

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 25 年度博士課程 進学

氏 名 張 榮維

指導教員名 伏信 進矢

論文題目

グループ B に属するリボヌクレアーゼコリシンの構造機能研究

バクテリオシンは細菌が生産するタンパク質毒素であり、同一ニッチにある他細菌に対する優位性獲得の手段として利用される。このうち、大腸菌およびその近縁細菌が有するバクテリオシンをコリシンと呼ぶ。コリシンは生産菌が持つ Col プラスミドにコードされており、同種のプラスミドを持たない他の感受性菌に作用する。コリシンの抗菌スペクトルは非常に狭く、生産菌と同種、あるいは近縁細菌にのみ作用するが、この点で抗生物質や他の生物毒素と異なる。コリシン D は ColD プラスミドにコードされた 697 アミノ酸からなる毒素タンパク質であり、その C 末端に存在する RNase ドメイン (C-terminal RNase Domain, CRD) が感受性菌の tRNA^{Arg} を特異的に切断する。コリシン生産菌は、自身が生産したコリシンによる「自殺」を防ぐために特異的な免疫性遺伝子を持つ。コリシン D の免疫性遺伝子にコードされるタンパク質 ImmD は 94 アミノ酸からなり、CRD とヘテロダイマーを形成することでその活性を阻害する。大腸菌には 4 種類の tRNA^{Arg} が存在するが、コリシン D はこれらのアンチコドンループの 3' 末端を特異的に切断し、タンパク合成を阻害する。生産菌から放出されたコリシンは、感受性菌の細胞表層に存在する特異的レセプター及びインポートシステムを経由して細胞内へと侵入する。このインポートシステムとして、TolA, TonB 及びこれに付随するシステムが利用されるが、TolA に依存するものはグループ A に、TonB に依存するものはグループ B に大別される。本研究で主な対象としたコリシン D はグループ B に属しており、鉄の取込みに関わる外膜レセプター FepA に結合し、TonB システム (TonB, ExbB, ExbD) を経由して細胞内に取り込まれた後、CRD が切り出されて細胞質内へと透過し、標的 tRNA に作用する。

コリシン D は、N 末端より translocation ドメイン (NTD、約 310 アミノ酸)、central ドメイン (CD、約 280 アミノ酸)、CRD (約 100 アミノ酸) の 3 つのドメインから構成される。このうち NTD は、コリシン B の N 末端領域と高い相同性を示す (配列同一性 95.2%)。コリシン B は感受性菌内膜にイオンチャンネル孔を形成する活性を持つが、コリシン D と同じグループ B に属しており、NTD の相同性から、両者の外膜透過経路は同一であると考えられる。また、コリシン B 全長の結晶構造が決定されたことから、構造生物学的な理解が可能となった。一方、

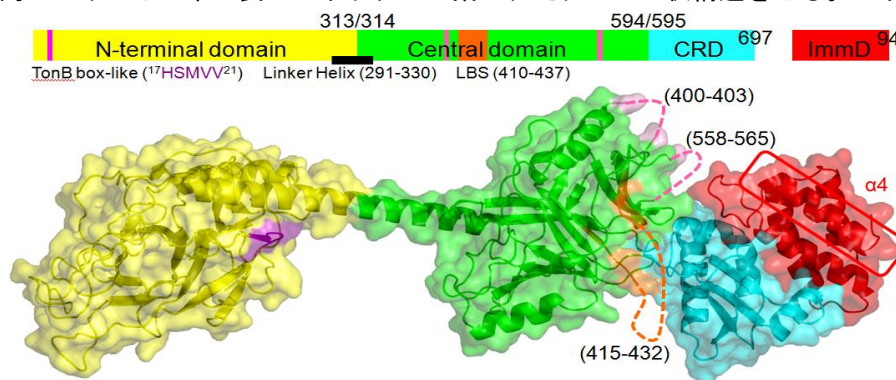
コリシン D の内膜透過には CD が関与すると考えられるが、その経路については多くの不明な点が残されていた。その理由の一つとして、これまでの議論が生化学的実験のみに基づいていたことが挙げられた。コリシン D に関しては、CRD と ImmD の複合体結晶構造が得られているのみで、CD の構造は未解明であった。そこで、本研究は、コリシン D の全体構造を決定することで、コリシン D の膜透過経路および個々のドメインの機能を明らかにすることを目的とした。また、コリシン D の tRNA^{Arg} 選択性と反応機構を構造生物学的に明らかにするために、CRD と tRNA との共結晶構造解析も試みた。更に、コリシン D による tRNA 切断を介した細胞死誘導機構についても検討を行った。

第 1 章 全長コリシン D の構造解析

本章では、コリシン D 全長タンパク質を用いて様々な条件で結晶化実験を行ったが、低分解能 (8.3 Å) の X 線回折を示す結晶しか得られなかった。全長コリシン D 結晶の分解能が低い理由の一つとして、分子全体が細長い構造をとるため、ドメイン配置が結晶格子内にコンパクトにおさまらないことが考えられた。そこで、コリシン B と高い相同性を示す NTD を欠失させることで、分解能が高い結晶が得られると期待した。

第 2 章 コリシン D313 (CD-CRD) 及び NTD の構造解析

コリシン D の NTD を欠失した 313 - 697 アミノ酸領域のコンストラクト (コリシン D313) を作製し、結晶化を行った。その結果、硫酸アンモニウムと PEG 400 を沈殿剤として用いた条件で分解能 1.85 Å の native データセットが得られた。そこで、次に Se-SAD 法を用いた位相決定を試みたが、野生型コリシン D313 では SeMet 置換体結晶が成長しなかった。これは、N 末端に連続して Met が存在するためと考え、これらを置換した三重変異体 (M344K/M345A/M352L) を用いて SeMet 置換体結晶を作製し、位相決定を行った。一方、NTD (1 - 321 アミノ酸領域) のみでも結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。本研究で決定したコリシン D313 の結晶構造は NTD を欠失しているが、コリシン B の NTD との類似性を利用することで、コリシン D の全体構造を推定した。コリシン D とコリシン B は、共に感受性菌の外膜に存在する FepA レセプターを利用して感受性菌の periplasm に侵入する。コリシン B の構造は 2 つのドメインに分けられ、両ドメインは一本の長いヘリックスで繋がれたダンベル状構造をとる。コリシン D313



の結晶構造を解析した結果、N末端の313-330アミノ酸領域が、コリシンBの長いヘリックスの一部に相当しており、両者はよく重なることが分かった(18個のアミノ酸のC α のroot mean square deviation = 0.262 Å)。これを踏まえ、コリシンDのNTDをホモロジーモデリングにより構築した後、このヘリックス部分を通してコリシンD313の構造に重ねることで、コリシンD全長(NTD、CD、CRD)の推定構造を得た。更に、すでに決定されていたCRDとImmDの複合体結晶構造を利用することで、コリシンD全長-ImmDヘテロダイマーの全体構造の推定に成功した。

全長コリシンDの構造を用いて、感受性菌への透過経路を以下のように推定した。まず、NTDは外膜に存在するFepAレセプターに結合し、そのバレル状のトンネル内を通過する。この際、コリシンDのN末端のTonB box配列(17-21アミノ酸領域にあるHSMVV)が内膜のTonBタンパク質に結合し、内膜のプロトン駆動力を利用することで、periplasmへと移行する。この過程でImmDがCRDから解離し、膜外に残ると考えられる。また、本研究により、CDには大部分がdisorderした長いループ状構造(413-436アミノ酸)をとる領域が存在することが分かった。以前の報告から、この領域は内膜に存在するシグナルペプチダーゼLepBと相互作用することで、内膜透過を促進することが示唆されていた。この領域がフレキシブルなループ構造をとることで、LepBとの相互作用を容易にしていると考えられる。また、LepBに捕えられたコリシンDのCRDが細胞質に到達する際に、内膜のAAA+プロテアーゼであるFtsHによりCDとCRDの間(589-590アミノ酸領域)が切断されることが報告されていた。本研究により、589-590の部分はCD構造の内部に位置することが判明したことから、FtsHによる切断には、この領域の部分的なunfoldingが必要であることが分かった。

第3章 コリシンD/tRNA複合体のX線結晶構造解析

アミノアシル tRNA 合成酵素は、tRNA の 3'末端にアミノ酸を付加する機能を持ち、tRNA を特異的に認識する酵素の代表例である。一方で、コリシンDのCRDの分子量は約12,000であり、同一tRNAを認識する大腸菌ArgRS(分子量:約65,000)に比べると分子サイズは小さいが、高い基質特異性を示す。分子の大きさから考えれば、CRDはArgRSのようにtRNA全体を認識することは不可能であり、切断部位であるアンチコドンループ近傍の塩基、或いは構造を認識すると予想される。これまでの生化学的実験結果から、アンチコドン3文字目のGおよびDループ上の塩基が切断効率および基質認識に影響することが示されているが、認識機構の完全な解明には至っていない。そこで、本章では、コリシンDとtRNAとの共結晶の取得を試みた。結晶性を向上させるために、N末端長を変化させた様々なコリシンDを用いた。また、基質tRNAについても、コリシンDによる切断を受けづらくするために塩基置換を施すなどの工夫を試みた。しかし、結晶化には至らなかった。この原因の一つとして、コリシンDのtRNA切断活性が非常に高く、tRNAと安定した複合体構造を維持できないことが考えられた。そこで、触媒残基を変異させた変異型コリシンDも用いたが、共結晶は得られなかった。また、変異導入によりタンパク質溶解度が大幅に低下したものもあり、こうしたことも結晶化出来なかった原因に挙げられた。

第4章 tRNAの切断と細胞死誘導との関係の解析

tRNAは細胞にとって必須の因子である。従って、コリシンDによるtRNA切断は、感受性菌の速やかな細胞死を誘導すると考えられていた。これは、コリシンDを短時間作用させただけで、感受性菌のコロニー形成能が顕著に低下することからくる「印象」も影響していると思われる。しかし、コロニーを形成しないことが細胞の「死」を意味するとは限らない。すなわち、tRNAが切断された感受性菌は、生きてはいるがコロニー形成能を失っている可能性もある。これに対し、温度感受性コリシンDを用いて任意の期間だけ感受性菌のtRNA切断を行うことで、少なくとも4時間は感受性菌の静菌的生育停止が観察されることが示されていた。そこで、これを担う因子を調べたところ、tmRNA及びSmpBが必要であることが分かった。これらの因子は、mRNA上で異常停止したリボソームのレスキューシステムであるtrans-translationを構成する。更に、この結果を補強するために、野生型コリシンDを作用させた感受性菌の生死を、LIVE/DEAD染色により調べた。その結果、tRNA切断特異的に静菌的生育停止が誘導されること、これにはtrans-translationが必要であることがあらためて示された。コリシンDやE5の生産菌集団は、他の大腸菌集団の生育を抑制しつつ、その間に自らの集団の細胞数を増やし、優位性を確保している可能性がある。

総括

本研究では、コリシンDのCD-CRDの結晶構造を決定し、これを用いて全長コリシンDの立体構造モデルを構築した。特に、CDの立体構造を初めて決定したことにより、内膜透過に関わる因子と相互作用する領域の構造的特徴を明らかにした。コリシンDのCDのcore foldは、グループAやグループBコリシンのN末端に存在するtranslocationドメインと似ていたことから、これらのドメインは共通のタンパク質を祖先に持ち、細菌の外膜及び内膜に存在する様々なタンパク質をハイジャックすることで透過機能を持つように分子進化してきたと予想された。更に、全長コリシンDの構造から、感受性菌の外膜と内膜を通過して最終的にCRDが細胞内に到達する経路を推定することができた。CRDが細胞内のtRNA^{Arg}を特異的に認識・切断する機構の構造基盤の解明には至らなかったが、一方でCRDの活性により引き起こされるタンパク質合成の阻害が感受性菌に与える影響の一端を明らかにすることができた。すなわち、tRNAを切断された大腸菌は直ちに細胞死には至らず、一定時間はtrans-translationに依存して静菌的に生育を停止することが分かった。tRNA切断によりコロニー形成能が低下することから、最終的には死菌となると考えられる。あるいは、生きてはいるがコロニーを形成出来ない状態へと移行する可能性もある。本研究により明らかにした、コリシンDの感受性大腸菌への侵入経路およびCRDの高い基質特異性に関する知見は、他のコリシン様バクテリオシンの作用機構解明にも貢献できると考えられる。更に、大腸菌感染症に対する治療など、臨床方面への応用も期待される。