

## 「梅毒トレポネーマの外膜タンパク質の生合成解析法の構築と阻害剤探索」

国立大学法人 宮崎大学 フロンティア科学総合研究センター 准教授

塩田 拓也

## 要旨

梅毒の原因菌である *Treponema pallidum* は、純粋培養できないため、生理学的理解やワクチン開発が遅れている。本研究では、*T. pallidum* の感染や生育に重要なタンパク質である外膜タンパク質(Outer membrane Protein: OMP)に着目しその解析法を開発した。具体的には、OMP の正しい立体構造での膜挿入(アセンブリー)反応を *T. pallidum* と同じグラム陰性菌に属する大腸菌から単離した膜画分 *E. coli* Microsomal Membrane (EMM) による再構築実験系である。モデル基質には TprD を選択し、*in vitro* 合成した TprD を EMM とインキュベートすることでアセンブリー反応が再現できた。TprD は予測構造と同じく EMM 中で三量体を形成した。アセンブリーは、輸送装置である BAM 複合体によって行われていた。さらに、表層露出領域と予測される部分に対する抗体を作成し、アセンブリー後の TprD と反応させると適切に抗体が結合できた。これにより *T. pallidum* の OMP の生化学的解析や、ワクチン候補となる領域の探索が可能なる方法が開発できた。

## 背景・目的

梅毒は、日本でも若年層を中心に爆発的に感染が拡大している。さらに、アジスロマイシン耐性梅毒の発生が確認されている。感染拡大・薬剤耐性菌が出現している現在において最重要項目は、新規抗菌薬やワクチンの開発である。また、早期診断方法の確立も必要である。これらを実現するための基礎研究としては、梅毒の原因菌である梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*) を TpCM-2 と呼ばれる血清含有組織培養培地でウサギ上皮細胞 (Sf1Ep) と共培養する方法が確立されている (1)。これに伴い、遺伝子解析などは可能になってきているが、純粋培養系がないため、生化学的解析などは難しい。

*T. pallidum* は、グラム陰性菌に属し、細胞膜(内膜)に加えて外膜を有する構造で、螺旋状の形態をとる。グラム陰性菌の外膜は、リン脂質とリポ多糖からなる非対称膜に、βバレル型の膜貫通領域をもつ OMP と、リポタンパク質と呼ばれるリン脂質に共有結合し外膜に局在するタンパク質が存在している(図1)(2)。外膜は、外界との接点として栄養老廃物の交換などの生育に必須な機能や、宿主-病原菌間相互作用や毒素分泌といった感染に必要な機能の舞台となる。これら様々な機能を外膜に付与している主な因子が OMP である。また、OMP の表層に露出している部分は、抗原となりやすくワクチン開発において重要な情報を提示する。OMP はβバレル型の膜貫通領域を持ち、この立体構造形成を伴った膜挿入

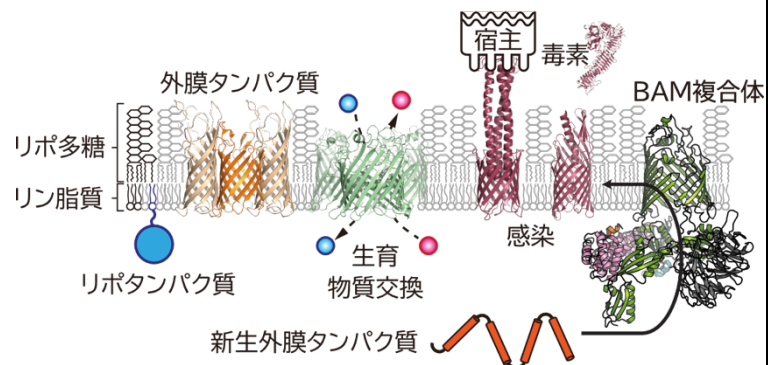


図1 グラム陰性菌外膜の模式図

(アセンブリー) が機能発現に必須である。

アセンブリーは、外膜に存在する Beta-barrel Assembly Machinery (BAM) 複合体によって行われる(3)。BAM 複合体は、輸送する OMP (基質) に存在する  $\beta$  シグナルと呼ばれる特定のアミノ酸配列を認識する。BAM 複合体の主要なサブユニットである BamA と BamD、さらに基質中の  $\beta$  シグナルは高度に保存されている(4)。すなわち、アセンブリー過程は抗菌薬の標的になる上に、アセンブリーされた OMP を解析できるようになれば効果的なワクチンとなる領域を決定することができる。そこで、本研究では、*T. pallidum* と同様に BAM 複合体を持ちグラム陰性菌のモデル生物である大腸菌を用い、大腸菌内の異物タンパク質を除去するシステムをできるだけ排除するために、単離した膜ベシクル画分 *Escherichia coli* Microsomal Membrane (EMM) を用いた再構築実験系を採用した(5)。

## 方法

### 1. *T. pallidum* の OMP の *in vitro* 合成

*T. pallidum* の OMP のうち TprB、TprC、TprD、TprF、Tp0479、Tp0548、TprI、TprJ、TprK、TprL の 10 種類を先行研究および構造予測から選定した。これらのアミノ酸配列を元に IDT 社のプログラムを用いてウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) での翻訳用にコドン最適化させた。得られた DNA 配列の 5'-UTR には Sp6-RNA polymerase binding site と  $\beta$ -Globin Leader 配列を、3'-UTR には poly リジン配列を付加することで *in vitro* 転写、翻訳の効率を高めた。この配列の合成遺伝子を PCR で増幅し、*in vitro* 転写用のテンプレート DNA とした。*In vitro* 転写は、Sp6 RNA polymerase によって、38°C 90 分で行い、反応後には反応液をウサギ網状赤血球ライセート (Retic) による *in vitro* 翻訳に加えた。Retic 反応液には、<sup>35</sup>S 放射性同位元素でラベルされたメチオニン、システインを加え、30°C で 90 分インキュベートした。反応後の Retic 溶液を *in vitro* 翻訳タンパク質として、以降の解析に用いた。

### 2. EMM の調整

大腸菌 (BL21、BamA シャットオフ株、BamD シャットオフ株) を培養し、OD<sub>600</sub>=1.0–1.2 程度で菌体を回収した。回収した菌体を Sonication buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) で懸濁し、超音波破碎にかけた。破碎後の菌体を 3,000 *xg* 10 分 4°C で分離し、上清をさらに 10,000 *xg* 10 分 4°C で分離し沈殿を EMM 画分として回収した。EMM は、SEM Buffer (250 mM Sucrose, 10 mM MOPS -KOH pH 7.2, 1 mM EDTA) に再懸濁した状態で保存した。

### 3. EMM アセンブリーアッセイ

保存していた EMM を 10,000 *xg* 10 分 4°C で再度回収し、AA Buffer (250 mM Sucrose, 1% (w/v) BSA, 10 mM MOPS-KOH, 15 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 2.5 mM KPi, 4 mM Methionine, 4 mM Cysteine, 0.09% (v/v) TritonX-100) で懸濁した。EMM 溶液に対して *in vitro* 翻訳反応後の retic 溶液を加え 30°C で任意の時間インキュベートした。各時間経過後、反応液を氷上に移し反応を停止した。反応停止後は、各結果に記載された処理をしたのちに、EMM を 10,000 *xg* 10 分 4°C で再度回収し、SDS Sample Buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 mM EDTA-NaOH pH 8.0, 2% (w/v) SDS, 1% (w/v) Sucrose, 0.03 (w/v) Bromophenol blue, 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol) で懸濁し、SDS-PAGE で展開したのちに、ラジオイメージングによって検出した。

### 4. 蛍光抗体によるアセンブリーされた TprD の解析

EMM アセンブリー反応後の EMM を遠心 (12,000 *xg*, 10 分, 4°C) で回収し Elix 水で懸濁した。こ

の工程を2回繰り返す、懸濁液をスライドガラスにアプライし、60°Cで15分乾燥した。乾燥後、5% (w/v) BSA を含む TBST (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) をスライドガラスに滴下し30分間室温で乾燥しないように放置した。TBSTで洗浄後、5% (w/v) BSA を含む TBST 溶液に一次抗体を加えてスライドガラスへアプライし、60分間室温で反応させた。洗浄後、5% (w/v) BSA を含む TBST 溶液に二次抗体 (Cy5 が付加されている) をスライドガラスへアプライし、60分間反応させた。TBSTで3回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

## 結果

### 1. *T. pallidum* の OMP は、EMM 中で $\beta$ バレル構造を形成する

コドン最適化により方法に記載した候補のうち TprI を除く全てを Retic で合成することができた。これらを EMM アセンブリーアッセイで解析した。OMP は、 $\beta$  バレル構造を形成すると、SDS 存在下でも立体構造を形成できるが、サンプルを加熱処理すると  $\beta$  バレルを形成する  $\beta$  ストランド間の水素結合が破壊され立体構造が壊れる。これらを比較するとゲル中の移動度 (見かけの分子量) が大きな変化が観察できる。すなわち、加熱の有無により SDS-PAGE 上での泳動度の違いを確認することで  $\beta$  バレル構造の形成を確認でき、これを Heat modifiability という(6)。全 10 種類の OMP について EMM アセンブリーアッセイを行い、Heat modifiability が見られるかを確認した (図2)。その結果、TprB、TprC、TprD、TprF、Tp0548、TprJ、TprL の7つにおいては非加熱で 100 から 150 kDa 付近にバンドが見られ、これは加熱されると概ね 50 から 75 kDa 付近にバンドが移動し、Tp0479 では、非加熱サンプルは加熱サンプルより若干大きく泳動されるという結果が得られ、これらは  $\beta$  バレル型膜タンパク質の特徴が観察された。TprK は、泳動度の違いが観察されなかった。

最も Heat modifiability が強く観察された TprD を以降モデル基質として決定した。Heat modifiability によって  $\beta$  バレル構造の形成が示唆されたが、膜に挿入されているかを調べるために尿素処理実験を行った。正しく膜にアセンブリーされた OMPs は 6 M 程度の高濃度の尿素に対しても耐性を示し、尿素処理後に超遠心分離をすると膜とともに沈殿画分に回収される(7)。一方、膜表在性タンパク質や、可溶性タンパク質は、尿素処理後には超遠心分離後の上清に回収される。TprD を基質として EMM アセンブリーアッセイを行った後、EMM を 6 M Urea で可溶化し、超遠心分離で沈殿 (ppt) と上清 (sup) に分け、これらを 1 の実験と同様に SDS-PAGE とラジオイメージングで解析した (図3)。その結果、TprD の 150 kDa 付近のバンドは尿素処理で沈殿画分に得られたため正しく膜挿入されていた。

### 2. TprD は BAM 複合体依存的に膜挿入される

次に TprD のアセンブリーが *in vivo* で起こっている BAM 複合体を介した過程で行われているかどうか

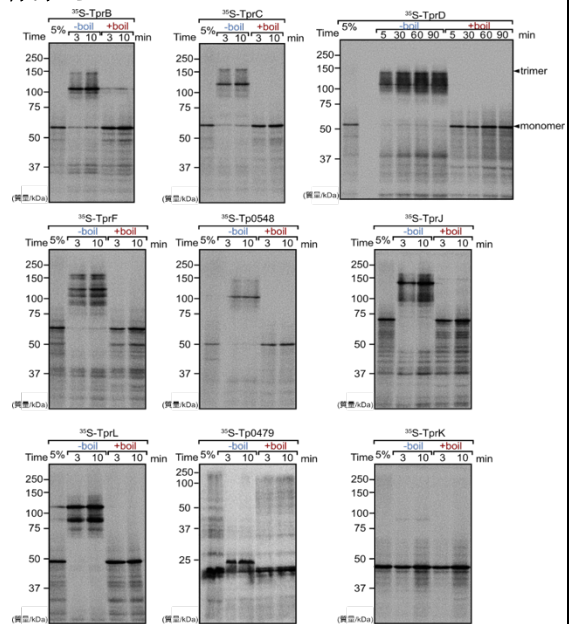


図2 *T. pallidum* の OMP の EMM アセンブリーアッセイ

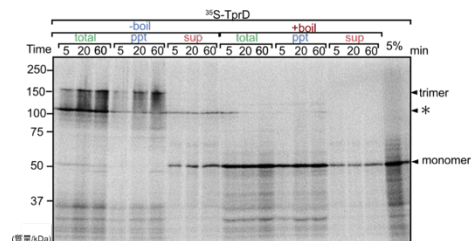


図3 TprD の尿素処理実験

かを調べるために、BAM 複合体のうち必須因子である BamA と BamD の発現をそれぞれ制御できる大腸菌から EMM を単離して EMM アセンブリーアッセイを行った (図4)。BamA と BamD の制御は、アラビノースプロモーターにより、培地に添加するアラビノースで発現、グルコースで抑制した。BamA および BamD を枯渇させた条件 (Glu) から単離した EMM を用いた結果では、TprD の 150 kDa 付近のバンドの形成効率が著しく低下していた。このことは TprD が BAM 複合体を介してアセンブリーされていることを示唆している。

### 3. EMM にアセンブリーされた TprD の抗体結合

ここまでの解析から EMM アセンブリーアッセイによって TprD が BAM 複合体を介して正しく膜にアセンブリーされていることが明らかになった。そこで、アセンブリーされた TprD の細胞表層露出部分が適切に溶液中に存在するかを確認するために抗体結合実験を行った。具体的には、TprD の予測構造中で最も大きい 11 本目と 12 本目の  $\beta$  ストランドの間にあるループ部分の一部の領域 (338-352 アミノ酸) に対するペプチド抗体を作製した。TprD を基質として EMM アセンブリーアッセイを行ったのち、EMM の膜ベシクルに対して抗体染色を行った。一次抗体として作製したペプチド抗体を、二次抗体として Cy5 が付加された蛍光抗体を用いた。コントロールには、TprD の DNA を用いずに *in vitro* 転写、翻訳をした Retic 反応液による EMM アセンブリーアッセイのサンプルを用いた。その結果、TprD をアセンブリーさせた EMM はコントロールの EMM に対して 30 倍以上の蛍光強度が得られた (図5)。このことから、EMM にアセンブリーされた TprD は、ループ部分に抗体が結合できた。

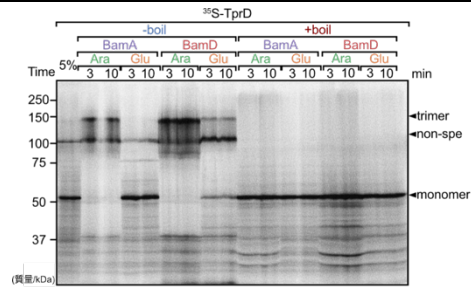


図4 TprDのBamA、BamD依存的なアセンブリー

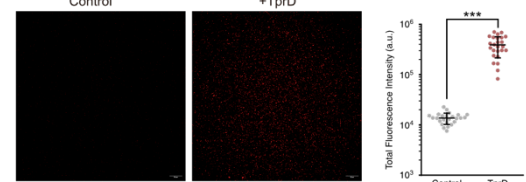


図5 TprDの尿素処理実験

## 考察

本研究では、*T. pallidum* の OMP の解析のための新規モダリティとして大腸菌の膜ベシクル画分である EMM を用いた *in vitro* 再構築実験系の開発に成功した。*T. pallidum* の OMP10 種類のうち9種類で Heat modifiability が確認でき、モデル基質として利用した TprD については BAM 複合体を介して外膜にアセンブリーされていることが確認できた。これは *T. pallidum* も有するグラム陰性菌に広く保存されている細胞内での過程を再現できているため、EMM にアセンブリーされた OMP の立体構造は *T. pallidum* の外膜中の構造と一致しているという高い信頼性がある。今後、EMM にアセンブリーされた OMP の機能解析を通して、*T. pallidum* のそれぞれの OMP の機能が解明され効果的な抗菌薬や感染阻害薬が開発できると考えられる。

また、抗体染色実験において、予測された細胞表層ループに対する抗体が適切に結合できることが示された。 $\beta$  バレル型膜タンパク質の構造予測の信頼性は、膜貫通領域の  $\beta$  ストランド部分が高く、ループ部分は低い。ループ部分は細胞表層に露出するため、この部分が免疫機構と密接に関与することを考慮すると予測だけでは不十分でありタンパク質を用いた解析が必要である。EMM アセンブリーアッセイは、信頼性の高い立体構造によって膜に挿入されているため、抗体が結合できうる「開いた」ループ部分の探索が可能になる。今後、EMM アセンブリーアッセイとファージディスプレイ法、ペプチドアレイ法などを組み合わせることで、開いたループを決定することで、効果的なワクチン開発が期待できる。

## 共同研究者

なし

## 引用論文

1. Fieldsteel, A.H., Cox, D.L., and Moeckli, R.A. (1981). Cultivation of Virulent *Treponema pallidum* in Tissue Culture. *Infect Immun* **32**, 908–915.
2. Gan, L., Chen, S., and Jensen, G.J. (2008). Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 18953–18957.
3. Plummer, A.M., and Fleming, K.G. (2016). From Chaperones to the Membrane with a BAM! *Trends in Biochemical Sciences* **41**, 872–882.
4. Voulhoux, R., and Tommassen, J. (2004). Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Research in Microbiology* **155**, 129–135.
5. Gunasinghe SD, Shiota T, Stubenrauch CJ, Schulze KE, Webb CT, Fulcher AJ, Dunstan RA, Hay ID, Naderer T, Whelan DR, Bell TDM, Elgass KD, Strugnell RA, Lithgow T. (2018) The WD40 Protein BamB Mediates Coupling of BAM Complexes into Assembly Precincts in the Bacterial Outer Membrane. *Cell Rep.* **3**, 2782-2794.
6. Thewasano N, Germany EM, Maruno Y, Nakajima Y, Shiota T. (2023) Categorization of Escherichia coli outer membrane proteins by dependence on accessory proteins of the  $\beta$ -barrel assembly machinery complex. *J Biol Chem.* **299**, 104821.
7. Germany EM, Thewasano N, Imai K, Maruno Y, Bamert RS, Stubenrauch CJ, Dunstan RA, Ding Y, Nakajima Y, Lai X, Webb CT, Hidaka K, Tan KS, Shen H, Lithgow T, Shiota T. (2024) Dual recognition of multiple signals in bacterial outer membrane proteins enhances assembly and maintains membrane integrity. *Elife.* **12**, RP90274.

## 助成研究に関連した発表論文

なし