

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15249

研究課題名(和文) 乳酸菌におけるシグナル配列非依存的なタンパク質の分泌機構の解明

研究課題名(英文) A typical signal sequence-independent export mechanism of elongation factor Tu in lactic acid bacteria

研究代表者

西山 啓太 (NISHIYAMA, Keita)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40756029

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)：翻訳伸長因子(EF-Tu)は、乳酸菌をはじめとする多くの腸内細菌において細胞外へ分泌され、細胞表面にとどまることで腸管定着因子としての機能を発揮するタンパク質である。しかし、これまでEF-Tuの細胞外への分泌機構はほとんど不明であった。本研究では、EF-TuのC末端に保存される特定のアミノ酸依存的に膜輸送経路により分泌される、EF-Tuの新たな分泌機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EF-Tuは腸内細菌の定着因子として注目されてきたが、分泌経路が不明であるため、定着因子としての機能的役割の解析は、各菌株の現象論の域にとどまっていた。EF-Tuの新たな分泌シグナルの特徴づけと本配列を介した分泌経路を見出したことは、EF-Tuを介した腸内細菌の定着プロセスを理解するうえで重要な知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：Several cytoplasmic proteins such as elongation factor Tu (EF-Tu), which lack a typical N-terminal export signal sequence, have been found to be localized outside the cell in several Lactobacillus strains. EF-Tu often exert additional functions as a bacterial adhesion factor. However, the mechanism underlying the N-terminal typical signal sequence-independent export of these cytoplasmic proteins is largely unknown. Here we identified the secretion of EF-Tu depends on the C-terminal sequence containing certain hydrophobic amino acid residues and that the sequence contributes to the membrane export processes. This study improves our understanding of the Lactobacillus colonization strategy in the intestinal environment.

研究分野：応用微生物学

キーワード：EF-Tu シグナル配列 乳酸菌 腸内細菌 腸管定着

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌をはじめとするヒト腸内共生細菌にとって、菌体表層の付着因子(アドヘシン)を介した腸管への定着は、重要な生存戦略のひとつである。アドヘシンの中には、既知の分泌シグナル配列が無いにも関わらず、細胞外へと分泌されるタンパク質が数多く存在する。これらの多くは、解糖系やタンパク質合成系ではたらくハウスキーピング因子が該当し、分泌された後に菌体表層に留まることでアドヘシンとしての機能を発揮する。そのため、本来の機能に加え、異なる役割を持つことからしばしば多機能タンパク質(ムーンライティングタンパク質)と呼ばれる。とくに、*Lactobacillus* 属では、このようなタンパク質が多数同定されており、腸管定着における関与が示されてきた。しかし、既知の分泌シグナル配列の無いこれらのタンパク質がどのような分泌機構により細胞外へと移行するか不明であるため、ムーンライティングタンパク質のアドヘシンとしての役割は、特定の菌株における現象論の域に留まっており、これらの機能的役割を正確に理解するためにも、分泌機構の解明が強く求められてきた背景がある。

2. 研究の目的

本研究では、*Lactobacillus reuteri* で見出されたアドヘシンのひとつ翻訳伸長因子(Elongation Factor Tu, EF-Tu)に着目し、乳酸菌におけるシグナル配列非依存的なタンパク質の分泌機構の解明を目的とした。本課題を立案するにあたり、EF-Tuの分泌機構について予備検討を行ったところ、EF-Tuの分泌は、ATPase阻害剤により低下する現象を見出した。さらに、EF-TuのC末端領域の欠損によっても分泌は著しく低下した。すなわち、EF-Tuの分泌は、既知の分泌シグナル配列とは異なる配列またはアミノ酸残基依存的に、能動的な輸送経路により分泌されるとの仮説を立てた。

本研究は、EF-Tuにおける分泌シグナルの特徴づけと、EF-Tuの膜透過反応の証明を基盤として、これまで不明であったEF-Tuの分泌機構を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

本研究では、以下に示す研究項目を実施した。なお、当初の研究計画では、(2)に示した膜小胞を介した分泌経路の評価とEF-Tuの*in vivo*機能解析は予定していなかったが、研究課題の遂行にあたり、科学的に重要かつ興味深い知見が得られると判断したので、追加項目として実施した。

(1) EF-Tuの推定分泌シグナルの解析

① EF-Tuの推定シグナルが異種タンパク質を輸送可能か評価するため、EF-TuのC末端領域(EF-Tu-C)をβ-lactamase(Bla)に融合したキメラを作製し、*Escherichia coli*を宿主としてタンパク質を発現させ、ウエスタンブロッティングにより分泌を評価した。また、EF-Tu-Cの役割を詳細に評価するため、*Bacillus subtilis*、*E. coli*、*L. reuteri*を宿主としてEF-TuにFLAGタグを導入したEF-Tu(EF-Tu^{FLAG})を発現させた。次に、EF-Tu^{FLAG}のアミノ酸欠損体及び置換体を作製し、ウエスタンブロッティングにより分泌を評価した。さらに、EF-Tu-Cを基質として、プロテオリポソームを用いた膜透過試験を実施することで、EF-Tuの推定分泌シグナルの膜透過反応における役割を評価した。

② *E. coli*を宿主として、複数の膜輸送装置のアミノ酸を置換した変異タンパク質を作製し、置換システイン到達性評価によりEF-Tu-Cとの相互作用を評価した。

③ *L. reuteri*の分泌タンパク質をプロテオミクスにより解析した。*L. reuteri* JCM1081野生株とSec変異株、各菌株の細胞外タンパク質をSDS-PAGEに供したのち、質量分析により各タンパク質を同定した。

(2) 膜小胞を介したEF-Tuの分泌と*in vivo*における機能解析

① 膜小胞(MV)は、細菌のタンパク質分泌機構のひとつである。*E. coli*や*Bifidobacterium*が産生したMVにもEF-Tuが含まれることを示唆するデータが得られたため、MVによるEF-Tuの分泌についても検討した。さらに、MVによるEF-Tuの分泌とEF-Tu-Cとの関連性についても、EF-Tu-Cのアミノ酸変異体を用いた実験により評価した。

② EF-Tuは乳酸菌のアドヘシンとして注目されてきたが、腸内でどのように機能するか明確な結論は得られていない。そこで、蛍光ビーズにEF-Tuタンパク質を固定した疑似細菌をマウスに投与し、組織透明化処理することで腸内でのEF-Tu固定蛍光ビーズの局在を評価する実験を設定した。

4. 研究成果

(1) EF-Tuの推定分泌シグナルの解析

① BlaにEF-Tu-Cを付加したキメラを*E. coli*に導入した。EF-Tu-C依存的にBlaの分泌が確認され、さらに*E. coli*にアンピシリン耐性を付与した。次にEF-Tu^{FLAG}を*B. subtilis*、*E. coli*、*L. reuteri*に導入し、EF-Tu-Cの欠損が分泌に及ぼす影響を確認したところ、いずれの菌株においてもEF-Tu-Cの欠損は、EF-Tu^{FLAG}の分泌を著しく低下させた。すなわち、EF-Tu-Cはグラム陽性菌・陰性菌において共通した役割を持つことが推察され、さらに異種タンパク質の分泌シグナルとしても機能することが明らかとなった。

次に、EF-Tu^{FLAG}の特定のアミノ酸をアラニンまたはグリシンに置換した実験により、EF-Tu-Cに含まれる塩基性または疎水性のアミノ酸の置換体は、EF-Tu^{FLAG}の分泌を著しく低下させた。さら

に、プロテオリポソームを用いた膜透過試験から、EF-Tu-Cに含まれるこれらのアミノ酸が膜透過反応に必要であることが示された。

② Sec ファミリーと EF-Tu の相互作用を評価したところ、上記で見出した EF-Tu-C のアミノ酸が膜輸送装置との相互作用に寄与することが示された。

③ *L. reuteri* 野生株と Sec 変異株のプロテオミクスにより分泌タンパク質を比較したところ、既知の N 末端分泌シグナル配列を有するタンパク質に加え、EF-Tu 以外の細胞内タンパク質の分泌にも影響を与えた。さらに、これら複数のタンパク質において、EF-Tu の推定シグナルと似た配列的特徴を見出すことができた。

以上より、EF-Tu-C に含まれる特定のアミノ酸の電荷と疎水性が分泌シグナルとしての機能に関与しており、その機構は、EF-Tu-C を介した細胞膜および膜輸送装置との相互作用のもとに成立することが考えられた (図1)。

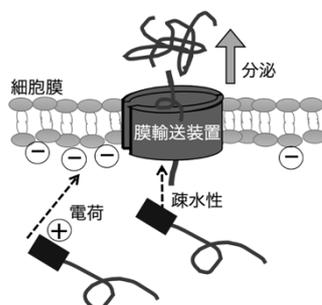


図1. EF-Tuの推定分泌機構
C末端領域を介して菌体外へと分泌される

(2) 膜小胞を介した EF-Tu の分泌と *in vivo* における機能解析

① *E. coli* や *Bifidobacterium* は、特定の培養条件において MV を産生する。MV 画分を回収しプロテオミクスを行なったところ、同定されたタンパク質の中に EF-Tu が高頻度で含まれた。

(1) で作製した EF-Tu-C 変異タンパク質を用いて、MV への EF-Tu の移行度について検討したところ、EF-Tu-C の欠損により、MV 中での EF-Tu の検出率は顕著に低下した。本領域は、細胞膜との相互作用に密接にかかわることから、MV への EF-Tu の移行にも特定のアミノ酸領域が深く関与すると推察された。すなわち、これらのことから、EF-Tu-C が寄与する EF-Tu の分泌経路は複数存在することも示された。

② EF-Tu は pET システムなど大腸菌を用いた組換えタンパク質として比較的容易に精製することができる。この性質に着目し、表面にカルボキシ基を導入した緑色蛍光ビーズに、組換え EF-Tu タンパク質を固定することで擬似細菌を作製した。さらに、蛍光ビーズを投与したマウスの腸を組織透明化処理し、マウス腸内での継時的な蛍光ビーズの移動を可視化することに成功した。蛍光ビーズの局在は、固定されたタンパク質に依存し、特に EF-Tu 固定化ビーズは、投与後 24 時間でも腸内に留まった。このことは、EF-Tu が生体内においてもアドヘシンとして機能することを強く支持しており、ムーンライティングタンパク質の機能を生体内で評価可能な実験系を構築した (図2)。

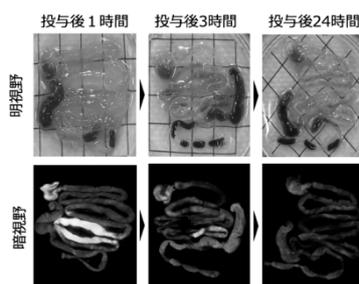


図2. マウス消化管におけるEF-Tu固定蛍光ビーズの様子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishiyama K, Sugiyama M, Yamada H, Makino K, Ishihara S, Takaki T, Mukai T, Okada N	4. 巻 9
2. 論文標題 A new approach for analyzing an adhesive bacterial protein in the mouse gastrointestinal tract using optical tissue clearingScientific reports	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41151-y.	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 -
1. 著者名 Nishiyama K, Nagai A, Uribayashi K, Yamamoto Y, Mukai T, Okada N	4. 巻 52
2. 論文標題 Two extracellular sialidases from Bifidobacterium bifidum promote the degradation of sialyl-oligosaccharides and support the growth of Bifidobacterium breve	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 22-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anaerobe.2018.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 西山啓太, 岡田信彦	4. 巻 76
2. 論文標題 消化管ムチンとの相互作用を介したビフィズス菌の定着機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 288-291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 76-04-4-11.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiyama K	4. 巻 66
2. 論文標題 Study of the adherence properties of Lactobacillus and Bifidobacterium species to intestinal tract and application to the prevention of pathogenic infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Milk Science	6. 最初と最後の頁 219-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11465/milk.66.219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama K, Yamamoto Y, Sugiyama M, Takaki T, Urashima T, Fukiya S, Yokota A, Okada N, Mukai T	4. 巻 8
2. 論文標題 Bifidobacterium bifidum extracellular sialidase enhances adhesion to the mucosal surface and supports carbohydrate assimilation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00928-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00928-17	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 -

1. 著者名 Nishiyama K, Kagamitani T, Yamamoto Y, Okada N, Mukai T	4. 巻 66
2. 論文標題 The elongation factor Tu from Lactobacillus reuteri inhibits the adhesion of Helicobacter pylori to porcine gastric mucin.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Milk Science	6. 最初と最後の頁 17-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.11465/milk.66.17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西山啓太, 向井孝夫	4. 巻 29
2. 論文標題 ビフィズス菌と宿主腸粘膜との相互作用に関わる因子	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本乳酸菌学会誌	6. 最初と最後の頁 13-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 腸内細菌が産生する代謝産物から紐解く細菌の共生機構
3. 学会等名 東日本支部-第8回日本生物工学会東日本支部コロキウム「腸内細菌研究の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 腸内細菌のムーンライティングタンパク質を介した宿主定着とその解析技術 - 組織透明化を中心に -
3. 学会等名 2019年度日本乳酸菌学会秋期セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 腸内細菌の消化管ムチンとの相互作用を介した定着戦略
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会シンポジウム，乳酸菌，腸内細菌およびミルクオリゴ糖の健康機能科学（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 腸内細菌の宿主消化管における定着戦略
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishiyama K, Koyama N, Odamaki T, Yoshida K, Takaki T, Sato M, Fukuda S, Sakanaka M, Kurihara S, Katayama T, Tomoda H, Mukai T, Atarashi K, Honda K, Xiao J-Z, Okada N, Osawa R
2. 発表標題 A symbiotic gut bacterial metabolite promotes Bifidobacterium colonization
3. 学会等名 Keystone Symposia, Microbiome (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishiyama K
2. 発表標題 Preventing Campylobacter infection by Lactobacillus gasseri
3. 学会等名 7th Beneficial Microbes Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 啓太, 杉山 真言, 向井 孝夫, 岡田 信彦
2. 発表標題 組織透明化法を用いたムーンライティングタンパク質の腸管付着因子としての解析方法の確立
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山啓太, 杉山真言, 向井孝夫, 岡田信彦
2. 発表標題 組織透明化法を用いたムーンライティングタンパク質の腸管付着因子としての機能解析
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山啓太, 長井暁, 吹谷智, 横田篤, 山本裕司, 向井孝夫, 岡田信彦
2. 発表標題 Bifidobacterium bifidum の細胞外シアリダーゼの 腸粘液との相互作用と糖の質化における役割
3. 学会等名 第22回腸内細菌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishiyama K, Yamamoto Y, Sugiyama M, Fukiya S, Yokota A, Okada N, Mukai T
2. 発表標題 The extracellular Sialidase from Bifidobacterium bifidum modulates bacterium-host interactions and supports the assimilation of carbohydrates
3. 学会等名 12th International Symposium on Lactic Acid Bacteria (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 ビフィズス菌の宿主腸粘膜への定着に関わる菌体表層タンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2017年度秋期セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 Adhesion properties of bifidobacteria on intestinal mucin
3. 学会等名 森永乳業創業100周年記念国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Nishiyama K, Mukai T	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 194
3. 書名 Lactic Acid Bacteria. Methods in Molecular Biology	

1. 著者名 西山啓太	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 120
3. 書名 月刊BIO INDUSTRY, 乳酸菌の機能と活用	

〔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
研究協力者	向井 孝夫 (MUKAI Takao) (20229917)	北里大学・獣医学部 (32607)	
研究協力者	杉山 真言 (SUGIYAMA Makoto) (30648225)	北里大学・獣医学部 (32607)	