

令和元年6月19日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18529

研究課題名(和文)細菌 型分泌装置の回転運動に基づくエフェクター分泌機構の解明

研究課題名(英文) Research for bacterial type III secretion system based on needle rotation model

研究代表者

扇田 隆司 (Ohgita, Takashi)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80737263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌の院内感染は免疫力が低下した癌患者や高齢者にとって致命的である。我々は緑膿菌が感染時に毒素を分泌する際に用いる 型分泌装置の機能メカニズムを解明し、これを標的とする感染阻害薬の開発につながる知見を得ることを目指している。以前に我々は、注射器型の 型分泌装置が針の部分を回転させることを見出した。この知見に基づいて本研究では、針の回転と毒素タンパク質の分泌が相関する可能性を見出した。さらに、 型分泌装置の機能メカニズムをより詳細に解析するための実験系を構築するために必要ないくつかの知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、 型分泌装置の針の回転運動が毒素タンパク質の分泌と相関する可能性を見出した。この知見は 型分泌装置によるタンパク質分泌メカニズムの解明を進展させ、 型分泌装置による毒素分泌を抑制する新規抗菌薬の開発につながることを期待される。また、 型分泌装置の機能メカニズムをより詳細に解析するための実験系の構築に有益な知見が得られた。これを基に 型分泌装置の機能解析系が構築できれば、装置がどのように機能するのかについてより詳細な知見が得られ、機能メカニズムの解明が大きく進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Clinical infection with *Pseudomonas aeruginosa* is lethal for people with lowered immunity. We attempt to clarify the functional mechanism of type III secretion system, which is used for secretion of toxic proteins during infection. Previously, we found out that syringe-like type III secretion system rotates its needle. In this study, the correlation between the needle rotation and secretion of toxic proteins was suggested. Moreover, we obtained useful information to construct reconstruction system of type III secretion.

研究分野：生物物理学

キーワード： 型分泌装置 緑膿菌 抗菌薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症は、ペニシリンをはじめとする抗菌薬の開発により一時は克服されたかに思われたが、近年に入り、既存抗菌薬が効かない薬剤耐性菌が出現し、再び深刻な問題となっている。緑膿菌は人の体内や環境中に常在しており健常者に対しては病原性を示さないが、免疫力が低下した癌患者や高齢者等に対して重篤な肺炎・敗血症を引き起こす日和見感染菌である。消毒液や内視鏡等の医療器具を介した院内感染が度々報告されており、発症後の致死率は80%と非常に高い。最近では複数の抗菌薬に対して耐性を示す多剤耐性緑膿菌も現れており、緑膿菌の院内感染の防止は臨床上、極めて重要な課題の一つとなっている。この対策としては、既存抗菌薬とは異なる機序で作用し、耐性菌が出現しにくい新規の抗菌薬の開発が必要となる。

細菌が抗菌薬耐性を獲得する機構としては、

標的タンパク質の変異による抗菌薬の結合親和性の低下、抗菌薬分解酵素の発現、抗菌薬排出ポンプの発現、の3つが主に知られている(図1)。この3つの耐性獲得機構を回避できる新規抗菌薬の標的分子として、我々は型分泌装置に着目した。型分泌装置は緑膿菌や感染性大腸菌などのグラム陰性病原細菌が保有する注射器型のタンパク質分泌装置である。細菌は菌体外から突出したニードルを宿主細胞膜に挿入し、型分泌装置を介してエフェクターと呼ばれる毒素タンパク質を宿主細胞質へと注入する(図2)。同一の装置で複数種のエフェクタータンパク質が注入されるが、その多くは細胞内シグナル伝達系を攪乱させたり、細胞骨格系の再重合を引き起こすなど、宿主内を感染に適した環境へと変化させる。したがって、型分泌装置を阻害すれば、感染を誘起するこれらタンパク質が宿主内へと注入されず、感染を防止できると期待される。

型分泌は、装置のニードル先端部を宿主細胞膜に挿入し、細菌内でのエフェクタータンパク質の産生、分泌装置へのエフェクタータンパク質の装填、エフェクタータンパク質のニードル内輸送、宿主細胞内へ移行したエフェクタータンパク質の機能発現、という過程を経て起こる(図2)。このうち、エフェクタータンパク質輸送機構を解明して阻害分子を設計できれば、エフェクタータンパク質の種類によらず型分泌の総括的な抑制が可能となり、細菌感染を強力に防止できると期待される。そこで、我々は型分泌装置によるエフェクタータンパク質輸送機構を解明し、これに基づいた新規抗菌薬の開発に有益な知見を得ることを目的として研究を進めている。

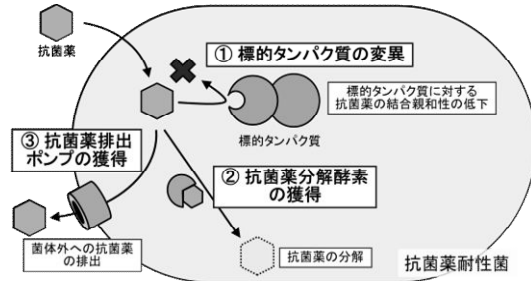


図1. 細菌の抗菌薬耐性獲得機構

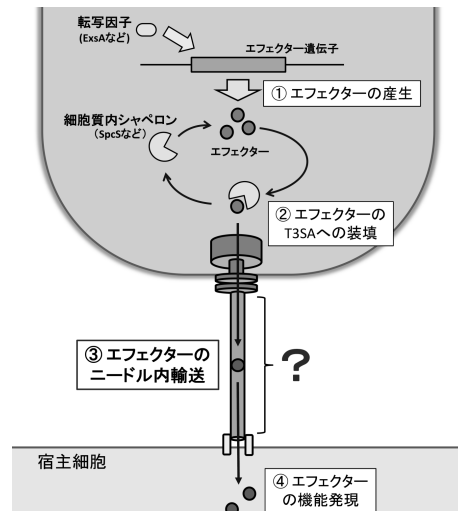


図2. 型分泌によるエフェクター輸送過程

2. 研究の目的 型分泌装置は30種類以上の構成タンパク質が複雑に重合してできた超分子ナノマシンである。同じく複数のタンパク質から成る超分子複合体である細菌べん毛と類似のサブユニット構造を有しており、構成タンパク質間にも相同性が認められることから、両装置は共通の祖先ナノマシンから分岐したと考えられている。また近年では、型分泌装置の細胞質内ユニットと、細胞のエネルギーであるATPを産生するF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPaseとの類似性も報告されている。型分泌装置と類似性を示すこれら2つの分子装置がいずれも細胞膜内外のプロトン濃度勾配により生じるプロトン駆動力を利用して回転運動を行うこと、および型分泌がプロトン駆動力依存的に起こることに基いて、我々は「型分泌装置がプロトン駆動力依存的にニードルを回転させることでエフェクターを輸送するのではないか」という仮説を立てた。この仮説に基づき、以前に我々は顕微鏡下で観察可能な蛍光マイクロビーズをニードル先端部に結合させ、エフェクター分泌条件でのニードルの動きを観察した。その結果、エフェクター分泌条件でニードルがプロトン駆動力依存的に回転することを明らかにした(図3) [Ohgita 他, FASEB.J (2013)]. さらに、ポリエチレングリコールやムチンなどの高粘性高分子を添加して培地粘性を上昇させてニードルの回転を物理化学的に阻害すると、エフェクター分泌量が減少することを見出し [Ohgita 他, Open Biol. (2013)], 型分泌装置がプロトン駆動力を用いてニードルを回転させるこ

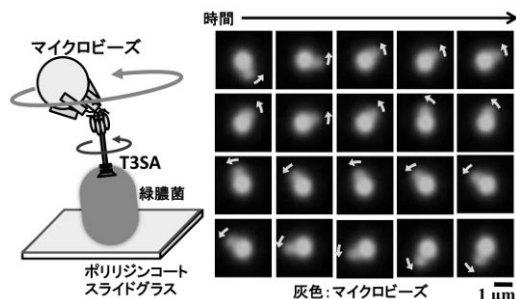


図3. エフェクター分泌条件での型分泌装置の回転運動

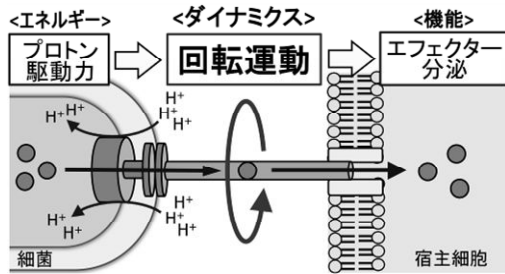


図4. ニードルの回転とエフェクター分泌

いる [Rathinavelan 他, Biophys.J. (2010)]. この報告から我々は「Ⅲ型分泌装置のニードルが内部の疎水性らせん溝と逆方向に回転することで、装填されたエフェクタータンパク質が一方方向性にニードル内を輸送される」というモデルを考案した(図5)。図5のモデルに従えば、ニードルの回転速度とエフェクタータンパク質の輸送速度が相関すると考えられる。そこで本研究では、ニードル回転速度とエフェクタータンパク質の輸送速度を定量評価するための実験系の構築、ならびに両者の相関解析を行い、図5のモデルの検証を試みた。

### 3. 研究の方法

本研究では、図5のモデルの検証を目的に、まずは緑膿菌のエフェクタータンパク質輸送速度を定量評価して、ニードル回転速度との相関を調べた。次に、Ⅲ型分泌装置の機能メカニズムをより詳細に解析するための *in vitro* 実験系の構築を試みた。

#### (1) 緑膿菌のエフェクタータンパク質輸送速度の定量評価

：緑膿菌の3種類のエフェクタータンパク質 ExoS, ExoT および ExoY のそれぞれにエピトプタグ 3FLAG を付加した融合タンパク質を発現する各種緑膿菌株を作製した。これらタンパク質を過剰発現させた状態で分泌を誘導した際の上清中エフェクタータンパク質量を図6に示す競合 ELISA 法にて定量評価し、その経時変化からⅢ型分泌装置のエフェクター輸送速度を算出した。

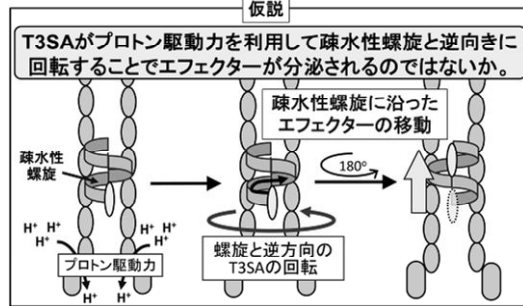


図5. Ⅲ型分泌装置のエフェクター輸送モデル

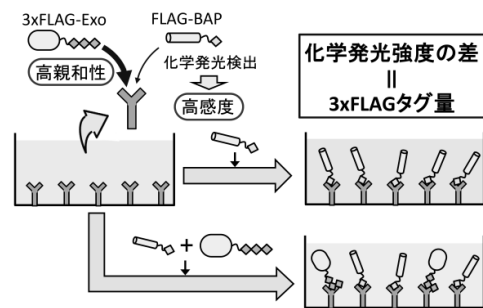


図6. エフェクター輸送速度評価のための競合 ELISA 系

#### (2) Ⅲ型分泌装置の *in vitro* 機能解析系の構築

：生菌を用いた機能解析では、多数の夾雑物が存在するため、Ⅲ型分泌装置の詳細な機能メカニズム解析は困難である。そこで本研究では、図7に示す方法で夾雑物を削減したⅢ型分泌装置の *in vitro* 機能解析系の構築を検討した。この機能解析系の構築に向けて、系の基盤となるⅢ型分泌装置を含む膜系を得るため、装置を発現した緑膿菌から菌体内成分を除去したバクテリアゴーストの調製条件と、膜タンパク質を再構成した脂質膜小胞に外部から物質を封入する方法の2点について検討した。

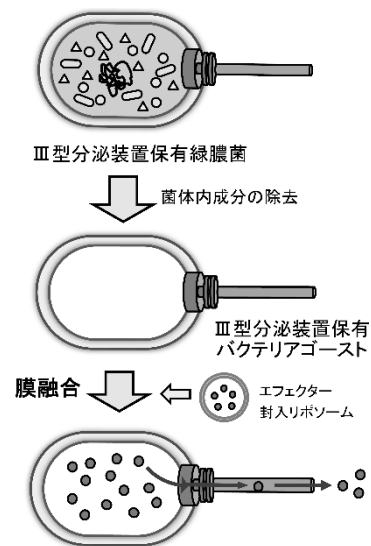


図7. 緑膿菌ゴーストを用いたⅢ型分泌の *in vitro* 評価系の構築

### 4. 研究成果

#### (1) 緑膿菌のエフェクタータンパク質輸送速度の定量評価

：図6の評価系を用いて、3種類のエフェクタータンパク質 ExoS, ExoT および ExoY の上清中濃度の時間変化を測定した結果、それぞれ毎分 1.10, 1.13 および 0.935 nM アミノ酸とほぼ同程度の速度で変化することが確認できた(図8)。このことから、エフェクター輸送速度に対するエフェクタータンパク質のアミノ酸配列の影響は小さいことが示唆された。さらにこの測定結果を基に、緑膿菌1菌体あたり1つのⅢ型分泌装置を保有すると仮定して、装

とでエフェクター輸送を行うことを明らかにした(図4)。

この知見に基づいて、本研究ではニードルの回転運動をエフェクター輸送力へと変換する分子機構の解明を試みた。2010年に報告されたニードル内でのエフェクター輸送に関するシミュレーション実験の結果では、ニードル内壁には疎水性アミノ酸がらせん状に配列した溝が存在しており、Ⅲ型分泌装置に装填されたエフェクタータンパク質はこのらせんに沿って回転しながらニードル内を輸送されることが示唆されて

らにこの測定結果を基に、緑膿菌1菌体あたり1つのⅢ型分泌装置を保有すると仮定して、装

置のエフェクター輸送速度を見積もると毎分約 2200 アミノ酸を分泌するという結果になった。ニードル構成タンパク質の結晶構造から再構成されたニードル構造モデルに基づき、ニードル長さを約 350 、疎水性らせん溝の回転数を 15 回転として、エフェクター輸送速度からニードル回転速度を見積もると約 450 rpm となった。マイクロビーズ付加時の回転速度がビーズ半径に反比例すると仮定した場合、ビーズ付加時の回転速度は約 3.5 rpm と見積もられ、実測値である 3 rpm とよく一致した。このことから、ニードル回転速度とエフェクター輸送速度の相関が示唆され、図 5 のエフェクター輸送モデルの妥当性が支持された。

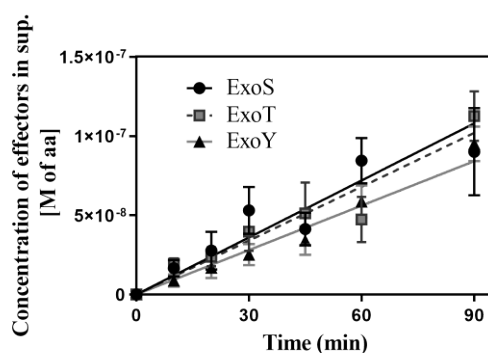


図 8. 競合 ELISA による緑膿菌エフェクター輸送速度の評価

## (2) 型分泌装置の *in vitro* 機能解析系の構築

### 緑膿菌バクテリアゴーストの調製条件の検討

図 7 に示す 型分泌装置の *in vitro* 機能解析系を構築するため、型分泌装置を発現させた緑膿菌からバクテリアゴーストを調製するための条件を検討した。まずは、SDS や NaOH を用いて細菌細胞膜に孔をあけ、遠心加圧により菌体内成分を押し出す Sponge-like method [Amara AA 他, *ScientificWorld J.* (2013)] を検討したが、この方法では緑膿菌が完全に溶菌してしまい、ゴーストが回収できないことがわかった。そこで、バクテリオファージ X-174 由来の孔形成タンパク質 Lysis protein E を発現させて菌体内成分を排出させる方法 [Haidinger W. 他, *Appl Environ. Microbiol.* (2003)] でバクテリアゴーストの調製を検討した。Lysis protein E 発現プラスミドを形質転換した緑膿菌株を作製し、その培養液にイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加することで、Lysis protein E の発現を誘導した。バクテリアゴーストの形成はゴースト形成に伴う培養液濁度の低下から評価した。その結果、この方法でゴーストの形成が報告されている大腸菌 DH5 株では IPTG 添加後 3 時間で濁度の低下が認められたが、緑膿菌 PA01 株では IPTG 添加後も濁度の低下は認められなかった (図 9A)。この原因として緑膿菌表面を覆うアルギン酸の影響を考え、アルギン酸分解酵素共存下で Lysis protein E を発現させたところ、わずかではあるが濁度の低下が認められた (図 9B)。しかし、この方法ではゴーストの調製効率は非常に低いため、調製効率を向上させるためのさらなる条件検討が必要である。以上の結果から、大腸菌で報告されている方法では緑膿菌ゴーストは調製できず、緑膿菌に適した調製条件をより詳細に検討する必要があることがわかった。

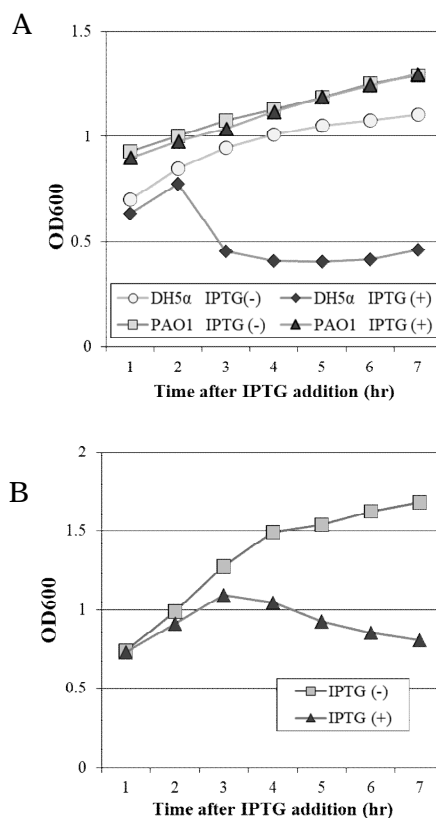


図 9. Lysis E 発現による細菌ゴーストの調製  
A. 緑膿菌 PA01 株および大腸菌 DH5 株に Lysis E を発現させた際の OD600 の経時変化  
B. アルギン酸分解酵素存在下での Lysis E 発現による緑膿菌 PA01 株の OD600 の経時変化

### 膜タンパク質再構成膜小胞への物質封入方法の検討

図 7 の解析系を構築するには、バクテリアゴーストにエフェクタータンパク質を封入する必要がある。この方法として、エフェクタータンパク質を封入した膜融合性リポソームを調製し、これをバクテリアゴーストと膜融合させる方法を考案した。この方法が実際に可能かを検討するため、モデル内封物質として低 pH 環境下で崩壊するドキシルピシン-ポリグルタミン酸複合体 (Dox-PGA) を用い、これを膜融合性が高いリポソーム (脂質膜組成 DOPE : DCP = 9 : 2) に封入したリポソーム (Dox-PGA リポソーム) を調製した。Dox-PGA が崩壊すると Dox の蛍光消光が解消されて Dox 蛍光が増強するが、Dox-PGA リポソームでは pH を低下させても Dox 蛍光は回復しなかったことから、リポソーム内部には外部 pH 変化が伝達されないことが確認できた (図 10)。このリポソームをプロトン透過チャネルとして働く電位依存性アニオンチャネル (VDAC) を再構成したリポソーム (VDAC リポソーム) (脂質膜組成 DOPC : DOPE : DOTAP = 6 : 3 : 2) と混合して膜融合させると、pH の低下による Dox 蛍光の回復が認められた (図 10B)。この結果は、2 つのリポソームが膜融合し、膜上の VDAC がリポソーム内部に外部 pH 変化を伝達したことで、内部の Dox-PGA が崩壊したことを反映すると考えられた。したがって、同様の方法を用いることで、型分泌装置含有膜小胞に任意のエフェクタータンパク質を封入することができることが示唆

された。

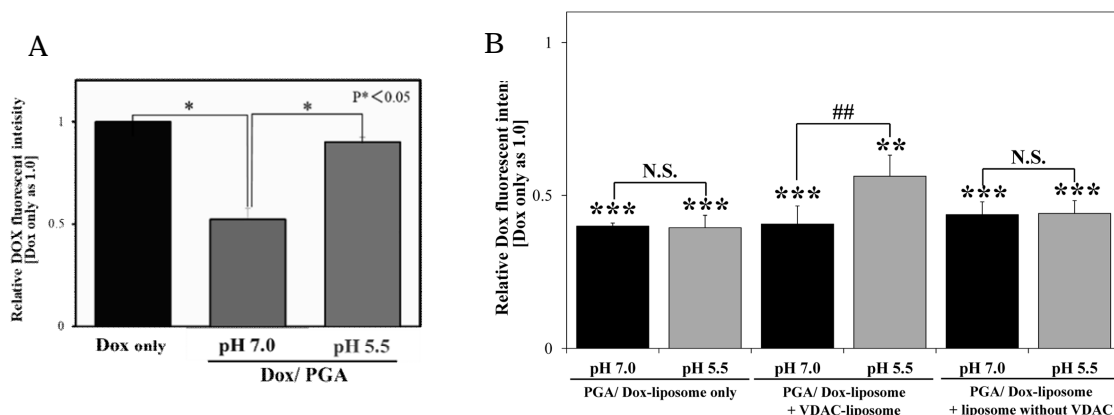


図 10. リポソーム間の膜融合を利用した任意の内封物を有する膜タンパク質再構成リポソームの構築  
 A. Dox-PGA 複合体の形成と崩壊に伴う Dox 蛍光強度の変化. Dox の蛍光は PGA と複合体を形成することで消光するが、低 pH 環境では複合体が崩壊して回復する。  
 B. リポソームに封入した Dox-PGA の pH 応答性の評価. VDAC 再構成リポソームとの膜融合によりリポソーム内に封入された PGA/Dox の pH 応答性が回復した。

以上、本研究において 型分泌装置の invitro 機能解析系の構築は達成できなかったが、系の構築に必要な手法を確立するための有益な情報が得られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ohgita T., Saito H., Biophysical mechanism of protein export by bacterial type III secretion system., *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol. 67, 2019, 341-344.

扇田隆司, 細菌 型分泌装置による細胞膜を超えたタンパク質輸送, 膜 (Membrane), 査読有, Vol. 44, 2019, 101-104.

〔学会発表〕(計 4 件)

扇田隆司, 林直樹, 後藤直正, 小暮健太郎, 斎藤博幸, タンパク質分泌の新規リアルタイム評価系を用いた細菌 型分泌メカニズムの検討, 日本膜学会第 38 年会, 2016

扇田隆司, 林直樹, 上川翼, 初山京子, 福田昂平, 小暮健太郎, 後藤直正, 斎藤博幸, 細菌 型分泌機構の解明を目指した分泌装置の回転-分泌関連の検討, 第 11 回トランスポーター研究会年会 (招待講演), 2016.

扇田隆司, 林直樹, 福田昂平, 初山京子, 後藤直正, 斎藤博幸, 細菌 型分泌装置のエフェクター輸送機構解明のための回転-分泌関連の検討, 第 14 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム PPF2016, 2016

扇田隆司, 福田昂平, 初山京子, 林直樹, 後藤直正, 斎藤博幸, 細菌 型分泌装置の回転運動によるエフェクター輸送の制御, 第 54 回日本生物物理学会大会, 2016

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。