

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14639

研究課題名（和文）クライオ電子顕微鏡による Ⅲ型分泌系蛋白質輸送装置の構造基盤研究

研究課題名（英文）Structural analysis of type III protein export apparatus by electron cryomicroscopy

研究代表者

川本 晃大（Kawamoto, Akihiro）

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：90631523

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、未だ明らかにされていないⅢ型分泌系の蛋白質分泌機構を解明することを目的とし、クライオ電子顕微鏡を用いてその全体構造を高分解能で明らかにすることを目指した。同じⅢ型分泌系に分類される細菌べん毛蛋白質輸送装置に着目し、構成膜蛋白質の構造解析を行った結果、これまでの生化学的実験から予想されていたものとは異なる対称性で構造を形成していることが明らかになった。また、その構造は、すでに報告されているイオンチャネルの構造と類似性があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性菌の出現により治療困難な感染症が増え、新たな視点からの感染症対策が急務となっている。本研究で着目しているⅢ型分泌系の蛋白質分泌機構を分子・原子レベルで解明し、これらの働きを不活化することができれば、細菌を殺さず病原性のみを破壊する新しいタイプの感染症治療薬の開発につながることを期待される。また、すでに報告されているイオンチャネルの構造との類似性が示されたことから、これまで提唱されていた分泌機構とは異なる、新たな蛋白質の分泌機構の解明につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of protein secretion in the type III secretion system by using cryo-electron microscopy to reveal the overall structure of the system at high resolution.

We focused on the bacterial flagellar type III protein secretion system, which is classified into the same type III secretion system, and analyzed the structure of the constitutive membrane protein, revealing that it forms symmetries different from those predicted by previous biochemical experiments. In addition, the structure is similar to the previously reported ion channels suggested that the functions were also similar.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 タンパク質輸送 膜タンパク質

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

毎年、細菌感染による食中毒が発生する。中でも O157 に代表される腸管出血性大腸菌は溶血性尿毒症症候群を発症するなど重症化しやすく、日本やアメリカなどの先進国でも集団感染が発生し、大きな社会問題となっている。現在、細菌感染の治療には様々な抗生物質が用いられている。しかしながら、抗生物質を多用することで抗生物質に耐性を持った耐性菌が出現し、治療困難なケースが報告されている。そのため、抗生物質を使わずに新たな着眼点からの感染症治療薬の開発が求められている。

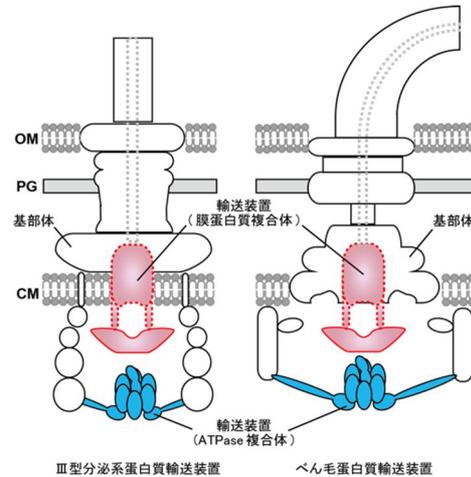


図 1. 蛋白質輸送装置の概略図

病原性細菌は、様々な分泌系を用いて病原因子であるエフェクターを宿主細胞に送り込み、細菌感染症を引き起こす。病原性細菌によって保有する分泌系は異なるが、なかでも Ⅲ型分泌系はサルモネラ、赤痢菌、O157 を含む腸管出血性大腸菌など、細菌性食中毒を引き起こす細菌が持つ分泌系として知られている。Ⅲ型分泌系は細胞外構造と、内膜と外膜を含む細胞表層膜内に存在し、中心に直径 2 nm のチャネル構造がある基部構造で構成されている。さらに基部直下には、ATPase を含む 8~9 種類のタンパク質で構成される蛋白質輸送装置が存在し、輸送のタイミングを制御することで効率の良いタンパク質輸送を可能にしている。申請者は、クライオ電子線トモグラフィーを用いてサルモネラ、赤痢菌の Ⅲ型分泌系の構造解析を行い、蛋白質輸送装置の細胞質ドメイン構造を明らかにした。さらに、Ⅲ型分泌系の構成蛋白質と高い相同性を持ち、同じ

Ⅲ型分泌系に分類される細菌べん毛蛋白質輸送装置の細胞質ドメイン構造を明らかにした。2 つの蛋白質輸送装置の細胞質ドメイン構造は類似しており、共通の輸送メカニズムを有していることが示唆された。しかし、蛋白質輸送装置の構成蛋白質の多くは膜蛋白質で、その全体構造については未だ明らかにされていない。そのため、どのようにして輸送基質蛋白質であるエフェクターやべん毛蛋白質が細胞膜を透過し細胞外に分泌されていくのか、Ⅲ型分泌系の蛋白質分泌機構の詳細は分かっていない。これまで、国内外の研究グループが蛋白質輸送装置の単離精製を試みているが、膜貫通領域を含む蛋白質輸送装置の単離精製の成功例は報告されていない。申請者らは最近、べん毛蛋白質輸送装置に着目し精製方法を検討した結果、蛋白質輸送装置だけではなく、基部体の部分構造と共に発現、精製を行うことで、6 種類の構成膜蛋白質を含むべん毛蛋白質輸送装置の単離精製に成功した(予備実験)。上記結果は、Ⅲ型分泌系の蛋白質分泌機構の解明を飛躍的に進めるものである。

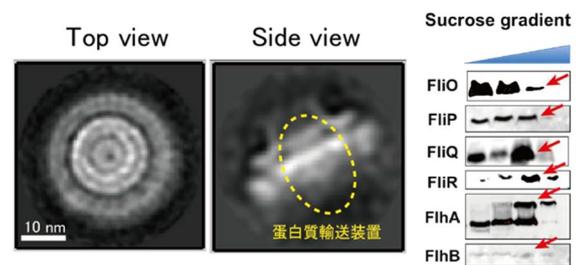


図 2. 精製したべん毛蛋白質輸送装置と基部体

## 2. 研究の目的

本研究は、抗生物質を使わず細菌感染を治療する新規治療薬開発に向けて、未だ明らかにされていない Ⅲ型分泌系の蛋白質分泌機構を解明することを目的としている。具体的には、同じ Ⅲ型分泌系に分類される細菌べん毛蛋白質輸送装置に着目し、クライオ電子顕微鏡を用いてその全体構造を高分解能で明らかにする。野生型と蛋白質の分泌頻度が高くなる変異体の構造を比較

することで、蛋白質輸送装置の構造変化を明らかにし、輸送装置の開閉機構および蛋白質分泌機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、細菌べん毛蛋白質輸送装置の立体構造を明らかにし、 $\sigma$ 型分泌系が有する蛋白質の分泌機構を原子レベルで解明するために、以下の研究計画を実施した。

#### (1) 単離精製したべん毛蛋白質輸送装置のクライオ電子顕微鏡構造解析

予備実験から、べん毛蛋白質輸送装置の単離精製に成功している。また、負染色法による電子顕微鏡観察により、クライオ電子顕微鏡構造解析に適した試料濃度、分散状態であることは確認済みである。クライオ電子顕微鏡を用いて、単離精製したべん毛蛋白質輸送装置の構造解析を行う。精製されたべん毛蛋白質輸送装置にはべん毛基部体の部分構造が含まれているが、申請者はすでにその部分の構造解析に5.6Å分解能で成功している。本研究で得られた立体構造と基部体の部分構造を比較することで、べん毛蛋白質輸送装置の構造を明らかにする。さらに、得られた立体構造と配列から予想される二次構造を比較し、べん毛蛋白質輸送装置の原子モデルを構築する。

#### (2) 単離精製したべん毛蛋白質輸送装置変異体のクライオ電子顕微鏡構造解析

べん毛蛋白質輸送装置の構成膜蛋白質であるFlhA、FlhBの変異により、べん毛蛋白質の分泌頻度が高くなることが報告されている(Minamino and Namba.Nature.2008)。申請者らはクライオ電子線トモグラフィーを用いて、変異体の細胞質ドメインを観察し、べん毛蛋白質輸送装置の構造が変化していることを明らかにした(予備実験)。これらの結果から、FlhA、FlhBの変異によって蛋白質が膜透過しやすい構造(オープン構造)に構造変化していると考えられる。この構造変化したべん毛蛋白質輸送装置の構造を明らかにすることができれば、輸送装置の開閉機構を解明することができる。上記仮説を検証するために、クライオ電子顕微鏡を用いてべん毛蛋白質輸送装置変異体の構造解析を行う。初年度は、FlhA(V404M)、FlhB(P28T)の変異を導入した発現系を作成し、べん毛蛋白質輸送装置変異体の単離精製法の検討を行う。

前年度に作成した発現系と単離精製法を用いて、べん毛蛋白質輸送装置変異体の構造解析を行う。野生型のべん毛蛋白質輸送装置の構造を基に変異体構造の原子モデルを構築する。そして、野生型と変異体の構造を比較し、べん毛蛋白質輸送装置の構造変化を明らかにする。FlhA、FlhBの変異に伴う構造変化から輸送装置の開閉機構を明らかにし、 $\sigma$ 型分泌系の蛋白質分泌機構の解明を行う。

### 4. 研究成果

クライオ電子顕微鏡を用いて、単離精製したべん毛蛋白質輸送装置の構造解析を行った。得られた立体構造と基部体の部分構造を比較することで、べん毛蛋白質輸送装置の同定を試みたが、低分解能で不明瞭な部分が多く、べん毛蛋白質輸送装置の構造を同定することは出来なかった。低分解能の理由として、精製過程で構成膜蛋白質が欠落し、構造が不安定になったことが考えられる。そこで、可溶性に用いる界面活性剤の濃度や種類を複数検討し、べん毛蛋白質輸送装置の構造解析を再度行った。得られた構造はわずかながら分解能を向上させることに成功したが、べん毛蛋白質輸送装置の同定には至らなかった。本研究では、べん毛基部体と一緒にべん毛蛋白質輸送装置を単離精製したが、べん毛蛋白質輸送装置の構造を安定化させるためには、べん毛繊維構造などを含めたべん毛モーター全体を単離精製して構造解析する必要があると考えられる。今後、べん毛モーター全体の精製方法を検討し、高分解能での構造解析を行うことで、べん毛蛋白質輸送装置の全体構造を明らかにしていく。

次に、蛋白質輸送装置全体構造の精製だけではなく、部分構造の単離精製を試み、4種類の部分構造の単離精製に成功した。そこで、単離精製が成功した4種類の構成膜蛋白質に着目して構造解析を進めた。4種類のうち、3種類の構成膜蛋白質の構造は昨年、海外のグループによって構造が発表されたが、1種類の構成膜蛋白質の構造は明らかにされていない。精製条件を検討した結果、構造解析に十分な濃度での単離精製に成功した。また、低分解能であるが、構造解析にも成功した。構造解析の結果から、これまでの生化学的実験から予想されていたものとは異なる対称性で構造を形成していることが明らかになった。また、その構造は、すでに報告されているイオンチャネルの構造と類似性があることが示された。今後は、高分解能での構造解析を成功させ、イオンチャネルとの類似性を議論するとともに、蛋白質の分泌機構の詳細についても明らかにする予定である。

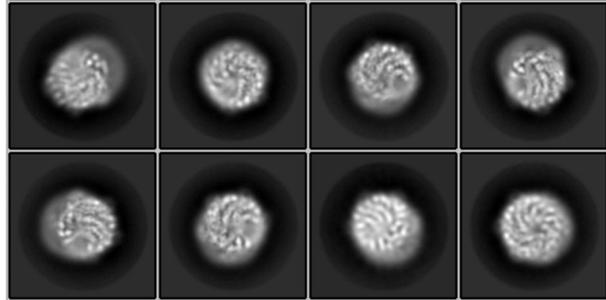


図3. 構成膜蛋白質の2次元平均像

さらに、輸送過程中の蛋白質輸送装置の構造にも着目して研究を進めた。細胞の内と外をひっくり返した反転膜小胞の系を用いて、輸送過程中の蛋白質輸送装置の可視化実験をクライオ電子線トモグラフィー法を用いて行った。輸送基質を膜外から加えることで、反転膜内部に形成されたべん毛繊維および輸送基質と結合した蛋白質輸送装置の可視化に成功した。この実験系から ATPase 複合体による ATP 加水分解エネルギーとプロトン駆動力のどちらか片方のエネルギーさえあれば、輸送が駆動することが明らかになり、型分泌系がそれぞれのエネルギーを独立して使うことのできるハイブリッドエンジン型の装置であることが示唆された。また、輸送基質どうしの相互作用が輸送順序や輸送効率に関係することが明らかになった。

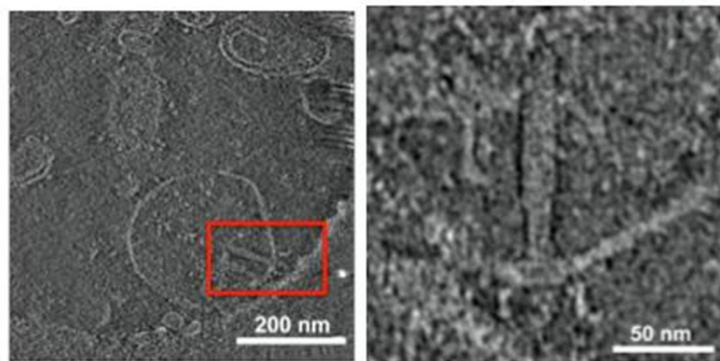


図4. 反転膜小胞内にできたべん毛繊維構造と蛋白質輸送装置

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Terashima Hiroyuki, Kawamoto Akihiro, Tatsumi Chinatsu, Namba Keiichi, Minamino Tohru, Imada Katsumi	4. 巻 9
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 -
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 Tahara Hajime, Takabe Kyosuke, Sasaki Yuya, Kasuga Kie, Kawamoto Akihiro, Koizumi Nobuo, Nakamura Shuichi	4. 巻 4
2. 論文標題 The mechanism of two-phase motility in the spirochete <i>Leptospira</i> : Swimming and crawling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.aar7975	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 Sasaki Yuya, Kawamoto Akihiro, Tahara Hajime, Kasuga Kie, Sato Ryoichi, Ohnishi Makoto, Nakamura Shuichi, Koizumi Nobuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Leptospiral flagellar sheath protein FcpA interacts with FlaA2 and FlaB1 in <i>Leptospira biflexa</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0194923	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 Nagamura Reina, Fukuda Masahiro, Kawamoto Akihiro, Matoba Kyoko, Dohmae Naoshi, Ishitani Ryuichiro, Takagi Junichi, Nureki Osamu	4. 巻 75
2. 論文標題 Structural basis for oligomerization of the prokaryotic peptide transporter PepTSo2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 348-358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X19003546	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 Berengut Jonathan F, Berengut Julian C, Doye Jonathan P K, Pre?ern Domen, Kawamoto Akihiro, Ruan Juanfang, Wainwright Madeleine J, Lee Lawrence K	4. 巻 47
2. 論文標題 Design and synthesis of pleated DNA origami nanotubes with adjustable diameters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11963-11975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz1056	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

1. 著者名 Nishikawa Miyuki S., Nakane Daisuke, Toyonaga Takuma, Kawamoto Akihiro, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Miyata Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Refined Mechanism of Mycoplasma mobile Gliding Based on Structure, ATPase Activity, and Sialic Acid Binding of Machinery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	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) 10.1128/mBio.02846-19	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 Terashima Hiroyuki, Tatsumi Chinatsu, Kawamoto Akihiro, Namba Keiichi, Minamino Tohru, Imada Katsumi	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 126 ~ 126
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 Yamada Tomohito, Yoshida Toru, Kawamoto Akihiro, Mitsuoka Kaoru, Iwasaki Kenji, Tsuge Hideaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Cryo-EM structures reveal translocational unfolding in the clostridial binary iota toxin complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 288 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-020-0388-6	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 Hiroyuki, Hirano Keiichi, Inoue Yuna, Tokano Takaya, Kawamoto Akihiro, Kato Takayuki, Yamaguchi Erika, Namba Keiichi, Uchihashi Takayuki, Kojima Seiji, Homma Michio	4. 巻 -
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 -
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 Minamino Tohru, Kawamoto Akihiro, Kinoshita Miki, Namba Keiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular Organization and Assembly of the Export Apparatus of Flagellar Type III Secretion Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics in Microbiology and Immunology	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) 10.1007/82_2019_170	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川本晃大
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いたタンパク質の動的機能構造解析
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川本晃大、宮田知子、木下実紀、南野徹、今田勝巳、加藤貴之、難波啓一
2. 発表標題 Rotational symmetry structure of the bacterial flagellar motor for torque transmission revealed by cryo-EM
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Kawamoto, Tomoko Miyata, Miki Kinoshita, Tohru Minamino, Katsumi Imada, Takayuki Kato, Keiichi Namba
2. 発表標題 Structure and rotational symmetry of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy.
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Kawamoto, Tomoko Miyata, Miki Kinoshita, Tohru Minamino, Katsumi Imada, Takayuki Kato, Keiichi Namba
2. 発表標題 Structure and rotational symmetry of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy.
3. 学会等名 第74回日本顕微鏡学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川本晃大
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるMycoplasma pneumoniaeの細胞接着タンパク質P1の立体構造解析
3. 学会等名 2019年度日本マイコプラズマ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川本晃大
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を使った病原性細菌の運動機能や分泌機構解明への挑戦
3. 学会等名 第92日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川本晃大
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による構造解析法チュートリアル
3. 学会等名 CBI学会2019年大会（招待講演）
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
研究協力者	木下 実紀  (Kinoshita Miki)		