

## 2 成分毒素の酵素サブユニット CPILE-a の構造解析 Crystal structure of catalytic subunit of binary toxin, CPILE-a

吉田徹, 津下英明\*

京都産業大学 総合生命科学部, 〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

Toru Yoshida and Hideaki Tsuge\*

Kyoto Sangyo University, Motoyama Kamigamo, Kita-ku, Kyoto, 603-8555, Japan

### 1 はじめに

2 成分毒素は、酵素活性を持つ触媒サブユニットと、触媒ユニットを標的細胞内へ輸送するための輸送サブユニットから構成される。輸送サブユニットは標的細胞膜に存在する受容体に結合した後、標的細胞膜上のプロテアーゼによって N 末端が切断され、多量体化して孔を形成する。そしてさらに、多量体は膜貫通孔を形成するように構造変化を起こす。触媒サブユニットは、この孔をアンフォールドしながら通過すると考えられているが、触媒サブユニットが多量体化した輸送サブユニットにどのように結合するのか、また、触媒サブユニットがどのようにアンフォールドするのかはよく分かっていない。そこで我々は、2 成分毒素である *Clostridium perfringens* iota-like toxin (CPILE) に注目し、その構造を X 線結晶構造解析によって明らかにすることとした。なお CPILE は、ADP リボシル化酵素として機能する触媒サブユニット (CPILE-a) と、輸送サブユニット (CPILE-b) より構成される。

### 2 実験

#### 【精製と結晶化】

CPILE-a 全長は N 末 GST タグと共に大腸菌で発現させた。大腸菌破碎上清を Glutathione Sepharose に通した後、GST タグをスロンビンによって切断し、さらにゲルろ過クロマトグラフィーを通して精製品とした。CPILE-a の結晶は 100 mM Tris pH8.5, 18% PEG4000, 200 mM MgCl<sub>2</sub> の条件で得ることが出来た。NAD<sup>+</sup>, NADH との共結晶化は、それらを高濃度 (10mM) で加えることで達成された。CPILE-b の結晶化も試みたが、現時点で良質な結晶は得られていない。

#### 【構造解析】

位相決定のために、CPILE-a の持つ 3 つのセリンをシステインに置換した変異体の結晶を作製した。それは、wild-type CPILE-a がシステインを持っておらず、wild-type CPILE-a の結晶に重原子が結合しなかったためである。3 重システイン変異体の結晶に 1 mM HgCl<sub>2</sub> をソーキングし、SHELX を用いた SAD 法で位相を決定した。精密化は COOT, Phenix を用いて行った。

### 3 結果および考察

CPILE-a, CPILE-a/NADH, CPILE-a/NAD<sup>+</sup> の構造を、2.0 Å, 2.3 Å, 1.8 Å の分解能で各々決定した。

CPILE-a の構造は、Ia (CPILE と相同な酵素) の構造によく似ていた。しかし、基質である actin と相互作用すると予想される側に、Ia にはない 2 本のループが突き出していた (Protruding loop (PT-) I, II) (図 1)。PT-I, II 各々のアミノ酸をアラニンに置換し活性を測定した結果、PT-I のみ actin との結合に重要であることが分かった。また、Ia/actin 複合体で見られた actin の Glu270 側鎖を収納するポケット (Tyr, Leu, Lys より構成される) は、CPILE-a でも同様に保存されていた。そのため Glu270 を介した相互作用は CPILE-a でも Ia と同様に重要であることが示唆された。

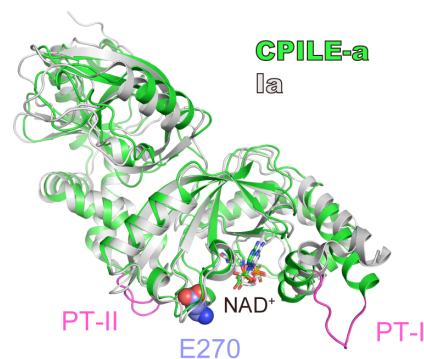


図 1 : CPILE-a/NAD<sup>+</sup> と Ia/NAD<sup>+</sup> の重ね合わせ

### 謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費基盤研究 C 「ADP リボシル化酵素 C3 の RhoGTPase 認識機構の解明」 (15K08289) の支援を受けて行われました。放射光実験ではいつもスタッフの皆様にお世話になっており、深く感謝申し上げます。

### 参考文献

[1] W. Toniti *et al.*, PLoS ONE 12, e0171278 (2017).

\* tsuge@cc.kyoto-su.ac.jp