

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450102

研究課題名(和文) 線毛装置の分子基盤に関する研究：膜内で伸縮する機能性タンパク質繊維の創製に向けて

研究課題名(英文) Type IV pilus machinery of *Thermus thermophilus*

研究代表者

玉腰 雅忠 (Tamakoshi, Masatada)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10277254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：好熱菌テルムス・テルモフィルスの細胞表面にある4型線毛の形成や機能を発揮するために必要な膜装置中に機能不明なリポタンパク質が見出されていた。その遺伝子を破壊した好熱菌を作製したところ、平面運動やウイルス感染が起きなくなった。このタンパク質は線毛を収縮することに関与することが示唆された。また、運動能やウイルス感染能の異なる好熱菌間で線毛タンパク質を移植したところ、運動能もウイルス感染能も変えることはできなかった。構造タンパク質以外のタンパク質も取り替える必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The extreme thermophile *Thermus thermophilus* produces Type IV pili (T4P) on the cell surface. A gene deletion of a protein found in T4P machinery led to loss of twitching motility and sensitivity to a T4P-dependent phage. The expression of the genes encoding the structural protein of HB8 in HB27 was not sufficient for twitching motility and infection of T4P-dependent phage. This result suggests that T4P-related function requires other protein(s) in addition to the structural proteins.

研究分野：細菌学

キーワード：線毛 高度好熱菌

1. 研究開始当初の背景

4 型線毛は多くのバクテリアが細胞表層に産生し、太さ数ナノメートル、長さは数マイクロメートルに及ぶ。このタイプの線毛は伸びるだけでなく、縮むこともできる。それを利用して、線毛が寒天などの表面に接着し、その後線毛が縮むことによって細胞が運動できる。また、線毛に吸着したウイルスは、線毛が縮むことによってバクテリアの表層に近づきやすくなる。このような機能を発揮するために、10 種類程度の膜タンパク質が協調的に働くことが知られている。しかし、テルムス属の好熱菌では線毛が外膜チャネルを貫通するためのタンパク質と相互作用するタンパク質がわかっていない。また、テルムス属細菌の代表的な株 HB8 と HB27 では、線毛の形成や機能を発揮するための膜タンパク質を比較すると、多くの場合ほぼ同じアミノ酸配列を持つが、線毛構造タンパク質だけはアミノ酸配列が大きく異なり、また立体構造も大きく異なる予想されている。これはテルムス属細菌の線毛形成装置が、多様な構造や機能をもつ繊維物質を作製できる可能性を示唆する。

2. 研究の目的

高度好熱菌の 4 型線毛をモデルとして、

(1) 4 型線毛が外膜を通るためのチャネルタンパク質と相互作用するリポタンパク質の機能解析、および(2) HB8 株の線毛を構成するタンパク質を HB27 株で発現させ、4 型線毛が関わる機能にどう影響するかを調べる。これらを通して、線毛の伸張や収縮に関わるタンパク質の機能を探ると共に、4 型線毛形成装置を用いて新しい機能性繊維を作ることを目指す基盤研究とする。

3. 研究の方法

(1) 用いた好熱菌とウイルス

好熱菌としてテルムス・テルモフィルス HB8 および HB27、および、それらの線毛遺伝

子破壊株、*pyrE* 遺伝子破壊株を用いた。ウイルスとして YS40 と TMA を用いた。ウイルスの感染が感染できるかどうかはブランク形成法を用いた。

(2) 遺伝子破壊

TTHA0007 および TTC1615 の遺伝子を破壊するためのベクターを理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。*pyrE* 遺伝子株を形質転換し、抗生物質カナマイシン耐性菌を得た。これら新規の遺伝子内にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていることを遺伝子増幅法により確認した。

(3) 運動能の解析

好熱菌を寒天上で増殖させ、顕微鏡により増殖領域の端を観察した。

(4) DNA の取り込み能

pyrE 遺伝子をゲノムに組み込むためのベクターを用い、生菌数に対する形質転換細胞数の割合を求めた。

4. 研究成果

(1) 外膜チャネルと相互作用する推定リポタンパク質の機能解析

寒天上で好熱菌を培養し、増殖領域の端を顕微鏡により観察すると、野生株では波打ったように見えるが、線毛を破壊した株ではシャープに見える。本研究で作製したリポタンパク質の遺伝子破壊株では増殖領域の端が線毛破壊株と同様にシャープになっており、運動能を失うことがわかった(図 1)。また、線毛依存的に感染するウイルスは、このリポタンパク質遺伝子を破壊した好熱菌に全く感染できなかった。一方、リポタンパク質遺伝子の破壊株は、核酸合成に関わる *pyrE* 遺伝子も予め破壊されている。その遺伝子を回復するためのベクターを用いて、DNA の取り込み能を調べたところ、野生株と同じ程度の

効率（0.03～0.14%）で形質転換された。

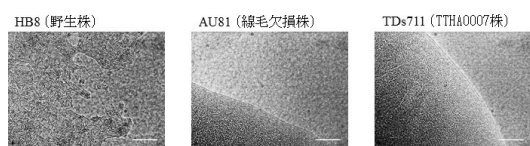


図1 TTHA0007 遺伝子破壊株の運動能 スケールバーは 50 μm

この結果は、淋菌などとは異なり、テルムス属細菌の場合は DNA の取り込みと平面運動が必ずしもリンクしていないことを示しており、以前の結果を支持するものである。

予備的な結果ではあるが、本研究で作製された遺伝子破壊株の細胞表層には、線毛繊維が出ていることがわかった。線毛の有無、運動能、およびウイルス感染能をまとめて考えると、この遺伝子の機能は線毛を収縮させるためのモーター分子 PilT1 の機能と極めて似ているが、PilT1 よりも線毛の機能に関して大きなダメージを与える（表）。テルムス属は粘液細菌と同様に、PilT1 に依存しない線毛が収縮することが示唆されているが（投稿準備中）、本研究で作製された遺伝子破壊株は、その運動能も失った。線毛が形成されるにもかかわらず、運動能やファージ感染能を失うという性質は、他の生物種も含めて本研究で初めて見出された。さらに、線毛に依存して感染するファージは、遺伝子破壊株に全く感染できなかったが、これは線毛の収縮がないと感染できないか、もしくはこの推定リポタンパク質が無くなることにより、ファージの感染に関わるタンパク質の機能が阻害されるためと考えられる。

表 リポタンパク質遺伝子破壊株と線毛収縮モーター遺伝子破壊株の比較

	野生株	線毛破壊株	リポタンパク質破壊株	$\Delta pilT1$
線毛繊維	+	-	+	+
運動能	+	-	-	±
DNA取り込み能	+	-	+	+
ウイルス感染能	+	-	-	±

+ および - は、その表現型がそれぞれ見られる、および見られない、ことを示し、± は弱く見られることを示す。

(2) HB8 の線毛の HB27 における発現

ウイルス YS40 は HB8 には感染できるが、HB27 には感染できない。また HB8 は HB27 より運動能力が高い。そこで、HB8 の線毛を構成するタンパク質の遺伝子を HB27 で発現させ、ウイルス感染能や運動能にどのような変化を及ぼすかを調べた。その結果、YS40 は得られた変異好熱菌に感染できなかった。また、運動能はむしろ低下した（図2）。DNA の取り込み能は 1/10 程度に低下した。この変異好熱菌は、HB27 の線毛も発現する筈だが、この結果は、HB8 と HB27 では線毛の形成機構が異なるか、または別の線毛関連タンパク質も移植しなければ機能しない可能性などが考えられる。HB8 と HB27 にはこの線毛構造タンパク質の他に、擬構造タンパク質の配列も異なることがわかっており、それらも移植しなければ機能を十分発揮しない可能性がある。

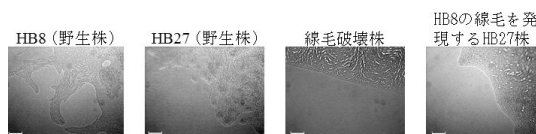


図2 HB8 の線毛を発現させた HB27 由来株の運動能 スケールバー：50 μm

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）

〔学会発表〕（計4件）

玉腰 雅忠、常泉 賢司、千葉 直也、山岸 明彦、安田 卓人、丸山 貴浩、小池 あゆみ「*Thermus thermophilus* 由来4

型線毛の伸張および収縮に関わる分子モーターの機能解析」2017年 生体運動合同班会議（口頭発表）、2017/1、神戸国際会議場

Masatada Tamakoshi, Kenji Tsuneizumi, Naoya Chiba and Akihiko Yamagishi

“Functional Analysis of Type IV pilus Traffic ATPases of the Extreme Thermophile *Thermus thermophilus*”

Extremophiles 2016, 2016/9, Kyoto University

丸山 貴浩、佐々木 亜由美、安田 卓人、玉腰 雅忠、小池 あゆみ「*Thermus thermophilus*由来 IV型線毛複合体の構造解析」第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会（ポスター発表）、2015/12、神戸

玉腰 雅忠、志村 洸洋、尾方 美沙樹、山岸 明彦「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の線毛関連新規リポタンパク質」第37回日本分子生物学会年会（ポスター発表）、2014年11月、横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~lcb-7/tamakoshi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉腰 雅忠 (TAMAKOSHI, Masatada)
東京薬科大学・生命科学部・准教授
研究者番号：10277254

(4) 研究協力者

小池 あゆみ (Koike-Takeshita, Ayumi)