

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790468

研究課題名(和文) 3型分泌システムの試験管内再構成 - 分泌機構解明と応用展開 -

研究課題名(英文) In vitro reconstitution of Type III secretion system - basic and applied research -

研究代表者

林 史夫 (Hayashi, Fumio)

群馬大学・理工学研究院・助教

研究者番号：60400777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性病原菌による感染症は3型分泌装置と呼ばれるナノサイズの注射器によってエフェクタータンパク質が宿主細胞に注入されることから始まる。エフェクターの1つであるSptPは35-139残基で特定のシャペロンSicPと複合体を形成すると報告されていたが、試験管内再構成の実験から106-136残基にコア領域があることを示した。SptP/SicP複合体の解離にはInvCのATPase活性が必要であるといわれているが、再構成実験ではInvC存在下でSptP/SicP複合体の解離やATPase活性の増大は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：SptP is a virulence effector protein of Salmonella that is involved in bacterial invasion into a host cell. For effective secretion, SptP forms a complex with SptP-specific chaperone SicP through its chaperone-binding domain, residues 35-139. We suggested that residues 106-136 of SptP are important for complex formation with SicP by in vitro reconstitution experiments. The dissociation of the SptP/SicP complex requires ATPase activity of InvC. So, we purified InvC, and then characterized its ATPase activity and tested whether InvC ATPase dissociates the complex. InvC ATPase activity showed positive cooperativity, suggesting that InvC subunits form a homo-oligomer. Furthermore the ATPase activity was stimulated in the presence of liposomes, suggesting that InvC interacts with plasma membrane and the activity is regulated by the interaction. In the presence of liposomes and SptP/SicP complexes, InvC ATPase activity was not increased further and did not dissociate SptP/SicP complexes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：病原性 3型分泌システム タンパク質大量発現

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性病原菌による感染症の発症は 3 型分泌装置 (T3SS) と呼ばれるナノサイズの注射器によってエフェクター (病原因子) タンパク質が宿主細胞に注入されることから始まる。多くの病原細菌の感染機構を解き明かす鍵はエフェクターの毒性発揮機構とエフェクターの分泌機構の解明だといわれている。

研究開始時点で、サルモネラにおけるエフェクター分泌機構は次のように考えられていた (図 1)。

- エフェクターとエフェクター特異的シャペロンとの相互作用
- エフェクター・シャペロン複合体と T3SS 特異的 ATPase (InvC) との相互作用
- ATPase 活性によるエフェクター・シャペロン複合体の解離
- ATPase 活性によるエフェクターの構造解きほぐしとチャネルへの挿入
- プロトン駆動力によるニードル先端に向けた輸送

このモデルは、主に分子生物学的、細胞生物学的アプローチに基づいて立てられており、概容を理解するには十分である。しかしながら、このモデルは相互作用するタンパク質間の相互作用領域、動的構造変化等の空間的な情報、酵素活性のキネティクス、分子量論、エネルギー論等の定量的情報が不足しており、“装置”としての“作動様式”を理解するため、すなわち分子マシナリーを理解するためにはこれまでとは異なるアプローチが必要であった。

申請者は定量的情報の取得の重要性を考えており、かねてよりタンパク質の大量調製と試験管内評価により、以下のような成果を挙げた。

- ATPase (InvC) の詳細なキネティクス解析から、1 分子の ATP の加水分解で 0.4 ~ 35 分子のエフェクターを分泌することを見積もった。つまり、1 分子の ATP 加水分解

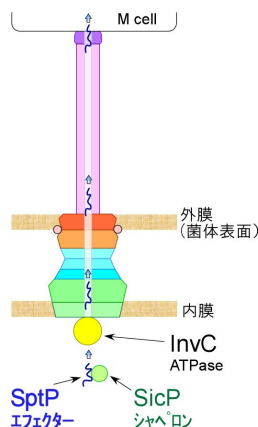


図 1, T3SS の病原因子エフェクターの分泌モデル

エネルギーで複数の基質を分泌する仕組みが隠れていることを示唆した。

- InvC と膜との相互作用は知られていたが、その意義は不明であった。リポソーム存在・非存在下でのキネティクス解析により、InvC は自身の局在の違いによって ATPase 活性を自動的に調整できることを示し、ATPase 活性とエフェクター輸送との効率的なカップリングを制御できるモデルを提案した (第 83 回日本細菌学会ワークショップ発表)。
- シャペロンの 1 つである SicP の大量調製にも成功した。しかし、InvC との相互作用、InvCATPase 活性への効果はなかった (Hayashi et.al, 2009)。

2. 研究の目的

申請者は、これまでにエフェクターの分泌機構に関わるタンパク質をいくつか調製してきた。あと、エフェクタータンパク質 SptP と機能未知タンパク質 InvI、内膜タンパク質を含む膜成分が調達できれば、エフェクター分泌に係わる細菌サイトゾル内のイベントを試験管内で再現できる段階に到達した。

本研究課題では、試験管内で T3SS のエフェクター分泌イベントの再構築と定量的解析を念頭に置き、SptP、InvI の調製法の確立、パートナータンパク質との相互作用等を明らかにする。

3. 研究の方法

目的タンパク質を大腸菌大量発現系と種々クロマトグラフィーを用いて調製し、試験管内で酵素活性測定、相互作用解析を行う戦略で臨んだ。

プラスミド構築

発現プラスミドとして、目的または戦略に応じて pET3c, pET19b, pET49b, pET50b, pACYCDuet-1 を使い分けた。Salmonella enterica serovar typhimurium 運動野生株 SJW1103 からゲノムを調製し、それを鋳型として目的タンパク質をコードする DNA 塩基配列をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅した。その DNA 断片を発現プラスミドにクローニングした後、DNA 塩基配列の正常性を DNA シーケンシングで確認した。

タンパク質の調製

各発現プラスミドはタンパク質発現用大腸菌に移入した。目的タンパク質を未変性状態で調製するときは 20 で培養し、変性状態で調製するときは 37 で培養した。IPTG 処理は、目的タンパク質に応じてタイミング、濃度を最適化した。

遠心により集めた菌体を適切な組成の緩衝液で懸濁し、超音波処理で菌体を破碎した。目的タンパク質を未変性状態で調製するときは、その後の遠心上清を、変性状態で調製

するとき、遠心沈殿を次の操作に用いた。遠心上清に含まれる目的タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーで粗精製し、その後のイオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。遠心沈殿は適切な組成の緩衝液で十分に洗浄したのち、尿素を含む緩衝液で処理した。尿素により可溶化された目的タンパク質は尿素存在下でイオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。目的タンパク質の精製度は SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) で調べ、タンパク質量はピシンコニン酸法を用いた。

タンパク質間相互作用解析 (SptP/SicP) 未変性状態で精製した SicP 溶液と変性状態で精製した SptP を 100:1 の比率で混合し、10 分後 native-PAGE を行い、染色もしくは PVDF 膜に転写した。ウェスタンブロッティングには抗 SicP 抗血清、抗 SptP 抗血清を用い、ECL システムで検出した。

ATPase 活性評価

未変性状態で精製した InvC の ATPase 活性はマラカイトグリーン法で測定した。酵素反応液の基本組成に加え、リポソーム存在下、SptP/SicP 存在下でも ATPase 活性を測定した。

4. 研究成果

SicP と相互作用する SptP 領域の新提案

SptP の SicP 相互作用領域はファウエスタン法により 15-100 残基、プロテアーゼフットプリンティング法により 35-139 残基と報告されていた。SptP と SicP は分泌の初期過程で結合し、後期過程で InvC の ATPase 活性の効果で解離する。このような特性を示す両タンパク質の相互作用領域、結合定数を明らかにすることは分子マシナリー解明に重要である。

タンパク質間相互作用を調べるとき、通常は未変性状態のタンパク質を調製する。しかしながら、様々な試みにもかかわらず、SptP の SicP 結合領域を未変性状態で調製することは困難だった。そこで、尿素存在下で変性状態として調製した。SptP 濃度を高くし、未変性状態の SicP と 1:100 で混合することで、SicP と複合体を形成すれば可溶性に、複合体を形成しなければ尿素の効果は薄れ不溶化すると考えた。SptP₁₋₈₉、SptP₁₋₁₀₅、SptP₁₋₁₃₆、SptP₁₋₁₅₈ と SicP を混合し、native-PAGE で複合体の有無を調べたところ、SptP₁₋₁₃₆、

SptP₁₋₁₅₈ のみが複合体を形成した (図 2)。つまり、SicP との相互作用に重要なアミノ酸配列は 106-136 残基中に存在することを示した。試験管内再構成法により、新しい可能性を示したことになる。複合体形成に、短い配列に基づく限られた原子間相互作用が有効であるならば、解離過程において局所的に作用を及ぼすメカニズムの存在が推察できる。また、両タンパク質を個別に可溶性タンパク質として調製できたことは、相互作用の速度論的解析への道が開けたといえる。

InvCATPase 活性の基本的特性

InvC の ATPase 活性はエフェクターの分泌に必須であると報告されているが、酵素学的な知見は以前研究代表者らが pET19b/invC を用い InvC を調製・解析したもののしかない。しかし、その InvC は N 末端に pET19b 由来の 23 残基の余分な配列が付加されていたため、今回は 2 残基しか付加配列がない InvC を新たに調製し、酵素学的解析を行った。

InvC 濃度が異なる反応溶液を調製し、ATPase の比活性を算出したところ、InvC 濃度 0~1.5 μM で上昇し、1.5 μM 以上で一定となった。また、InvC は内膜と相互作用すると考えられており、その代替品であるリポソーム存在下では更に ATPase 活性が上昇した。

0.4 μM InvC のヒル係数, Km (mM), Kcat (s⁻¹) は、2.8, 1.7, 0.14, 1.5 μM InvC のそれらは、1.7, 2.0, 0.30, リポソーム存在下での 1.5 μM InvC のそれらは、1.7, 2.1, 0.69 であった。ヒル係数値より、すべての条件において正の協同性---サブユニット間の相互作用---が示され、InvC がホモ多量体を形成することが推察できた。Km 値より、すべての条件において、InvC の ATP に対する親和性はかなり低いことがわかった。細胞内の ATP 濃度が 1~2 mM であることを考えると、サルモネラ体内で InvC だけでは最大活性を示せないこと、菌体内の ATP 濃度の変動に応じて活性が制御されることが考えられた。Kcat 値は InvC 濃度を上げることで約 2 倍、リポソーム存在下では約 5 倍となり、正の協同性とリポソーム依存性を支持する結果が得られた。しかし、最も高い活性でも、1 分子の ATP を代謝するのに 1.4 秒もかかることを示した。

研究代表者らがこれまでに報告した pET19b/invC 由来の InvC 活性評価との違いは、リポソーム存在下で InvC 濃度が 1.5 μM の時の活性であった。本研究で用いた N 末端付加配列が短い InvC では活性の増大が見られたことより、N 末端がリポソームとの相互作用に関係があることが示唆された。

SptP/SicP 存在下での InvCATPase

InvC の酵素学的解析から、InvC 単独の ATPase 活性は非常に低かった。SptP/SicP 複合体の解離に InvCATPase 活性が必要であるとの報告から、前述の SptP₁₋₁₃₆/SicP 複合体存在下で InvC の ATPase 活性を調べた。しか

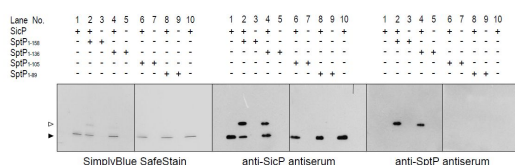


図 2, SptP/SicP の複合体を評価する native-PAGE

し, InvC の濃度, リポソームの有無にかかわらず, ATPase 活性の促進は見られなかった。また, SptP₁₋₁₃₆/SicP の解離も検出できなかった。SptP₁₋₁₃₆/SicP 複合体だけでなく, SptP₁₋₁₃₆ もしくは SicP がそれぞれ存在するときも ATPase 活性に大きな変化は見られなかった。InvC の ATPase 活性を促進するタンパク質として内膜タンパク質や InvI といったこれまでにまったく報告のないタンパク質群が関与しているのではないかと考えた。

InvC/InvI 共発現

invI を pET49b にクローニングし大量調製を試みた。しかし, GST-InvI は非特異的に様々なタンパク質を吸着させる特徴があるようで通常のクロマトグラフィー法での精製は困難であった。そこで, InvC/InvI の共発現系を構築した。複数準備した発現系の中の一つが InvC/InvI 相互作用を示唆するデータが得られた。今後はさらに詳しく調べていく予定である。

内膜タンパク質を利用するために, 反転膜小胞の作製を試みたが, 目的を達するための質と量を確保するためにはもう少しの検討が必要である。

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1件)

Hayashi, F., Kawashima, Y., Takeuchi, S., Okimori, L., Inobe, E., and Oosawa, K., SptP₁₀₆₋₁₃₆ plays a role in the complex formation with SptP-specific chaperone SicP. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, In press.

[学会発表](計9件)

林史夫, 川島有理恵, 竹内仁, 沖森健輔, 大澤研二; SptP の 106-136 残基が SicP との複合体形成に重要である; 第 87 回日本細菌学会総会; 2014 年 3 月 26-28 日; タワーホール船堀, 江戸川区

竹内仁, 林史夫, 川島有理恵, 大澤研二; シャペロン SicP の重要なエフェクター SptP 結合領域; 第 87 回日本細菌学会総会; 2014 年 3 月 26-28 日; タワーホール船堀, 江戸川区

沖森健輔, 林史夫, 渡辺綾, 伊野部江里, 中澤雄基, 大澤研二; 3 型分泌装置の可溶性タンパク質 InvC と InvI の複合体形成の検討; 第 87 回日本細菌学会総会; 2014 年 3 月 26-28 日; タワーホール船堀, 江戸川区

Kawashima, Y., Hayashi, F. Kenji Oosawa; Interactions of SicP with SptP subdomains in SicP-binding domain; 第 50 回日本生物物理学会年会; 2012 年 9 月 22-24 日; 名古屋大学, 名古屋

Watanabe, A., Hayashi, F., Oosawa, K.; Purification and characterization of glycine-proline- fused type of InvC involved in *Salmonella* type III secretion system; 第 50 回日本生物物理学会年会; 2012 年 9 月 22-24 日; 名古屋大学, 名古屋

林史夫; サルモネラ 3 型分泌システムのタンパク質科学; 医工連携グループミーティング 2012 年 1 月 24 日; 群馬大学、前橋【招待講演】

林史夫; 超微細装置生体ナノ装置を調べる・取り出す・利用する; 財団法人群馬大学科学技術振興会セミナー; 2011 年 11 月 25 日; 群馬大学、桐生【招待講演】

川島有里恵, 伊野部江里, 林史夫, 大澤研二; サルモネラ病原性タンパク質/シャペロン複合体の試験管内形成; 第 5 回日本ゲノム微生物学会若手の会; 2011 年 9 月 29 日; ろうきん研修所富士センター, 静岡

Hayashi, F., Kawashima, Y., Inobe, E., Oosawa, K.; In vitro formation of the SicP-SptP1-158 complex; International Union of Microbiological societies 2011 congress; September 6-10, 2011, Sapporo

[その他]

ホームページ等

<http://seibutsu-butsumi.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 史夫 (HAYASHI, FUMIO)

群馬大学・理工学研究院・助教

研究者番号: 60400777