

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07108

研究課題名(和文) 部位特異的光架橋を用いた細菌III型分泌装置のタンパク質膜透過経路の解明

研究課題名(英文) Translocation pathway of the bacterial flagellar typeIII secretion system analyzed by site-directed photo-crosslinking

研究代表者

寺島 浩行 (TERASHIMA, Hiroyuki)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：60791788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細菌べん毛を構築するべん毛輸送装置のタンパク質分泌メカニズムとべん毛構築・機能メカニズムについて研究した。反転膜小胞を用いた試験管内輸送再構成系を使い、フック、フィラメントをin vitroで構築させることができた。また、物差しタンパク質FliKによってフックの長さを55nmに制御できた。これらの研究成果によって、べん毛が自分自身の構成要素だけで自律的に構築される分子機械であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌べん毛は、細胞外に長く伸びた線維状の超分子複合体である。その構築メカニズムを明らかにすることによって、タンパク質から構築される分子機械の作動原理と設計原理を知ることができる。本研究の成果によって、べん毛の構築原理の一端を解き明かすことができ、学術的意義のある研究成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of protein export, construction and function of the bacterial flagellum. Using an in vitro transport assay with the inverted membrane vesicles, we were able to construct hook and filament in vitro. The length of hook was regulated to 55 nm by the molecular ruler protein FliK. These results revealed that the flagellum is a molecular machine that is autonomously constructed using only flagellar components.

研究分野：細菌学

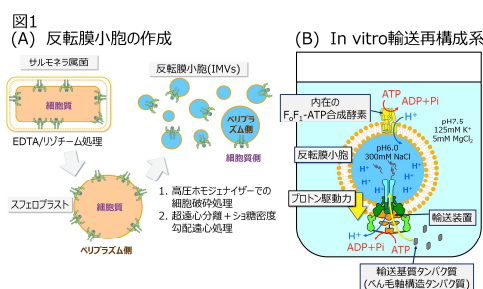
キーワード：細菌べん毛 III型分泌装置 光架橋 in vitro再構成 タンパク質分泌

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌やサルモネラ属菌は、ニードル複合体と呼ばれる針状の細胞小器官を使い、上皮細胞などに病原性タンパク質を直接送り込んでいる。これによって、宿主細胞の生理機能を操り、様々な病原性を発揮する。ニードル複合体の根元には、III型分泌装置と呼ばれるタンパク質輸送体が存在しており、これが病原性タンパク質(エフェクター)の膜透過を行っている。ニードル複合体の構成タンパク質の結晶構造や電子顕微鏡による全体構造は解析されてきたが、その内部に存在するIII型分泌装置のタンパク質輸送については十分に理解されていない。一方で、細菌の運動器官であるべん毛も、その根元にIII型分泌装置を持っており、同じファミリーのタンパク質輸送体である。両者は、アミノ酸配列から超分子構造までよく似ており、基本的には同じ作動機構で働くと考えられている。べん毛は約20種類の構成タンパク質が、数万分子集合して構築される超分子複合体である。研究の歴史の長さから、べん毛III型分泌装置の分子メカニズムの研究は、ニードル複合体よりも進んでいる。べん毛III型分泌装置は、6種類の膜タンパク質(FliA、FliB、FliO、FliP、FliQ、FliR)からなる輸送ゲートと、3種類の細胞質タンパク質(FliH、FliI、FliJ)からなるATPase複合体で構成されている。タンパク質輸送のエネルギー源はプロトン駆動力であり、ATP加水分解エネルギーが輸送効率を高めるために使われている。輸送される基質タンパク質はFliBによって選別され、べん毛構成タンパク質(13種類)のみが輸送される。そして、基質タンパク質は、輸送ゲートを通過して細胞外へと輸送される。しかしながら、III型分泌装置によるタンパク質の膜透過において、(1)基質タンパク質がどのように輸送ゲートに運ばれ、(2)輸送ゲートのどこを通過して細胞膜を横断するのかはほとんど分かっていない。そこで、タンパク質の膜透過経路の解明を行うために、基質タンパク質とIII型分泌装置の間に部位特異的光架橋を行う。

2. 研究の目的

基質タンパク質がIII型分泌装置のどこを通過して細胞膜を横断していくのか明らかにする。そのための方法として、in vitro 輸送アッセイ系と光架橋性基質タンパク質を使う。従来のin vivo 実験では、遺伝子発現のフィードバック制御や複数の基質タンパク質が存在するため、細胞内の条件を制御することが難しかった。それらの問題を解決するための手法として、最近我々は、輸送能を持った反転膜小胞を作製し、in vitro で基質タンパク質の輸送を検出することに成功した(図1)。この方法を使えば、外液に目的の基質タンパク質1種類だけを加え、その輸送のみを検出することが可能である。光架橋性非天然アミノ酸 p-benzoyl-phenylalanine (pBPA)は、UV照射によって相互作用しているタンパク質と共有結合的に架橋することができる。pBPA導入した基質タンパク質をin vitro 輸送アッセイ系で輸送させ、UV照射で光架橋を起こし、架橋相手を同定することでタンパク質の膜透過経路を明らかにする。



光架橋性非天然アミノ酸 p-benzoyl-phenylalanine (pBPA)は、UV照射によって相互作用しているタンパク質と共有結合的に架橋することができる。pBPA導入した基質タンパク質をin vitro 輸送アッセイ系で輸送させ、UV照射で光架橋を起こし、架橋相手を同定することでタンパク質の膜透過経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) べん毛輸送装置を基質タンパク質がどこを膜透過するのか明らかにするために、部位特異的光架橋法を用いた。輸送基質としてフックキャップタンパク質 FliG を使った。また輸送を一定の場所で止めるためにC末端にGFPを融合させた。FliG-GFPに、アンバーコドンサプレッサーを用いた光架橋性非天然アミノ酸(pBPA)の導入を行った。光架橋実験は、細胞内とin vitro 輸送再構成系の2種類の方法を試みた。

(2) In vitro 輸送再構成系を用いて、べん毛の構築過程の詳細な解明を行った。In vitro 輸送再構成系は、サルモネラ属菌(ネズミチフス菌)の細胞を高圧ホモジェナイザーで破碎すると形成される膜の内外が反転した膜小胞のことである。反転膜小胞溶液に、輸送基質タンパク質とATPase複合体、ATPを加えることによって反転膜内へと基質タンパク質を輸送させる計測系である。膜透過経路の解明には、FliGのみならず他の基質タンパク質の膜透過の動態を計測することも重要であると考えられる。そこで、in vitro 再構成系を用いて、フック、ジョイント、フィラメントの構築の再現を行った。

(3) べん毛輸送装置は、細胞膜上のMSリングの内側に形成される。サルモネラ属菌では、輸送装置が存在しなくてもMSリングの構成タンパク質 FliFのみでMSリングが形成される。一方で、これまでの研究から、ビブリオ属菌のMSリングはFliFのみでは形成されないと考えられてきた。そこで、ビブリオ属菌のMSリングの構築に必要な要素の探索を行った。

(4)べん毛の構築を *in vitro* 再構成系によって再現できた。次に、機能的なべん毛モーターの再構成と、それをういた機能解析を達成したいと考えた。そこでまずは、べん毛が回転するために必要な固定子と回転子の間の相互作用の実体について、部位特異的光架橋法を用いて明らかにした。

4. 研究成果

(1) 輸送基質タンパク質と輸送装置の間に光架橋によって架橋形成させ、相互作用を検出することを試みた。基質となる FlgD の様々な位置にアンバーストップコドン変異を導入し、UV 反応性非天然アミノ酸 pBPA をアンバーコドンサプレッサー法により導入した。細胞に UV 照射後、いくつかの変異体において、基質 FlgD と輸送装置 FlhA との間に架橋産物が検出された。また、*in vitro* 輸送再構成系を用いて、光架橋実験を行った。しかしながら、両実験系において再現性良く架橋産物を検出することができず、実験条件によって結果がぶれてしまった。

(2) *In vitro* 輸送再構成系によって、べん毛の構造構築を試験管内で再現することを試みた。この実験によって、実験条件を厳密に制御したうえでべん毛がどのように構築されていくのかがあきらかにする。べん毛のフックの長さは、55nm に制御されている。これを担っているのは、輸送装置 FlhB と基質タンパク質 FliK である。FliK はたまに輸送され、フックの長さが 55nm に満たない時は細胞外へと分泌される。しかし、フックが 55nm に達すると FliK の C 末端領域が FlhB の C 末端領域と相互作用し、基質特異性が切り替わり、フックの伸長が止まる。この現象を *in vitro* 輸送再構成系を用いて再現することを試みた。その結果、FliK を反応溶液中加入することによって、フックの長さを 55nm 程度に制御することに成功した。この結果は、フックの長さ制御には FliK と輸送装置が必要十分であることを示している。次に、基質特異性の切り替えが起こり、フィラメント型基質が輸送されるようになっていることを確かめるために、溶液中にフィラメント型タンパク質を加え *in vitro* 輸送アッセイを行った。その結果、正常なフックの後にフィラメントが形成されていた。また、フックとフィラメントの継ぎ目にはジャンクションが形成されていた(図2)。この結果から、べん毛線維の構築には、構成コンポーネント、FliK、輸送装置が必要十分に働くことが明らかになった。*In vivo* では、遺伝子発現とべん毛構築の共役が見られるが、この共役はべん毛構築を効率的に行うための機能であることが推測された。また、*in vitro* でべん毛構築過程を再現できたことで、今後、タンパク質分泌の分子レベルでの作動機構を明らかにすることができると期待される。さらに、べん毛輸送装置が III 型分泌系に属することから、*in vitro* 輸送再構成系を使ったタンパク質分泌阻害剤スクリーニング系の構築が期待される。

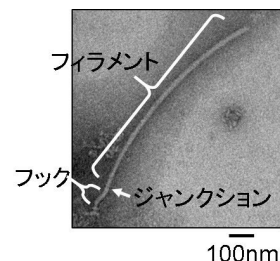


図2 *in vitro*再構成系で構築したべん毛構造

(3)細菌べん毛の構築は、細胞質膜上の MS リングと輸送装置の構築から始まると考えられている。MS リングは、FliF が数十個集合して構築されるリング構造体であり、その内部に輸送装置が構築される。そのため、輸送装置の機能を明らかにするためには、MS リングの構築についても知る必要がある。ピブリオ属菌の MS リングの形成過程について明らかにするために、FliF と他のタンパク質を過剰発現し、MS リングを形成する条件を検討した。ピブリオ属菌の FliF はべん毛位置・本数制御タンパク質 FlhF、あるいは C リングタンパク質 FliG との共発現によって、MS リング形成を促進されることが分かった。また、形成された MS リングを高速原子間力顕微鏡を用いて観察したところ、大きな土台の上に小さなシリンダーが乗ったような形状をしており、その先端には穴のような窪みが観察された。この穴は輸送装置から膜透過された基質タンパク質の透過経路であると考えられる。これら一連の結果は、FlhF、FliG が FliF の適切な空間的/時間的制御を行い、MS リング形成及び最終的にはべん毛形成を制御していることを示唆している。

(4) *in vitro* 輸送再構成系を構築し、べん毛構築を試験管内再構成できたことで、次にモーター機能までの完全なべん毛機能の再構成を視野に入れた研究を長期的に考えている。そこで、まずは、べん毛モーターがどのようなメカニズムで回転するのか明らかにすることを目指した。べん毛モーターの回転は、固定子と呼ばれる膜タンパク質複合体中を流れるイオン流と共役して起こる固定子の構造変化と、それに伴う固定子-回転子間相互作用によって発生すると考えられている。しかしながら、固定子-回転子間相互作用に関わる残基は遺伝学的な変異体解析から示されているが、物理的な相互作用を生化学的に示した研究はほとんどなかった。そこで、本来の研究目的で使用した部位特異的光架橋法を使い、固定子-回転子間相互作用に直接かかわる残基の同定と、相互作用ペアの同定を行った。その結果、相互作用に関わる残基を同定した。また、これまで知られていなかった新規相互作用残基を同定することにも成功した。更に、

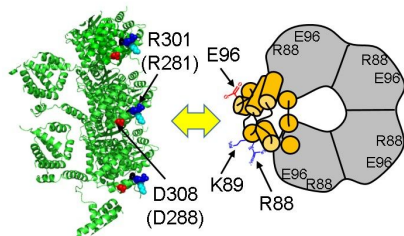


図3 固定子-回転子間相互作用

システインジスルフィド架橋法を用いて、相互作用する残基ペアの同定を行い、固定子 PomA K89 と回転子 FliG R281 のペア、固定子 PomA K89 と回転子 FliG D288 のペアを同定した。これらの結果から、固定子と回転子間の静電的な誘引と反発がトルクを発生させる可能性と歯車回転モデルを提案した(図 3)。今後、更に詳細な固定子-回転子間相互作用の分子メカニズムを明らかにすることで、生体型分子回転モーターの作動基盤を理解し、将来的な人工ナノマシン創成につなげることができるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Terashima H, Kojima S, and Homma M	4. 巻 203
2. 論文標題 Site-directed crosslinking identifies the stator-rotor interaction surfaces in a hybrid bacterial flagellar motor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00016-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00016-21	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 Terashima H, Hirano K, Inoue Y, Tokano T, Kawamoto A, Kato T, Yamaguchi E, Namba K, Uchihashi T, Kojima S, and Homma M.	4. 巻 202
2. 論文標題 Assembly mechanism of a supramolecular MS-ring complex to initiate bacterial flagellar biogenesis in Vibrio species.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00236-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JB.00236-20	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 Terashima H, Tatsumi C, Kawamoto A, Namba K, Minamino T, Imada K.	4. 巻 10
2. 論文標題 In Vitro Autonomous Construction of the Flagellar Axial Structure in Inverted Membrane Vesicles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 E126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom10010126	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 Norihiro Takekawa, Miyu Isumi, Hiroyuki Terashima, Shiwei Zhu, Yuuki Nishino, Mayuko Sakuma, Seiji Kojima, Michio Homma, Katsumi Imada	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Structure of Vibrio FliL, a New Stomatin-like Protein That Assists the Bacterial Flagellar Motor Function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00292-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.00292-19.	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 Hiroyuki Terashima, Akihiro Kawamoto, Chinatsu Tatsumi, Keiichi Namba, Tohru Minamino, Katsumi Imada	4. 巻 9(3)
2. 論文標題 In Vitro Reconstitution of Functional Type III Protein Export and Insights into Flagellar Assembly	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00988-18.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.00988-18.	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 Hiroyuki Terashima, Katsumi Imada	4. 巻 15
2. 論文標題 Novel insight into an energy transduction mechanism of the bacterial flagellar type III protein export.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophys Physicobiol.	6. 最初と最後の頁 173-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.15.0_173. eCollection 2018.	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 寺島 浩行、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 細菌べん毛回転に必要な固定子 回転子間の相互作用機構
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺島 浩行、川本 晃大、巽 千夏、難波 啓一、南野 徹、本間 道夫、今田 勝巳
2. 発表標題 In vitro分泌再構成系を用いたべん毛III型分泌装置の作動メカニズムの解明
3. 学会等名 第34回日本バイオフィルム学会学術集会&第57回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺島浩行、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 部位特異的架橋法による細菌べん毛固定子 - 回転子間相互作用の検出
3. 学会等名 日本生体工エネルギー研究会 第46回討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺島浩行、小嶋誠司、本間道夫
2. 発表標題 網羅的光架橋法による細菌べん毛回転モーターの固定子-回転子間相互作用の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺島浩行、川本晃大、巽千夏、難波啓一、南野徹、本間道夫、今田勝巳
2. 発表標題 細菌III型分泌装置に対する阻害剤を探索するための新規網羅的アッセイ系
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺島浩行、川本晃大、巽千夏、難波啓一、南野徹、今田勝巳
2. 発表標題 細菌べん毛輸送装置によるタンパク質輸送の反転膜小胞を用いたin vitro再構成
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------