

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07024

研究課題名(和文) 腸管系病原菌の感染を制御するIV型線毛システムの機能解明

研究課題名(英文) Investigating the roles of type IV pilus system in regulating enteric infection of bacterial pathogens

研究代表者

河原 一樹 (Kawahara, Kazuki)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60585058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌問題が深刻化する中、細菌の付着および定着過程を標的とした治療法開発が注目されている。我々は、腸管毒素原性大腸菌に関する研究から、IVb型に分類される線毛がこれらの過程において重要であるだけでなく、さらに、線毛先端部において分泌タンパク質と相互作用することが宿主腸管上皮への付着と定着に必要なことを見出した。本研究では、この細菌線毛と分泌タンパク質とのインタープレイが、腸管系病原菌に幅広く保存された特徴であることを示すとともに、新規の創薬標的となり得ることを提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、腸管系病原菌の感染過程の理解につながるだけでなく、定着阻害剤やワクチンの開発等への応用が可能である。特に、定着阻害剤は、細菌を死滅させる抗生物質とは異なり、耐性菌を生じさせないことから、薬剤耐性菌問題の解決に向けた新規の感染症予防・治療アプローチとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the post-antibiotic era, there has been an increasing interest in developing novel therapeutics targeting bacterial infection processes involving adhesion and colonization. In enterotoxigenic *Escherichia coli* infection, we have demonstrated that type IVb pilus (T4bP) plays crucial roles in such processes, but it also requires a secreted protein at its pilus-tip to attach to and colonize host intestinal epithelium. We here show that this interplay between T4bP and secreted protein is widely conserved among enteric pathogens and is considered to be a potential new therapeutic target.

研究分野：構造生物学

キーワード：腸管系病原菌 定着 IV型線毛 分泌タンパク質 X線単結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

近年、抗生物質・抗菌薬に対する耐性菌の出現が深刻な問題となっており、それらに代わる新規の細菌感染症対策の確立が喫緊の課題になっている。数多くの研究が国内外で進められているが、細菌の生育を阻害するのではなく、細菌が産生する病原因子の働きを阻害することで感染を制御する方法が注目を集めている。多様な病原因子の中でも、細菌感染において最も重要な過程である定着と関連する線毛は、魅力的な創薬標的と考えられており、線毛の働きを阻害する薬剤は、定着を防ぎ、病原菌を死滅させずに宿主外に排出できることから、耐性菌を生じさせない長所がある。しかしながら、未だ多くの病原菌において、巨大な繊維状タンパク質重合体である線毛の立体構造や機能の詳細についての理解が不十分であり、効果的な阻害剤の開発は進んでいない。

2. 研究の目的

細菌が菌体表面に産生する線毛は、ピリン (pilin) と呼ばれる構成タンパク質が螺旋状に重合することで形成され、シャペロン・アッシャー (chaperone-usher : CU) 経路もしくは IV 型線毛 (type IV pilus : T4P) システムにより作られる形態の異なる二種類の線毛に大別される。いずれの線毛も、先端部において、少数のみ発現するマイナーピリンを持つことが多く、ピリン様ドメインに加えて、アドヘシン (adhesin) と呼ばれる付着に関するドメインを持つことが知られている。これまでの CU 線毛に関する研究から、線毛先端部に存在するマイナーピリンがレクチン様ドメインを持つことが示され、宿主上皮における糖鎖認識が線毛を介した付着機構の共通テーマと考えられた。しかしながら、我々の腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli* : ETEC) の研究から、ETEC が産生する IVb 型線毛 (type IVb pilus : T4bP) の一種である定着因子抗原 III (colonization factor antigen III : CFA/III) は、線毛先端部にレクチン様ドメインを持つマイナーピリンが存在するものの、糖鎖ではなく、細菌が産生する分泌タンパク質と相互作用して機能することが明らかになり、さらに、この分泌タンパク質が脂質二重膜への結合能を有することから、分泌タンパク質が、線毛と宿主腸管上皮を橋渡すことで ETEC の付着と定着に関与することを解明した (Oki et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018 **115** 7422.)。

本研究では、この新たに見いだされた線毛と分泌タンパク質とのインタープレイが ETEC を含む細菌が保有する T4bP システムに共通した特徴であることを実証し、また、構造生物学的手法により、各細菌の分泌タンパク質の機能を解明することを目的とする。得られた情報から T4bP システムの腸内環境における役割を考察し、細菌定着を阻害する新規薬剤開発へ向けた基盤情報を得る。

3. 研究の方法

(1) コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) が保有する T4bP と分泌タンパク質の相互作用解析

T4bP としては、ETEC の CFA/III 線毛だけでなく、同じく ETEC の Longus 線毛、コレラ菌の毒素共発現線毛 (toxin-coregulated pilus : TCP) 、そして、シトロバクター・ローデンチウム菌 (*Citrobacter rodentium*) の colonization factor Citrobacter (CFC) 線毛が知られている。本研究では、代表的な T4bP システムであるコレラ菌の TCP について、物理化学的手法を用いて、線毛と分泌タンパク質との相互作用解析を実施するほか、X 線単結晶構造解析により、タンパク質複合体の立体構造決定を行うことにより、当該 T4bP システムにも ETEC と同様の線毛と分泌タンパク質とのインタープレイが存在するか否かを検証した。

(2) 腸内細菌科細菌における T4bP システムの探索とその機能解析

前述の通り、T4bP システムの報告例は、未だ一部の腸管系病原菌に限られているため、本研究では、ETEC の T4bP システムの配列情報に基づくデータベース検索により、同様のシステムを有する細菌種の網羅的探索を実施した。また、得られた情報に基づき、各細菌の分泌タンパク質を推定し、それらを分子系統樹解析によって複数の系統に分類した。続いて、各系統の代表的な菌種の分泌タンパク質について、X 線単結晶構造解析による立体構造解析を実施することで、その機能推定を試みた。

4. 研究成果

(1) コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) が保有する T4bP と分泌タンパク質の相互作用解析

ETEC の研究から発見された線毛と分泌タンパク質とのインタープレイが、他の細菌の T4bP システムにも共通した特徴であるかを検証するため、代表的な T4bP の一種であるコレラ菌の TCP 線毛について研究を実施した。TCP は、線毛の主要構成タンパク質であるメジャーピリン TcpA と線毛先端部に位置するマイナーピリン TcpB から構成され、定着に必須である分泌タン

パク質 TcpF の菌外輸送に関わることが過去の研究から示唆されているが、その詳細な機構は未解明であった。本研究では、等温滴定型熱量計、超遠心分析機、質量分析計を用いた相互作用解析を実施し、分泌タンパク質 TcpF が線毛先端部のマイナーピリン TcpB と 3:3 の化学量論比で結合することを明らかにした。また、両者の複合体の結晶構造解析を実施し、コレラ菌の分泌タンパク質である TcpF が、EPEC の分泌タンパク質である CofJ と同様に、N末端部に存在するフレキシブルな領域でマイナーピリンと相互作用することを明らかにした（図1）。

これらの結果から、T4bP システムでは、線毛先端部のマイナーピリンが分泌タンパク質のN末端の特徴的な配列を認識することで、線毛の伸長に伴い分泌タンパク質を菌外に輸送することが示唆された。マイナーピリンとの相互作用に関わる分泌タンパク質のN末端領域には、芳香族アミノ酸が共通して存在していることから、我々は、この分泌に重要なアミノ酸残基を含む領域を“IVb 型線毛分泌シグナル”と命名した（Oki et al. *Sci. Adv.* 2022 8 eabo3013）。

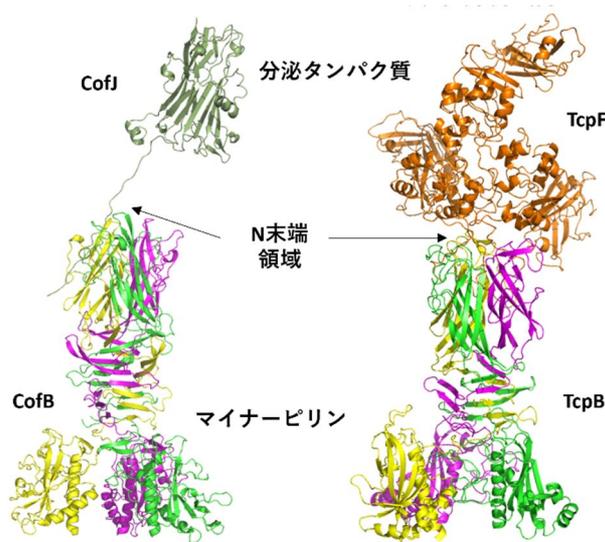


図1. EPEC(左)及びコレラ菌(右)のマイナーピリン-分泌タンパク質複合体の構造モデル。

(2) 腸内細菌科細菌における T4bP システムの探索とその機能解析

細菌における T4bP システムの分布状況を調べるため、EPEC が保有するマイナーピリンのアミノ酸配列情報に基づき、相同性検索プログラム BLASTp を用いて類似配列を探索した。その結果、腸内細菌科細菌に属する大部分の細菌が類似のタンパク質を保有することが明らかになった。得られた情報から、各細菌の T4bP システムをコードするオペロン構造を推定したところ、いずれの細菌もオペロン中に分泌タンパク質をコードする遺伝子を含むことが明らかになった。これらの分泌タンパク質を分子系統樹解析により分類したところ、10 系統に分類されることが示された。また、いずれの分泌タンパク質もN末端部に芳香族アミノ酸を含む“IVb 型線毛分泌シグナル”と推定される領域を有しており、EPEC と同様に、マイナーピリンとの相互作用に関わる領域と考えられた。

本研究では、各系統から代表的な菌種(系統1: EPEC、系統2: *C. rodentium*、系統3: *Providencia vermicola*、系統4: *C. amalonaticus*、系統5: *Rahnella rivi*、系統6: *Serratia sp.*、系統7: *R. aquatilis*、系統8: *Klebsiella oxytoca*、系統9: *Lelliottia amnigena*、系統10: *P. manganoxydans*)を選定し、それらの分泌タンパク質について、X線単結晶構造解析による立体構造決定を実施した。その結果、既知の系統1に加えて、系統2および7について、立体構造決定に成功した(図2)。

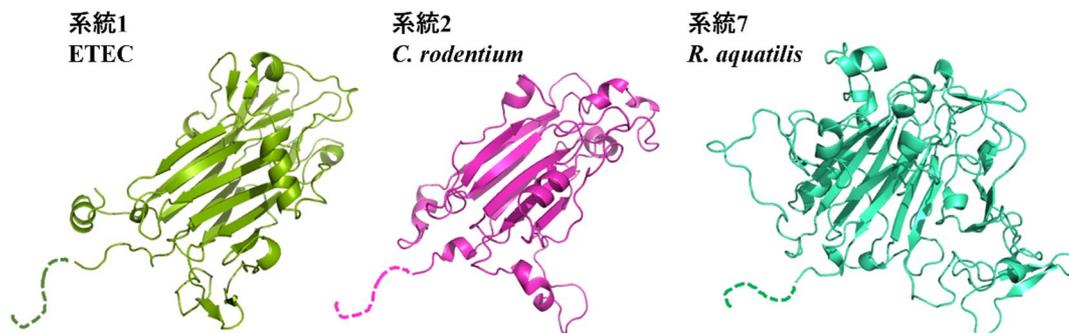


図2. 系統1、系統2、系統7に属する各分泌タンパク質の結晶構造。

その他の系統については、プログラム AlphaFold2 を用いて立体構造を推定した。その結果、いずれの分泌タンパク質も系統1に属する EPEC の CofJ と同様に β サンドウィッチ型の構造を基本骨格としていることが明らかになった。また、系統2および7の結晶構造については、CofJ と同様に分子中に芳香族アミノ酸に富むループ領域を持つことから、当該領域において、脂質二重膜の認識に関与することが想定されたが、AlphaFold2 の予測構造であるその他の系統の分泌タンパク質についてはループ領域の予測精度が低く、そのような機能推定が困難であった。

今後更なる研究が必要であるが、本研究の成果から、分泌タンパク質がこれらの細菌の腸管定着を制御する薬剤開発に向けた有望な標的となり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okii Hiroya, Kawahara Kazuki, Imori Minato, Imoto Yuka, Nishiumi Haruka, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Muroga Yuki, Yoshida Akihiro, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Matsuda Shigeaki, Iida Tetsuya, Nakamura Shota	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis for the toxin-coregulated pilus dependent secretion of Vibrio cholerae colonization factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabo3013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abo3013	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 市岡慎也、飯森南斗、沖大也、今井友也、松田重輝、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太、河原一樹
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌が分泌する可溶性定着因子とリボソームの相互作用解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kawahara Kazuki
2. 発表標題 Structural basis for the type IVb pilus-dependent secretion of Vibrio cholerae colonization factor
3. 学会等名 57th United States-Japan Cooperative Medical Science Program Joint Panel Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沖大也、河原一樹、飯森南斗、西海遥夏、丸野孝浩、内山進、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、中村昇太
2. 発表標題 コレラ菌が形成するIVb型線毛TCPIによる定着因子TcpiF認識機構
3. 学会等名 第55回ヒブリオシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯森南斗、沖大也、今井友也、松田重輝、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太、河原一樹
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌が分泌する可溶性定着因子の脂質膜認識機構の解明
3. 学会等名 第20回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Iimori Minato, Nishiumi Haruka, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Matsuda Shigeaki, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Iida Tetsuya, Nakamura Shota
2. 発表標題 Secretion mechanism of the colonization factor via Type IVb pilus TCP from <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 ASM Microbe 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Iimori Minato, Oki Hiroya, Imai Tomoya, atsuda Shigeaki, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Iida Tetsuya, Nakamura Shota, Kawahara Kazuki
2. 発表標題 Membrane recognition by secreted colonization factors of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
3. 学会等名 ASM Microbe 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Iimori Minato, Nishiumi Haruka, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Matsuda Shigeaki, Iida Tetsuya, Nakamura Shota
2. 発表標題 Structural basis for type IVb pilus-dependent secretion of the colonization factor from <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河原一樹、沖大也、飯森南斗、今井友也、松田重輝、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 IV型線毛の機能を制御するマイナーピリンの構造生物学的研究
3. 学会等名 日本結晶学会令和4年度年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大嶋恵子、沖大也、飯森南斗、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太、河原一樹
2. 発表標題 腸内細菌がIVb型線毛システム依存的に分泌するタンパク質の特徴
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖大也、飯森南斗、西海遥夏、丸野孝浩、内山進、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、河原一樹、中村昇太
2. 発表標題 コレラ菌が形成するIVb型線毛TCPを介した定着因子の分泌機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖大也、飯森南斗、西海遥夏、丸野孝浩、内山進、松田重輝、飯田哲也、河原一樹、中村昇太
2. 発表標題 腸管系病原菌が形成するIVb型線毛を介した定着因子の分泌機構
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯森南斗、沖大也、今井友也、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、中村昇太、河原一樹
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌が分泌する可溶性定着因子の脂質膜認識機構
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 折田将輝、沖大也、飯森南斗、今井友也、松田重輝、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太、河原一樹
2. 発表標題 外部環境に応答した腸管毒素原性大腸菌の可溶性定着因子分泌機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沖大也、河原一樹、飯森南斗、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、中村昇太
2. 発表標題 コレラ菌が形成するIV型線毛TCPの構造解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯森南斗、沖大也、河原一樹、松田重輝、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太
2. 発表標題 コレラ菌が産生する分泌タンパク質とIV型線毛の相互作用解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野
<https://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b001/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------