

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07365

研究課題名(和文)細菌III型分泌装置ニードルの毒素分泌メカニズムの構造生物学的基盤

研究課題名(英文)Structural basis for the mechanism of bacterial type III secretion system by CryoEM

研究代表者

藤井 高志 (Fujii, Takashi)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：10582611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢菌はIII型分泌装置・ニードル複合体により宿主細胞へとエフェクター蛋白質を打ち込み宿主の細胞骨格の再構築を伴う貪食を誘導し、それを利用して宿主細胞内に侵入・感染する。ニードル複合体は膜を貫通する基部体と”針”であるニードル繊維、ニードル繊維の先端にあるチップ複合体に分けられる。興味深いことに、輸送ゲートである基部や宿主細胞と直接接触するチップ複合体ではなく、ニードル繊維構成蛋白質MxiHに毒素分泌パターンが異なる変異株が複数存在する。本研究課題では、細菌の毒素分泌メカニズムの構造生物学的基盤の解明を行うためにクライオ電子顕微鏡を用いて変異体の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

貧困国を中心として、赤痢菌による細菌感染症は多くの生命を奪う深刻な問題である。赤痢菌の毒素蛋白質輸送機構のメカニズムを原子レベルの構造解析によって可視化することは、そのメカニズムの解明への大きな一歩となる。輸送ゲートや宿主細胞に直接結合するチップ複合体についての変異ではなくニードルと呼ばれる繊維構造(毒針部分)への変異が毒素分泌パターンに大きな違いをうむことは非常に興味深い。この謎にクライオ電顕で迫った。

研究成果の概要(英文)：Dysentery bacteria use the type III secretion system called needle complex to launch effector proteins into host cells, inducing phagocytosis with restructuring of the host cytoskeleton, which is then used to invade and infect host cells. The needle complex can be divided into a membrane-spanning basal body, a needle and a tip complex, which is the tip of the needle. Interestingly, there are several mutant strains that differ in the pattern of toxin secretion in the needle component protein MxiH, rather than in the base, which is a transport gate, or in the tip complex, which is in direct contact with host cells. In this research project, we analyzed the mutants using cryo-electron microscopy to elucidate the structural biological basis of the bacterial toxin secretion mechanism.

研究分野：生物物理

キーワード：クライオ電顕

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

貧困国を中心として、赤痢菌による細菌感染症は多くの生命を奪う深刻な問題である。赤痢菌の毒素蛋白質輸送機構のメカニズムを原子レベルの構造解析によって可視化することは、そのメカニズムの解明への大きな一歩となる。輸送ゲートや宿主細胞に直接結合するチップ複合体についての変異ではなくニードルと呼ばれる繊維構造(毒針部分)への変異が毒素分泌パターンに大きな違いをもたらすことが明らかになっていた。ニードル繊維蛋白質 MxiH のアミノ酸変異によって起きる原子レベルの構造変化と毒素分泌パターンの連関を明らかにすることにより輸送メカニズムの本質に迫った。

2. 研究の目的

赤痢菌は III 型分泌装置・ニードル複合体により宿主細胞へとエフェクター蛋白質を打ち込み宿主の細胞骨格の再構築を伴う貪食を誘導し、それを利用して宿主細胞内に侵入・感染する。ニードル複合体は膜を貫通する基部体と”針”であるニードル繊維、ニードル繊維の先端にあるチップ複合体に分けられる。興味深いことに、輸送ゲートである基部や宿主細胞と直接接触するチップ複合体ではなく、ニードル繊維構成蛋白質 MxiH に毒素分泌パターンが異なる変異株が複数存在する。本研究課題では、細菌の毒素分泌メカニズムの構造生物学的基盤の解明を行うために以下の2つのサブテーマに取り組んだ。A.複数の異なる表現型をもつ変異型ニードル繊維の構造を3オングストローム分解能で構造解析し、繊維の原子構造に由来する毒素分泌の仕組みを解明する。B.ニードル先端に存在し宿主細胞を感知し、孔を形成するチップ複合体の高分解能構造解析を行い宿主細胞の感知・開孔機構を解明する。

3. 研究の方法

高分解能のデータ収集には、氷包埋条件の微調整が非常に重要である。クライオ電子顕微鏡法では、水分子とタンパク質の密度差に由来する密度マップを得るので氷の厚さが薄いことが、S/N比の高い画像取得に重要である。そのため、氷包埋したサンプルを観察しながら、凍結条件(湿度や温度)を詳細に検討する必要があるが、変異型ニードル繊維は、サブユニットである MxiH に点変異が入っており、野生型と比べると、繊維の安定性がかなり低い(保管時にらせん繊維複合体が壊れてしまう)ことが高分解能データ収集へのハードルとなっていた。精製したサンプルを長期間溶液中で保管できるということは高分解能データを撮影する上で重要である。そのため、保存溶液の組成や pH を詳細に検討した。

サブテーマ B に関しては、精製方法から見直す必要があり、界面活性剤の検討及ショ糖密度勾配遠心法を用いたマイルドな方法などのテストを行った。また、ナノディスクを用いた精製方法を検討した。

4. 研究成果

サブテーマ A に関しては、保管溶液の組成・pH を見直すことにより、比較的安定な条件を見いだした。繊維の安定な凍結保存にはトレハロースの添加が有効であることを見出した。その後、データ収集に取り組み、3種類の異なる表現型をもつ変異型ニードル繊維それぞれについてデータ収集を完了し、現在データを解析している。

サブテーマ B に関しては、従来法では収率・精製度が著しくなかった。そこで、ニードル複合体

の可溶化に使う界面活性剤の検討および、ショ糖密度勾配遠心法を用いたマイルドな方法で精製法の改善を試み、収率は低いながらも精製方法を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada, Y., Namba, K. & Fujii, T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Cardiac muscle thin filament structures reveal calcium regulatory mechanism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-14008-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Fujii T., Namba K.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 18
3. 書名 Integrative Structural Biology with Hybrid Methods	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------