

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24117006

研究課題名(和文)バクテロイデーテス細菌の滑走運動マシナリーの構造とダイナミクス

研究課題名(英文)Structure and dynamics of gliding machinery in Bacteroidetes phylum bacteria

研究代表者

中山 浩次(NAKAYAMA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：80150473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 71,800,000円

研究成果の概要(和文)：Flavobacterium johnsoniaeなどのバクテロイデーテス門細菌の多くは、独特のメカニズムによって表面上で急速な滑走運動を示す。この滑走運動は、GldおよびSprタンパク質からなる新規な運動装置に依存し、SprBアドヘジンが必要である。SprBは、細胞表面から伸びる150 nm長の細いフィラメントであり、菌体上を閉環のラセンループに沿って動き、基盤に付着すると細菌細胞の回転と並進を引き起こすと考えられる。GldJによるマルチレール構造が外膜の内側表面にあり、SprBアドヘシンがこの構造に沿いながら移動することで滑走運動が生じると思われる。

研究成果の概要(英文)：Many of the Bacteroidetes phylum bacteria such as Flavobacterium johnsoniae exhibit rapid gliding motility on the substratum by a unique mechanism. This gliding motility relies on novel gliding machinery consisting of Gld and Spr proteins and requires SprB adhesin. SprB is a thin filament of 150 nm length extending from the cell surface, it is thought that SprB movement on the bacterial body along the closed spiral loop and attachment to the substratum cause rotation and translation of the bacterial cell. The multi-rail structure by GldJ is on the inner surface of the outer membrane, and gliding motility is supposed to occur by the movement of SprB adhesin along this structure.

研究分野：細菌学

キーワード：運動 細菌 蛋白質分泌

1. 研究開始当初の背景

細菌は運動性・非運動性の細菌に大別され、運動性の細菌はべん毛、ペリプラズムべん毛、IV型線毛などを用いて位置移動する。運動性細菌のなかには固体表面を滑るように動くものがあり、滑走運動 (gliding motility) と呼ばれる。グラム陰性菌の一大グループであるバクテロイデーテス細菌に含まれる多くの細菌は滑走運動を行うがそのメカニズムは不明である。その運動様式は複雑で、前後に滑るように運動し、反転し、回転する、が組み合わさったものである (Fig. 1)。この滑走運動にかかわるタンパク質群は、バクテロイデーテス細菌が引き起こす様々な感染症と深く結びついている。たとえば、バクテロイデーテス細菌に含まれる歯周病原細菌やアユ冷水病原細菌などの病原細菌にも滑走運動関連遺伝子群が存在し、病原性プロテアーゼの分泌に関わる。つまり、運動と分泌という2つの機能をもつ複合的マシナリーとして、広く保存されている。この運動マシナリーの全容を解明することは、ユニークな分子機械の仕組みが解かるだけでなく、このマシナリーを有する病原細菌によって引き起こされる感染症の予防や治療につながる可能性を秘めている。研究代表者らは、これらのタンパク質群を遺伝学的なアプローチで同定してきた。しかし、ほとんどが機能未知であるため、形や動きに関する情報は乏しく、現在十分な理解は得られていない。

2. 研究の目的

バクテロイデーテス細菌は、グラム陰性菌の一大グループであり、海中・土壌・体内など、様々な環境に広く分布している。これらの多くは、ガラスや寒天などの表面上を動く能力をもっており、滑走運動と呼ばれている (Jarrell & McBride. Nat Rev Microbiol. 2008)。その速さは、バクテリアの表面運動の中でも「最速」であり、最大で毎秒 5 μm に達するものもいる。この運動様式は複雑で、

前後に動くだけでなく、反転したり、回転したり、まるでストリートダンサーのようにも振舞うことが知られている (Fig. 1)。しかし、このメカニズムは、モータータンパク質や、べん毛、線毛などの既知の生体運動とは根本的に異なっており、ほとんどわかっていない。そこで、本研究では他の班と協力し、この新奇運動マシナリーの構造・機能・動きを明らかにすることを目的とする。



Fig. 1. バクテロイデーテス細菌のユニークな運動。(Aizawa. ASM News 2005 より一部改変)

3. 研究の方法

(1) 滑走運動マシナリーがどのように動き・機能するのか

細菌が『生きたまま』の状態でのこのマシナリーを光学顕微鏡で観察し、ダイナミックな挙動を可視化する。マシナリーを特異的に蛍光標識すると、その挙動をリアルタイムで可視化することができる。また、全反射照明や高速カメラを用いると、高いシグナル・ノイズ比 (SN比) と時間分解能での観察ができる。最終的にはマシナリーを構成する全てのタンパク質を可視化する。

(2) マシナリー構成タンパク質の分子形状
マシナリー構成タンパク質は、十数種類同定されているが、分子形状が観察されたことがない。そこで、これらの機能未知タンパク質や複合体について分子形状を観察する。

菌体を EDTA と TX-100 で処理し、SprB フィラメントの基部構造を酢酸ウランやリンタングステン酸で陰性染色し、電顕観察する。また、急速凍結フラクチャー電子顕微鏡を用いて滑走運動している細菌のガラス面を観察する。

(3) モデルを数理的に検証する

実験で得られたデータをもとに、数理モデルを提案する。細菌のような小さいスケールの運動に対しては、周囲の流体はたいへん粘性の高い媒質としてふるまうことが知られている。このようないわゆるレイノルズ数ゼロの世界で成り立つ力学法則について、研究代表者らが提案したモデルが、正しいかどうかをシュミレーションする。具体的には、ベルトコンベアのような上記タンパク質の振る舞いから、前後運動・反転・回転を組み合わせたような、複雑な滑走運動が再現できるのか、連続体力学による理論を用いてそのバイオメカニクスを議論する。

4. 研究成果

運動に関連する外膜タンパク質 (SprB) に、ビーズをくっつけると、膜に沿って、約 $2 \mu\text{m/s}$ の速さでビーズが動くことがわかっている。SprB は、700 kDa の巨大タンパク質で、そのアミノ酸配列や局在から、滑走時には Adhesin として機能すると考えられている。しかし、このビーズの動きが、SprB タンパク質の直接的な動きによるものかどうかは、わからなかった。そこで、この外膜タンパク質を、直接蛍光標識し、そのダイナミクスを詳しく調べた。

運動時の SprB の挙動を直接可視化するために、SprB を抗体で標識した。化学固定した菌に対して、免疫蛍光法をおこなうと、SprB は、菌体表面に 20-30 個のシグナルとして検出できた。このシグナルが、膜上を動いているのか、確かめるために、化学固定せずに、免疫蛍光法をおこなった。ガラス上で運動をしている菌に対して、抗体を添加すると、濃度依存的に、ガラスへの結合能、運動能が、阻害された。

つまり、SprB タンパク質は、滑走運動に直接関与する、外膜タンパク質であるといえる。抗体の濃度を 100 倍希釈して使用したとき、結合・運動能が約 60%残っており、SprB の局

在にも影響が見られなかった。このとき、興味深いことに、シグナルは膜に添って、菌体のまわりを動きまわっていた。

このタンパク質の動きと、滑走運動の関わりを調べるために、菌体に阻害剤を加えて、滑走運動を止めてみた。バクテリアの運動のエネルギー源は、一般的に ATP かプロトン駆動力 (PMF) である。PMF の阻害薬である CCCP を添加すると、3 秒以内にタンパク質の動きが停止し、菌体も動かなくなった。この効果は可逆的で、CCCP を除くと、6 秒以内にタンパク質の動きが再開し、菌体も動き始めた。このような効果は、他の阻害剤では観察することが出来なかった。つまり、SprB の動きは、PMF に依存的で、滑走運動に必要な不可欠であると考えられる。

SprB のシグナルは、菌体の長軸方向には並進運動しているように見えた。この菌は、細く、500 nm 程度の厚みしかないので、ガラスに近い面も遠い面も、両側が見えている。そこで、まっすぐに運動している菌を選び、バクテリアの進行方向をプラスとして、SprB の長軸方向の動きの速さを測定した。ヒストグラムをとると、2 つのピークがあり、それぞれ、 $-3.4 \pm 1.1 \mu\text{m/s}$ と、 $-0.5 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ で、おおよそ同じ割合を占めていた。つまり、半分の SprB は末端に向かってゆっくりと動き、半分の SprB は先端に向かって速く動いている。

これは、SprB はガラスに対して、強く結合するとき、弱く結合するときの、2 つの状態をもっていることを意味する。バクテリアが直線的に運動しているときの速さ $\sim 1.9 \pm 0.6 \mu\text{m/s}$ を考慮すると、膜の上では、2 方向のシグナルはどちらも、ほぼ $2 \mu\text{m/s}$ の速さで流れていることになる。さらに、極では先端から末端へ、または末端から先端へ、SprB の移動方向が切り替わっていた。これらを総合すると、SprB は、長軸方向には一定の速さ

で膜上を並進運動し、極ではその方向を変えることが示唆された。

SprB のシグナルの軌跡を描くと、ジグザグした、波のような運動をとっていた。菌体上半分と下半分に位置する SprB をそれぞれ青色と赤色に色分けし、キモグラフをつくった。すると、それぞれの軌跡は赤色から青色へ、さらに赤色へと変化した。つまり、SprB は長軸方向に並進運動する際、短軸方向には、片方の側面からもう一方の側面に移動している。

それを詳しく調べるために、全反射照明顕微鏡を用いて、菌体のガラスに近い面のみを可視化した。並進運動の際、SprB は、菌体の側面から、もう一方の側面に向かって、左方向にのみ進んでおり、右方向には進んでいなかった。つまり、SprB は左巻きの閉じたループに沿って、膜上を移動していた。

菌体の表面には、フィラメント状の構造があることが、クライオ電子顕微鏡によって明らかになっている。この構造が SprB からなるかどうかを調べるために、電子顕微鏡で構造観察をおこなった。SprB 欠損株で、菌体の表面構造を観察すると、フィラメント構造がなくなっていた。さらに直接的に示すために、SprB を *F. johnsoniae* 細胞から単離した。2つの界面活性剤と、塩析によって、SprB が豊富な画分を得ることが出来た。この画分を観察すると、150 nm の長さのまっすぐなフィラメント状構造が見つかった。SprB に対する抗体は、特異的にこの構造に結合し、他の抗体だと結合しなかった。つまり、SprB は外膜から突き出た、150 nm の長さのフィラメント状タンパク質であることがわかった。

これらを総合すると、以下のようなモデルが考えられる。150 nm の長さのフィラメント状タンパク質、SprB は、プロトン駆動力をエネルギー源として、菌体表面を極から極へ、左巻きのらせんに沿ってループ状に動く。SprB が床と接着することにより、菌体の長軸

方向への並進運動が生じる。

SprB フィラメントの基部にどのような構造物があるかを調べるために、菌体を EDTA と TX-100 で処理して電顕観察を行ったところ、マルチレール様構造物がみられた。免疫電顕を行ったところ、この構造物には GldJ タンパク質が含まれていることがわかった。さらに GldJ-mcherry を発現した *F. johnsoniae* ではラセンの縞状にマルチレール様構造物が存在することがわかった。

バクテロイデーテス門細菌の滑走運動は IX 型分泌機構と密接な関係にある。IX 型分泌機構についてはバクテロイデーテス門細菌の *Porphyromonas gingivalis* で解析が進んでいる。PorK と PorN タンパク質による外膜内面のリング状構造物を発見した。また、PorK や PorN などの IX 型分泌機構の構成タンパク質の発現に二成分制御系と ECF-シグマ因子が関わることを解明した。また、本菌の病原因子であるジンジバインの分泌に関与している。このジンジバインは本菌の付着線毛の形成に必須であるが、本菌を始めバクテロイデーテス門細菌の付着線毛の形成メカニズムを分子レベルで明らかにした。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Gorasia DG, Veith PD, Hanssen EG, Glew MD, Sato K, Yukitake H, Nakayama K, Reynolds EC: Structural insights into the PorK and PorN components of the *Porphyromonas gingivalis* type IX secretion system. *PLoS Pathog*, 12(8):e1005820. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005820. 査読有

Xu Q, Shoji M, Shibata S, Naito M, Sato K, Elsliger M-A, Grant JC, Axelrod HL, Chiu H-J, Farr CL, Jaroszewski L, Knuth MW, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Curtis MA, Nakayama K, Wilson IA: A distinct type of pilus from the human microbiome. *Cell* 165(3):690-703, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.03.016. 査読有

Kadowaki T, Yukitake H, Naito M, Sato K, Kikuchi Y, Kondo Y, Shoji M, Nakayama K: A two-component system regulates gene expression of the type IX secretion component proteins via an ECF sigma factor. *Sci Rep* 6:23288, 2016, doi: 10.1038/srep23288. 査読有

Nakane D, Sato K, Wada H, McBride MJ, Nakayama K: Helical flow of surface protein required for bacterial gliding motility. *Proc Nat Acad Sci U S A* 110(27):11145-11150, 2013, doi: 10.1073/pnas.0912010107, 査読有

[学会発表](計5件)

中山浩次: バクテロイデーテス門細菌のIX型分泌機構およびV型線毛の研究. 第90回日本細菌学会(受賞講演), 2017年3月19-21日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Nakayama K: The Type IX secretion, gliding motility and type V pili. Protein Secretion in Bacteria Conference(招待講演), 2016年11月9-12日, シラタ・ビーチ・リゾート・ホテル(米国フロリダ州タンパ)

Nakayama K: Type IX secretion system and gliding motility in Bacteroidetes phylum bacteria. 第58回歯科基礎医学会学術大会(招待講演), 2016年8月24-26日, 札幌コンベンションセンター

(北海道札幌市)

Nakayama K: Type IX secretion system and gliding motility in Bacteroidetes phylum bacteria. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology(招待講演), 2016年5月12-13日, Kホテル(韓国慶州市)

Nakayama K: The type IX secretion system of *Porphyromonas gingivalis*(招待講演), PgLondon2015, 2015年6月23-25日, ロンドン大学クイーン・メアリー校(英国ロンドン)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/index_j.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 浩次(NAKAYAMA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号: 80150473

(2)研究分担者

佐藤 啓子(SATO, Keiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 70410579