

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02386

研究課題名(和文)細菌III型分泌の構造動態

研究課題名(英文)Structure and dynamics of the type III secretion system

研究代表者

今田 勝巳 (Imada, Katsumi)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：40346143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,300,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌の多くは、III型分泌系を用いて病原性分子を宿主細胞へ直接送り込み、宿主の生理機能を制御することで感染する。我々はIII型分泌の分子機構を明らかにするため、べん毛III型輸送装置を対象とし、電子顕微鏡解析、結晶構造解析、AFM、反転膜小胞(IMV)を用いた機能解析によりIII型分泌の構造動態の解明を目指した。その結果、輸送ATPase複合体の構造と新規の役割、輸送シャペロンがダイナミックな構造変化により輸送を制御するしくみ、輸送ゲート形成過程の解明、輸送スイッチングが起こる新規分子機構、輸送基質どうしによる輸送制御といった、III型輸送における新たな概念、知見を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Type III secretion system (T3SS) is one of the bacterial protein transporters used to deliver virulence proteins directly into their eukaryotic host cells for infection. To elucidate the molecular mechanism of the type III secretion, we investigated the flagellar T3SS, which is used for construction of the bacterial flagellum and is the most well-studied T3SS, by X-ray crystallography, electron microscopy, atomic force microscopy and inverted membrane vesicle assay techniques. We solved the structure of the export ATPase complex and found its novel roles on T3SS export. The structure of an export chaperone was also determined and the regulation mechanism of the secretion order was revealed. In addition, we proposed novel mechanistic models on the flagellar protein export, such as the mechanism of the export substrate switching, the assembly mechanism of the export gate complex and regulation of protein export by the interaction between the export substrates.

研究分野：生物物理学

キーワード：構造生物学 生物物理 細菌 結晶構造解析 電子顕微鏡 蛋白質輸送

### 1. 研究開始当初の背景

病原細菌の多くは、III型分泌系と呼ばれるニードル状の超分子複合体を用いて感染する。この分泌系により宿主細胞内に直接輸送されたエフェクターと呼ばれる蛋白質群は、宿主細胞の生理機能をコントロールし、病態が発現する。エフェクターの輸送能を失った菌株は病原性を失うため、III型分泌系は菌の病原性のみを破壊する新たな薬剤ターゲットとして注目され、分泌メカニズムの解明が医学・農学の広い分野において待望されている。これまでに電子顕微鏡による全体構造と構成蛋白質の結晶構造を組み合わせた研究から、ペリプラズム領域を貫く分泌装置躯体部の構造が、サルモネラ SPI-1 系や赤痢菌分泌装置について明らかになっている。しかし、細胞質側で働き、分泌輸送の本質に関わる輸送 ATPase 複合体と輸送ゲート複合体の構造・機能の知見は乏しく、基質選択・輸送のエネルギー変換・膜透過のしくみは、ほとんど分かっていない。一方、細菌べん毛形成で働く蛋白質輸送装置は、形態的にもアミノ酸配列レベルでも III 型分泌装置と高い相同性を持ち、III 型分泌系に分類される。約 30 種類の蛋白質がそれぞれ数個から数万個重合してできた複雑で巨大な構造体であるべん毛を構築するため、べん毛輸送系は輸送基質を適切なタイミングで選択的に輸送する機能を持つ。べん毛研究は歴史が長いことから、III 型分泌系の中ではべん毛輸送系の研究が最も進んでいる。べん毛輸送装置の輸送ゲート複合体は FliA, FliB, FliO, FliP, FliQ, FliR の 6 種類の膜蛋白質、輸送 ATPase 複合体は FliH, FliI, FliJ の 3 種類の可溶性蛋白質で構成され、さらに輸送シャペロン蛋白質群が輸送を制御している。我々は、べん毛 III 型分泌装置蛋白質の構造・機能研究を進め、輸送に関わる分子の多くが多機能性を持ち、ダイナミックな離合集散を通じて機能することを見出した。また、スフェロプラスト化したサルモネラ菌から輸送能を保持した反転膜ベシクル(IMV)を作製し、外部条件の厳密な制御と精密な輸送測定が可能な系の構築に成功した。しかし、輸送の本質である、基質選択、エネルギー変換、膜透過のしくみの本格的な解明には、ATPase 複合体と輸送ゲート複合体の構造輸送ゲートに対して輸送 ATPase 複合体や輸送基質/輸送シャペロンが離合集散する際の構造動態を明らかにする必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究では III 型分泌の分子機構を明らかにするため、III 型分泌系で最も研究が進んでいるべん毛 III 型輸送装置を対象とし、III 型分泌の構造動態の解明を目指している。輸送シャペロン、輸送基質/シャペロン複合体、輸送 ATPase 複合体、輸送ゲート複合体蛋白質の構造とそれらの相互作用を、電子顕微鏡解析、結晶構造解析、反転膜小胞(IMV)を用いた機能解析により明らかにし、その解析結果を統

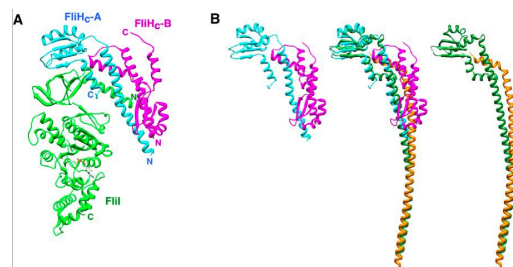
合して、III 型分泌系の構造基盤をを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

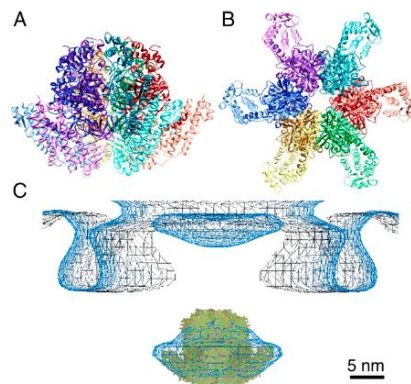
輸送シャペロン、輸送基質/シャペロン複合体、輸送 ATPase 複合体、輸送ゲート蛋白質の各構造は X 線結晶構造解析により、輸送ゲート複合体の構造は電子顕微鏡解析により解析した。また、電子線トモグラフィーにより作動状態にある輸送装置の低分解能解析に結晶構造解析結果を当てはめ、疑似原子レベル分解能のモデルを構築した。さらに、反転膜小胞による機能解析を組み合わせ、輸送 ATPase 複合体の機能、輸送シャペロンの機能、輸送基質特異性発現のしくみの解明を目指した。

### 4. 研究成果

(1) 輸送 ATPase 複合体を構成する FliH と FliI フラグメント複合体の結晶構造解析に成功した。FliH は V-ATPase の stalk と同様の構造であった。得られた結晶構造は FliH2-FliI 複合体を形成していた。結晶構造に基づき F1-ATPase の構造をテンプレートにした ATPase 複合体モデルを作成し、ミニセルから得られたクライオ電子顕微鏡像と比較したところ、両者はきれいに重なり、輸送 ATPase 複合体の向きを特定した。また、結晶構造に含まれない N 末領域がコイルドコイルを形成すると仮定すると、N 末領域の先端は C-リングと相互作用できることが示された (Imada et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2016)。



FliH-FliI 複合体の構造

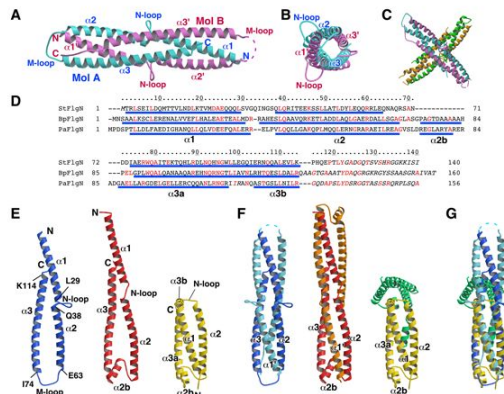


輸送 ATPase 複合体の構造モデル

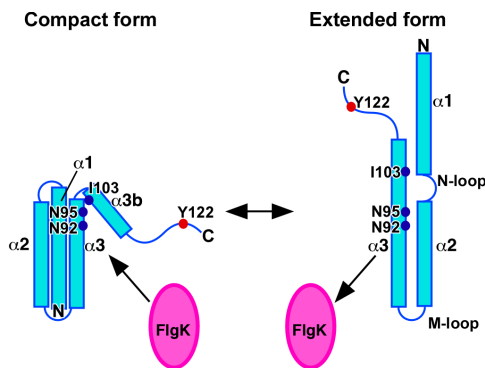
(2) 輸送シャペロンおよび輸送基質 / シャペロン複合体の構造解析

FlgNの構造と輸送基質受け渡し機構の解明

輸送シャペロンFlgNの結晶構造を解明した。3本のヘリックスのうち、alpha1とalpha2の間のループの構造変化により全体計上を大きく変えること、C末のalpha3の折れ曲がりて輸送基質、輸送装置蛋白質との親和性を大きく変え、輸送基質のゲートへの受け渡しを行うことを明らかにした (Kinoshita et al., *Mol Microbiol.*, 2016)



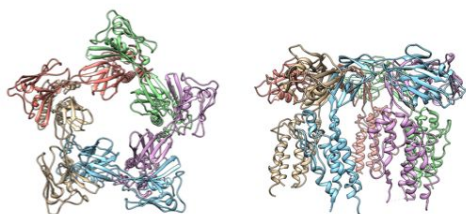
FlgNの構造比較



FlgNの構造変化により輸送基質の結合・解離を起こす様子のモデル図

FliT-FliD複合体の構造解析

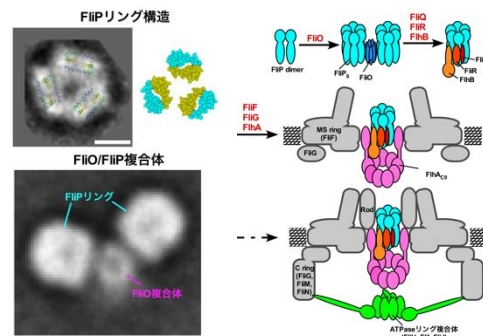
FliT-FliD複合体結晶の構造解析を行った。結晶構造にFliT部分の構造は現れなかったが、FliD 5量体の構造が明らかになった (投稿準備中)。



FliD 5量体の結晶構造

(3) FliPの構造

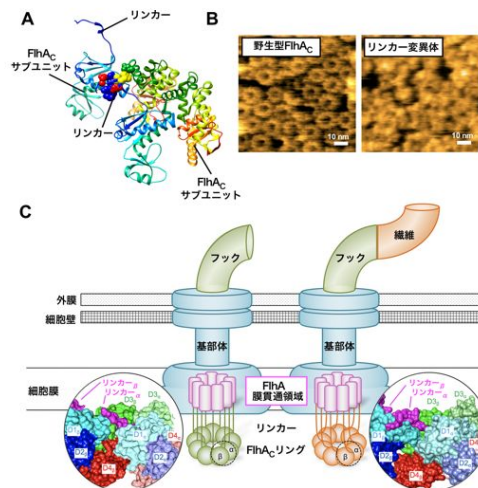
FliPのペリプラズムドメインの結晶構造を明らかにし、FliP複合体の電子顕微鏡投影像にあてはめることで、FliPが直径約10nmのdimer of trimer型のリング複合体を形成することを明らかにした。また、FliO-P複合体の電子顕微鏡解析と生化学解析より、FliOがFliP複合体形成におけるscaffoldであることを明らかにした。さらに、残りの4種類の輸送ゲートタンパク質 (FliQ, FliR, FlhB, FlhA) がFliPリングに直接結合すること、FlhAがべん毛基部のMSリングに直接結合することも明らかになった (Fukumura et al., *PLoS Biol.*, 2017)。



FliPのdimer of trimer型リング複合体構造(左上)、FliO-FliP複合体の電子顕微鏡投影像(左下)、輸送ゲート複合体形成モデル(右)。

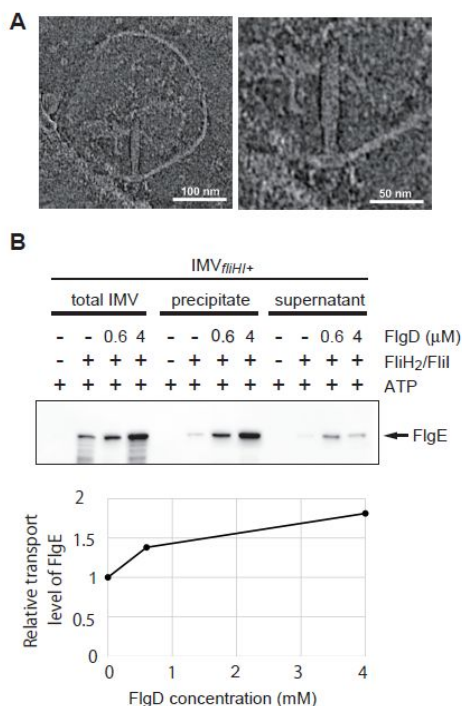
(4) FlhAリングの動的構造

FlhAの細胞質ドメインの9量体リング形成過程を高速AFMで可視化し、9量体形成がFlhAの膜貫通領域と細胞質ドメインをつなぐリンカー部分のコンフォメーション変化により調節されることが明らかになった。さらにリンカー部分の変異実験から、リンカー部によるFlhAの9量体リング構造の変化により輸送基質特異性がフック型からフィラメント型にスイッチするモデルを提出した (Terahara et al., *Sci Adv.* 2018)。



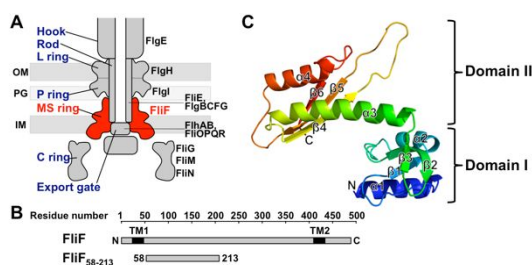
リンカーが調節するFlhAのリング形成

(5) 反転膜ベシクルを用いた実験から、ATPase 複合体によるATP加水分解エネルギーのみでも輸送が駆動すること、溶液中のFliH-I複合体が輸送効率を著しく上昇させることから細胞質中のFliH-I複合体がATPase 複合体形成時と異なる役割を持つことを明らかにした。また、フックキャップ蛋白質輸送がフック蛋白質輸送と競争せず、逆に促進することから、輸送基質どうしの相互作用が輸送順序や輸送効率に関係することが明らかになった (Terashima et al., *mBio*. 2018)。



FlgDとFlgEの輸送により反転膜ベシクル内に形成されたフック (A) と、FlgDによるFlgE輸送の促進効果 (B)。

(6) 輸送装置のハウジングを形成するべん毛回転子蛋白質 FliF について、FlhA と相互作用する領域を含むフラグメントの結晶構造を解明した。このフラグメントは SPI-I III 型輸送装置のハウジングリングを形成する PrgH と PrgK に相当する構造を持ち、べん毛輸送装置では FliF が PrgH と PrgK が融合した蛋白質に相当すると考えられる。また、PrgH-PrgK 複合体リング構造に基づいたリングモデルを構築した (投稿準備中)。



FliF フラグメントの結晶構造

## 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9件)

Terashima H, Kawamoto A, Tatsumi C, Namba K, Minamino T, \*Imada K. *In vitro* reconstitution of functional Type III protein export and insights into flagellar assembly. *mBo*. 9, (2018). in press. doi:10.1128/mBio.00988-18. 査読有。

Terahara N, Inoue Y, Kodera N, Morimoto YV, Uchihashi T, Imada K, Ando T, Namba K, Minamino T. (2018). Insight into structural remodeling of the FlhA ring responsible for bacterial flagellar type III protein export. *Sci Adv* 4:eaa07054. (2018). doi:10.1126/sciadv.aao7054. 査読有。

Kojima S, Takao M, Almira G, Kawahara I, Sakuma M, Homma M, Kojima C, \*Imada K. (2016). The Helix Rearrangement in the Periplasmic Domain of the Flagellar Stator B Subunit Activates Peptidoglycan Binding and Ion Influx. *Structure*. 26:590-598. (2018). doi: 10.1016/j.str.2018.02.016. 査読有。

Terashima H, Kawamoto A, Morimoto YV, Imada K, Minamino T. Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. *Biophys Physicobiol*. 14:191-198. (2017). doi: 10.2142/biophysico.14.0\_191. 査読有。

\*Imada K. Bacterial flagellar axial structure and its construction. *Biophys Rev*. 10:559-570. (2017). doi: 10.1007/s12551-017-0378-z. 査読有。

Fukumura T, Makino F, Dietsche T, Kinoshita M, Kato T, Wagner S, Namba K, \*Imada K, Minamino T. Assembly and stoichiometry of the core structure of the bacterial flagellar type III export gate complex. *PLoS Biol*. 15:e2002281. (2017). doi: 10.1371/journal.pbio.2002281. 査読有。

\*Imada K. Design and Preparation of the Fragment Proteins of the Flagellar Components Suitable for X-Ray Crystal Structure Analysis. *Methods Mol Biol*. 1593:97-103. (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6927-2\_7. 査読有。

Kinoshita M, Nakanishi Y, Furukawa Y, Namba K, \*Imada K, \*Minamino T. Rearrangements of  $\alpha$ -helical structures of FlgN chaperone control the binding affinity for its cognate substrates during flagellar type III export. *Mol. Microbiol*. 101, 656-670. (2016). doi: 10.1111/mmi.13415. 査読有。

\*Imada K., Minamino T., Uchida Y, Kinoshita M, Namba K. Insight into the flagella type III export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 113: 3633-3638 (2016). doi: 10.1073/pnas.1524025113. 査読有.

〔学会発表〕(計 50 件)

Imada K. In vitro observation of the bacterial flagellar type III protein export. OIST International Workshop on Bacterial Flagella, Injectisomes and Type III Secretion Systems, OIST. Onna, Okinawa. Mar 1, 2017.

今田勝巳. 細菌べん毛 III 型輸送装置の構造と輸送機構. 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台国際センター (仙台), Mar. 21, 2017

〔図書〕(計 2 件)

今田勝巳. (2017) 第 15 章 少数で製造をコントロール: 少数性生物学 永井健治、冨樫祐一 (編), 日本評論社, pp129-138.

〔その他〕

プレスリリース

[http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2018/20180426\\_1](http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2018/20180426_1)

[http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2018/20180323\\_2](http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2018/20180323_2)

[http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2017/20170804\\_1](http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2017/20170804_1)

[http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2016/20160315\\_1](http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2016/20160315_1)

新聞報道

日本経済新聞電子版 2018 年 4 月 27 日

北國新聞 2018 年 4 月 26 日

日刊工業新聞 2018 年 3 月 28 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今田 勝巳 (IMADA Katsumi)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 40346143

(2) 研究分担者

川岸 郁朗 (KAWAGISHI Ikuro)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号: 80234037

(3) 連携研究者

南野 徹 (MINAMINO Tohru)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号: 20402993

川本 晃大 (KAWAMOTO Akihiro)

大阪大学・大学院生命機能研究科・研究員

研究者番号: 90631523

川口 辰也 (KAWAGUCHI Tatsuya)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 10314353