

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17085

研究課題名(和文)細菌の型タンパク質分泌機構の生体ナノ構造イメージングによる機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Type IX secretion system using nano scale biomolecule imaging approach

研究代表者

柴田 敏史 (Satoshi, Shibata)

沖縄科学技術大学院大学・生体分子電子顕微鏡解析ユニット・研究員

研究者番号：30725057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：バクテロイデーテス門細菌独自の9型分泌機構(T9SS)は生育に必要な酵素類、病原性タンパク質を分泌するだけでなく、滑走運動装置としても機能する。本研究はT9SS複合体の構造解析と作動機構の解明を目指した。

本研究の結果、歯周病原細菌Porphyromonas gingivalisの外膜上の分泌装置の一部と思われるリング状構造を可視化することができた。また、シリカビーズを用いた新しい急速凍結法を確立すると共に、クライオ電子顕微鏡法を含む種々のイメージング技術を用いて、土壌細菌Flavobacterium johnsoniaeのらせん状滑走装置の存在を明らかにし、新たな滑走運動機構を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命機能のメカニズムを解明する上で、各々の機能を担う生体超分子の立体構造の情報は欠かせない。T9SSはバクテロイデーテス細菌にとって必須であり、病原性にも重要な役割を担う。研究成果はT9SSの構造、機能の理解という細菌学に新たな知見を与えるだけでなく、T9SSを標的とした分泌阻害、滑走運動阻害剤など感染防除法開発への足がかりになることが期待できる。また、新しい急速凍結法の提案は生体分子イメージング技術の発展にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：The type IX secretion system (T9SS) is unique to phylum Bacteroidetes bacteria and involved in the secretion of pathogenic proteins and gliding motility. To understand these mechanisms of T9SS, we tried to identify the structure of T9SS complex.

In this study, we visualized the ring-like pore structure of T9SS located in the outer membrane in the oral pathogen Porphyromonas gingivalis. In addition, we established a novel rapid freezing method using silica beads. Furthermore, we clarified the existence of helical gliding machinery located inside the outer membrane of the soil bacterium Flavobacterium johnsoniae using various imaging techniques including cryo-electron microscopy. Based on the gliding machinery results a new gliding mechanism was proposed.

研究分野：生体分子科学

キーワード：分泌装置 電子顕微鏡 病原性細菌 滑走細菌 T9SS 歯周病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は様々なタンパク質分泌システムをもち、それらは環境への適応、恒常性の維持に関与している。なかでも病原性細菌においては、エフェクター・外毒素の分泌によってホストの生体防御反応を攪乱し、感染成立、ホスト内での増殖、脱出に重要な役割を果たす。分泌メカニズムの解明は細菌生態の本質を理解する重要な研究テーマであり、またこれを標的とした新たな細菌感染防除法の確立に寄与する。

慢性歯周炎は45歳以上の日本人の半数以上が罹患している慢性感染症であり、歯の喪失の最大原因である。これまでの研究からバクテロイデーテス門に属する偏性嫌気性グラム陰性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は歯周炎の最も重要な病原細菌の一つと考えられている。*P. gingivalis* の病原性因子としては LPS や線毛、プロテアーゼが知られているが、強力な分解活性を示すジンジパインプロテアーゼ (Rgp と Kgp) は病原性の中心的役割を果たすと考えられている。ジンジパインは生体タンパク質を分解して直接組織を破壊するだけでなく、内在性マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の生産、活性化を引き起こし間接的な組織破壊も引き起こす。また各種サイトカイン、好中球レセプターの破壊、補体系の活性化あるいは分解など宿主の生体防御反応を不全化する。さらには X 因子やプロトロンビンの活性化、カリクレイン・キニン系活性化、フィブリン・フィブリノーゲンを分解し、血液凝固誘導、血管透過性亢進、易出血性を引き起こす重要な病原因子である (Guo et al., *Periodontal*, 2000, 2010; Kadowaki et al., *J. Biochem.*, 2000)。

ジンジパインの機能については多くの知見が得られているが、*P. gingivalis* は既知の細菌タンパク質分泌システム 1 型 (T1SS) から 8 型 (T8SS) の構成タンパク質遺伝子をもたず、その分泌系は明らかではなかった。しかし、近年その分泌システムについてブレイクスルーがもたらされ、バクテロイデーテス門特異的な新規分泌機構 IX 型分泌システム (T9SS) によってジンジパインが菌体外へ分泌されることが見出された。ジンジパインなどの T9SS 依存分泌タンパク質は N 末端に Sec 輸送シグナル配列と C 末端 (CTD) には T9SS 認識配列 (T9SS 分泌テイル) をもつ。これらの輸送タンパク質は Sec 装置によって内膜を通過し、T9SS 輸送装置により外膜を通過し菌体外に分泌される。この過程でシグナル配列と T9SS 分泌テイルは切断され、分泌されたタンパク質は機能を発揮する (Sato et al., *PNAS*, 2010; Nakayama, *J. Periodont. Res.*, 2015)。

P. gingivalis の T9SS は 11 種類の構成タンパク質 (PorK, PorL, PorM, PorN, PorP, PorQ, PorT, PorU, PorV, PorW, Sov) と 2 種類の調節タンパク質 (PorX, PorY) が関わっている。これらの T9SS 関連タンパク質群はバクテロイデーテス門に属する細菌の多くに保存されていることがゲノム情報から明らかになってきており、歯周病原細菌 *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga ochracea*、人獣共通感染症病原細菌 *Capnocytophaga canimorsus*、魚類感染症病原菌の *Flavobacterium psychrophilum* などでは病原性への関与が指摘されている。また土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* などバクテロイデーテス門細菌の多くが有する「滑走運動能」に関与する運動装置のコンポーネントとして T9SS の構成タンパク質が機能していることが明らかになっている (Sato et al., *PNAS*, 2010; McBride and Zhu, *J. Bacteriol.*, 2013)。

P. gingivalis のジンジパイン分泌は T9SS 構成タンパク質の 1 つでも欠けると障害をきたす。このことから、構成タンパク質は分泌超分子複合体を形成し協調的に機能していると予想される。これまで *P. gingivalis* 菌体より分離された PorK・PorN が直径約 50 nm のリング構造をとることが電子顕微鏡によって可視化され、分泌チャンネルであると提案されている (Gorasia et al., *PLoS Pathog.*, 2016)。また、申請者による電子顕微鏡解析により T9SS と深く関わる *F. johnsoniae* の滑走運動関連タンパク質 GldJ は 外膜の内側にフィラメント構造を形成することが明らかになっている (論文投稿準備中)。しかし T9SS の構造の全体像は未だ不明である。

2. 研究の目的

T9SS はバクテロイデーテス門細菌の多くに存在し、宿主への感染、生存ニッチ獲得のためのタンパク質分泌だけでなく、滑走運動コンポーネントの一部としても機能している。本研究の目的は T9SS 分泌超分子複合体を可視化・構造解析し、その構成分子が構造内でどのように協調的に存在・機能するかを明らかにすることで T9SS の分泌メカニズムを分子レベルで解明することである。

3. 研究の方法

菌体内の T9SS 分泌超分子複合体の可視化は浸透圧ショック法、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法、クライオトモグラフィー法、FIB-SEM (収束イオンビーム scanning electron microscopy) 法を用いて行った。T9SS 分泌超分子複合体の単離精製については細菌べん毛の単離精製法 (Aizawa SI., 2017, *Methods in Molecular Biology*, vol 1593.) および、レジオネラ T4SS の分泌超分子単離精製法 (Kubori et al., 2014, *PNAS*) を参考に行った。

透圧ショック法: 菌体を高張液 (0.5 M Suculose, 0.5 mM Tris/HCl pH7.5) で懸濁し氷冷後、10 倍量の氷冷した低張液 (超純水) を加え混合し菌体を浸透圧ショックにより破裂させた。未破裂な菌体は低速の遠心分離 10,000×g 5 分によって取り除き、上清中に含まれる破裂した菌体

を 15,000×g 20 分の遠心分離によって回収し、ネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) シリカビーズを用いた急速凍結レプリカ電子顕微鏡法による細菌滑走運動装置可視化方法の確立

従来の急速凍結レプリカ法では急速凍結試料の表面に露出する構造のレプリカ膜を観察するため、菌体の影になる菌体底面部と固体表面の接着面を観察することは不可能であった。そこで我々は菌体とシリカビーズの混合試料を急速凍結した後、レプリカ膜を作成し、ビーズの側面に接着した菌体を観察することで、接着面を横方向から可視化する新しい手法を開発した。この手法を用いることで、*F. johnsoniae* が滑走運動装置のアドヘジンとして機能する SprB によって固体表面に接着している様子を可視化する事ができた (図 1)。さらに、この手法は *Mycoplasma pneumoniae*、*Spiroplasma eriocheris* 等、他種の滑走細菌の接着様式を明らかにする事にも応用できること示し、Scientific reports 誌に報告した。

(Katayama E, Tahara YO, Bertin C, Shibata S, Application of spherical substrate to observe bacterial motility machineries by Quick-Freeze-Replica Electron Microscopy. Scientific reports 9(1) 14765 2019 年 10 月)

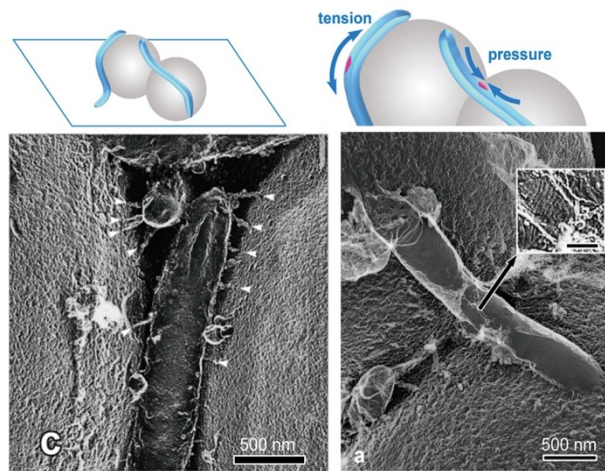


図 1. シリカビーズを用いた急速凍結レプリカ法

F. johnsoniae の接着を横方向から観察可能になった。菌体がアドヘジン SprB によってビーズ表面に接着している (左下、白矢印)。菌体内の楕状の滑走装置の一部が露出している (右下、拡大像)。Katayama et al., 2019 Sci. Rep.

(2) *F. johnsoniae* の外膜内側に存在するレール状滑走運動装置

F. johnsoniae の T9SS はタンパク質分泌、滑走運動と関連し、T9SS の構成タンパク質の一部は滑走運動装置としても機能する。菌体表面の SprB と菌体自体の動きを免疫蛍光染色と全反射照明蛍光顕微鏡法によって解析した。その結果 SprB は菌体表面を左向きらせんに沿って動き、個々の SprB は独立して動き、異なる速度で動く SprB 同士の追い越し現象が観察できた。また、菌体は滑走運動する際に反時計回りに回転していた。これらの結果は菌体表面に複数のレーンからなる滑走装置があり、それに沿って SprB が動き、SprB が基盤に接着すると、菌体は押し出され滑走することが示唆された。次に、浸透圧ショック法により処理した菌体をネガティブ染色し透過型電子顕微鏡で観察すると、SprB が付随したレール状の構造がみられた。この構造は 13 ある T9SS 関連 *gld* 遺伝子のいずれかの変異によって欠失したが、*sprB* や、その他滑走能に関するアクセサリ分子 *sprA-F* 遺伝子の変異の影響は受けなかった。また免疫電顕により、構造に GldJ が含まれることが明らかになった。さらに、クライオトモグラフィ法、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法によって、この滑走構造は菌体外膜内側に位置する事も確かめられた。これらのことから、GldJ は外膜側の滑走運動装置を構成し、ペリプラズム領域、内膜に位置する他の Gld タンパク質と複合体なり滑走運動装置を形成する可能性が考えられた。これまで、*P. gingivalis* の T9SS 構成タンパク質との相同性のある、GldK, L, M, N は生化学的解析等によって、複合体となり分泌に関与することが知られている。また GldA, F, G は内膜に位置し ABC トランスポーターを構成すると考えられている。リポタンパク質 GldB, D, H, I は外膜に位置すると予想される。これらと GldJ の関連性を示す事が今後の課題である。以上の知見は生物工学会誌に報告し、(柴田敏史、中山浩次、「運動マシナリーの多様性から見えるもの(前編)バクテロイデーテス細菌の滑走運動」生物工学会誌 96(4) 204-207 2018 年 4 月) 査読あり英文学術雑誌への投稿も準備中である。また、生物の運動メカニズムの起源と進化をテーマとして議論した論文を Genes to Cells 誌に報告した。(Makoto Miyata, Shibata Satoshi et al., Tree of motility - A proposed history of motility systems in the tree of life. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 25(1) 6 - 21 2020 年 1 月)

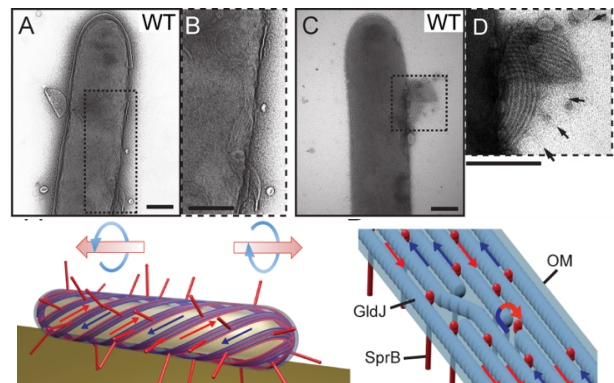


図 2. *F. johnsoniae* の滑走運動装置

菌体外膜の内側に位置する滑走運動装置 (A-D)。アドヘジン SprB と複合体となっている (D、黒矢印)。*F. johnsoniae* の SprB は複数のレーンからなる滑走運動装置に沿って菌体表面を左巻らせん状に動く。アドヘジンが固体表面に接着すると菌体を反時計回りに回転させながら押し出し、菌体は滑走する

(3) T9SS 分泌超分子複合体の可視化と単離精製

浸透圧ショック法により *P. gingivalis* を処理した後、ネガティブ染色し透過型電子顕微鏡により菌体中の T9SS 分泌複合体の可視化を試みた。この結果、菌体上に直径約 35 nm (± 1.5 nm、N=12) のリング状の構造物がみられた(図 3)。これはすでに報告されている菌体より単離された PorK・N からなるリング構造 (50 nm、Gorasia et al., 2016, Plos Pathog.) と形状が類似していたが直径が小さく、菌体内では他の Por タンパク質が PorK・N リングの内側に入り込んで複合体を形成しているため、見かけ上小さく見えている可能性が考えられる。次に T9SS の

菌体からの単離精製を試みた。菌体は氷冷下でプロテアーゼインヒビターカクテル (SIGMA) を含む Sucrose バッファーで懸濁し、終濃度 1mg/ml リゾチーム、1mM EDTA を加えた。この溶液に様々な界面活性剤を加え菌体の可溶化条件を検討した。しかしながら、*P. gingivalis* は偏性嫌気性細菌であり大量培養が困難である事、菌体が生産するジンジパインプロテアーゼの強力な分解活性のため T9SS の精製が困難であった。そこで *F. johnsoniae* を用いることにした。結果、両性界面活性剤 LDAO、もしくは TX-100 で菌体が可溶化し、PorK、PorN にそれぞれ相同な G1dK、G1dN を含む粗抽出フラクションが得られた。これを 35% の塩化セシウム溶液を用いた密度遠心勾配法によって分離し、G1dK、N を含むフラクションを得た。このフラクションをネガティブ染色し透過型顕微鏡で観察したが、特徴的なリング構造や、複合体のような構造は観察することはできなかった。G1dK、N からなるリング構造および付随するペリプラズム領域内の構造は精製過程で膜が除かれたため、構造が不安定になった可能性がある。FIB-SEM 法を用いた菌体内 T9SS 構造の解析については、SEM 観察では菌体膜付近の構造を識別できるほどの分解能が得られなかった。しかしながら、収束イオンビームで加工した試料のクライ電子顕微鏡トモグラフィ観察技術も近年発達し分解能の向上が見込まれるため、このような観察方法を試す予定である。

近年、PorM、G1dM の結晶構造が解かれ (Leone et al., 2018, Nat. Commun. 9:429)、また G1dL、M の複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析も行われている (James et al, 2020, bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.089193>)。これらの構造は分泌および滑走運動のプロトン駆動モーターであると予想されている。これらの構造を含んだ複合体の構造解析は T9SS の分泌および滑走運動メカニズムを理解するために重要な研究課題であり、引き続き、分子間のクロスリンクの導入等、異なるアプローチを用いた T9SS の単離精製法の確立と構造解析を目指す必要がある。

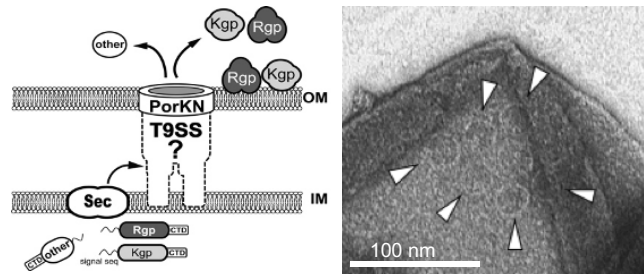


図 3. *P. gingivalis* の T9SS 分泌モデル

T9SS は分泌ポアを構成する PorK、N と外膜内側には PorL、M が位置すると考えられる (左)。菌体中の T9SS 分泌ポアと思われるリング構造 (右)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Miyata Makoto, Shibata Satoshi, et al	4. 巻 25
2. 論文標題 Tree of motility - A proposed history of motility systems in the tree of life	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 6~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Katayama Eisaku, Tahara Yuhei O., Bertin Clothilde, Shibata Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Application of spherical substrate to observe bacterial motility machineries by Quick-Freeze-Replica Electron Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51283-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shibata Satoshi, Matsunami Hideyuki, Aizawa Shin-Ichi, Wolf Matthias	4. 巻 26
2. 論文標題 Torque transmission mechanism of the curved bacterial flagellar hook revealed by cryo-EM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 941~945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-019-0301-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Meshcheryakov Vladimir A, Shibata Satoshi, Schreiber Makoto Tokoro, Villar Briones Alejandro, Jarrell Kenneth F, Aizawa Shin Ichi, Wolf Matthias	4. 巻 20
2. 論文標題 High resolution archaelium structure reveals a conserved metal binding site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201846340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shibata Satoshi, Shoji Mikio, Okada Kodai, Matsunami Hideyuki, Matthews Melissa M., Imada Katsumi, Nakayama Koji, Wolf Matthias	4. 巻 5
2. 論文標題 Structure of polymerized type V pilin reveals assembly mechanism involving protease-mediated strand exchange	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 830 ~ 837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41564-020-0705-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 柴田敏史、中山浩次	4. 巻 96
2. 論文標題 バクテロイデーテス細菌の滑走運動	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 204-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡田 広大, 中山 浩次, 庄子 幹郎, 柴田 敏史, 今田 勝巳
2. 発表標題 Structure of FimA, a major component protein of fimbriae of Porphyromonas gingivitis
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田 敏史, 庄子 幹郎, 岡田 広大, 今田 勝巳, 中山 浩次, Wolf Matthias
2. 発表標題 Structural analysis of Type V pilus by Cryo-electron microscopy
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Shibata, Shin-Ichi Aizawa and Matthias Wolf
2. 発表標題 Polarity and growth direction of an archaeellum filament
3. 学会等名 第24回べん毛交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibata S., Tahara O. Y., Katayama E., Kawamoto A., Kato T., Zhu Y., Namba K., Miyata M., Nakane D., McBride J. M., Nakayama K.
2. 発表標題 A Multi-Rail structure in the cell envelope for the Bacteroidete gliding machinery
3. 学会等名 Internatonal symposium Harmonized supermolecular motility machinery and its diversity (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田敏史、Matthias Wolf
2. 発表標題 Metal ion binding of the Methanococcus archaeellin required for filament integrity
3. 学会等名 第23回べん毛交流会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shibata S., Shoji M., Nakayama K., Wolf M.
2. 発表標題 Structural analysis of Type V pilus by Cryo-electron microscopy
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田敏史, 庄子幹郎, 松波 秀行, Melissa Matthews, 今田 勝己, 中山 浩次, Matthias Wolf
2. 発表標題 Cryo-EM Structure of polymerized Type V pilus of <i>P. gingivalis</i> reveals assembly mechanism
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----