

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460530

研究課題名(和文)病原細菌 IVB 型分泌系基質輸送チャネルの構造と動的構築過程

研究課題名(英文)Structural analysis and assembly pathway of the pathogenic bacterial type IVB secretion system transport channel

研究代表者

久堀 智子 (Kubori, Tomoko)

大阪大学・微生物病研究所・特任講師(常勤)

研究者番号：20397657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌レジオネラは宿主細胞に機能性タンパク質を輸送するため、その細胞表層に IVB 型分泌系という複雑な超分子複合体を形成する。その中で細胞内膜に局在する DotI/DotJ 複合体の精製とその生化学的解析から、これらがヘテロ 6 量体リング構造を形成し、基質輸送のためのチャネルとして機能する可能性が示された。さらに、DotI ペリプラズム領域の結晶解析から詳細な構造的知見が得られ、その情報を基盤とした機能解析を行い、輸送活性に重要な残基を特定した。さらに、この複合体は IVB 型分泌系中核複合体に相互作用し、固有の ATPase とともに輸送活性の中心的役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The bacterial pathogen *Legionella pneumophila* delivers a large array of the effector proteins into infected host cells using the type IVB secretion system. Among the proteins composing the system, inner membrane proteins DotI and DotJ form a hetero subcomplex that is anticipated to work as a transport channel of the IVB secretion system. We solved the crystal structure of the periplasmic domain of DotI and conducted functional analyses using the structural information. Bacterial localization analyses suggested that the DotI/DotJ complex can associate with the core complex of the type IVB secretion system on demand. In addition, we identified a bacterial ATPase that associates with the DotI/DotJ complex and is essential for the secretion function. These findings support our hypothesis that the DotI/DotJ complex plays a role crucial for the IVB secretion utilizing the ATP energy.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 タンパク質複合体 感染症 分泌系 レジオネラ 病原性

1. 研究開始当初の背景

病原細菌レジオネラは、その細胞表層に IVB 型に分類されるタンパク質分泌系を持ち、これを使って感染の鍵となる病原因子群を宿主細胞に直接輸送する。IV 型分泌系は、細菌の接合伝達系を進化的な起源とする点に他の分泌系とは異なる特徴があり、固有のメカニズムによって基質を輸送すると考えられる。我々は、レジオネラの Dot/Icm 遺伝子群にコードされた IVB 型分泌系の中で、特に細菌の内膜及びペリプラズムに局在し輸送機能に重要な役割を果たすと考えられる二つのタンパク質 DotI、DotJ に着目し研究を進めてきた。これらはいずれも欠損すると輸送機能が完全に無くなるため、IV 型分泌に不可欠の構成タンパク質であるが、安定な中核複合体には含まれないことを我々はすでに見出していた。DotI 及び DotJ はいずれも内膜貫通ドメインを持ち、互いに高い相同性を持つことから、遺伝子重複によって獲得されたと考えられる。また、DotI と DotJ は複合体を形成することを予備実験から見出しており、この複合体が IV 型分泌の基質輸送チャネルであると仮定して研究を展開してきた。

我々は平成 25 年度までに DotI ペリプラズムドメインの結晶化に成功しており、結晶から得られた構造情報をベースに DotI 及び DotJ の果たす役割を明らかにし、この複合体が輸送チャネルとして働くことを示したいと考えていた。

2. 研究の目的

DotI/DotJ 複合体の構造を分子あるいは原子のレベルで明らかにし、構造的知見と機能解析及び複合体の生化学的解析を組み合わせることにより、この複合体の果たす役割を明らかにする。また、この部分複合体がレジオネラ Dot/Icm IVB 型分泌系の中核(コア)複合体や他の構成タンパク質とどのように相互作用して機能を果たすかについての知見を得、分泌系全体の構造形成や機能における部分複合体の意義を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) DotI/DotJ 複合体の生化学的解析

大腸菌での共発現系を用いて、またレジオネラから DotI/DotJ 複合体を生化学的に単離し、分子組成を明らかにした。複合体の分子量やタンパク質のモル比を決定し、機能単位としての複合体の組成からその機能を推測した。また、大腸菌発現系で得られる複合体がネイティブなレジオネラでの複合体と同一の分子組成

であることを保証した。

(2) 構造情報をベースにした機能解析

DotI ペリプラズムドメインの結晶構造情報から多量体の形成に関わると考えられるアミノ酸残基に部位特異的置換変異を導入し、レジオネラでの複合体形成や基質分泌能を解析した。レジオネラ IV 型分泌系の輸送基質として同定されている DotA タンパク質の分泌を指標として評価を行った。

(3) DotI の細菌細胞内での局在解析

DotI/DotJ 複合体が IVB 型分泌系コア複合体とどのように相互作用して機能するかを調べるために、細菌細胞内での局在を蛍光顕微鏡法で解析し、コア複合体構成タンパク質との比較を行った。

(4) DotI/DotJ 複合体の結晶化

結晶化を目的として、大腸菌発現系を用いて膜透過部分を含んだ DotI/DotJ の安定複合体を大量精製することを試みた。

(5) DotI/DotJ 複合体に相互作用するレジオネラ IV 型分泌系構成タンパク質の同定と生化学的解析

Dot/Icm IVB 型分泌系構成タンパク質間で、相互作用に伴うタンパク質レベルの増強が見出されていることから、DotI の欠損変異株における他の構成タンパク質レベルの変動を解析し、DotI/J 複合体に相互作用するタンパク質候補を見出した。生化学的解析によりこのタンパク質が実際に DotI/J 複合体と相互作用しているかどうかを検証した。さらに同定タンパク質を含んだ部分複合体の発現及び精製を試みた。

4. 研究成果

(1) レジオネラ DotI、DotJ 欠損株、及びそれらの相補株を用いた生化学的解析により、DotI と DotJ は相互依存的に安定複合体を形成することが明らかとなった。大腸菌での共発現系を用い、安定な複合体を高純度で単離することに成功した。ブルーネイティブ電気泳動法などにより、得られた複合体はレジオネラから単離したネイティブな DotI/DotJ 複合体と同一の分子組成を持つことが示

された。さらに、複合体の光散乱法による解析から、DotI と DotJ の分子比は 2:1 であることが明らかとなり、レジオネラ IVB 型分泌系の中で DotI 4 分子と DotJ 2 分子が複合体を形成していることがわかった。DotI ペリプラズムドメインの結晶が多量体リング状構造であったことと考え合わせると DotI/DotJ はヘテロ 6 量体リング構造を形成する可能性が示唆された。

- (2) すでに得られている DotI ペリプラズムドメインの結晶構造情報から DotI/DotJ 複合体の多量体形成に関わる可能性のあるアミノ酸残基に部位特異的置換変異を導入し、輸送基質である DotA の分泌をモニターすることで輸送機能に重要なアミノ酸残基の構造上の位置を同定することができた。これらの残基の位置を構造ホモログである VirB8 と比較し、構造上近い位置に重要残基が集約していることがわかった。

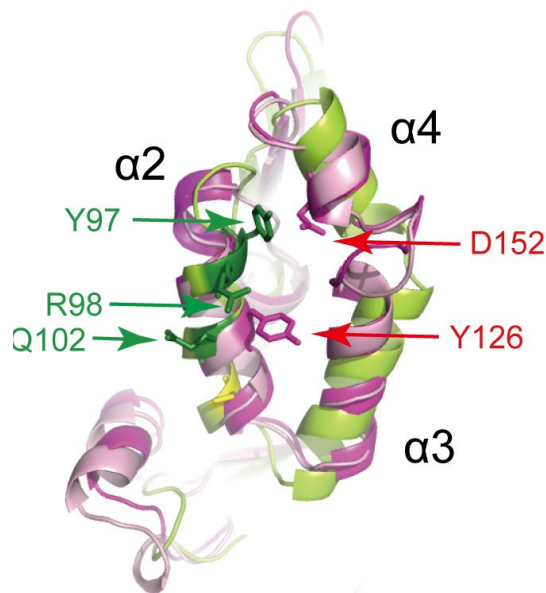


図1 DotI (緑) に導入した変異の中で IVB 型分泌系の輸送活性を強く阻害したアミノ酸残基の位置を示す。アラインした構造ホモログである *Brucella suis* の VirB8 (赤) の機能的に重要な残基の存在する部位との一致が認められた。

- (3) Dot/Icm IVB 型分泌系コア複合体の構成タンパク質である DotG 及び DotF とともに DotI の細菌細胞内局在を蛍光顕微鏡法で解析したところ、DotG や DotF が細菌の両局に検出されたのに対し、DotI は局だけに限定されない局在を示した。このことから、DotI/DotJ 複合体は感染の場においてオンデマンドにコア複合体と相互作用して輸送機能を実現する可能性が示唆された。

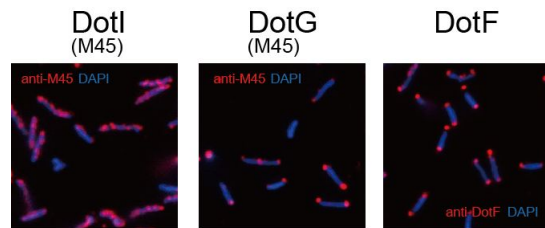


図2 エピトープタグによる免疫蛍光顕微鏡法によって検出された DotI とコア複合体の構成タンパク質 DotG 及び DotF の細菌細胞内局在の相違を示す。

- (4) 結晶化による詳細な構造解析を目的として DotI/DotJ 複合体を大腸菌大量発現系を用いて精製することを試みた。早い段階で複合体の単離には成功したものの、結晶化に十分と考えられる量と質の試料を得ることはできなかったため、結晶化には進められなかった。
- (5) DotI/DotJ 複合体に相互作用するタンパク質を Dot/Icm IVB 型分泌系を構成する 20 あまりのタンパク質の中から網羅的に探索し、輸送機能に必須なひとつの ATPase 活性を持つと予測されているタンパク質を見出した。プルダウン法などにより結合を検証し、また、ショ糖密度勾配遠心法による細胞分画で DotI/DotJ 複合体と共存する局在を示すことを確認した。さらに DotI, DotJ, とこの ATPase の 3 つのタンパク質を共発現する系を大腸菌で構築した。ATPase はタンパク質輸送のエネルギー源となり得ることが知られているため、DotI/DotJ 複合体は ATPase とともに輸送機能の中心的働きを担うことが示唆された。

以上の結果を統合し、レジオネラ Dot/Icm IVB 型分泌系の内膜部分複合体として輸送機能に重要な役割を担う DotI/DotJ 複合体を同定することに成功し、結晶化による構造

解析及び多角的な生化学的解析からその役割や輸送系全体の構築機構について大きな知見を与えることができたと考える。

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 3 件)

Kubori T. Life with bacterial secretion systems. *PLoS Pathog.* In press. (2016)
10.1371/journal.ppat.1005562

査読有

Kubori T and Nagai H. The type IVB secretion system: an enigmatic chimera. *Curr Opin Microbiol.* **29**:22-9 (2016) doi: 10.1016/j.mib.2015.10.001. Epub 2015 Oct 31. 査読有

Kuroda T, Kubori T, Bui TX, Hyakutake A, Uchida Y, Imada K and Nagai H. Molecular and structural analysis of *Legionella* DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. *Sci Rep.* **5**:10192 (2015) doi:10.1038/srep 10912.

査読有

[学会発表](計 14 件)

Kubori T, Bui XT, Hubber A and Nagai H. Manipulation of the host ubiquitin system by *Legionella* Deubiquitinases. 第 89 回日本細菌学会総会 2016 年 3 月 23 日 大阪国際交流センター(大阪府、大阪市)

久堀智子 病原性 IV 型分泌マシナリーの全構造解析 生体運動合同班会議 2016 年 1 月 10 日 キャンパスプラザ 京都 (京都府、京都市)

Kubori T, Bui XT, Hubber A and Nagai H. *Legionella* RavZ plays a role in preventing ubiquitin recruitment to bacteria-containing vacuoles. 第 14 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2015 年 9 月 9 日 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県、淡路市)

久堀智子 病原性 IV 型分泌マシナリーの全構造解析 新学術領域「運動超分子

マシナリーが織りなす調和と多様性」第 3 回領域全体会議 2015 年 6 月 11 日 金沢商工会議所(金沢県、金沢市)

久堀智子 レジオネラ IV 型分泌マシナリー内膜部分複合体の構造解析 新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第 3 回領域全体会議 2015 年 6 月 11 日 金沢商工会議所(金沢県、金沢市)

久堀智子、永井宏樹 レジオネラ IV 型分泌マシナリーの構造解析 第 12 回 21 世紀大腸菌研究会 2015 年 6 月 5 日 琵琶湖グランドホテル・京近江(滋賀県、大津市)

Kubori T, Bui XT, Hubber A and Nagai H. *Legionella* RavZ plays a role in preventing ubiquitin recruitment to bacteria-containing vacuoles. 第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 28 日 長良川国際会議場(岐阜県、岐阜市)

Kubori T, Koike M, Bui XT, Higaki S, Aizawa S and Nagai H. Native structure of a type IV secretion system core complex essential for pathogenesis of *Legionella* infection. 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2014 年 9 月 24 日 奈良県新公会堂(奈良県、奈良市)

Kubori T. Bacterial effector-involved temporal regulation by hijack of the host ubiquitin pathway. International Research Training Group 1273 "Strategies of human pathogens to achieve acute and chronic infections" 2014 年 9 月 1 日 (基調講演) Timmendorfer Strand, Germany

Kubori T and Nagai H. 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 タワーホール船橋(東京都、江戸川区)

Kubori T. Native structure of a type IV secretion system core complex essential for pathogenesis of *Legionella* infection. 第 19 回べん毛交流会(国際会議) 2014 年 3 月 2 日 県立広島大学サテライトキャンパス(広島県民文化センター)(広島県、広島市)

Kubori T, Kuroda T, Bui XT, Uchida Y, Imada K and Nagai H. Characterization of *Legionella* DotI and DotJ subcomplex

reveals a VirB8-like structure essential for type IV secretion. The 8th International Conference on *Legionella* 2013 年 10 月 31 日 Melbourne Convention & Exhibition Center, Melbourne, Australia

Kubori T, Kuroda T, Uchida Y, Imada K and Nagai H. 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、淡路市)

Kubori T, Kuroda T, Bui XT, Uchida Y, Imada K and Nagai H. Characterization of *Legionella* DotI and DotJ subcomplex reveals a VirB8-like structure essential for type IV secretion. Gordon Research Conference "Microbial Adhesion & Signal Transduction" 2013 年 7 月 21 日 Salve Regina University, Newport, RI, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
Nagai Lab
<http://nagai lab.biken.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久堀智子 (KUBORI, Tomoko)

大阪大学・微生物病研究所・特任講師(常勤)

研究者番号：20397657

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

今田勝巳 (IMADA, Katsumi)

大阪大学・理学部・教授

研究者番号：40346143

小池雅文 (Koike, Masafumi)

(平成 25 年度まで)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：50639979