

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15036

研究課題名(和文)キメラ技術で挑戦するスピロヘータべん毛特異的イオンチャネルの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of ion channel functioning in the spirochete flagella by genetically chimeric technique

研究代表者

中村 修一(Nakamura, Shuichi)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：90580308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の必須病原因子である運動性の機構解明は、感染症対策技術の発展につながる。本研究では、スピロヘータ類が持つペリプラスムべん毛の動作機構を明らかにするため、スピロヘータのべん毛固定子で外べん毛細菌のべん毛を回転させるキメラ実験を試みた。サルモネラなどのべん毛回転子・繊維とスピロヘータ固定子から成るキメラべん毛を作製したところ、固定子は正常に発現し、細胞膜に挿入されているようだが、べん毛の回転は見られなかった。固定子組み込みに必須であるMotBのペプチドグリカン結合ドメインの置換も行ったが、べん毛回転は確認できなかった。イオンチャネルやトルク発生部位の改変が必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bacterial motility is an essential virulence factor, and understanding its mechanism leads to development of technology for phylaxis. We focused on periplasmic flagella of spirochetes and attempted to clarify their rotation mechanism by constructing chimeric flagella composed of spirochete stator units and a flagellar rotor and filament from externally flagellated bacteria. We introduced a plasmid coding stator genes of the spirochete *Leptospira* into a *Salmonella* strain lacking stator genes. Although stator proteins, MotA and MotB, seemed to be expressed in *Salmonella* cells and were probably incorporated to the cell membrane, we could not observe flagellar rotation. Replacement of the peptidoglycan binding domain in MotB of *Salmonella* with that of *Salmonella* also did not work. These results suggest that modifications of ion channel or parts responsible for torque generation could be required to make chimeric *Salmonella* flagella rotated by *Leptospira* stator units.

研究分野：生物物理学、細菌学

キーワード：細菌べん毛 スピロヘータ 固定子 レプトスピラ イオンチャネル 分子モーター

## 1. 研究開始当初の背景

菌体の内部にべん毛を持つ螺旋細菌「スピロヘータ」類には、畜産分野に重大な経済的損失を与える感染症や様々な人獣共通感染症を引き起こす病原性種が多く含まれる。スピロヘータの感染様式は種によって異なるが、共通して「環境の粘性が高いほど活発に運動すること」と「運動性が低下すると弱毒化すること」が知られる (Rosey et al., 1996)。これらは、宿主体内の粘膜層で活発に運動して定着部位へと進む様子を想像させる。このことから、運動のエネルギー源である陽イオンの取り込み機構を標的とした感染症制御を発想するに至った。しかし、スピロヘータ類には培養が困難な種や、遺伝子操作法の確立が不十分な種が多いことから、運動に関する知見が乏しく、利用されるイオンの種類さえも明らかにされていなかった。スピロヘータ感染症に関する国内グループのこれまでの活動としては、レプトスピラ症を対象とした SATREPS (JICA-JST、九州大学、H27 終了) があった。国外では、パスツール研究所のグループが、スピロヘータ運動と病原性の相関を動物実験により示した (Lambert et al., 2012)。スピロヘータの感染における運動の重要性は古くから認識されているにも関わらず、運動機構に関する研究は、現在でもほぼ手付かずの状態である。

## 2. 研究の目的

本研究では、スピロヘータ類の菌体内べん毛を、培養や遺伝子操作が容易で、菌体の外側にべん毛を持つ大腸菌やサルモネラで発現させることにより、「菌体外に露出したスピロヘータべん毛」としての機能解析を行うことを目的とした。そのために、レプトスピラの基本運動の解析、外べん毛の機能改正法の確立も行った。

## 3. 研究の方法

(1) 外べん毛細菌のイオンチャンネル (motA/B) 欠損株は、 $\lambda$ ファージ組換えシステム (Detsunoko & Wanner, 2000) によって作製した。作製された  $\Delta$ motAB 株は、野生型株 (WT) と同じべん毛回転子とべん毛繊維を持つが、イオンチャンネルを持たないため、運動性は示さない。非運動性の確認は、顕微鏡観察によって行った。

レプトスピラの染色体 DNA を鋳型として、レプトスピラ motA/B 遺伝子を PCR により増幅した。得られた motA/B フラグメントをクローニングベクター pTrc99A (アンピシリン耐性、IPTG 誘導) に挿入した。作製したプラスミドをサルモネラ、大腸菌、または緑膿菌に導入した。

(2) イオンの種類に特異的なインジケータ (色素、蛍光蛋白質) を用いて細胞内イオン濃度変化を測定した。大腸菌およびサルモネラでは、pH 感受性蛍光蛋白質やナトリウム

イオン感受性色素を用いた定量的イオン濃度測定法が数多く確立されている。pH 変化 (プロトン透過活性) の測定には緑色蛍光蛋白質 GFP の変異体であるフルオリンを使用した。ナトリウムイオン濃度変化 (ナトリウムイオン透過活性) の測定には、CoroNa Green を使用した。

(3) べん毛モーターの回転機能の評価には、テザードセル法とビーズ法を用いた。テザードセル法は、べん毛1本をガラス面に付着させ、べん毛モーターの回転による菌体の回転を観察する手法である。ビーズ法は、菌体をガラス面に付着させ、べん毛1本にマイクロビーズを付着させて、ビーズの回転を観察する手法である。本研究では、外べん毛細菌として、サルモネラ (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1)、シュードモナス・シリング (*Pseudomonas syringae*) を使用した。サルモネラについては、べん毛回転計測の手法が既に確立されている。一方、緑膿菌については、べん毛繊維に対するビーズ標識の手法確立も行った。

## 4. 研究成果

(1) レプトスピラ固定子をコードするプラスミドをサルモネラまたは大腸菌に導入したところ、サルモネラまたは大腸菌内でのレプトスピラ固定子蛋白質の発現が確認された。固定子がイオンチャンネルとしての機能を持つには、細胞質膜およびペプチドグリカン層に挿入される必要がある。レプトスピラ固定子蛋白質のサルモネラまたは大腸菌内での局在は不明であったが、フルオリンを用いた細胞内 pH 変化の計測と、CoroNa Green を用いた細胞内ナトリウムイオン濃度変化の計測により、レプトスピラ固定子が両イオンの透過活性を高めることが分かった (レプトスピラ固定子を持たないコントロール株にくらべ、細胞内イオン濃度の変化量が大きかった)。

(2) レプトスピラ固定子が外べん毛細菌のモーターを回転させることを期待し、サルモネラ (周毛性プロトン駆動型細菌) または緑膿菌 (単毛性プロトン駆動型細菌) 内でレプトスピラ固定子を発現させたが、これらのキメラべん毛の回転は観察されなかった。

べん毛固定子がべん毛内で機能するには、ペプチドグリカン結合ドメインが必要であることが知られている。ビブリオ属細菌と大腸菌の組み合わせでキメラべん毛が作製された例があるが、この場合、ビブリオ固定子のペプチドグリカン結合ドメインを大腸菌のものに置換することで成功している (Asai et al., 2003, J. Mol. Biol.)。そのため、レプトスピラ固定子のペプチドグリカン結合ドメインをサルモネラ固定子のものに置換したキメラ固定子を固定子欠損型サルモネラに

導入する実験を行ったが、この手法によっても、レプトスピラ固定子によるサルモネラべん毛の動作を確認できなかった。レプトスピラのゲノムには、固定子遺伝子のオルソログが複数存在することが分かっているため、オルソログの共発現などが今後の課題である。

緑膿菌べん毛の回転機能解析を行う上で、テザードセルの手法や、直径 100 nm の金コロイドを用いたビーズ法を確立することができた (図 1)。緑膿菌モーターの pH 依存性なども分かった。これらは、新しい研究テーマにつながる可能性が期待される。

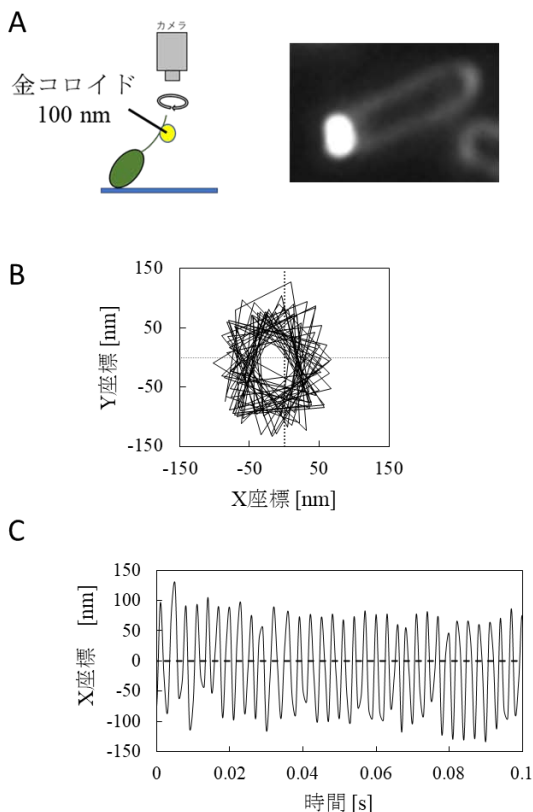


図 1. 緑膿菌べん毛の回転計測 (A) 直径 100nm の金コロイドをべん毛に付着させた緑膿菌の模式図 (左) と暗視野顕微鏡像 (右)。 (B) 緑膿菌べん毛に付着した金コロイドの回転軌跡。 (C) B に示したビーズの X 軸方向の変化。このモーターが約 380Hz で回転していたことを示している。

(3) レプトスピラの基本運動を観察する中で、病原性に重要と思われる、高粘度環境での運動特性や、運動方向制御に関する新しい現象を発見した。レプトスピラが生存する自然環境は、河川や水たまりなど、比較的低粘度であることが多い。一方、経皮的に動物に感染するにあたり、皮膚 (真皮) をはじめとする高粘度環境にさらされる。図 2 に示すように、粘度が高いほど、より高頻度に方向転換してその場に留まる確率を高めることは、高粘度環境、すなわち動物体内への侵入確率を高めることにつながると考えられる。このような、レプトスピラの基本運動機構に関して

得られた結果については、現在論文を執筆中である。

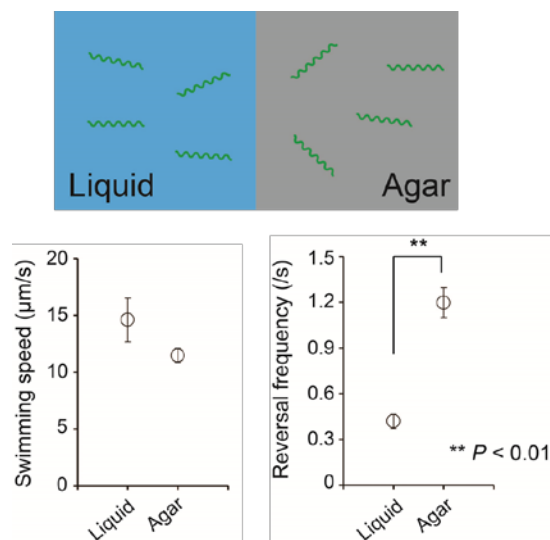


図 2. 水溶液中 (Liquid: 低粘度) とアガー中 (Agar: 高粘度) で非病原性レプトスピラ *Leptospira biflexa* の遊泳速度 (swimming speed) と方向転換頻度 (reversal frequency) を計測した結果。約 20 セルから得られた数値の平均値 (白丸) と標準誤差 (エラーバー) を示した。有意差検定は、Student's *t*-test による。

## 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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Shuichi Nakamura, Introduction to bacterial motility, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年
- ② 阿部圭吾, 高部響介, 中村修一, ゲル/液界面におけるレプトスピラ運動の解析: 経皮侵入メカニズムに対する洞察, 第 55 回レプトスピラ・シンポジウム, 2018 年
- ③ Shuichi Nakamura, Movement of the outer membrane in *Leptospira*: Implication for their diverse motilities, Gordon Research Conference: Biology of Spirochetes, 2018 年
- ④ 高部響介, 中村修一, スピロヘータべん毛モーター間で伝播する回転応力, 2018 年生体運動研究合同班会議, 2018 年
- ⑤ Taro Hariu, Takuto Tensaka, Naoya Terahara, Seishi Kudo, Shuichi Nakamura, Measurement of motility and flagellar rotation in *Pseudomonas* species., 第 55 回日本生物物理学会総会, 2017 年
- ⑥ Taro Hariu, Takuo Tensaka, Naoya Terahara, Seishi Kudo, and Shuichi Nakamura, Rotation assay of the *Pseudomonas syringae* flagellar motor, Bacterial Flagella, Injectisomes and Type III Secretion Systems, 2017 年

⑦ 針生太郎、天坂拓人、工藤成史、中村修二、シュードモナス属細菌における出力特性解析、第54会日本生物物理学会総会、2016年

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 修一 (NAKAMURA, Shuichi)  
東北大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：90580308

(2)研究協力者

森本 雄祐 (MORIMOTO, Yusuke)  
九州工業大学・生命情報工学科・助教