

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860289

研究課題名(和文) III型分泌装置の病原因子分泌機構の解明

研究課題名(英文) Structural analysis of type III secretion system in the immune cells

研究代表者

川本 晃大 (KAWAMOTO, Akihiro)

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員

研究者番号：90631523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラチフス菌は、Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2)にコードされている、III型分泌装置を用いてエフェクター分子を免疫細胞に送り込み、細胞内で増殖する性質を持つ。しかし、SPI-2 III型分泌装置の構造・分子機構は明らかになっていない。本研究では、病原因子分泌機構を明らかにする目的で食食回避時のSPI-2 III型分泌装置の構造解析を試みた。残念ながら、食食回避時のSPI-2 III型分泌装置の構造を明らかにすることはできなかったが、ネズミチフス菌ミニセル内に蛍光タンパク質EGFPを発現させ、感染時のサルモネラの局在位置を認識できる系を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：In human, infection by Salmonella enterica serovar Typhi (S. Typhi) usually causes typhoid fever. S. Typhi uses the type III secretion system (T3SS) encoded by Salmonella pathogenicity islands 2 (SPI-2) to deliver virulence effector proteins into immune cells such as dendritic cell and macrophage, thereby being able to survive and grow within host cells. However, the structure and secretion mechanism of SPI-2 T3SS are still unknown. In this study, we tried structural analysis of in situ SPI-2 T3SS in the immune cell. Unfortunately, we could not identify the structure of SPI-2 T3SS in the immune cell, but we were able to construct Salmonella mini-cell expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) to identify the localization of Salmonella mini-cell in the immune cells. Salmonella mini-cell with EGFP will enable the application of correlative light and electron microscopy (CLEM) to identify the structure of SPI-2 T3SS in the immune cell.

研究分野：医歯薬学

キーワード：III型分泌装置 サルモネラ 電子顕微鏡 電子線トモグラフィー

1. 研究開始当初の背景

サルモネラや赤痢菌などの病原性細菌は、型分泌装置を用いて病原因子を直接、標的となる宿主細胞に送り込み、その膜骨格の形態を制御して細胞内に侵入し増殖することで感染症を引き起こす。そのため、病原性細菌の病原因子分泌メカニズムを解明することは病原性細菌の感染を防ぐ上で重要である。

サルモネラは細胞侵入に関わる型分泌装置を染色体上の *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) と呼ばれる領域にコードしているが、SPI-1 とは別の SPI-2 領域にもう一つの型分泌装置をコードしている。SPI-2 にコードされている型分泌装置は、マクロファージなどの免疫細胞に取り込まれた後に発現し、病原因子を標的となる免疫細胞に送り込むことで貪食作用を回避して増殖する性質を持つことが知られている。また、SPI-2

型分泌装置の遺伝子発現制御には SPI 内外の遺伝因子や環境の急激な変化によって生じる細菌のストレスタンパク質が深く関与していることが明らかになっている。しかし、貪食回避機構の本質に関わる SPI-2 型分泌装置の構造や機能に関する知見は乏しく、SPI-2 型分泌装置の病原因子分泌機構はほとんど分かっていない。

これまで、数々の研究グループが SPI-2 型分泌装置の単離精製および構造解析を試みているが、成功例の報告はまだされていない。これは元々の発現量の少なさと遺伝子発現制御の難しさに起因するものと考えられる。また、相同性の高い SPI-1 型分泌装置の可溶化条件でも単離精製することはできていない。そこで、SPI-2 型分泌装置を菌体から単離精製するのではなく、菌体内の構造をそのまま可視化することがよい戦略と考えた。報告者はこれまで、低温電子線トモグラフィーによる、細胞内環境下での生体分子の可視化および立体構造解析に取り組ん

できた。低温電子線トモグラフィーは、生体分子を単離精製せずに細胞内環境下で構造解析ができるため、細胞内で起こるタンパク質間の相互作用や構造変化を明らかにすることができる。しかし、細胞の厚さが 1 μm を超えてしまうと電子線が透過せず、内部構造の立体構造解析はできない。そのため、厚さが約 1 μm あるサルモネラや赤痢菌などの病原性細菌の内部構造を可視化することは困難であった。この問題を解決するため、報告者は原核細胞の細胞分裂に必須なタンパク質 FtsZ をネズミチフス菌内で過剰発現させ、細胞分裂を促進させることで厚さ 0.5 μm 以下のミニセルの作成に成功した。ネズミチフス菌ミニセルは、通常サイズのネズミチフス菌と同様にべん毛を使って泳ぐことができ、型分泌装置によって病原因子を分泌する。ミニセルの作成に成功したことにより、高画質で菌体内部の構造解析ができるようになり、その結果、SPI-1 型分泌装置のタンパク質輸送装置複合体を 4.4 nm 分解能で構造解析することに成功し、これまで単離精製が困難だった輸送装置複合体の立体構造を明らかにした。得られた構造から、タンパク質(病原因子)を効率良く輸送するために必要な ATPase 複合体が輸送装置直下から離れた位置に存在することが明らかになり、過剰な分泌を避けるために輸送を一時的に休止する機構が存在するのではないかと考えている。単離精製が困難な SPI-2 型分泌装置の構造についても、上記の系と方法を用いることで明らかにすることができれば、SPI-2 型分泌装置の病原因子分泌機構の研究が可能である。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに培ってきたミニセル作成技術と *in situ* の構造情報を得ることができる低温電子線トモグラフィーを用いて、貪食回避時の SPI-2 型分泌装置の構造解析

を目指した。SPI-2 型分泌装置の輸送装置複合体の構造および構造変化を可視化することで、病原因子分泌メカニズムの明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、マウスの骨髄などから回収した免疫細胞にネズミチフス菌ミニセルを感染させ、低温電子線トモグラフィーにより貪食回避時のSPI-2 型分泌装置の構造解析を行う。上記ですでに述べた通り、電子顕微鏡観察を行う上で重要となるのが試料(細胞)の厚さである。そこで、構造解析に適した免疫細胞の種類、培養条件、感染条件の比較検討を行う。

さらに、効率良く SPI-2 型分泌装置の構造解析を進めていくため、蛍光顕微鏡で観察した場所と同一の場所を透過型電子顕微鏡で観察することができる光-電子相関顕微鏡法を用いる。

(1) 蛍光タンパク質 EGFP を発現させた変異株の作製

免疫細胞感染時のサルモネラの局在位置を簡単に認識できる系を作製するため、ネズミチフス菌ミニセル内に蛍光タンパク質 EGFP を発現させる変異株を作製する。

(2) 構造解析に適した免疫細胞の検討

GM-CSF(顆粒球単球コロニー刺激因子)による分化誘導系を利用し、マウスの骨髄から回収した樹上細胞とマクロファージ、M-CSF(単球コロニー刺激因子)による分化誘導系を利用し、マウスの骨髄から回収したマクロファージ、そしてチオグリコレートで誘導した腹腔渗出性マクロファージ、計4種類の免疫細胞を用意し、培養条件と感染条件の比較検討を行う。

(3) 光-電子相関顕微鏡法

電子顕微鏡観察で使用するグリッド上で、免疫細胞に EGFP を発現させたネズミチフス菌ミニセルを感染させ、構造解析に適した培

養条件、感染条件の検討を行う。検討した系を用いて、蛍光顕微鏡観察および同一視野を低温電子線トモグラフィーで観察する。

4. 研究成果

(1) ネズミチフス菌ミニセル変異株の作製

以前の研究で作製したネズミチフス菌ミニセルに EGFP 遺伝子を導入し、EGFP を発現するネズミチフス菌ミニセル変異株の作製に成功した。ネズミチフス菌ミニセルは、通常の菌体の大きさよりも半分以下になるため、EGFP の蛍光強度の低下が懸念されたが、免疫細胞感染時の細胞内でも局在位置が確認できるほどの蛍光強度を有していることが確認できた。

(2) 培養条件および感染条件の検討

作製したネズミチフス菌ミニセル変異株を4種類の免疫細胞に添加し、1時間後に蛍光顕微鏡観察を行った。4種類の免疫細胞のうち、GM-CSFによる分化誘導系を利用したマクロファージとチオグリコレートで誘導した腹腔渗出性マクロファージが、ガラス表面に接着し細胞先端部分の厚さが非常に薄くなっていることが観察された。さらにGM-CSFによる分化誘導系を利用したマクロファージ内に感染したネズミチフス菌ミニセル変異株が観察された(図1)。

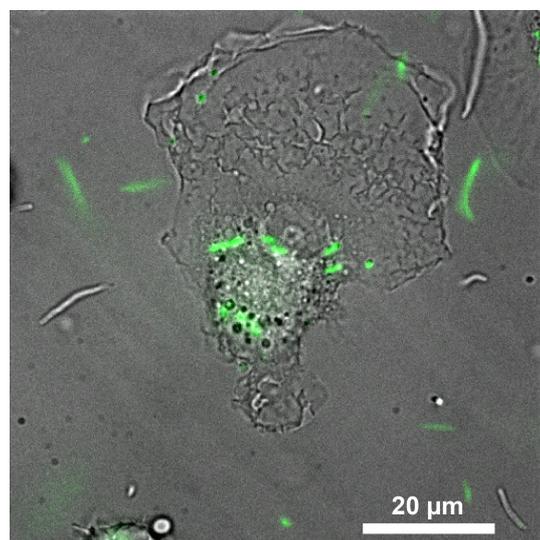


図1. マクロファージ内に感染したネズミチフス菌ミニセル変異株

次に、GM-CSF による分化誘導系を利用したマクロファージにネズミチフス菌ミニセル変異株を添加後、培養時間を長くして感染率の変化を評価した。培養時間を長くすることで感染率の上昇を期待したが、感染率は上がらず、また感染したネズミチフス菌ミニセル変異株が細胞先端よりも中心部分に局在している割合が高くなり、電子顕微鏡観察が困難であることが示された。上記の結果から、ネズミチフス菌ミニセル変異株を添加後、1時間以内に顕微鏡観察する条件が最も効率の良い感染条件であることが示された。しかし、効率よく電子顕微鏡を行うためには、さらに感染率の高い観察条件が必要になる。そこで、マクロファージを数時間培養後、ネズミチフス菌ミニセル変異株を添加し、感染率の評価を行った。事前に培養することで細胞先端部分が広がり、感染率の上昇が見られた。しかし、培養時間を長くすることで細胞同士が重なるもしくは密集してしまい、細胞先端部分の厚さが厚くなってしまった。そのため、マクロファージの濃度に応じて、2~6時間事前培養する条件が最も効率の良い感染条件であることが示された。

(3) 光-電子相関顕微鏡法での観察

電子顕微鏡観察で使用するグリッド上で、上記で検討した感染条件で培養した後、試料を急速凍結し光-電子相関顕微鏡法を用いて細胞先端に局在しているネズミチフス菌ミニセル変異株の観察を行った。しかしながら、急速凍結した試料の温度を維持したまま、高倍率で蛍光顕微鏡観察することができず、感染部位を同定することができなかった。また、低温電子線トモグラフィーを用いて細胞先端で感染しているネズミチフス菌ミニセル変異株の撮影を行ったが、予想以上に試料が厚く、菌体内に存在する SPI-2 型分泌装置の構造を明らかにすることはできなかった。今後の課題として、感染状態のネズミチフス菌ミニセルの観察を行うために更なる培養

条件および感染条件の検討が必要であるとともに、高倍率の蛍光顕微鏡観察が行えるよう、光-電子相関顕微鏡法の装置開発が必要である。

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)

Kawamoto A, Matsuo L, Yamamoto H, Namba K, Miyata M. Periodicity in attachment organelle revealed by electron cryotomography suggests conformational changes in gliding mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. mBio. 2016 7(2):e00243-16. doi:10.1128/mbio.00243-16. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 川本晃大 MS リングの対称性は本当に26回なのか? 2015年度べん毛研究交流会 2016.03.06 滝の湯(山形県)
- (2) 川本晃大, 森本雄祐, 加藤貴之, 難波啓一 低温電子線トモグラフィーにおける電子線直接検知型カメラの効果 第53回日本生物物理学会年会 2016.09.14 金沢大学(石川県)
- (3) Terashima H, Kawamoto A, Tatsumi C, Minamino T, Namba K, Imada K. 細菌べん毛 型分泌装置のエネルギー変換メカニズム 第53回日本生物物理学会年会 2016.09.13 金沢大学(石川県)
- (4) 川本晃大, 加藤貴之, 難波啓一 電子直接検出カメラを用いたタンパク質の構造解析 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 2015.06.10-12 金沢商工会議所会館(石川県)
- (5) 川本晃大, 宮田知子, 堀田秀磨, 稲葉敏, 森本雄祐, 西岡典子, 小嶋誠司, 加藤貴之, 本間道夫, 難波啓一 低温電子顕微鏡を用いた海洋性ピブリオ菌べん毛モーターの構造解析 第12回21世紀大腸菌研究会 2015.06.04-05 琵琶湖グランドホテル・京近江(滋賀県)
- (6) 寺島浩行, 川本晃大, 巽千夏, 南野徹, 難波啓一, 今田勝巳 反転膜小胞を用いた型分泌装置の *in vitro* タンパク質輸送測定 第12回21世紀大腸菌研究会 2015.06.04-05 琵琶湖グランドホテル・京近江(滋賀県)
- (7) 寺島浩行, 川本晃大, 巽千夏, 南野徹, 難波啓一, 今田勝巳 細菌べん毛の型分泌装置の再構築 第88回日本細菌学会総会 2015.03.26-28 長良川国際会議場(岐阜県)
- (8) Kawamoto A, Purification and structural analysis of FliF. HFSP Japan Meeting.

- 2015.02.23-25. ルスツリゾート(北海道)
- (9) Kawamoto A. *In Situ* Structures of *Salmonella* Injectisome and Flagellar Type Secretion System. IGER International Symposium on Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies. 2015.01.15-16. 名古屋大学東山キャンパス(愛知県)
- (10) 川本晃大 サルモネラニードル複合体およびべん毛型分泌装置の細胞内機能構造 次世代顕微サイエンス若手研究会 2014.11.03-04 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)
- (11) Terashima H, Kawamoto A., Minamino T, Namba K, Imada K. 細菌型分泌装置の *in vitro* 輸送再構築系の構築 第52回日本生物物理学会年会 2014.09.25-27 札幌コンベンションセンター(北海道)
- (12) 川本晃大, 森本雄祐, 宮田知子, 南野徹, Kelly T. Hughes, 加藤貴之, 難波啓一 サルモネラニードル複合体およびべん毛型分泌装置の細胞内機能構造新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第2回領域全体会議 2014.06.16-18 大雪クリスタルホール(北海道)
- (13) Kawamoto A., Morimoto YV, Miyata T, Minamino T, Hughes KT, Kato T, Namba K. *In situ* structures of *Salmonella* injectisome and flagella type secretion systems by electron cryotomography. International Biophysics Congress. 2014.08.03-07. Brisbane, Australia.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本 晃大 (KAWAMOTO, Akihiro)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任
研究員
研究者番号：90631523

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし