

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790411

研究課題名(和文) 計算生物学・構造生物学的手法による III型分泌機構の構造基盤及び分泌シグナルの解明

研究課題名(英文) Elucidation of structural mechanism of substrate selection and secretion signal in T3SS secretion by theoretical and experimental structural biology

研究代表者

佐藤 慶治 (Sato, Yoshiharu)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00554586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：多くの病原細菌は、III型分泌装置を用いて宿主細胞内へエフェクターと呼ばれる病原因子を送り込み、宿主細胞機能を攪乱する。本研究では、サルモネラIII型分泌装置のアンフォールダーゼによる基質選択が、AAA+プロテアーゼClpXPの基質選択と同様の機構で行なわれていることを生化学/構造生物学的解析により見出した。この知見を元に、3次元構造レベルでの構造特性解析を取り入れる形で、エフェクター予測アルゴリズムを改良した。本手法で得られたエフェクター候補のうち9件について検証を行ない、STM1239を含む5件の遺伝子が実際にサルモネラ培養上清に分泌されるTTSS基質であることを確かめた。

研究成果の概要(英文)：Many bacterial pathogens manipulate cellular functions of host cells by injecting virulence proteins(T3SS effectors) into host cells using T3SS apparatus. Structural modeling analysis and biochemical experiments revealed that substrate selection and the recognition in T3SS secretion are conducted by the similar mechanism as used in the system of AAA+ protease ClpXP-substrate interaction. Based on the findings, structural property analysis was integrated into the effector prediction system, and the prediction accuracy was further improved. Experimental validation for 9 putative Salmonella effectors listed by this program revealed that five novel effectors including STM1239 were confirmed to secrete into supernatant of culture media.

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：サルモネラ III型分泌装置 エフェクター 病原因子

1. 研究開始当初の背景

現在までにグラム陰性菌における主要な分泌装置として I~VI の 6 つの分泌装置が知られている。多くの病原微生物は、III 型分泌装置や IV 型分泌装置を介してエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞内へと注入し、細胞機能を攪乱する。これまでに多くの研究者達が、エフェクターにコードされている分泌シグナルの同定を試みてきた。近年、バイオインフォマティクス解析により、エフェクターの N 末端に見られる特徴的なアミノ酸組成(Ser/Thr が多く、Asp/Glu が少ない)、低 G+C 含量、外来性遺伝子に特徴的な遺伝子進化系統プロファイルといったエフェクターの特徴が報告された。しかし、Sec 分泌機構の基質にコードされている程の鮮明なシグナル配列の特定に至っておらず、ゲノム配列に基づくエフェクター予測を困難にしている。実際に、エフェクター研究が盛んに行なわれてきたサルモネラにおいても、エフェクターのリストが毎年更新され、エフェクターの全容解明に至っていない。このような状況を打破すべく、申請者は、バイオインフォマティクスによるエフェクターの特徴解析を実施し、エフェクターの N 末端にコードされている新たな特徴を見出した。新規特徴とは、“高度に揺らいだ N 末端構造”、“正電荷に偏った静電的ポテンシャル”及び“N 末端コドンの非最適化による翻訳効率の低下”であり、従来報告されていた“低 G+C 含量”や“外来性由来を示す系統関係”といったシグナル認識とは無関係な特徴と比べ、より分泌シグナルの構造特性に迫る特徴を明らかにした(Sato et al. 2011 BMC bioinformatics)。さらに、複数の発現プロファイリングデータを統合し、同様の発現パターンを示す遺伝子群を高精度に推測するアルゴリズムと組み合わせることによって、全ゲノムからエフェクターを高精度に予測するシステムの構築に成功した(当研究室 HP よりソフトウェアを配布 <http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bisei/software/>)。また申請者は、一連のエフェクター解析と平行して、構造生物化学的アプローチによるシャペロンの基質認識機構の研究にも取り組んできた。ATPase シャペロンである ClpX による基質のアンフォールドにおいて、基質の末端部位の揺らぎが重要であることを見出し、さらに認識タグとシャペロン間親和性を相互作用エネルギーの観点から予測可能なシステムの構築に成功している(8th international conference on AAA proteins 2009 において口頭発表)。III 型分泌装置の基質は、InvC と呼ばれる ATPase アンフォールダーゼによってアンフォールドされると示されており、ClpX と同様のメカニズムで基質の認識及びアンフォールディングが起きると予想し、ClpX 研究で構築した構造シミュレーションのフレームワークを III 型分泌基質に適用可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、サルモネラにおける III 型分泌装置を介したエフェクター分泌の構造基盤を明らかにする。特に、3 次元構造レベルでコードされていると考えられる分泌基質上の分泌シグナルに着目し、その構造特性の解明及びシグナルのモデル化を目指す。得られたモデルを、申請者が開発済みのエフェクター予測システムに組み込むことで、全ゲノムレベルでエフェクターの特定が可能なスクリーニングシステムの完成へと繋げる。また、III 型分泌装置による分泌シグナルの認識様式について、分子動力学・量子力学計算と高速原子間力顕微鏡(High-Speed Atomic Force Microscopy、HS-AFM)のアプローチを組み合わせた新しい手法を確立し、基質-分泌装置間相互作用の経時的な変化、分泌基質認識の構造基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

* InvC 6 量体構造の分子モデリングと基質間相互作用の構造解析

サルモネラ InvC 6 量体構造をホモロジーモデリングにより構築し、既知基質の N 末端 20aa. との相互作用について、分子動力学計算によりその安定性、相互作用部位を検討した。また、基質選択メカニズムに高度な類似性があると考えられた ClpX-既知基質間相互作用との比較を行なった。

*高速 AFM による ClpXP-基質相互作用のリアルタイム 1 分子観測

実験的に基質-TTSS アンフォールダーゼ相互作用を構造学的観点から解析する事を目的として、高速 AFM を用いた溶液中相互作用構造の解析を行なった。当初 InvC6 量体を精製し基質との相互作用を解析する予定であったが、安定な 6 量体状態に置いて精製タンパクを得る事が難しかったため、認識様式が類似している ClpXP-基質間相互作用のリアルタイム観測を行なった。高速原子間力顕微鏡は熊本大学発生医学研究所の小椋教授が所有する機器を使用させて頂いた。

*ClpXP トラップ実験による疑似ファゴソーム環境 ClpXP 基質の同定

ClpX-基質間相互作用と、TTSS アンフォールダーゼ-基質間相互作用との間に類似性があることが示されたため、2 つの基質選択性に重複があるかについて実験的に検証した。基質を分解せずトラップする Ser111Ala ClpP-trap 変異体を構築し、疑似ファゴソーム環境下で ClpX と相互作用している基質を網羅的に同定する大規模プロテオーム解析を実施し、ファゴソーム内で実際に ClpX がエフェクターを基質として認識するかを検討した。

*改良版エフェクター予測候補の実験的検証

立体構造における相互作用エネルギーの安定性解析をエフェクター予測システムに組み込み、得られた予測エフェクター候補について培養上清への分泌、宿主細胞への移行を検討する。

4. 研究成果

*InvC6 量体-基質間相互作用安定化の構造メカニズム

SPI1 エフェクターの N 末端 20aa. の構造をモデリングして InvC6 量体構造との相互作用を分子動力学計算により検証したところ、InvC6 量体構造のポア領域に存在する負電荷とエフェクター N 末端の負電荷の少ない構造がかみ合う様に安定化していることが示された。また、N 末端が高度に揺らいだ構造を取る場合、複合体構造を形成するためのアクセシビリティが上昇することも示され、このアクセシビリティ上昇が基質選択の重要なファクターであると考えられた。さらに、本相互作用のメカニズムは、ClpX が基質を認識する際のメカニズムと高度に類似している事が示された。

*ClpXP-基質間相互作用の溶液中リアルタイム観測

当研究室で同定した基質 F1hDC と ClpXP との相互作用を高速 AFM によりリアルタイム観測した。基質 F1hDC を Ni-NTA-膜上に固定し、高速 AFM 観測する事で、分解による基質構造の変化をトレースできることが分かった。また、F1hDC 単体の構造を観測するためには、基盤上に Streptoavidin 格子を作成し、その上に Biotin-NTA を作り、His-F1hDC を結合させる方法で高精度に立体構造を観測できた。ClpXP と ATP を加えて F1hDC の分解をリアルタイムでトレースする実験を行ない、NTA 上に固定された F1hDC が実際に分解して行く様子をミリ秒スケールかつ溶液中構造において観測する事に成功した。この解析手法は、基質分解/アンフォールディングの詳細なカイネティクス解析、さらには相互作用解析に適用可能な解析システムとなりうる。

また、Streptoavidin システムでは F1hC の C 末端部位の揺らぎ構造を観測し、ClpX がこの揺らいだ C 末端部位を捕捉するという生化学的実験データと一致する結果が得られた。高度に揺らいだ天然変性領域がどのようにプロテアーゼに認識されるのか、またその揺らぎの程度と分解感受性の相関について今後本解析手法を応用する事で、興味深い発見へと繋がる事が期待される。

*疑似ファゴソーム条件における ClpXP 基質トラップ実験

疑似ファゴソーム条件下での ClpXP 基質を同定するトラップ実験を行なったところ、5 件の SPI2 のエフェクター (SlrP, SifA, SteC, SseE, SseD) が ClpXP 基質として同定された。

このことから、前述の構造解析により示されていた TTSS アンフォールダーゼと ClpX との基質認識機構に類似性があるという理論が正しいことが示され、2 つの基質選択について一部の重複があることが示された。これまでの研究から、エフェクター N 末端の翻訳スピードは非常に遅いことも示している。揺らぎの大きい N 末端の翻訳速度が速い場合、ClpXP に優先的に分解を受けてしまうため、翻訳速度が遅い事が、エフェクターとして分泌されるためのもう一つのシグナルであるという新しい分泌制御モデルが考えられる。

*推定されたエフェクター候補の実験的検証

本解析技術で推定されたエフェクターランクの高かった 9 件の遺伝子について実験的な検証を行なった。この中で、STM1239 は本予測技術で予測された推定信頼度の高いエフェクター候補であり、早くから実験的検証を行なって来た。このエフェクターは SPI1、SPI2 の両条件下で培養上清に分泌され、さらに CyaA アッセイにより、HeLa 細胞、RAW264.7 マクロファージ様細胞へ SPI1 分泌装置依存的に移行するエフェクターであることが確かめられた。現在当研究室では STM1239 の機能解析を進めており、サルモネラマクロファージ内生存における役割についてその一部が明らかになってきた。

また、その他 4 件 (STM1554, STM1670, STM0081, STM2747) の候補について、培養上清への分泌を確認している。この中で、STM1554 (SgrE) はごく最近他の研究グループから宿主細胞へ移行するエフェクターであると決定され、本解析精度の正確さが立証された。今後さらなる検証を重ねることで、より多くのエフェクター同定へと繋がること期待される。

*配布ソフトウェアの更新と公開

研究室のホームページから公開しているエフェクター予測ソフトウェアについて、KEGG データベースの仕様変更に伴う解析部位の変更を行った。現在世界中の研究者からソフトウェア使用に関する問い合わせを受け付け、個別対応と適宜フィードバックを行なっている。エフェクター解析研究分野における研究推進に貢献しているものと考えられる。

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 4 件)

1. Takaya, A., Sato, Y., Shoji, T., Yamamoto, T. (2013) Methylation of 23S rRNA nucleotide G748 by RlmAII methyltransferase renders *Streptococcus pneumoniae* telithromycin susceptible. **Antimicrob Agents Chemother** 57(8):3789-3796. (査読有り)
2. Kikugawa, S., Nishikata, K.,

- Murakami, K., Sato, Y., Suzuki, M., Altaf-Ul-Amin, Md., Kanaya, S., Imanishi, T. (2012) PCDq: human protein complex database with quality index which summarizes different levels of evidences of protein complexes predicted from H-Invitational protein-protein interactions integrative dataset **BMC systems biology** 6(Suppl 2),S7 (査読有り)
3. Gough, CA., Homma, K., Yamaguchi-Kabata, Y., Shimada, MK., Chakraborty, R., Fujii, Y., Iwama, H., Minoshima, S., Sakamoto, S., Sato, Y. et al. (2012) Prediction of protein-destabilizing polymorphisms by manual curation with protein structure. **PLoS One** 7(11),e50445 (査読有り)
4. Hayashida, K., Hara, Y., Abe, T., Yamasaki, C., Toyoda, A., Kosuge, T., Suzuki, Y., Sato, Y. et al. (2012) Comparative genome analysis of three eukaryotic parasites with differing abilities to transform leukocytes reveals key mediators of Theileria-induced leukocyte transformation. **MBio** 3(5),e00204-e002012. (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Flit enhances the ClpXP-catalyzed degradation of master regulator FlhD₄C₂ in *Salmonella*. 佐藤 慶治, 高屋 明子, 山本 友子 第 87 回日本細菌学会総会 2014.3.28 (東京 タワーホール船堀)
2. Flit fine-tunes the flagellar biogenesis by enhancing the ClpXP-catalyzed degradation of master regulator FlhD₄C₂. Akiko Takaya, Yoshiharu Sato, Tomoko Yamamoto EMBO workshop on AAA+ proteins: from mechanism and disease to targets. 2013.9.15-19 (Commundo Hotel Neuss, Germany)
3. 協調的認識により調節される AAA+プロテアーゼ ClpXP の基質特異性. 佐藤慶治、唐田清信、高屋明子、山本友子第 86 回日本細菌学会総会 2013.3.18-20 (千葉 幕張メッセ)
4. Substrate specificity of AAA+ protease ClpXP determined by bipertite recognition. Yoshiharu Sato, Akiko Takaya, Tomoko Yamamoto 第 35 回日本分子生物学会年会 口頭発表 2012.12.11-12 (福岡 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bisei/>
<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/bisei/software/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 慶治 (千葉大学・大学院薬学研究
院 助教)

研究者番号 : 00554586

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し