

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：32606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893230

研究課題名(和文)バクテロイデスがもつ滑走・分泌装置の3次元ダイナミクス

研究課題名(英文)3D dynamic imaging of gliding-secretion apparatus in Bacteroidetes

研究代表者

中根 大介 (Nakane, Daisuke)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：40708997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：バクテロイデテス門に属する細菌 *Flavobacterium johnsoniae* は固形物表面上を滑走する。この動きにはべん毛線毛といった既知の運動装置とは全く異なる。興味深いことに、歯周病原細菌などの病原因子の分泌システムとも深く結びついており、これらの細菌によって引き起こされる感染症の予防や治療につながる可能性を秘めている。本研究では1.表面タンパク質が左巻きらせんのループに沿って外膜上を動き回ること、2.表面タンパク質が固形物表面との接着力を変えること、を明らかにし、これは戦車の走行装置である『無限軌道』とよく似た運動の仕組みをもつことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cells of *Flavobacterium johnsoniae* crawl rapidly over surfaces in a process called gliding motility. These cells do not have flagella or pili but instead rely on a novel motility machine composed of proteins that are unique to the phylum Bacteroidetes. The motility adhesins SprB and RemA are propelled along helical paths on the cell surface by the still poorly-defined gliding motor. Interaction of these adhesins with a surface results in rotation and translocation of the cell. SprB and RemA are delivered to the cell surface by the type IX secretion system (T9SS). T9SSs are confined to but common in the phylum Bacteroidetes. Transmembrane components of the T9SS may perform roles in both secretion and gliding motility.

研究分野：基礎細菌学

キーワード：バクテリア 滑走運動 分泌装置 らせん 光学顕微鏡 無限軌道

1. 研究開始当初の背景

バクテロイデス属細菌は、細菌の一大グループであり、海中・土壌・体内など、様々な環境に広く分布している。これらの多くは、ガラスや寒天などの表面上を動く能力をもち、滑走運動と呼ばれている (Jarrell & McBride. Nat Rev Microbiol. 2008)。その速さは、バクテリアの表面運動の中でも「最速」であり、最大で毎秒 5 μm に達するものもある。この運動様式は複雑で、前後に動くだけでなく、反転したり、回転したり、まるでストリートダンサーのようにも振舞うことさえできる (Fig. 1)。しかし、これらのバクテリアは、べん毛、線毛などの運動装置をもちておらず、ゲノム上にも既知の生体運動に関連する遺伝子は見つかっていないため、ユニークな運動メカニズムであると言える。これらのタンパク質群は、遺伝学的なアプローチで同定されてき

ているが、ほとんどが機能未知であるため、形や動きに関する情報は乏しく、十分な理解は得られていない。研究代表者は、このメカニズムの全容解明を目指す。



Fig. 1. バクテロイデス細菌のユニークな運動。(Aizawa. ASM News 2005 より、一部改変)

病原因子分泌にも働く、ハイブリッドな装置 これまでに、土壌中のキチン分解菌として知られる運動性のバクテロイデス *Flavobacterium johnsoniae* を用いて、滑走運動に必須である約 10 の機能未知遺伝子群が同定されてきてい研究目的 (つづき)

る (McBride and Zhu. J.Bac 2013)。興味深いことに、それらのオルソログは、非運動性のバクテロイデスであり、ヒトの歯周病原細菌として知られる *Porphyromonas gingivalis* にも保存されており、ジンジパインと呼ばれる病原性プロテアーゼの分泌に必須の遺伝子であった (Sato, et.al. PNAS. 2010)。つまり、バクテロイデス属には、滑走運動だけでなく病原因子などのタンパク質分泌にもはたらく特殊な装置が存在すると考えられる (Fig. 2)。

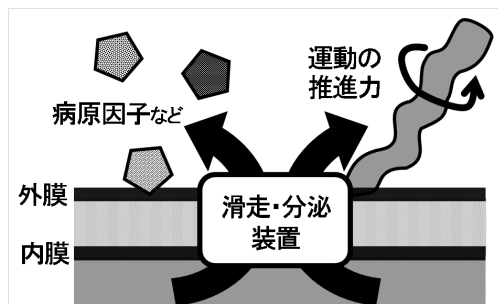


Fig. 2. バクテロイデス属には、運動にも病原因子分泌にもはたらく特殊な装置が存在する。

一般的に、バクテリアの『分泌と運動』とはかかわりが深く、プロテオバクテリアに属する病原細菌では研究が進んでいる (Craig and Li. Curr Opin Struct Biol. 2008)。たとえば、腸管出血性大腸菌 O157 に代表される病原細菌の有する III 型分泌装置と、運動装置であるべん毛が起源を同一にする良く似た構造をもつことが知られている (Kubori, et.al. Science. 1998)、プロテオバクテリアとは系統的に遠く離れたバクテロイデス属の滑走・分泌装置もよく似た関係にあるのかもしれない。つまり、このメカニズムの全容解明は、ユニークな分子機械の作動原理を明らかにするだけでなく、バクテロイデス細菌が独自に進化させてきた病原因子分泌システムを理解することにもつながる。たとえば、40 歳代以上の日本人の約半数が罹患している慢性歯周炎の重要な病原菌である *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* にこの分泌システムが存在しており、また、犬・猫の咬傷からヒトに感染する高死亡率の感染症の病原菌 *Capnocytophaga canimorsus* やアユ冷水病を引き起こす *Flavobacterium psychrophilum* にも存在することがゲノム情報から明らかであり、これらの病原菌の武装解除に資する戦略においてそれらがもつ潜在的な波及効果は非常に高い。

2. 研究の目的

バクテロイデス属に含まれる多くの細菌は、ガラスや寒天などの固体表面を滑るように動く、滑走運動をおこなうが、そのメカニズムは不明である。この滑走運動にかかわるタンパク質群は、バクテロイデスが引き起こす様々な感染症と深く結びついている。たとえば、バクテロイデス属に含まれる歯周病原細菌やアユ冷水病原細菌などの病原細菌にも滑走運動関連遺伝子群が存在し、病原性プロテアーゼの分泌に関わる。つまり、滑走運動だけでなく、タンパク質分泌にもはたらく特殊な装置が、バクテロイデス属には広く保存されている。この滑走・分泌装置の全容を解明することは、ユニークな分子機械の仕組みを理解するだけでなく、この装置を有する病原細菌によって引き起こされる感染症の予防や治療につながる可能性を秘めている。研究代表者は、この滑走・分泌装置のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

研究の軸となるのは、『ベルトコンベアー』のようにふるまうタンパク質である。このタ

ンパク質, SprB は, 滑走運動に接着因子としてかわる巨大外膜タンパク質である. このタンパク質を蛍光色素で特異的に標識すると, 細菌の菌体表面を高速で動き回っていることが, すでに申請者による予備実験より明らかになっている. この現象が, メカニズム解明の鍵を握ると考え, 以下の研究を提案する. タンパク質を3次元的にナノオーダーで追跡できる蛍光顕微鏡システムを整備する. これまで蓄積してきた, 遺伝学的リソースを活用し, 他の構成タンパク質すべての動きを可視化し, 装置の全体像をつかみ, 時空間的な制御メカニズムを明らかにする. バクテロイデスの滑走・分泌装置に関する研究は, 本研究の研究協力者のウイスコンシン大学 Mark McBride 教授らによって, 運動性のバクテロイデス, *Flavobacterium johnsoniae* を用いて, 主に遺伝学を中心に展開してきており (McBride, Annu Rev Microbiol. 2001), 滑走運動に欠損がある変異体の分離・解析により, 十数種類の滑走関連遺伝子が同定されている. しかし, 滑走・分泌装置の動作原理の全容を解明するために必要である, 滑走・分泌装置の構造や動きを見る研究は, ほとんどなされていない. そこで, 本研究では, 特に外膜上でのタンパク質のダイナミクスに焦点を当てて, 研究を進める. 本研究で注目する滑走・分泌装置はどのように動き, 機能しているのか, 独自の光学顕微鏡を用いた可視化技術により, メカニズムの本質を明らかにする. 研究対象は, *F. johnsoniae* をもちいる. この種は, 遺伝学的なリソースが整っており, 好気性で培養も簡単であり, 研究を効率的に進めることができる.

4. 研究成果

滑走・分泌装置は, バクテリアの膜表面で, どのように動き, 機能しているのだろうか? 一般に, バクテリアの運動やタンパク質輸送に関する装置は膜近傍に存在することが知られている. しかし, それらが3次元的にどのように動き, 機能するのか, ナノオーダーでの微小な動きが検出された例はほとんどない. 本研究では, 3次元の位置を検出できる顕微鏡をもちいて, バクテロイデス属がもつ滑走・分泌装置の挙動を『生きたまま』, リアルタイムで可視化する. 最終的には, 装置を構成する全てのタンパク質を可視化することで, それらの時空間的な制御メカニズムを明らかにした.

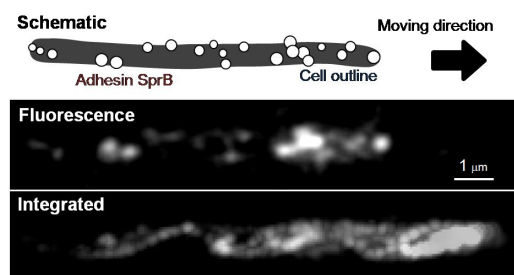


Fig. 3. 接着タンパク質のドット状シグナル(上段・中段). 2秒間のシグナルの動きを重ね合わせたもの(下段).

この運動にはバクテロイデス・フィラムに特有の遺伝子群が関わっている. 約 20 遺伝子が同定されており, 複数のタンパク質が膜周辺に局在し, 機能している. 興味深いことに, それらの遺伝子群の類似遺伝子は歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* では病原プロテアーゼの分泌にも関わっている. このことは, べん毛と Type III 分泌装置の関係のように, 滑走運動とタンパク質分泌をつなぐような新しい装置がバクテロイデス細菌に存在することを示唆する. 高い運動活性を持つことで知られる *Flavobacterium johnsoniae* は, 約 2 $\mu\text{m}/\text{s}$ の速さでガラス表面上を動く. 運動に関連する外膜タンパク質 (SprB) に, ビーズをくっつけると, 膜に沿って, 約 2 $\mu\text{m}/\text{s}$ の速さでビーズが動くことがわかっている. SprB は, 700 kDa の巨大タンパク質で, そのアミノ酸配列や局在から, 滑走時には Adhesin として機能すると考えられている. しかし, このビーズの動きが, SprB タンパク質の直接的な動きによるものかどうかは, わからなかった. そこで, この外膜タンパク質を, 直接蛍光標識し, そのダイナミクスを詳しく調べた. 運動時の SprB の挙動を直接可視化するために, SprB を抗体で標識した. 化学固定した菌に対して, 免疫蛍光法をおこなうと, SprB は, 菌体表面に 20-30 個のシグナルとして検出できた. このシグナルが, 膜上を動いているのか, 確かめるために, 化学固定せずに, 免疫蛍光法をおこなった. ガラス上で運動をしている菌に対して, 抗体を添加すると, 濃度依存的に, ガラスへの結合能, 運動能が, 阻害された. つまり, SprB タンパク質は, 滑走運動に直接関与する, 外膜タンパク質であるといえる. 抗体の濃度を 100 倍希釈して使用したとき, 結合・運動能が約 60% 残っており, SprB の局在にも影響が見られなかった. このとき, 興味深いことに, シグナルは膜に添って, 菌体のまわりを動きまわっていた. このタンパク質の動きと, 滑走運動の関わりを調べるために, 菌体に阻害剤を加えて, 滑走運動を止めてみた. バクテリアの運動のエネルギー源は, 一般的に ATP がプロトン駆動力 (PMF) である. PMF の阻害薬である CCCP を添加すると, 3 秒以内にタンパク質の動きが停止し, 菌体も動かなくなった. この効果は可逆的で, CCCP を除くと, 6 秒以内にタンパク質の動きが再開し, 菌体も動き始めた. このような効果は, 他の阻害剤では観察することが出来なかった. つまり, SprB の動きは, PMF に依存的で, 滑走運動に必要な不可欠であると考えられる (Fig. 3). SprB のシグナルは, 菌体の長軸方向には並進運動しているように見えた. この菌は, 細く,

500 nm 程度の厚みしかないので、ガラスに近い面も遠い面も、両側が見えている。そこで、まっすぐに運動している菌を選び、バクテリアの進行方向をプラスとして、SprB の長軸方向の動きの速さを測定した。ヒストグラムをとると、2 つのピークがあり、それぞれ、 $\sim 3.4 \pm 1.1 \mu\text{m/s}$ と、 $\sim 0.5 \pm 0.5 \mu\text{m/s}$ で、およそ同じ割合を占めていた。つまり、半分の SprB は末端に向かってゆっくりと動き、半分の SprB は先端に向かって速く動いている。これは、SprB はガラスに対して、強く結合するとき、弱く結合するときの、2 つの状態をもっていることを意味する。バクテリアが直線的に運動しているときの速さ $\sim 1.9 \pm 0.6 \mu\text{m/s}$ を考慮すると、膜の上では、2 方向のシグナルはどちらも、ほぼ $2 \mu\text{m/s}$ の速さで流れていることになる。さらに、極では先端から末端へ、または末端から先端へ、SprB の移動方向が切り替わっていた。これらを総合すると、SprB は、長軸方向には一定の速さで膜上を並進運動し、極ではその方向を変えることが示唆された。SprB のシグナルの軌跡を描くと、ジグザグした、波のような運動をとっていた。菌体上半分と下半分に位置する SprB をそれぞれ青色と赤色に色分けし、キモグラフをつくった。すると、それぞれの軌跡は赤色から青色へ、さらに赤色へと変化した。つまり、SprB は長軸方向に並進運動する際、短軸方向には、片方の側面からもう一方の側面に移動している。それを詳しく調べるために、全反射照明顕微鏡を用いて、菌体のガラスに近い面のみを可視化した。並進運動の際、SprB は、菌体の側面から、もう一方の側面に向かって、左方向にのみ進んでおり、右方向には進んでいなかった。つまり、SprB は左巻きの閉じたループに沿って、膜上を移動していた。菌体の表面には、フィラメント状の構造があることが、クライオ電子顕微鏡によって明らかになっている。この構造が SprB からなるかどうかを調べるために、電子顕微鏡で構造観察をおこなった。SprB 欠損株で、菌体の表面構造を観察すると、フィラメント構造がなくなっていた。さらに直接的に示すために、SprB を *F. johnsoniae* 細胞から単離した。2 つの界面活性剤と、塩析によって、SprB が豊富な画分を得ることが出来た。この画分を観察すると、150 nm の長さのまっすぐなフィラメント状構造が見つかった。SprB に対する抗体は、特異的にこの構造に結合し、他の抗体だと結合しなかった。つまり、SprB は外膜から突き出た、150 nm の長さのフィラメント状タンパク質であることがわかった。これらを総合すると、以下のようなモデルが考えられる。150 nm の長さのフィラメント状タンパク質、SprB は、プロトン駆動力をエネルギー源として、菌体表面を極から極へ、左巻きのらせんに沿ってループ状に動く。SprB が床と接着することにより、菌体の長軸方向への並進運動が生じる。

以上のように滑走運動のメカニズムに関しては解明されつつある。これは顕微鏡による可視化技術の発展、分子生物学的な変異体・抗体リソースの充実、数学的なモデル構築、それぞれが融合することで、学際的な研究が展開したことによる。滑走運動は分泌装置とよく似た進化的起源をもつと考えられているので、得られた成果はタンパク質の分泌メカニズムを明らかにするうえでも重要な成果といえる。

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 7件)

1. 中根大介、中山浩次、西坂崇之(学習院大・理). バクテリア滑走運動の新しいメカニズム ~戦車のような仕組みで動くバクテリア~ . 生物と化学 査読有 53, 215-216. (2015)
2. 久留島潤、中根大介、西坂崇之、富田治芳*(群馬大・医). Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala2-crossbridged peptidoglycan. Journal of Bacteriology 査読有 197, 286-295. (2015) 関連する図が表紙として採用された
3. 成田由香、中山浩次(長崎大・医歯薬)、他 7 名 中根大介 5 番目 Lack of a surface layer in *Tannerella forsythia* mutants deficient in the type IX secretion system. Microbiology, 査読有 160, 2295-303. (2014)
4. 中根大介、中山浩次、西坂崇之(学習院大・理). 戦車のような仕組みで動くバクテリア . 生物物理 査読有 54, 269-270. (2014)
5. 木下佳昭 1、中根大介 1、政池知子、水谷佳奈、宮田真人*、西坂崇之* . Unitary step of gliding machinery in *Mycoplasma mobile*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有 111, 8601-06. (2014) 1Equally contributed 産経新聞で報道 .
6. 和田浩史、中根大介、Hsuan-Yi Chen . Physical basis for the emergence of motility driven by cell-surface flow. Physical Review Letters 査読有 111, 248102. (2013)
7. 中根大介、佐藤啓子、和田浩史、Mark. J. McBride、中山浩次(長崎大・歯). Helical Flow of surface protein required for bacterial gliding motility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有 110, 11145-50. (2013)

[学会発表](計 5件)

1. 中根大介(招待講演) IX 型分泌装置を可視化する 第 88 回日本細菌学会総会

岐阜

2. 中根大介(招待講演) 原核生物の体の動かしか方 環境微生物系学会合同大会 2014 浜松
8. 中根大介(招待講演) 戦車のような仕組みで動くバクテリア 日本農芸化学会 2014年度大会 東京 (2014年03月)
13. 中根大介(招待講演) Bacterium moves like a tank. 第51回 日本生物物理学会年会 京都
14. 中根大介(招待講演) べん毛でもモータータンパク質でもないバクテリアの運動の仕組み 第3回 分子モーター討論会 東京

〔図書〕(計 1件)

1. 宮田真人(大阪市大・理), 中根大介. Gliding mechanism of the *Mycoplasma pneumoniae* subgroup – implications from studies on *Mycoplasma mobile*. Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis –Chapter 12, Horizon Press 査読有 237-253. (2014)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中根大介 (NAKANE, Daisuke)

学習院大学・理学部物理学科 助教

研究者番号：40708997

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし