

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34306

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891024

研究課題名(和文) 回転-分泌相関の可視化による細菌 型分泌装置のエフェクター分泌機構の解明

研究課題名(英文) Evaluation of correlation between rotation and secretion of type III secretion apparatus for clarifying the effector secretion mechanism

研究代表者

扇田 隆司 (Ohgita, Takashi)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80737263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌などの細菌は注射器型の 型分泌装置(T3SA)を介して感染に関わるエフェクタータンパク質を宿主細胞に注入するが、T3SA内をエフェクターがどのように輸送されるのかは不明である。本研究では、T3SA内でのエフェクター輸送速度を定量評価し、この速度が以前に観察したT3SAの回転速度と相関する可能性を見出した。この結果から、T3SAが回転運動を行うことでエフェクターを輸送することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* inject effector proteins, which contribute to bacterial infection, into host cytosol via needle-like type III secretion machinery (T3SA). However, the transport mechanism of effectors in T3SA is unclear. In this study, we measured the speed of effector transport in T3SA. The measured speed of effector transport in T3SA showed correlation with the speed of T3SA rotation previously observed. Consequently, it was suggested that effectors are transported in T3SA needle by the rotation of T3SA.

研究分野：生物物理学

キーワード：細菌 型分泌装置 緑膿菌 回転-分泌相関

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は免疫力が低下した癌患者や高齢者等に感染して重篤な肺炎・敗血症を引き起こす[致死率 80%]。また、環境中や体内に常在し、既存抗菌薬のほとんどに耐性を示すことから撲滅は難しい。そのため、緑膿菌感染の予防は臨床で極めて重要な課題である。

ヒトが注射を打つように、緑膿菌は注射器型のⅢ型分泌装置(T3SA)の針(ニードル)を宿主細胞膜に挿入してエフェクターと呼ばれる毒素タンパク質を宿主内に注入する(図1)。注入されたエフェクターは宿主内を感染環境へ変化させ、その後、細菌が宿主内に侵入して感染が成立する。そのため、T3SAを介したエフェクター輸送を阻害すれば感染を防止できるが、現在、T3SA内でのエフェクター輸送機構は不明である。そこで我々は、T3SA阻害を機序とする抗菌薬開発に有益な情報を得るべく、T3SA内でのエフェクター輸送機構の解明を目標に研究を行っている。

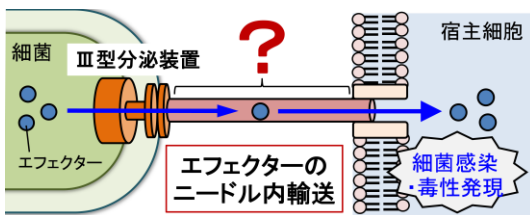


図1. T3SAを介したエフェクター分泌

T3SAの構造は細菌べん毛と酷似しており、べん毛がプロトン駆動力をエネルギーとして回転するように、T3SAを介したエフェクター分泌にもプロトン駆動力が必要である。これら両装置の類似性に基づき、我々は「T3SAがべん毛と同様にプロトン駆動力をエネルギーとして回転することでエフェクターを分泌するのではないか」と考えた。

この仮説を検証するため、我々はエフェクター分泌条件でのT3SAの動きを観察した。T3SAは小さすぎて直接は観察できないので、ニードル先端部にマイクロビーズを特異的に結合させ、ビーズの動きとしてT3SAの動きを検出した。その結果、T3SAがプロトン駆動力依存的に回転する様子の観察に成功した[Ohgita 他, FASEB.J (2013)]. (図2)

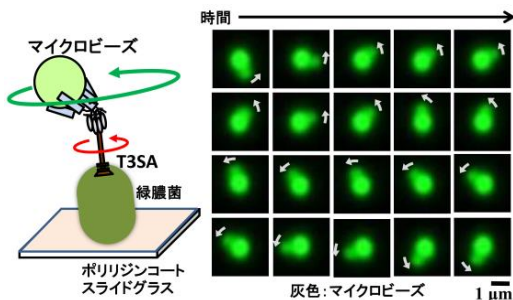


図2. T3SAの回転運動観察

さらに、培地粘性の増大によりT3SAの回転が停止するとエフェクター分泌量が減少することも見出した[Ohgita 他, Open Biol.

(2013)]. 以上より、T3SAがプロトン駆動力依存的に回転することでエフェクターを分泌することが示唆された(図3)。

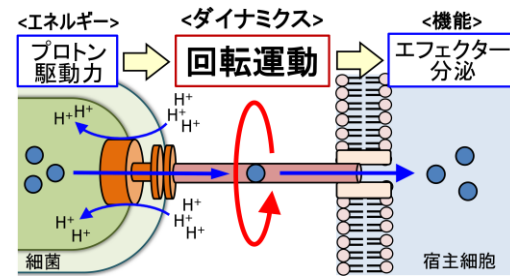


図3. 回転によるエフェクター分泌

2. 研究の目的

以上の結果から、T3SAの回転運動がエフェクター分泌に関与することが示唆された。それでは、回転運動からエフェクター輸送力への変換はどのような機構で起こるのか?本研究ではこの分子機構の解明を目指す。

T3SAニードル構成タンパク質の結晶構造を基に行われたシミュレーション実験にて、ニードル内壁には疎水アミノ酸が螺旋状に並んだ溝が存在し、エフェクターはこの螺旋に沿って回転しながらニードル内を輸送されることが示唆されている[Rathinavelan 他, Biophys.J. (2010)].

この報告とT3SAが回転するという知見に基づき、我々は「T3SAがニードル内の疎水螺旋と逆方向に回転することで、螺旋に装填されたエフェクターが一方向性にニードル内を輸送されるのではないか」という仮説を立てた(図4)。

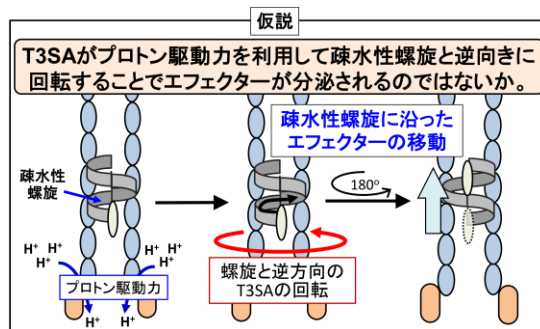


図4. T3SAのエフェクター輸送機構仮説

本研究ではこの仮説を検証するためにT3SAの回転速度とニードル内でのエフェクター輸送速度の相関を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では上述の仮説を検証するために、(1) T3SAニードル内でのエフェクター輸送速度の定量評価および(2) T3SA回転速度の定量評価を行い、(3)両速度の相関を調べることで、T3SAの回転運動とエフェクター輸送との関係の評価した。

(1) エフェクター輸送速度の定量評価系の構築

Ⅲ型分泌は①細菌内でのエフェクター産生、②T3SA へのエフェクター装填、③T3SA 内でのエフェクター輸送の3つの過程に分けられる。このうち、③が律速過程となる条件では、上清中に分泌されたエフェクター量の変化が T3SA 内でのエフェクター輸送速度を反映することになる。そこで、まずは③のエフェクター輸送過程がⅢ型分泌の律速過程となる条件を検討した。

次に上清中のエフェクター量を定量評価するための評価系の構築を試みた。従来のエフェクター分泌の評価は、エフェクターを含む細菌培養上清を濃縮し、ウエスタンブロット法にてエフェクターを検出することで行われていた。しかし、この方法は培地上清の濃縮過程での回収率やウエスタンブロット法の定量性の問題から、エフェクター分泌量の定量評価には適さない。そこで、本研究では上清中エフェクター量を定量評価するための実験系を新たに構築した。

(2) T3SA 回転速度評価系の構築

以前に構築した T3SA 回転運動評価系では回転プローブとしてマイクロビーズを用いているため、回転運動への影響が大きいことが予想され、また球形であるため、回転速度の評価には適さない。そこで、この問題を解決するため、回転プローブとして小サイズで棒状の金ナノロッドを用いることで T3SA の回転速度評価系を構築することにした。

(3) エフェクター輸送速度-T3SA 回転速度相関の解析

(1)で構築するニードル内エフェクター輸送速度評価系および(2)で構築する T3SA の回転速度評価系を用いて、種々条件でのエフェクター輸送速度および T3SA 回転速度を定量評価し、その結果から両者が相関関係を示すかを調べて図 4 の仮説の検証を試みた(図 5)。

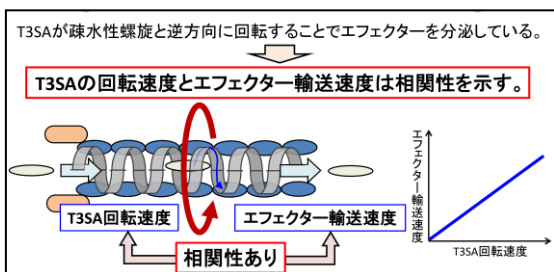


図 5. T3SA の回転-エフェクター輸送相関

4. 研究成果

(1) エフェクター輸送速度の定量評価系の構築

①緑膿菌のⅢ型分泌の律速過程を調べるため、Ca²⁺キレート剤 EGTA でⅢ型分泌を誘導後、細菌内および上清中のエフェクター量を経時的にウエスタンブロット法で評価した。

その結果、野生型緑膿菌の場合、上清画分には EGTA 添加 30 分後にすでに多量のエフェクターが検出されたのに対して、菌体内画分では 90 分後ようやく検出され始めた。このことから、T3SA を介したエフェクター輸送速度は、菌体内でのエフェクター産生速度よりも速いこと、すなわちⅢ型分泌の律速過程がエフェクター産生過程であることが示唆された。

そこで、エフェクター輸送過程をⅢ型分泌の律速過程とすべく、エフェクター発現プラスミドからエフェクターを大量産生させたところ、菌体内にエフェクターが蓄積した状態で上清中エフェクター量が経時的に増加する様子が認められた。このことから、この条件では T3SA 内でのエフェクター輸送過程がⅢ型分泌の律速過程となっていることが示唆された。

② ①の条件では、上清中エフェクター量の増加速度が T3SA 内でのエフェクター輸送速度を反映すると考えられる。そこで、次に上清中エフェクター量を定量評価するための実験系を構築した。最初、エフェクターを蛍光標識し、上清の蛍光強度を測定することでエフェクター分泌量を連続的かつ高感度に検出することを試みた。このためにエフェクターにテトラシステインタグを修飾し、約 1 nM 程度のエフェクターまで検出できる評価系を構築したが、この評価系では上清中エフェクターを検出できなかった。このことから、上清中エフェクター濃度は 1 nM 以下であることが示唆された。そこで、より高感度にエフェクターを検出するために、エピトープタグ 3xFLAG をエフェクターに修飾するとともに、3xFLAG ペプチドを高感度に定量するための競合 ELISA 系を構築した。構築した ELISA 系では約 50 pM~15 nM という高感度で 3xFLAG ペプチドが定量できた。この評価系を用いて 3 種類のエフェクター(ExoS, T, Y) の分泌速度を評価した結果、いずれのエフェクターも約 3 pM/min の速度で上清中濃度が上昇することが確認できた(図 6)。

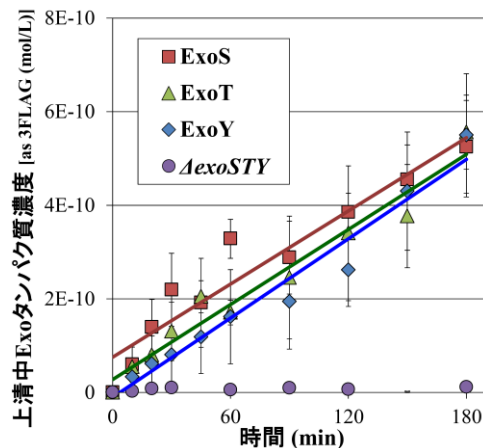


図 6. T3SA のエフェクター輸送速度評価

(2) T3SA 回転速度評価系の構築

: T3SA の回転速度を評価するため、サイズが小さく異方性のある金ナノロッドを回転プローブとして用いる T3SA 回転評価系の構築を試みた。金ナノロッドは顕微鏡の暗視野観察で行った。その結果、暗視野観察では金ナノロッドと緑膿菌の区別ができず、スライドグラスに固定しきれない緑膿菌が回転しているのか、それとも T3SA に結合した金ナノロッドが回転しているのかが判別できなかった。このことから、金ナノロッドの異方性を利用して T3SA 回転を検出するには、金ナノロッドを蛍光分子で修飾し、蛍光顕微鏡で特異的に観察する必要があることが示唆された。この点については今後、検討予定である。

(3) エフェクター輸送速度-T3SA 回転速度相関の解析

(1)で得られた T3SA のエフェクター輸送速度に関する情報を基に T3SA 回転速度との相関性を検討した。(2)で T3SA 回転速度評価系は構築できなかったが、以前にマイクロビーズを回転プローブとする T3SA 回転評価で偶然観察された、2 つのビーズが結合した状態での回転観察の結果から T3SA 回転速度の実測値を約 20~30 秒/1 回転として比較検討した。

今回の実験では、実験系内に T3SA が何個存在するのか、各 T3SA の分泌速度は等しいのか、等の情報は得られていない。そこで、仮に実験系内に存在する緑膿菌が 1 装置ずつ T3SA を保有しており、全ての T3SA は同じ速度でエフェクターを分泌すると仮定してエフェクター分泌速度の見積もりを行った。その結果、T3SA 1 装置あたりのエフェクター分泌速度は約 6 分子/分であり、T3SA 回転速度は約 1000 回転/分 = 0.060 秒/1 回転と見積もられた。この結果を基に、マイクロビーズが先端部に結合した状態での T3SA 回転速度を計算すると、約 10 秒/1 回転となった(図7)。

この結果は実際に観察された T3SA の回転速度 (20~30 秒/1 回転) に近い値である。このことから、T3SA の回転運動速度とニードル内エフェクター輸送速度が相関することが示唆された。

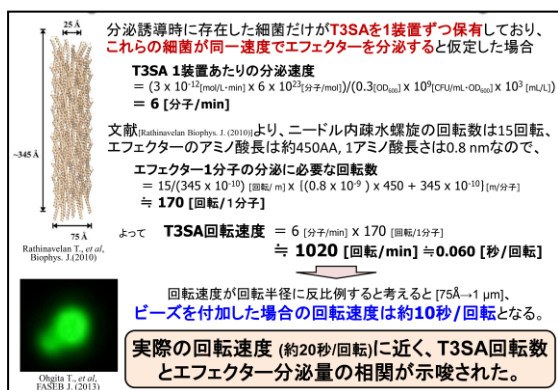


図7. エフェクター輸送速度からの T3SA 回転速度の見積もり

以上、本研究において、図4の仮説の検証には至らなかったものの、T3SAのエフェクター輸送速度を定量評価することに成功し、T3SA回転がT3SA内でのエフェクター輸送に関与することを示唆する結果が得られた。また、図4の仮説を検証する上で必要な実験系を構築する際の検討課題も明らかとなった。今後、本研究で得られた知見を基にT3SA内でのエフェクター輸送メカニズムに関する研究の進展が期待される。

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 12 件)

- ① 扇田 隆司、林 直樹、後藤 直正、小暮 健太郎：細菌III型分泌機構の解明を目指したエフェクター分泌の定量評価. 日本薬学会第136年会, 2016年3月27日, 神奈川
- ② 扇田 隆司、林 直樹、後藤 直正、小暮 健太郎：III型分泌機構の解明を目指した分泌装置のエフェクター分泌速度の定量評価. 第89回日本細菌学会総会, 2016年3月24日, 大阪
- ③ 上川 翼、扇田 隆司、林 直樹、後藤 直正、小暮 健太郎：緑膿菌とリポソームの物理的接触がIII型分泌システムに及ぼす影響の検討. 第89回日本細菌学会総会, 2016年3月24日, 大阪
- ④ 扇田 隆司、上川 翼、榎山 京子、林 直樹、後藤 直正、小暮 健太郎：細胞III型分泌機構の解明を目指したエフェクター輸送のリアルタイム評価系の構築. 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月14日, 石川
- ⑤ 榎山 京子、扇田 隆司、小暮 健太郎：タンデム型エフェクターによるT3SA内エフェクター分泌機序の評価. 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月13日, 石川
- ⑥ 扇田 隆司、林 直樹、後藤 直正、小暮 健太郎：III型エフェクターの分泌抑制を目指した分泌装置の回転-分泌相関の解析.

第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 27 日, 岐阜

京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号 : 80737263

⑦ 扇田 隆司、林 直樹、後藤直正、小暮健太郎 : 細菌Ⅲ型分泌装置の回転運動観察に基づくエフェクター分泌機構の検討. 第 4 回 4 大学連携研究フォーラム(京都工芸繊維大学、京都府立医科大学、京都府立大学、京都薬科大学), 2014 年 12 月 2 日, 京都

(2) 研究分担者
なし

⑧ 扇田 隆司、林 直樹、後藤 直正、小暮 健太郎 : 細胞膜を足場とする細胞Ⅲ型分泌装置の回転運動の観察とこれに基づいたエフェクター分泌機構の検討. 膜シンポジウム 2014, 2014 年 11 月 26 日, 兵庫

(3) 連携研究者
なし

⑨ 扇田 隆司、林 直樹、後藤 直正、小暮 健太郎 : 高粘性環境が細菌Ⅲ型分泌装置の回転運動-エフェクター分泌相関に及ぼす影響の検討. 第 64 回日本薬学会近畿支部大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都

⑩ Takashi Ohgita, Naoki Hayashi, Naomasa Gotoh, Kentaro Kogure : Evaluation of physicochemical effect of viscous polymers toward rotation and effector secretion of bacterial type III secretion apparatus. 第 52 回日本生物物理学会年会 2014 年 9 月 25 日, 北海道

⑪ Takashi Ohgita, Naoki Hayashi, Naomasa Gotoh, Kentaro Kogure : Analysis of bacterial type III effector secretion mechanism based on the observation of rotation of type III secretion apparatus. IUPAB congress 2014, 2014 年 8 月 6 日, Brisbane

⑫ 扇田 隆司、林 直樹、後藤 直正、小暮 健太郎 : 細菌Ⅲ型分泌装置の回転運動-エフェクター分泌相関に対する高粘性環境の物理化学的影響. 日本膜学会第 36 年会, 2014 年 5 月 12 日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

扇田 隆司 (OHGITA TAKASHI)