

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390105

研究課題名(和文) 高分解能イメージングで探る病原細菌 B型分泌系のコア複合体

研究課題名(英文) Molecular dissection of type IVB secretion system core complex.

研究代表者

永井 宏樹 (Nagai, Hiroki)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：80222173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円、(間接経費) 3,960,000円

研究成果の概要(和文)：病原菌は感染を成立させるため、細菌由来のタンパク質を宿主細胞に輸送します。この輸送を司る、したがって感染現象の鍵となる細菌分泌装置はいくつかのタイプに分類されていますが、ピロリ菌やレジオネラが持つIV型分泌装置の実体はほとんどわかっていませんでした。本研究はレジオネラの病原性に必須であるIV型分泌装置の実体の解明を目的に行われ、細菌病原性に必須なIV型分泌装置としては世界で初めて、その中核を構成するコア複合体の単離および電子顕微鏡解析に成功しました。

研究成果の概要(英文)：Bacterial pathogens manipulate host cellular processes using their own proteins. These proteins, so-called effectors, are injected into host cells using specialized nanomachines assembled on the bacterial cell surface. One such nanomachine is the type IV secretion system (T4SS). Here we have successfully unveiled the electron microscopic structure of the core complex of the Dot/Icm T4SS, which is essential for Legionella pathogenesis. This is the first report unveiling the structure of a T4SS core complex essential for bacterial pathogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：細菌 タンパク質分泌 IV型分泌 レジオネラ 接合伝達

1. 研究開始当初の背景

病原細菌のタンパク質分泌系として、最初にその分子構造が電子顕微鏡レベルで明らかにされた III 型分泌系は、注射器によく似た針状の突起を持つ特徴的な構造を有し、宿主細胞に直接タンパク質を注入するという機能を合理的に説明した (Kubori et al., *Science* 1998)。一方、様々な病原細菌で多様な役割を担う IV 型分泌系は、ようやく中核となる構成タンパク質が同定されいくつかの系で部分構造が解かれ始め、全体構造解明への機が熟しつつあった。

細菌の IV 型分泌系は、接合伝達系と起源を共にするという点から分類された病原因子輸送系であり、接合伝達系も IV 型分泌系の一つとして位置づけられる。輸送基質は毒素・エフェクタータンパク質、伝達性プラスミドや可動性遺伝因子など多岐に渡ることが大きな特徴である。病原性発現の機構解明への糸口となるばかりでなく、遺伝子水平伝達による多剤耐性菌の出現を引き起こす経路の機構解明のためにもその全貌の解明が待望されている。しかしながら、IV 型分泌系は、遺伝子群の構成や、輸送基質分子の種類・大きさ、複雑さ・局在などが非常に多様であることから、極めて多岐に渡る輸送活性を持つと考えられ、輸送装置の実体や輸送メカニズムについては近年にいたるまでほとんど理解されていなかった。

IV 型分泌系は配列上の相同性などからさらに IVA 型・IVB 型に分類されており、両者とも多くの病原細菌・接合プラスミドに存在している。IVA 型では 2004 年、Christie らが宿主植物細胞に DNA を輸送する病原菌 *アグロバクテリア (Agrobacterium tumefaciens)* の VirB 分泌系において基質 DNA と直接相互作用する輸送装置コアタンパク質を同定した (Cascales et al. *Science*)。2009 年に、Waksman らは IVA 型分泌系の細菌内外膜を貫通するコア複合体を単離し (Fronzes et al. *Science*)、さらにその外膜部分複合体をそのまま結晶化することにより原子構造を解き明かした (Chandran et al. *Nature*)。コア複合体の大量発現、精製はアグロバクテリアでは困難であるため、この研究は、構造的に等価と考えられる大腸菌接合プラスミドを用いて行われ、それがブレイクスルーとなり大きな成功を収めた。

一方 IVB 型分泌系の構造はこれまで全くわかっていなかった。我々はヒト病原菌レジオネラ (*Legionella pneumophila*) の Dot/Icm IVB 型分泌系外膜コアタンパク質 DotD の結晶構造を決定し、その結果、驚いたことに IVB 型分泌系は少なくとも部分的には IVA 型よりもむしろ II 型あるいは III 型に分類される分泌系に構造的に類似してい

ることを明らかにした (Nakano, et al., *PLoS Pathogens* 2010)。このことは、先に構造が解かれた IVA 型とは全く違う構造を IVB 型が有している可能性を強く示唆する。他の構成タンパク質に関する知見からも、IVB 型がいろいろなタイプの分泌系の特徴をモザイク的に有していると申請者らは考えている。IVB 型分泌系の全体構造が明らかになれば、細菌の病原因子分泌系の進化的成り立ちにも重要な知見を与えると期待される。我々は IVB 型分泌系の個々の構成タンパク質の構造・機能解析を既に手がけており、この技術や成果を発展させて全体構造の解明に繋がりたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、IVB 型分泌系からコア複合体・部分複合体を単離・解析し、多角的な研究を展開する。

- (1) IVB 型分泌系コア複合体・部分複合体の単離、精製
IVB 型分泌系のコア複合体・部分複合体を生化学的に単離、精製する手法を確立する。
- (2) 電子顕微鏡等による高解像度構造解析
透過型電子顕微鏡ネガティブ染色法などにより、精製した構造体を解析する。

これらを総括することにより、最終的に IVB 型分泌装置の実体を明らかにすることを目指す。

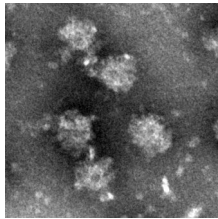
3. 研究の方法

- (1) IVB 型分泌系コア複合体・部分複合体の単離、精製
レジオネラを液体培養し菌体を回収する。EDTA 存在下においてリゾチームを作用させることにより、細菌細胞壁を分解したスフェロプラストを得る。これに界面活性剤・DNase I を作用させることにより、溶菌液を調製する。これを出発材料とし、超遠心分離法によって分泌系コア複合体を濃縮する。電子顕微鏡観察用には、ゲル濾過により低分子量夾雑物を除去した。
単離されたコア複合体について、質量分析法などによりその構成タンパク質を決定した。さらに、構成タンパク質欠損株から部分複合体を単離した。
- (2) 電子顕微鏡等による高解像度構造解析
上記方法で単離されたコア複合体・部分複合体について、負染色を行った後、透過型電子顕微鏡によりその構造解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 細菌病原性に必須な IV 型分泌系として世界で初めて、コア複合体を単離・解析

背景でも述べた通り、エフェクタータンパク質を宿主細胞内へ輸送する細菌分泌系は、病原菌の感染成立において中心的な病原因子である。本研究の成果により、細菌病原性に必須な IV 型分泌系として世界で初めて、コア複合体を単離・解析することに成功した。



単離されたレジオネラ IV 型分泌系
コア複合体の電子顕微鏡像

単離されたレジオネラ IVB 型分泌系コア複合体は、これまでに明らかにされていた IVA 型接合伝達系コア複合体と同様中心部に輸送チャネルを形成しているものとみられる穴が見られる。少なくとも 5 種類のタンパク質により構成されており、外径は直径が接合伝達系コア複合体よりはるかに大きいものであった。また、構成タンパク質欠失株の解析から、少なくとも 2 種類の部分複合体が得られ、これらの結果はコア複合体の構築過程への示唆を与えるものであった。これらの成果は、待望されている IV 型分泌の動作原理の解明への基礎を与えるだけにとどまらず、病原性に必須な細菌分泌系を阻害するという新規作用機序を持つ新規抗生剤開発への道を開くものである。これらの成果を報告する主要原著論文は、本報告書執筆時において米国科学アカデミー紀要に投稿・査読中である。

- (2) より高解像度の構造解析に向けて

クライオ電子顕微鏡を利用した単粒子解析では、より自然に近い条件で、負染色による透過電子顕微鏡解析を超えた高解像度構造解析が可能であるが、多数のタンパク質複合体のクライオ電子顕微鏡像を得る必要がある。現在の単離法ではこれに十分な質・量の資料を得ることが困難であるため、標識配列付加によるアフニティー精製法・大腸菌等を利用した高発現系の開発などを行ってきた。これらにより、今後のより高解像度構造解

析に発展させていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Hiroki Nagai and Tomoko Kubori. Dot/Icm type IVB secretion systems of *Legionella* and other gram-negative bacteria. *Front. Microbiol.* 2011, 2:136, doi: 10.3389/fmicb.2011.00136, 査読有

[学会発表](計 20 件)

1. 久堀 智子, 永井 宏樹, “Structural analysis of a type IV secretion system core complex essential for bacterial virulence” 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 日(26-28)、タワーホール船堀(東京)
2. 永井宏樹、久堀智子、Xuan Bui Thanh、小池雅文、桧垣沙緒里、相沢慎一 “ヒト病原菌レジオネラの病原因子輸送装置” 分子遺伝学シンポジウム 2014 新しい生命像を導いた大腸菌遺伝学の系譜、2014 年 3 月 1 日、京都大学北部総合教育研究棟・益川ホール(京都)
3. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Masafumi Koike, Saori Higaki and Shin-ichi Aizawa, “Structural analysis of a type IV secretion system core complex essential for bacterial virulence.”, Cold Spring Harbor Asia meeting on Bacterial Infection and Host Defense, Nov. 19, 2013, (18-22) Suzhou, China
4. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Masafumi Koike, Saori Higaki, Shin-ichi Aizawa, Takuya Kuroda, Miki Kinoshita, Yumiko Uchida and Katsumi Imada, “Structural analysis of the type IVB secretion system” The 8th International Conference on *Legionella*, Nov. 1, 2013, (29-1) Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia.
5. Tomoko KUBORI, Takuya KURODA, Xuan Thanh BUI, Yumiko UCHIDA, Katsumi IMADA and Hiroki NAGAI, “CHARACTERIZATION OF LEGIONELLA DOTI AND DOTJ SUBCOMPLEX REVEALS A VIRB8-LIKE STRUCTURE ESSENTIAL FOR TYPE IV SECRETION SYSTEM.”, Oct 31, 2013, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia.
6. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Masafumi Koike, Saori Higaki and Shin-ichi Aizawa,

- “Interdomain protein transport: a critical strategy employed by bacterial pathogens and symbionts.” 第 12 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2013 年 9 月 13 日、淡路夢舞台国際会議場、(兵庫県)
7. Tomoko Kubori, Takuya Kuroda, Yumiko Uchida, Katsumi Imada, Hiroki Nagai, “Characterization of *Legionella* DotI and DotJ subcomplex reveals a VirB8-like structure essential for type IV secretion.” 第 12 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2013 年 9 月 11 日、淡路夢舞台国際会議場、(兵庫県)
 8. 永井宏樹、久堀智子、小池雅文、桧垣沙緒里、相沢慎一、 “レジオネラ Dot/Icm IVB 型分泌系のコア複合体”、第 7 回細菌学若手コロッセウム、2013 年 8 月 8 日(7-9)、フォレストヒルズガーデン / 広島エアポートホテル(広島)
 9. 永井宏樹、Interdomain protein transfer as a critical mechanism for Matryoshka-type evolution. 第 2 回マトリョーシカ型生物学研究会、2013 年 7 月 24 日、ホテル京都ガーデンパレス
 10. 永井宏樹、レジオネラ Dot/Icm IVB 型分泌系の進化・構造・機能、第 10 回 21 世紀大腸菌研究会、2013 年 06 月 20 日、ラフォーレ修善寺(静岡)
 11. Tomoko Kubori, Takuya Kuroda, Yumiko Uchida, Katsumi Imada, Hiroki Nagai Structural analysis of the DotI/DotJ subcomplex in the *Legionella* type IVB secretion system. 第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 03 月 18 日、幕張メッセ(千葉県)
 12. Saori Higaki, Masafumi Koike, Tomoko Kubori, Shin-Ichi Aizawa, Hiroki Nagai Purification and structural analysis of type IV secretion apparatus in *Legionella pneumophila*. 2012 年度べん毛交流会、2013 年 03 月 04 日、伊香保温泉(群馬県)
 13. 小池雅文、桧垣沙緒里、久堀智子、相沢慎一、永井宏樹レジオネラ IVB 型分泌装置コア構造体の電子顕微鏡による構造解析、感染症若手フォーラム 2013、2013 年 03 月 01 日、北広島クラッセホテル(北海道)
 14. 黒田琢弥、内田裕美子、久堀智子、永井宏樹、今田勝巳 IV 型分泌系構成蛋白質 DotI の構造、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県)
 15. Nagai, H. Interdomain protein transport: a critical strategy employed by bacterial pathogens and symbionts, 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県)
 16. Tomoko Kubori, and Hiroki Nagai, *Legionella* DotI and DotJ form a multimeric subcomplex associated with the core complex of the Dot/Icm type IVB secretion system. 日本生物物理学会第 50 回年会、2012 年 09 月 23 日、名古屋大学(名古屋)
 17. Kuroda T, Uchida Y, Kubori T, Nagai H, Imada K, Structure of DotI, a core component of the Type IVB secretion system. 日本生物物理学会第 50 回年会、2012 年 09 月 22 日、名古屋大学(名古屋)
 18. Tomoko Kubori, Takuya Kuroda, Katsumi Imada and Hiroki Nagai, *Legionella* DotI and DotJ form a multimeric subcomplex associated with the core complex of the Dot/Icm type IVB secretion system. 第 1 回淡路島感染症・免疫フォーラム、2012 年 09 月 13 日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)
 19. 永井宏樹、レジオネラ Dot/Icm IVB 型分泌系の進化・構造・機能、第 9 回 21 世紀大腸菌研究会、2012 年 06 月 22 日、長浜口イザルホテル(滋賀)
 20. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Noboru Nakano, Miki Kinoshita, Yumiko Uchida, Takuya Kuroda, Katsumi Imada Structural insights highlight mosaic nature of the type IVB secretion system. 第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 27 日、長崎市
- 〔その他〕
研究室ホームページ
<http://nagailab.biken.osaka-u.ac.jp/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
永井宏樹 (NAGAI, Hiroki)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：80222173
 - (2) 連携研究者
相沢慎一 (AIZAWA, Shin-ichi)
県立広島大学・生命環境学部・教授
研究者番号：50222451
- 今田勝巳 (IMADA, Katsumi)
大阪大学・理学系研究科・教授
研究者番号：40346143