, 得 られた両菌種由来の結晶構造もほぼ相同であった. CDT ホロトキシンは、1分子のCdtBタンパク質に1分子の CdtA タンパク質と1分子の CdtC タンパク質が結合した全 体として柄の太いマッシュルームのような形状をしてお り、それぞれのサブユニットは球状タンパク質領域を介し て相互に結合していた (図 2-A). また, aCdtA の Cys-137 と Cys-150, Cys-179 と Cys-198 および aCdtC の Cys-96 と Cys-107, Cys-135 と Cys-149 がそれぞれ 2.5~3.0Åの 距 離で近接しており、これらのシステイン残基は S-S 結合を 形成していることが示唆された¹¹⁾.以下に rc-hCDT および aCDT の両結晶構造から明らかになった重要な特徴を示 す.

1) CDT の毒性活性に重要と思われる構造

CdtB サブユニット: CdtB タンパク質は DNase I の活性に必須な残基をほぼ保存しており、標的細胞の染色体DNA を直接傷害して CDT の毒性を発現する、本毒素の活性サブユニットであると考えられている⁶. しかし CdtB タンパク質は、in vitro ではウシ DNase I のデオキシリボヌクレアーゼ活性の 1/10000 程度の活性(ニッキング活性)しか示さない. CDT の結晶構造中では CdtB サブユニットは、DNase I や HAP1(human DNA repair endonuclease)や大腸菌の exonuclease III に見られる DNase I fold と呼ばれる構造と類似した折り畳み構造をしていた. 従って、CdtB タンパク質が DNase I と類似の活性を有するタンパク質であることが構造的にも支持された¹². 実際、これらの保存性残基をアラニンに置換した変異 rc-hCDT は CDT 毒性が非常に減少した¹³.

CdtA と CdtC サブユニット: CDT の毒性発現には活性 サブユニットである CdtB タンパク質以外に CdtA タンパ ク質と CdtC タンパク質が必要である。そこで CdtA タンパク質と CdtC タンパク質は、CdtB タンパク質を標的細胞 内に侵入させるのに必要な結合サブユニットであると推測 されている。CdtA タンパク質と CdtC タンパク質は一次構

352 〔生化学 第79巻 第4号

Deep Groove

Aromatic Patch

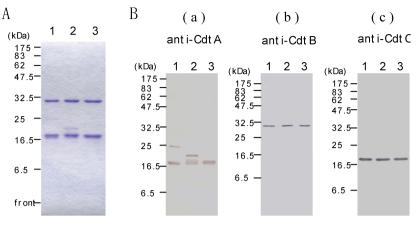


図1 欠失型の aCdtA を含む CDT 精製標品の SDS-ポリアクリルアミドゲル解析(A)とウエス タンブロット解析(B)

(a) 抗 CdtA 血清, (b) 抗 CdtB 血清, (c) 抗 CdtC 血 清を用いた. レーン 1, 野生型 CDT; レーン 2, $A \triangle_{19-38}CDT$; V - V 3, $A \triangle_{19-47}CDT$. aCdtB V31kDa, aCdtC は 18kDa のバンドとして検出され る. aCdtA は 18kDa のバンドに加えて, 24.5kDa (野生型) と 19.5kDa (A△19-38CDT) のバンドが検 出されるが、A△19-47CDTでは18kDaのバンドのみ が検出される.

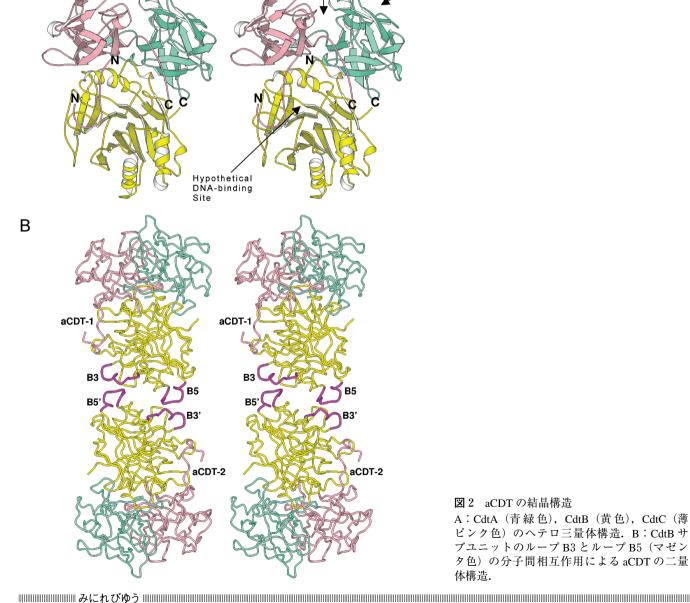


図2 aCDT の結晶構造

A:CdtA(青緑色), CdtB(黄色), CdtC(薄 ピンク色)のヘテロ三量体構造.B:CdtBサ ブユニットのループB3とループB5 (マゼン タ色)の分子間相互作用による aCDT の二量 体構造.

Α

造上では有意な相同性を示さないが、CDT の両結晶構造 において CdtA サブユニットと CdtC サブユニットは共に ヒマ種子に含まれる毒性糖タンパク質リシンのB鎖の第 一繰り返し構造に最も類似した構造をしていた. またレク チン様の CdtA と CdtC が活性サブユニット CdtB に結合し ている構造は、リシンのレセプター結合領域であるB鎖 とリシンの活性サブユニットとの結合様式に類似してお り、CDT はAB₂型のA-B 毒素の一種であることが強く示 唆された¹²⁾. さらに、CdtA サブユニットには 10 個の芳香 族アミノ酸が露出した疎水性領域 aromatic patch が、CdtA と CdtC 両サブユニット間には溝構造 groove が見出された (図 2-A)¹²⁾. これらの構造は CDT と標的細胞との結合活 性等に重要な役割を演じていることが示唆されている13. 現在 CDT のレセプターとして、フコースを含む N 型糖タ ンパク質¹⁴⁾やガングリオシド GM3¹⁵⁾が報告されているが、 aromatic patch や groove がこれらのレセプターの認識や結 合に関与している可能性が考えられる.

2) CDT 複合体の安定性に影響を及ぼす構造

rc-hCDT と aCDT は各サブユニットの一次構造や複合体 の結晶構造が非常に似ているにも拘らず, aCDT は安定性 が低くスクロース依存的である,変性状態から再生ができ ない、通常のカラムクロマトグラフィーで精製ができない 等の性状がrc-hCDTとは大きく異なっている。筆者らは これらの性状の違いが、aCDT の凝集し易い性質に起因し ていると考えた. そこで, rc-hCDT と aCDT の結晶の分子 充填様式を比較したところ, CdtB の 181 番目から 192 番 目の配列 (ループ B5) の違い (aCdtB では¹⁸¹TSSPSSPER-RGY¹⁹², hCdtBでは¹⁸¹NSSSSPPERRVY¹⁹²;下線は保存され ていない残基)が最も分子間相互作用に影響を及ぼしてい ることが示唆された¹¹⁾. この領域は rc-hCDT の結晶では構 造が一部乱れており分子間相互作用をしていなかったが、 aCDT の結晶構造では別の aCdtB 分子の¹³⁵HSDSSL¹⁴¹の領 域 (ループ B3'; hCdtB の 135 番目から 141 番目の配列は aCdtBと全く同じである)と強く相互作用していた(図2-B). 従って, aCdtB のループ B5 とループ B3' が aCdtB タ ンパク質間の相互作用を引き起こして aCDT を凝集させ, aCDT の安定性を低下させると考えられた。スクロースは この aCdtB タンパク質間の相互作用による凝集を緩和さ せる効果があると推定される. では何故, A. actinomycetemcomitans は安定性の低い CDT を産生するのか? A. actinomycetemcomitans は健常なヒトの口腔常在菌でもある ことから、宿主であるヒトへの侵襲的な効果を最小限にす るように CDT 毒素を適応させてきた可能性が考えられる.

或いは、aCDTの安定性を向上させるような突然変異が限 局性侵襲型歯周炎を発症させる一つのトリガーになってい るのかもしれない.

5. お わ り に

CDT は多種類のグラム陰性病原細菌によって産生され、ユニークな毒性機構を示す興味深い外毒素である. CDT 産生細菌における CDT の病原因子としての役割の解明や、CDT の標的細胞内への侵入や核への侵入といった CDT の毒性発現機構の詳細な解明がこれからの重要なテーマになると思われる.

本稿で紹介しました研究において、エドマン法は富山医科薬科大学の五味知治先生、aCDTの結晶化とその解析はカンザス大学の小本純一先生との共同研究で行いました。また、吉川昌之介先生には研究全般に亘りご指導を賜りました。ここに記し感謝いたします。

- Johnson, W.M. & Lior, H. (1987) FEMS Microbiol. Lett., 43, 19–23.
- Pickett, C.L., Cottle, D.L., Pesci, E.C., & Bikah, G. (1994) Infect. Immun., 62, 1046–1051.
- 3) Scott, D.A. & Kaper, J.B. (1994) Infect. Immun., 62, 244-251.
- Sugai, M., Kawamoto, T., Pérès, S.Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., Kurihara, H., Suginaka, H., & Osward, E. (1998) *Infect. Immun.*, 66, 5008–5019.
- Comayras, C., Tasca, C., Pérès, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E., & De Rycke, J. (1997) *Infect. Immun.*, 65, 5088–5095.
- 6) Lara-Tejero, M. & Galán, J.E. (2000) Science, 290, 354-357.
- Saiki, K., Konishi, K., Gomi, T., Nishihara, T., & Yoshikawa, M. (2001) Microbiol. Immunol., 45, 497–506.
- Shenker, B.J., Kushner, M.E., & Tsai, C.-C. (1982) Infect. Immun., 38, 986–992.
- Lara-Tejero, M., & Galán, J.E. (2001) Infect. Immun., 69, 4358– 4365.
- Saiki, K., Gomi, T., & Konishi, K. (2004) J. Biochem., 136, 335–342.
- Yamada, T., Komoto, J., Saiki, K., Konishi, K., & Takusagawa,
 F. (2006) Pro. Sci., 15, 362–372.
- Nešić, D. Hsu, Y., & Stebbins, E.C. (2004) Nature, 429, 429– 433
- 13) Nešić, D. & Stebbins, E.C. (2005) *PLoS Pathog.*, 1, 1–11.
- 14) McSweeney, L.A. & Dreyfus, L.A. (2005) Infect. Immun., 73, 2051–2060.
- 15) Mise, K., Akifusa, S., Watarai, S., Ansai, T., Nishihara, T., & Takehara, T. (2005) *Infect. Immun.*, 73, 4846–4852.

才木 桂太郎¹, 山田 太郎², 田草川 房夫², 古西 清司¹

(1日本歯科大学生命歯学部微生物学講座, 2カンザス大学分子生物化学講座)

Structure, function, and stability of cytolethal distending toxin

Keitarou Saiki¹, Taro Yamada², Fusao Takusagawa², and Kiyoshi Konishi¹ (¹Department of Microbiology, Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, Fujimi 1–9–20, Chiyoda-ku, Tokyo 102–8159, Japan; ²Department of Molecular Biosciences, University of Kansas, 1200 Sunnyside Ave., Lawrence, KS 66045–7534, USA)

マルチドメインキチナーゼの全長構造

1. はじめに

キチナーゼは、N-アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合 で連結したポリマーであるキチンを分解する. キチンは, 不溶性で強固な結晶構造を持ち, 自然界において構造多糖 として見出すことができる。 キチンを細胞壁の構成成分の 一つとして利用している真菌では、生育や形態形成にキチ ナーゼが必要であると考えられている10. 植物は生体中に キチンを持たないものの、生体防御機構の一部としてキチ ナーゼを発現し、病原菌の細胞壁中に含まれるキチンを分 解することで、その生育を阻むとされている²、細菌のキ チナーゼの主要な役割は、キチンを資化し、栄養素を獲得 することと言えるであろう3.いずれにしても、不溶性で 強固なキチンを効率的に分解するために、キチナーゼはマ ルチドメインからなり、活性ドメインに加え、キチン吸着 に関わるなどの補助的なドメインを併せ持っていることが 多い、これは、キチナーゼに限らず、糖質加水分解酵素に 普遍的な特徴であり、多くの場合、ドメイン間は柔軟なリ ンカーで結ばれている. 現在, 原子レベルでタンパク質の 立体構造を知ろうとする場合、最も有力な手段となるのが X線結晶構造解析であるが、これには、目的のタンパク質 を結晶化させることが必要不可欠である. しかしながら, 柔軟なリンカーを持つタンパク質の結晶化は、その自由度 が原因となって困難であることが多い. このような場合, ドメイン単位に分割して結晶化を行うことが最も現実的な 解決法であるが、構造解析が成功しても全長タンパク質と

してのインタクトな構造情報を得ることはできない. 最近, 筆者らは, X線結晶構造解析のこのような短所を補うべく, 低分解能ではあるが, 溶液状態のまま構造解析が可能である X線溶液散乱法を併用することで, 初めてマルチドメインからなる Bacillus circulans キチナーゼ A1 の全長構造を決定した⁴⁾. これを含めて, マルチドメインキチナーゼの全長構造について概説したい.

2. キチナーゼの全長構造解析の現状

マルチドメインキチナーゼの全長構造はこれまで、Serratia marcescens キチナーゼA(ChiA)とB(ChiB)の2例のみが、X線結晶構造解析により明らかにされている5.60. これらのキチナーゼは、いずれも糖質加水分解酵素のファミリー18に属する活性ドメインと、キチン吸着に関わるドメインを一つずつ持っている。これらのドメインおよびリンカーは互いに密着しており、リンカーは硬直していると考えられる。実際、結晶中での原子の熱振動を表すパラメータである温度因子の値が、リンカーと両ドメインとで同程度である。つまり、これまではリンカーが柔軟なタイプのマルチドメインキチナーゼの立体構造解析はなされていなかった。

3. Serratia marcescens キチナーゼ A

ChiA は N 末端のキチン吸着に関わるドメイン(N 末端ドメイン)と C 末端の活性ドメインからなる(図 1). 活性ドメインには、深い基質結合クレフトが存在し、その内部に触媒部位が位置している. ChiA の属するファミリー18 では、「substrate assisted catalysis mechanism」が反応機構として提唱されている n . すなわち、酸性アミノ酸(ChiA では Glu315)が酸塩基触媒として作用し、基質自体の C2 位のアセトアミド基が求核性触媒として直接反応

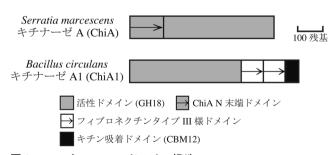


図1 ChiAと ChiA1のドメイン構造

GH は糖質加水分解酵素 (glycoside hydrolase) の活性ドメイン, CBM は基質結合ドメイン (carbohydrate-binding module) を意味する. いずれもアミノ酸配列の相同性により分類される.