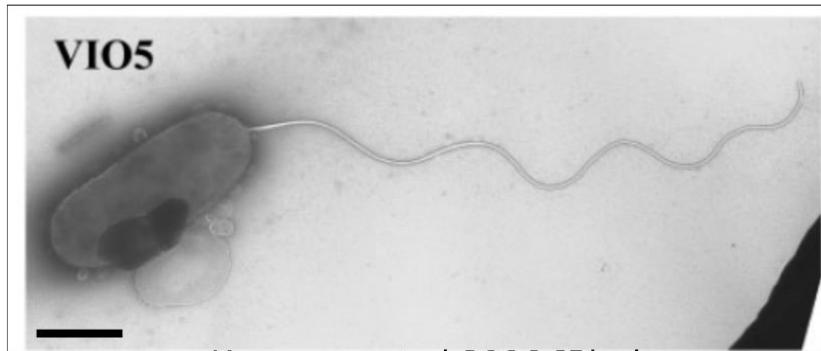


細菌III型分泌系を科学する

本間研 助教
寺島浩行

細菌べん毛は生物の持つナノマシンである

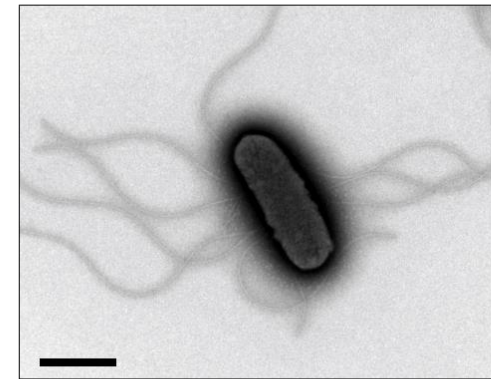
Vibrio alginolyticus



1 μ m

Kusumoto et al 2006 JBiochem

Salmonella typhimurium



1 μ m

ビブリオ菌の遊泳



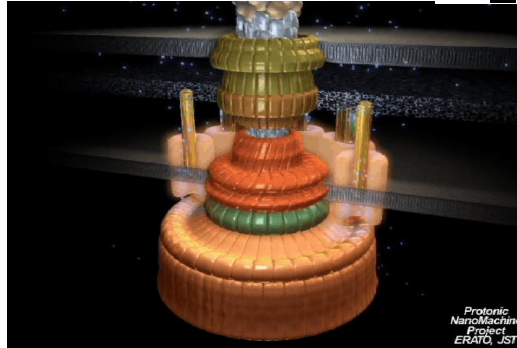
生物ナノマシン/分子機械としての特徴

1. 2万分子以上のべん毛タンパク質が秩序立って構築される
2. 回転する

生物界における回転ナノモーター

回転モーター

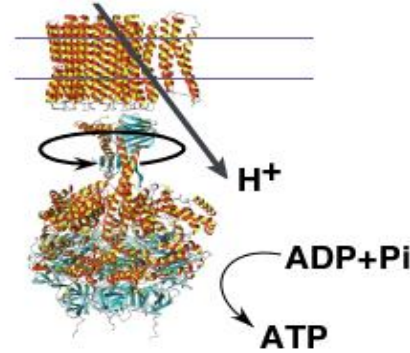
細菌べん毛



(べん毛基部構造)

F_0F_1 -ATP合成酵素

labuchi FA-130

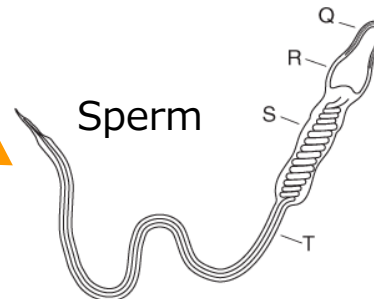


Torque/motor	4600 pN nm	40 pN nm	3.9×10^{17} pN nm
Size(diameter)	45 nm	10 nm	2.5×10^7 nm
max.rotation rate	350 Hz (大腸菌)	130 Hz	107 Hz
	1700 Hz (ビブリオ菌)		



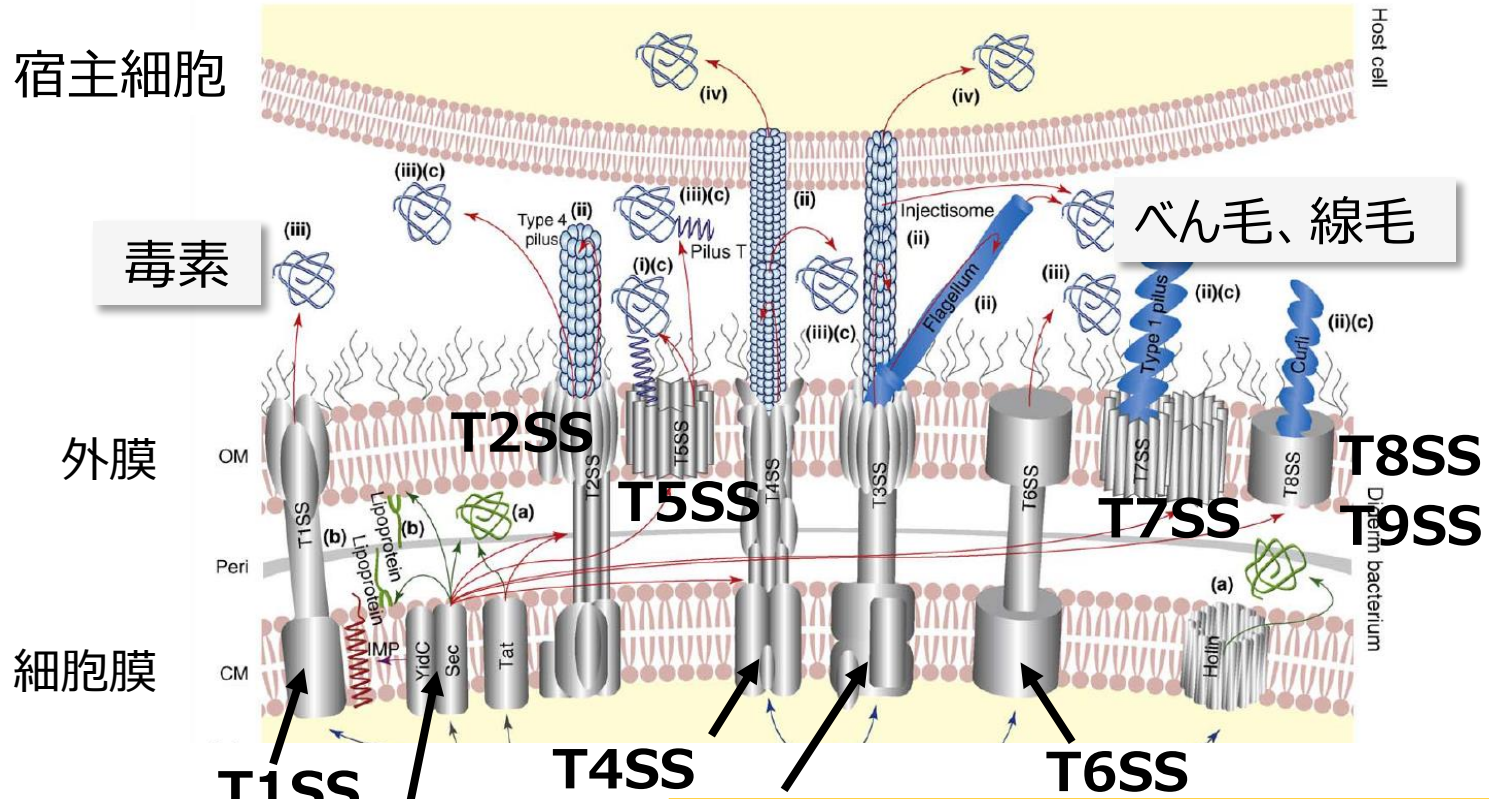
真核生物の鞭毛

- 微小管-ダイニン系
- 鞭打ち運動
- ATPがエネルギー源



精子、ユーグレナ、クラミドモナス等

細菌の持つタンパク質分泌装置



T1SS
Secトランスロコン

T3SS

(III型分泌装置)

→細菌べん毛やインジェクチソームの
構造構築・エフェクター分泌に働く

III型分泌装置系

Salmonella enterica

細菌べん毛

インジェクチソーム

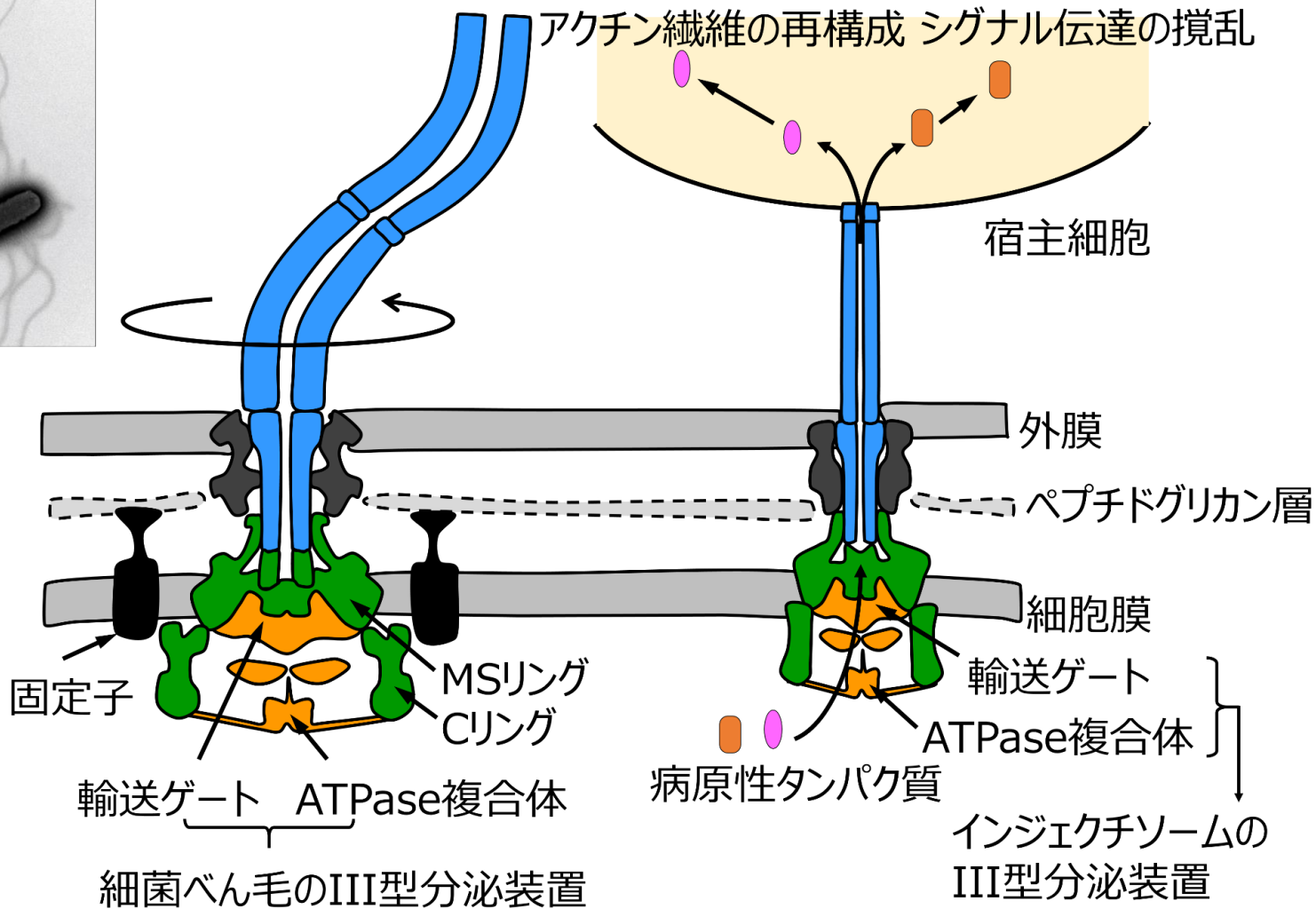
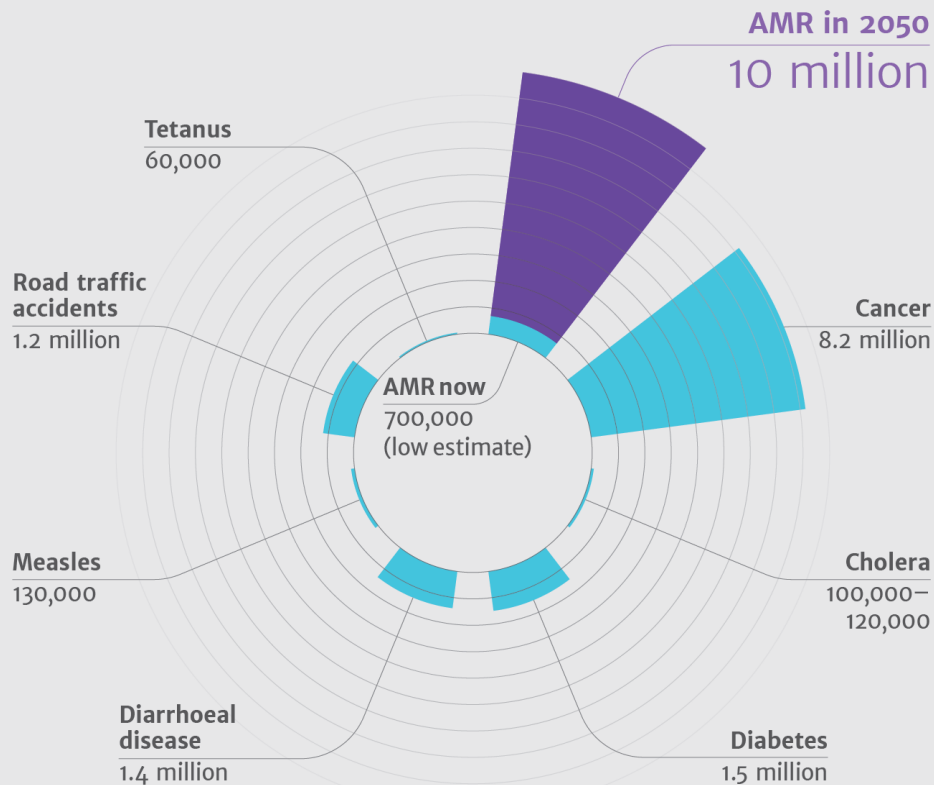


図2、細菌べん毛(左)とインジェクチソーム(右)の模式図。菌体表層上に緑色で示した基部構造が存在し、その内側に橙色のIII型分泌装置が存在している。

2050年での薬剤耐性菌による死亡者数の推定

Deaths attributable to AMR every year compared to other major causes of death



耐性化の原因

- 排出ポンプ
- 変異による作用点の変化
- バイオフィルム

臨床における対策

- 適切な抗菌薬の使用
- 薬剤耐性菌の拡大阻止
- 新規抗生物質の開発

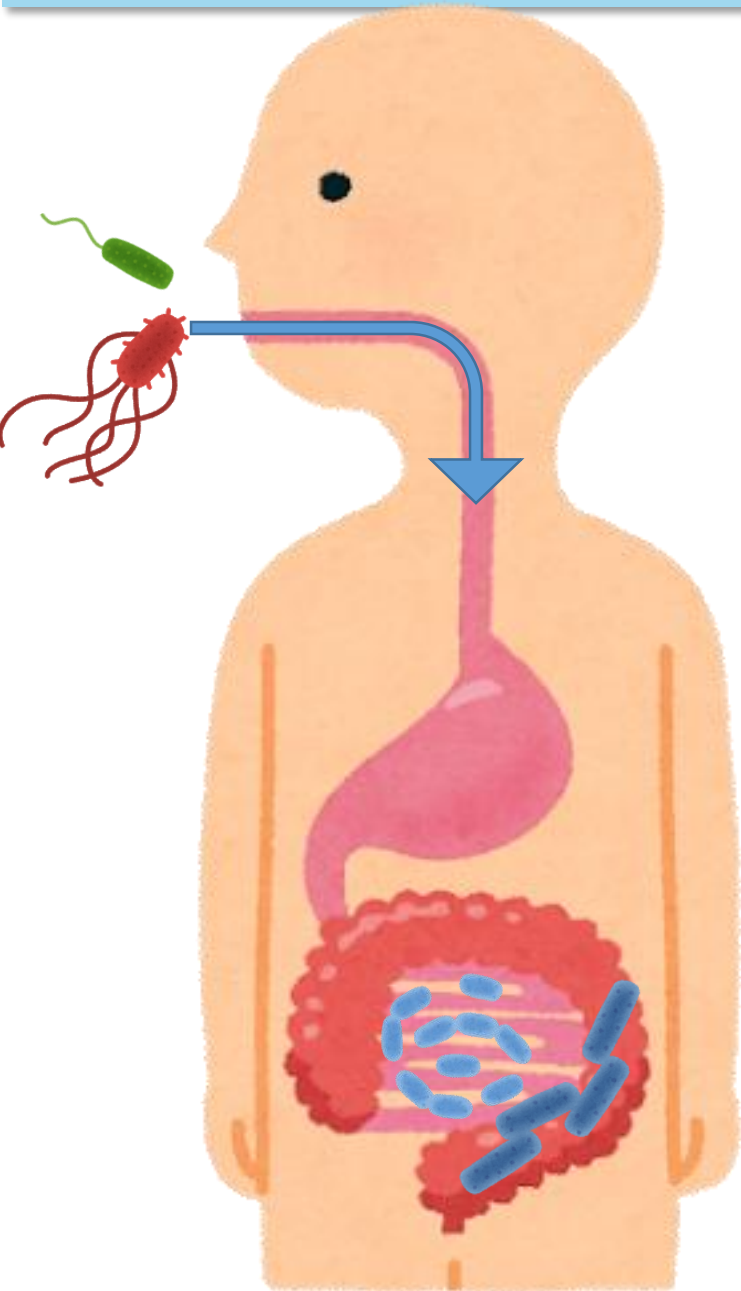
では、基礎研究でできることは、

→細菌の生理活性や機能をコント

ロールする新規手法の発見・開発

できたら素晴らしいのでは？

病原性細菌はテロリスト？



細菌べん毛や線毛などの
運動器官

→乗り物で都市に侵入

コロニー&バイオフィルム
形成

→潜伏・拠点作り

毒素、エフェクター、分泌
装置

→爆弾や銃器で攻撃

細胞傷害・細菌叢の乱
れ

→インフラや住民に危害

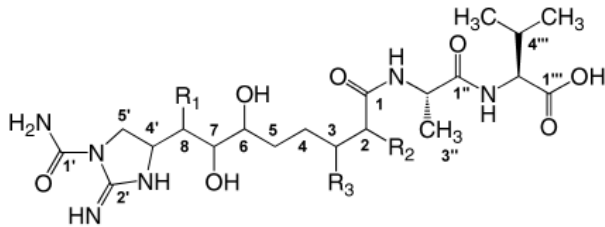
免疫・細菌叢による病
原菌排除

→警察・自警団による
治安維持

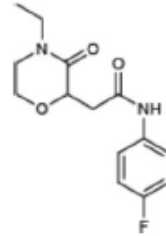
抗生物質投与

→無差別爆弾投下
(効果は抜群！
しかし、周囲に被害
も、、、)

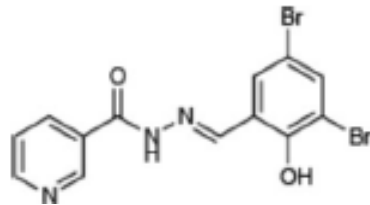
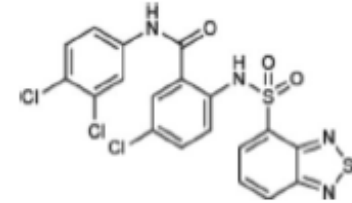
III型分泌装置阻害剤の一例



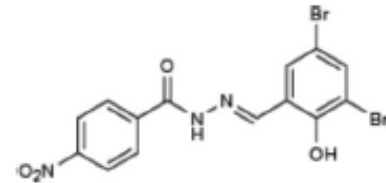
Iwatsuki et al 2008



Aiello et al 2010



Nordfelth et al 2005



Kauppi et al 2003

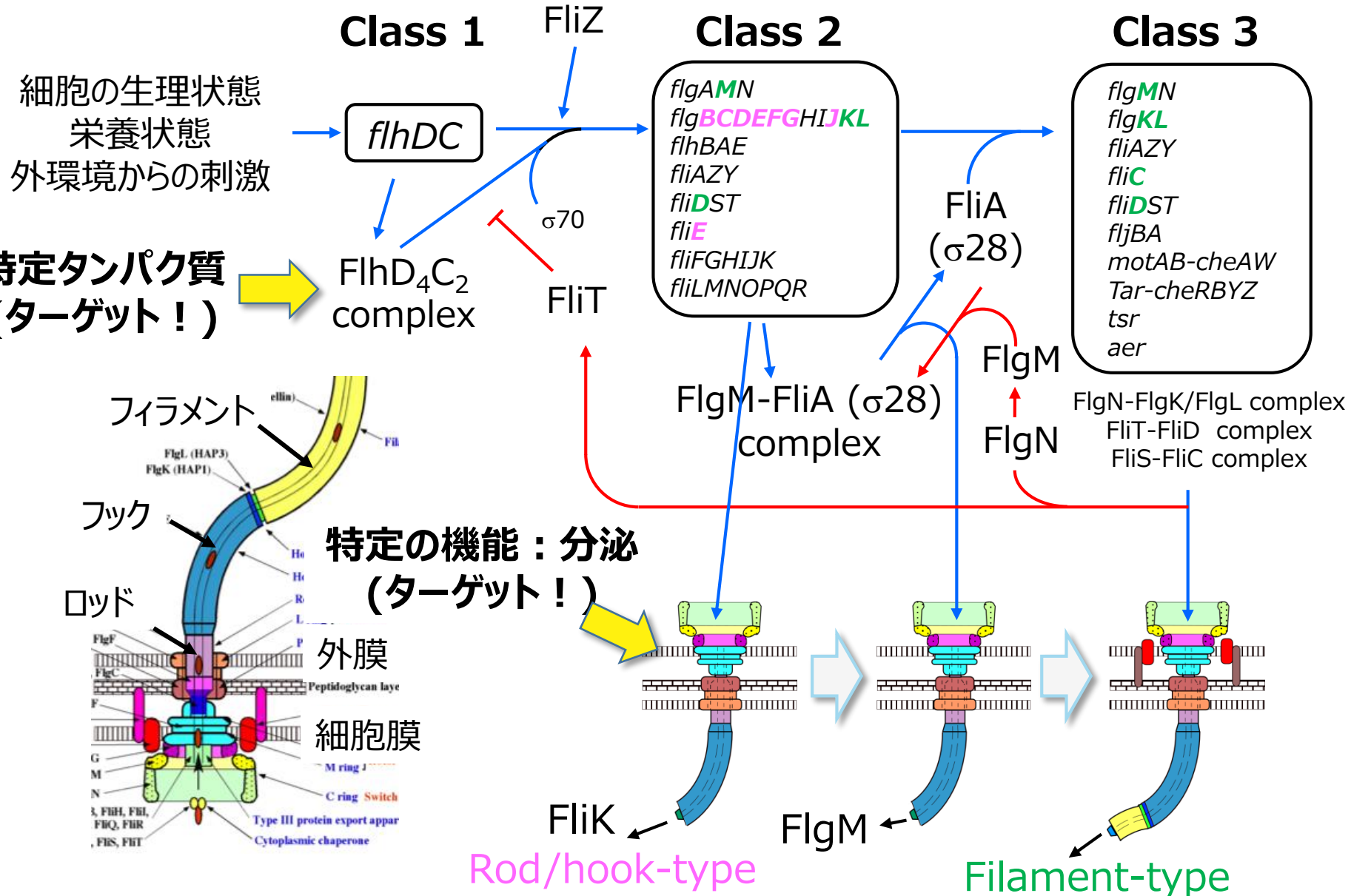
遺伝子発現やIII型分泌装置の構築・分泌過程のどこかを阻害している。
→作用点が不明

阻害剤探索系の問題点

細菌細胞に対する実験系は、栄養状態などグローバルな遺伝子発現の変化が、III型分泌装置の発現・構築・機能に影響するため、阻害剤の効果の検証が難しい。

→**特定タンパク質や、特定の機能に絞って阻害剤探索する必要性**

複雑なべん毛遺伝子群の発現制御



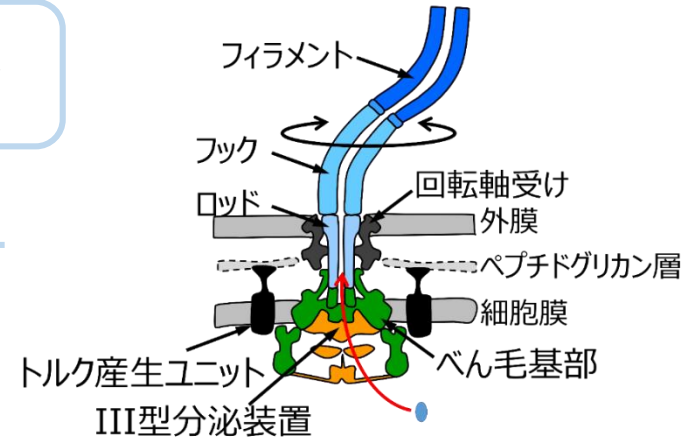
研究目的

III型分泌装置による分泌自体を阻害する薬剤の開発



問題点：

1. III型分泌装置によるタンパク質の分泌機序の理解
 - エネルギー源はどのように使われているのか？
 - 一分子レベルでの分泌過程は？
2. 細菌細胞(in vivo)での実験系は、グローバルな遺伝子発現の変化が、III型分泌装置の構築・機能に影響する。
 - 細胞内の栄養・エネルギー状態が変わるだけでも遺伝子発現に影響受けるため、阻害剤の効果の検証が難しい。



解決策：

遺伝子発現に影響を受けず、条件を厳密に制御可能な、
生化学的なin vitroでのタンパク質分泌再構成系の構築

反転膜小胞を用いた*in vitro*分泌測定系

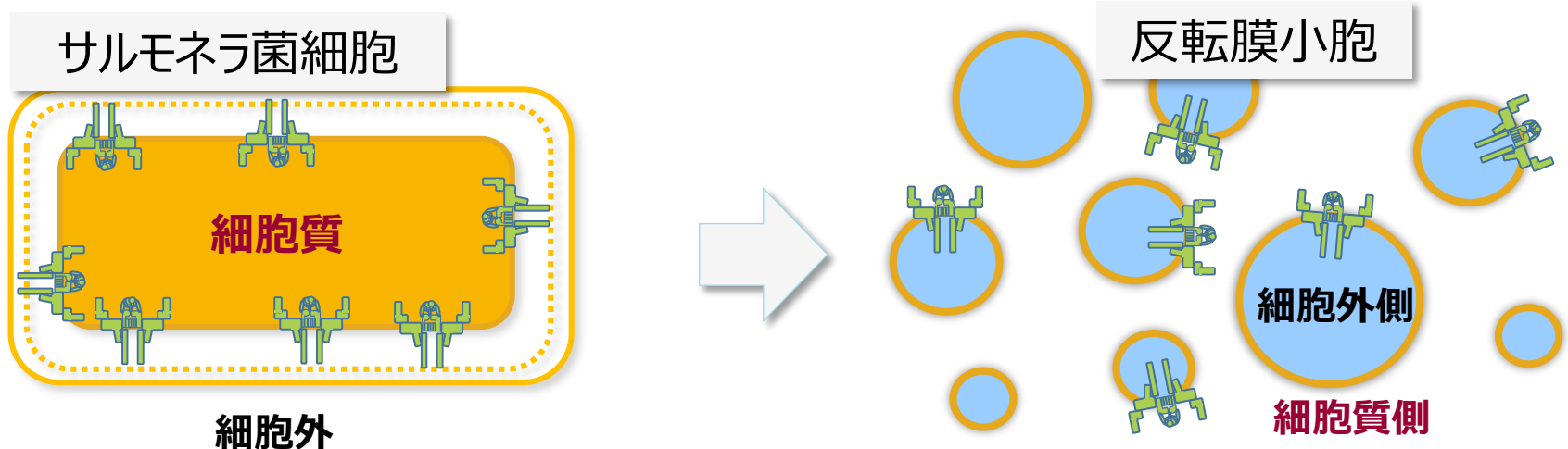
アプローチ1：III型分泌装置の精製・脂質膜再構成

→難易度が高すぎる

1. 膜タンパク質複合体
2. 約200サブユニット、分子量7MDa以上

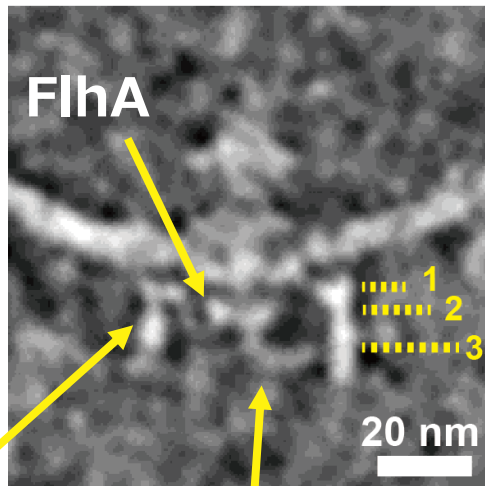
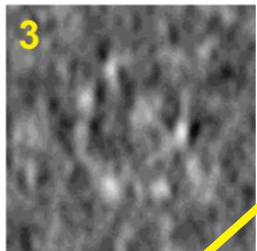
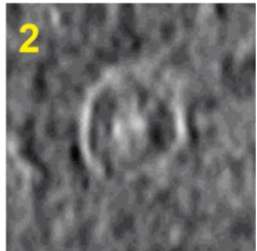
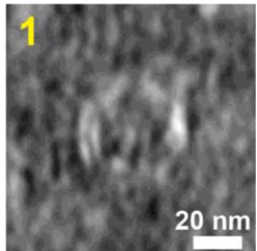
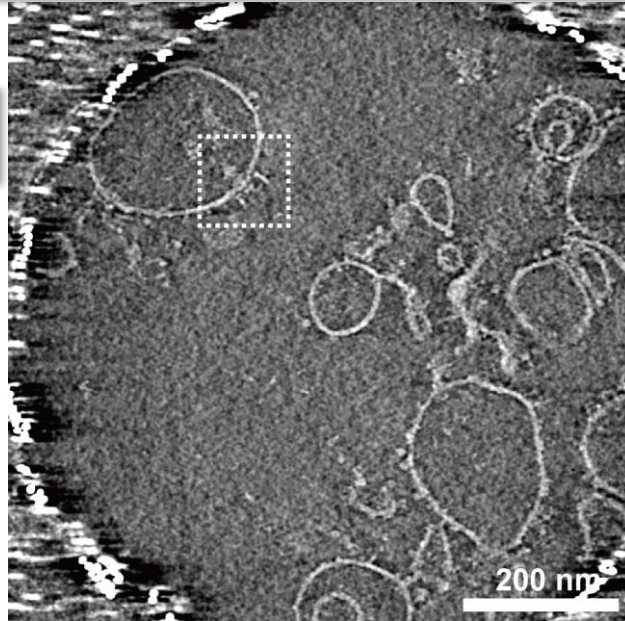
アプローチ2：反転膜小胞を用いた*in vitro*再構成

1. 細胞質側が外側を向くため、条件を制御しやすい
2. 精製する必要がない



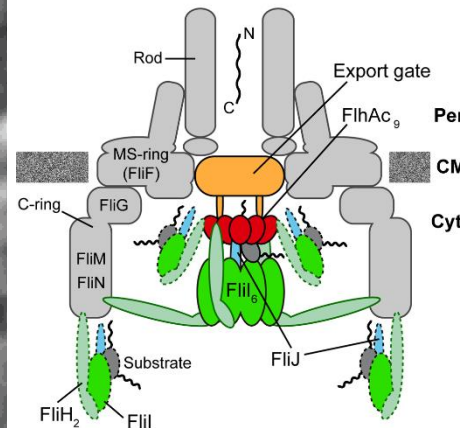
電子線クライオトモグラフィーによる反転膜の観察

IMV *fliHI+*

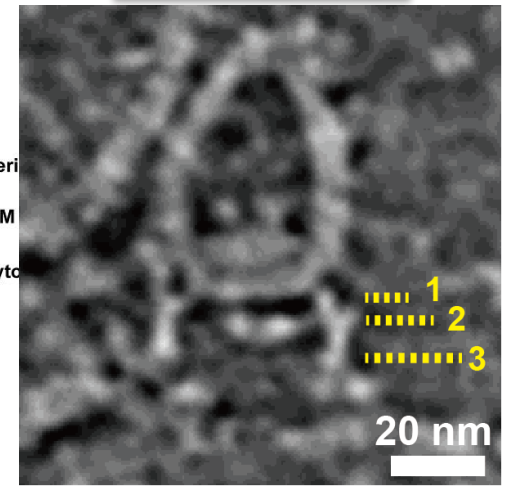


C-ring

FliH/FliI



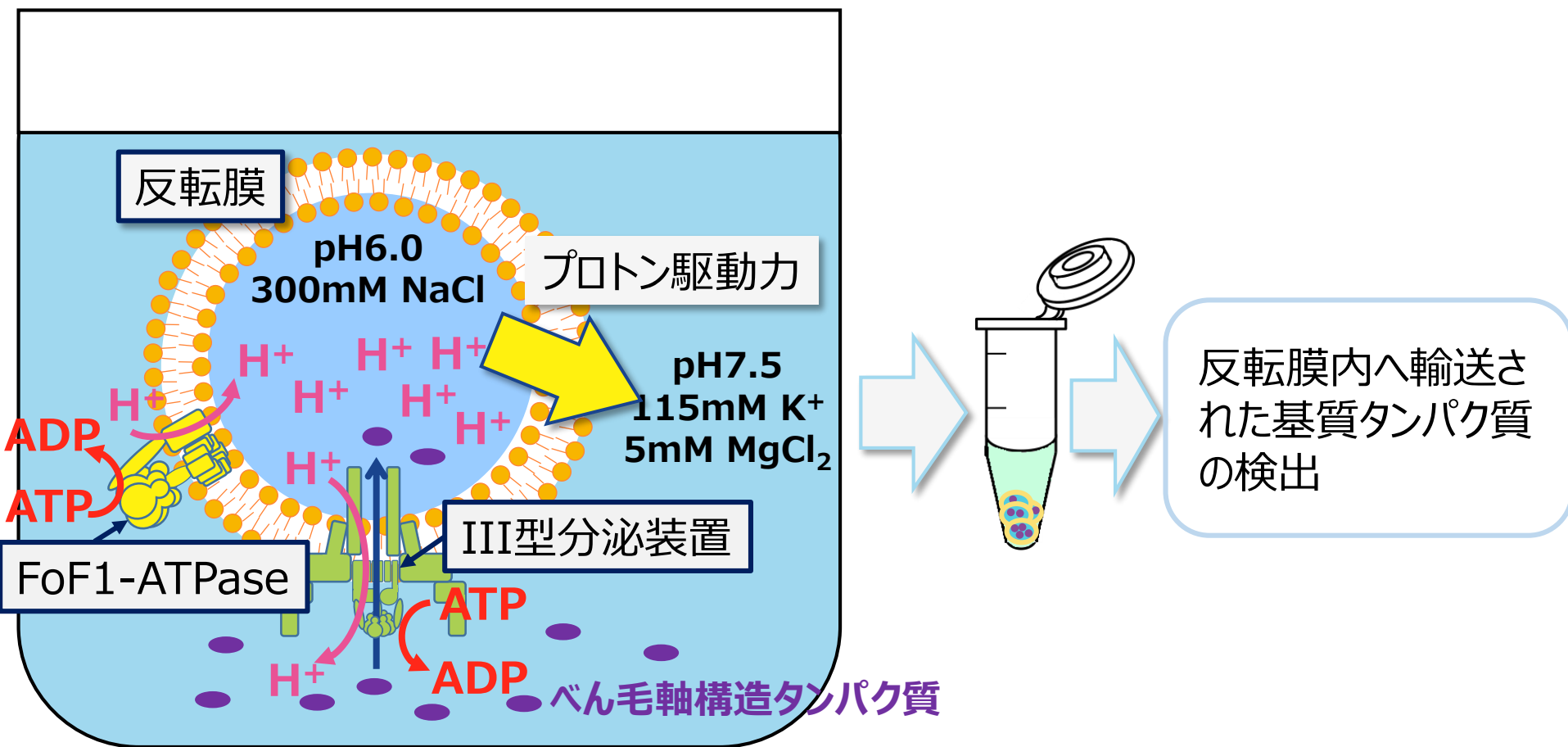
IMV Δ *fliHI*



Terashima *et al*, *mBio*, 2018

Titan Krios (FEI), 300kV, Tilt angle: ± 70
camera: direct detector (Falcon II)

反転膜小胞を用いた *in vitro* 分泌計測系



III型分泌装置のタンパク質分泌のためのエネルギー源

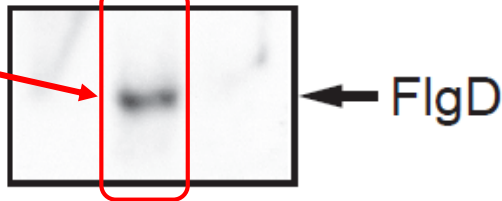
1: **プロトン駆動力が分泌を駆動**

2: **ATP加水分解エネルギーが分泌を促進**

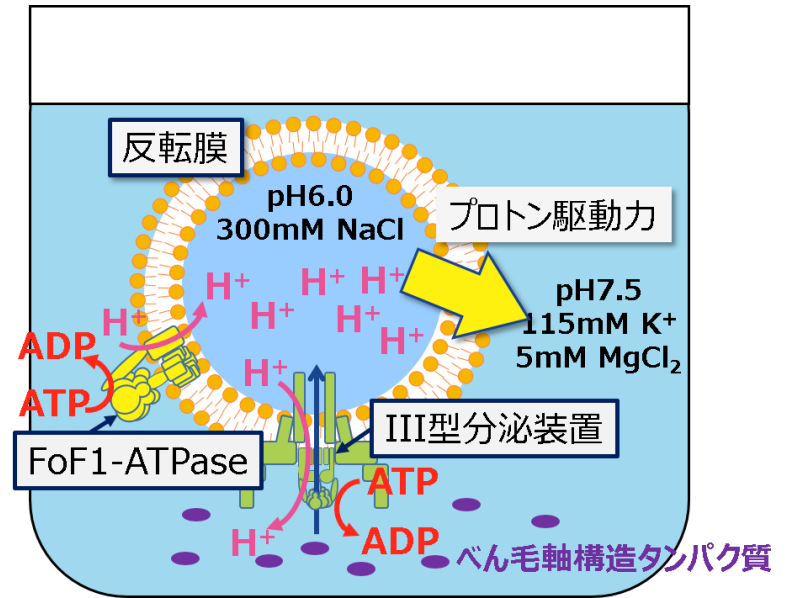
反転膜小胞内へのべん毛タンパク質の輸送

IMV_{ΔfliHI/+ΔpH/pNa}

-	-	-	FliH ₂ /FliI
-	+	+	ATP
-	-	+	CCCP



プロトン駆動力
依存的な分泌



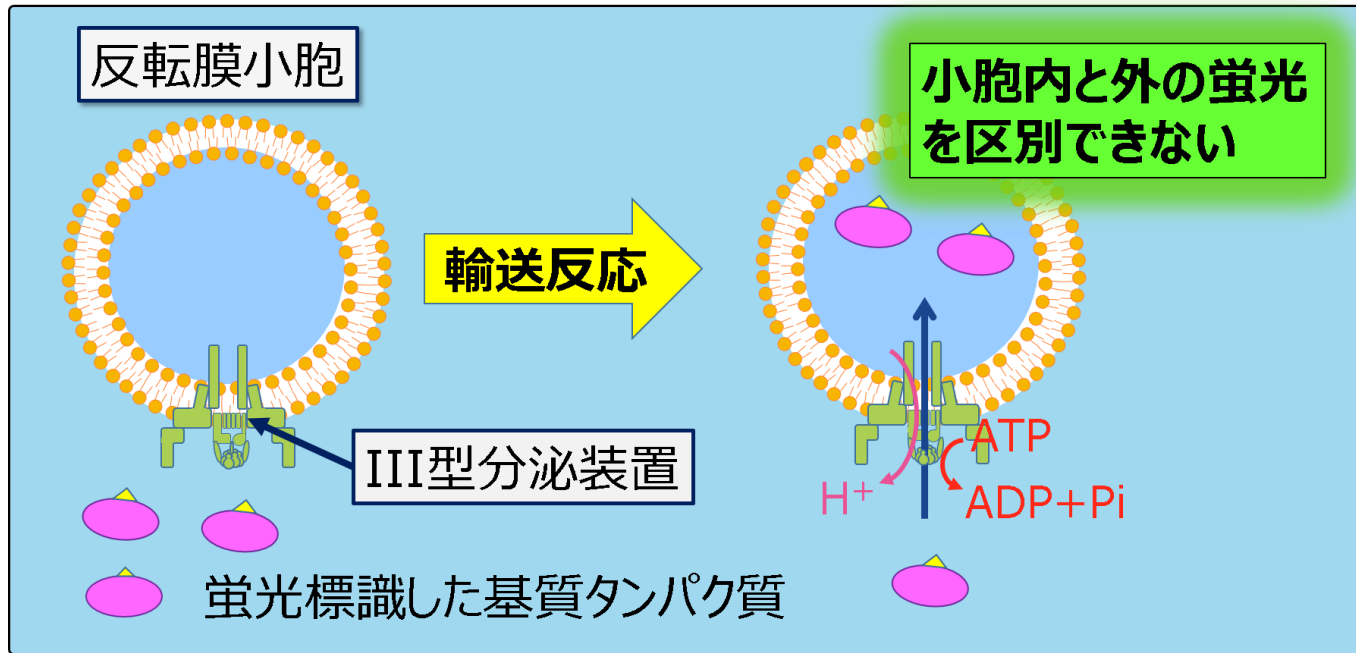
-	-	-	1.5	-	1.5	-	FliI (μM)
-	-	-	-	1.5	-	1.5	FliH ₂ /FliI (μM)
-	0.25	1.5	-	-	0.25	0.25	FliJ (μM)



ATP加水分解エネルギーによる分泌促進

III型分泌装置に対する阻害剤の探索・開発

蛍光標識した基質タンパク質を使った実験の場合。



問題点

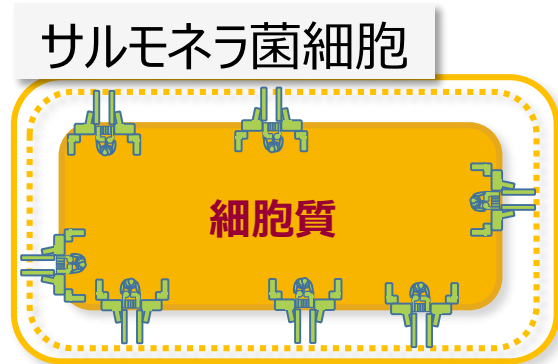
- 蛍光標識した基質タンパク質では、超遠心で反転膜を回収しないと、小胞内と外の蛍光を区別できない。



解決策

- 小胞内に輸送されたときだけ蛍光を発するような実験系を作る。

III型分泌装置に対する阻害剤の探索・開発



細胞外

LacZ Ω を含む菌懸濁液
で反転膜を作製する

反転膜小胞

細胞外側

細胞質側

LacZの α 相補性を使った実験の場合

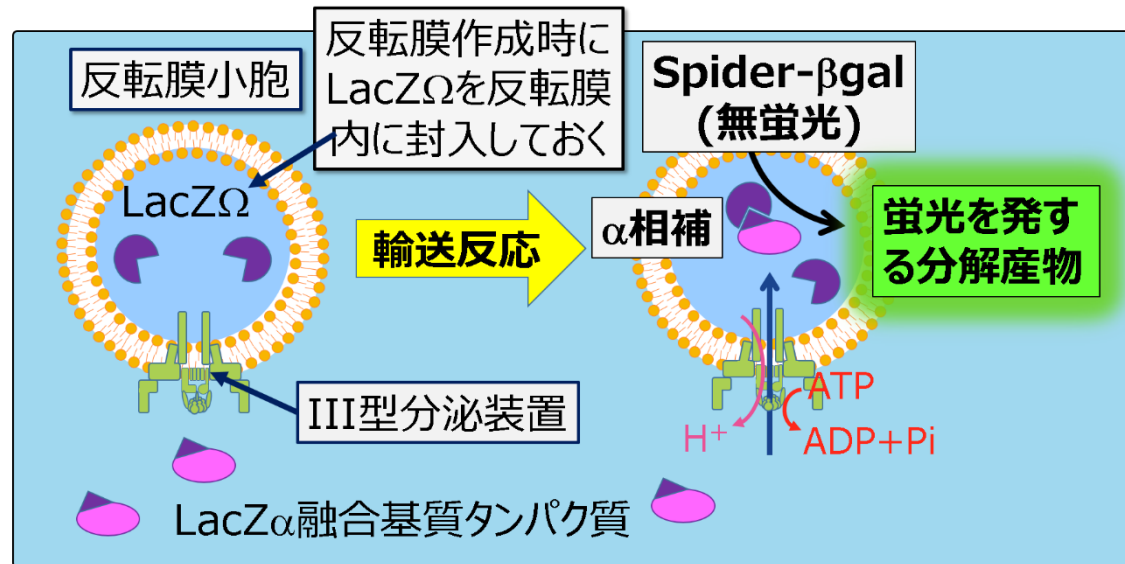
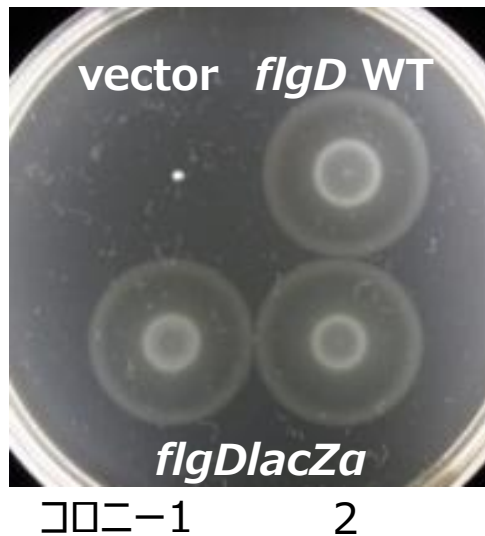


図4、 β ガラクトシダーゼと蛍光基質を用いたIII型分泌装置の*in vitro*輸送アッセイ系。反転膜作成時に反転膜内に不活性型 β ガラクトシダーゼ(LacZ Ω)を封入する。外液にLacZ α 融合基質タンパク質を加え、輸送反応を起こす。反転膜内にLacZ α 融合基質タンパク質が輸送されると、反転膜内のLacZ Ω と活性型 β ガラクトシダーゼを形成し、Spider- β galが分解され蛍光を発する。

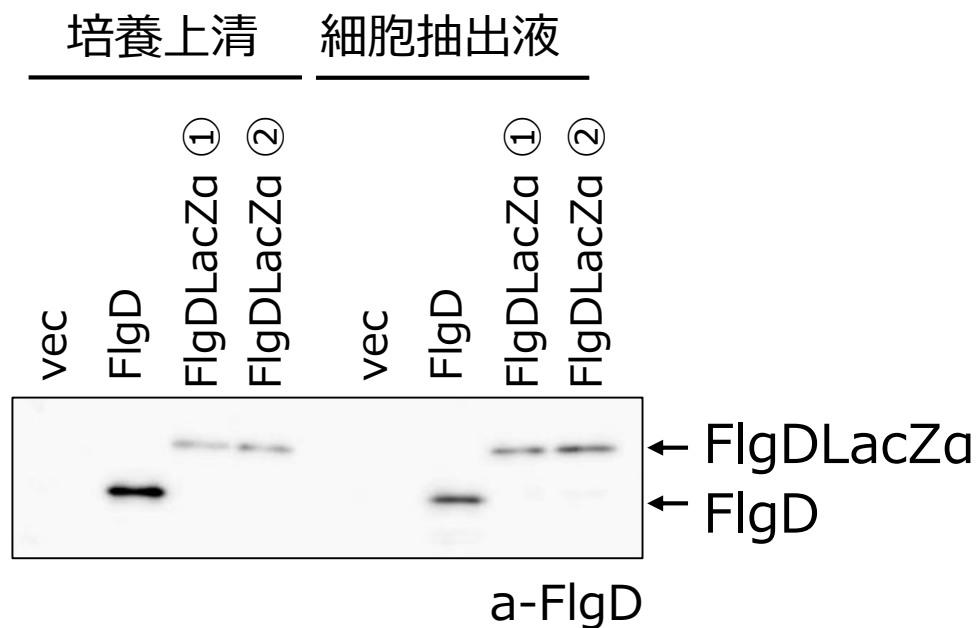
LacZα融合基質タンパク質の機能確認

軟寒天培地中での運動のアッセイ



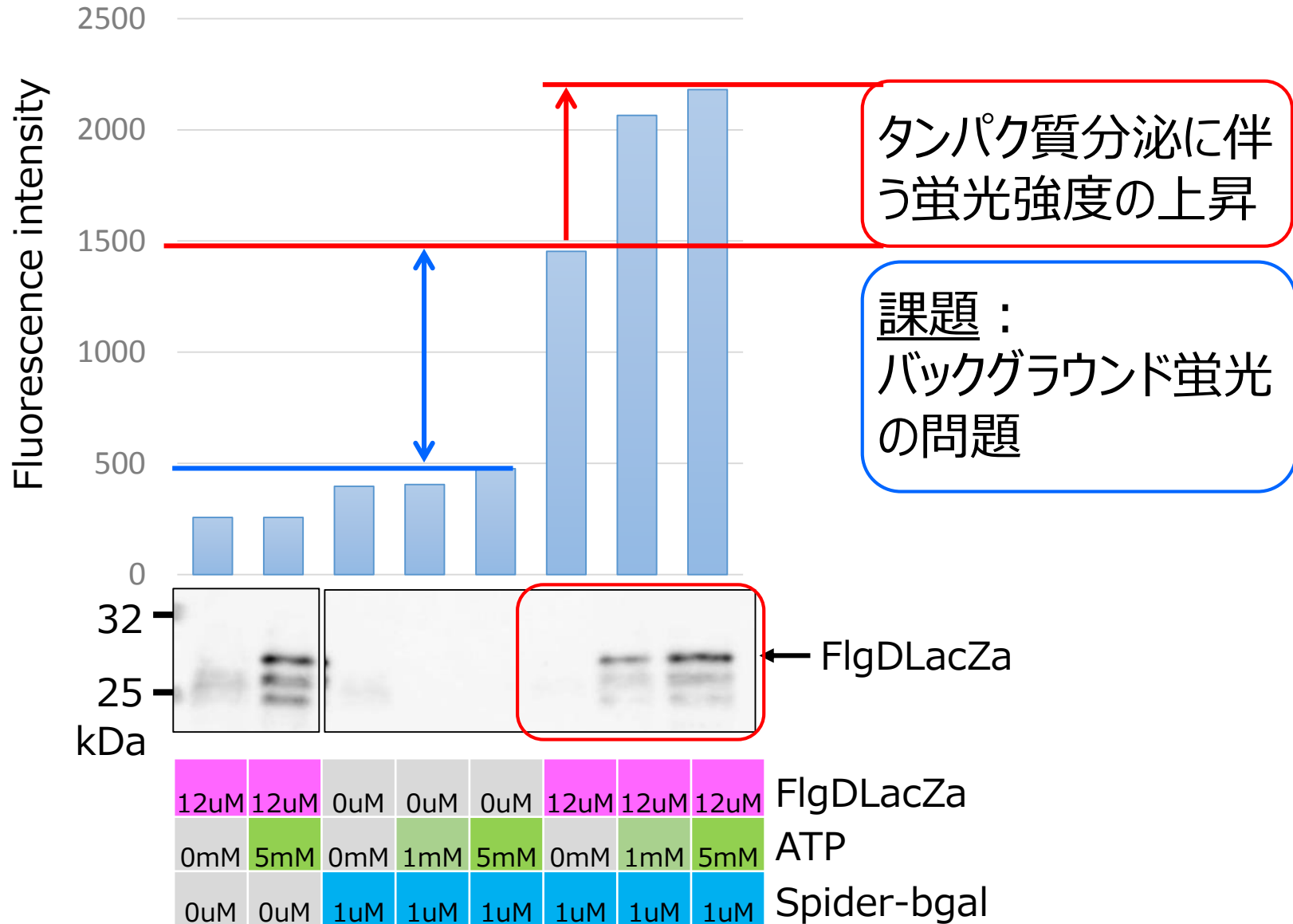
Salmonella Δ *flgD*
/pBAD33-*flhB* + pTrc99aNde-*flgD*
TG 0.3% agar plate, 30°C, 6hrs

細菌細胞からのタンパク質分泌

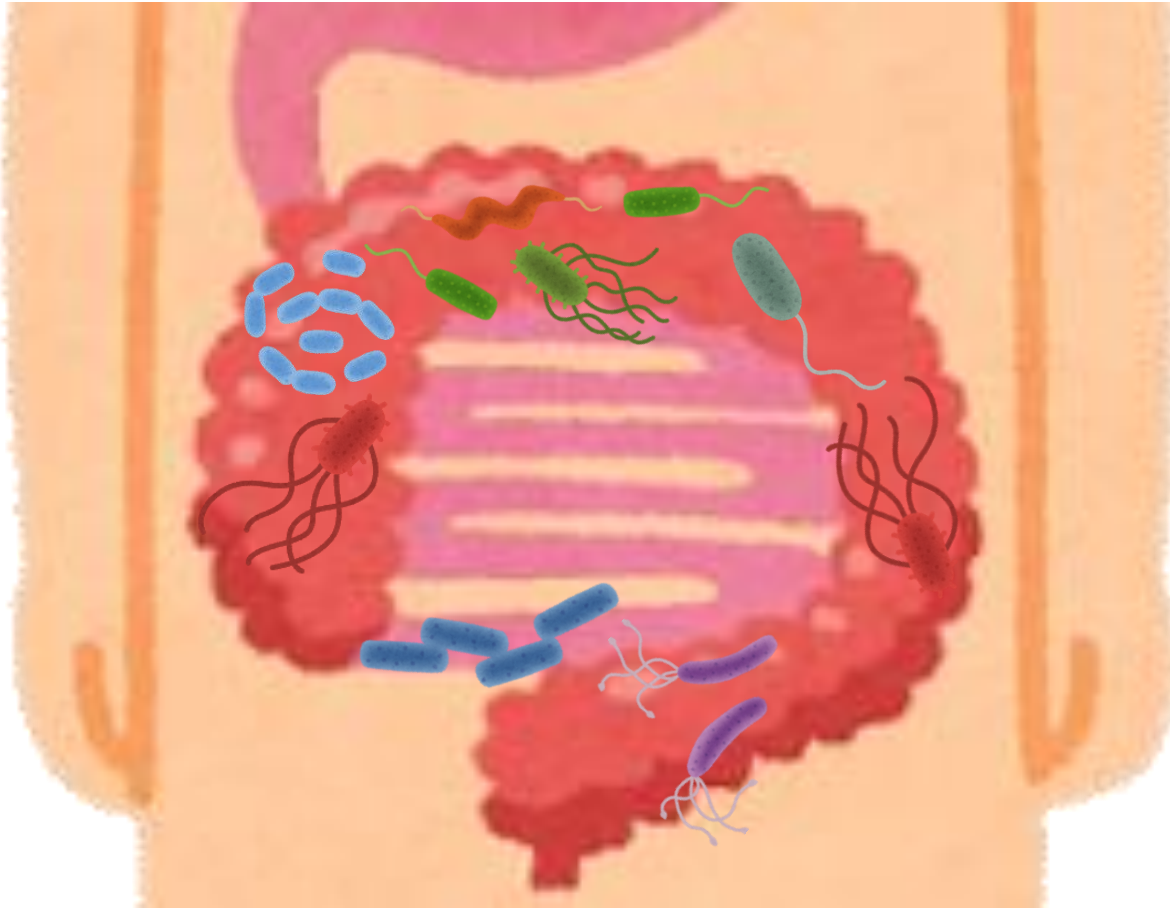


LacZα融合基質タンパク質(FlgDLacZα)は機能的であり、細胞からべん毛III型分泌装置を介して培養上清中に分泌される。

マイクロプレート上での輸送活性測定



III型分泌系阻害剤は何に使える？



腸内細菌叢には、べん毛を持つ菌も持たない菌もいる。



阻害剤でべん毛形成を阻害したら何が起きる？



誰も知らない！！

もしかしたら腸内細菌叢の構成が大きく変化し、宿主に大きく影響するかもしれない。



良い影響？ 悪い影響？

乳酸菌などはべん毛を持たないし、腸内で優勢な嫌気性菌もべん毛を持たないことが多い。

III型分泌装置系

Salmonella enterica

細菌べん毛

インジェクチソーム

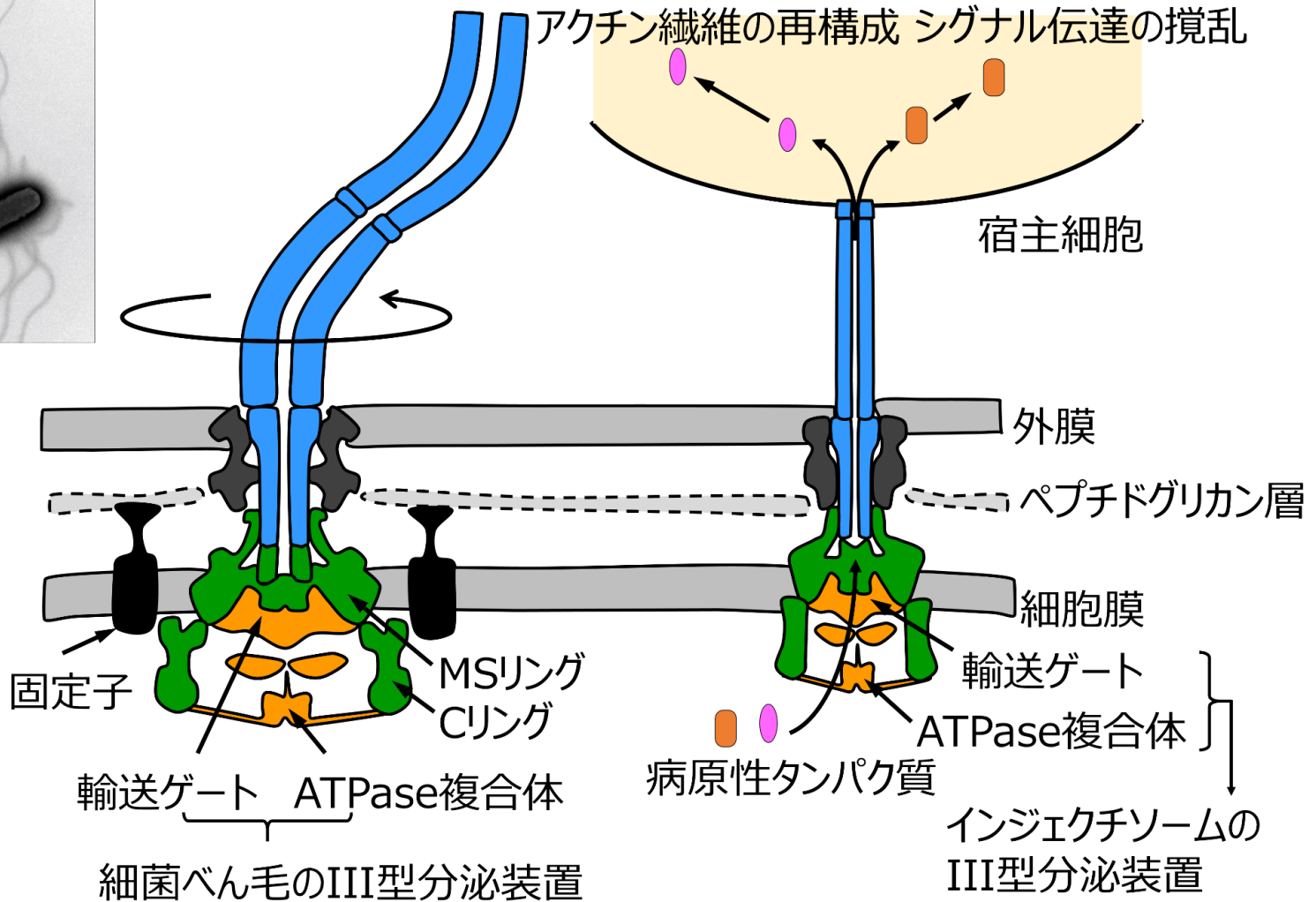
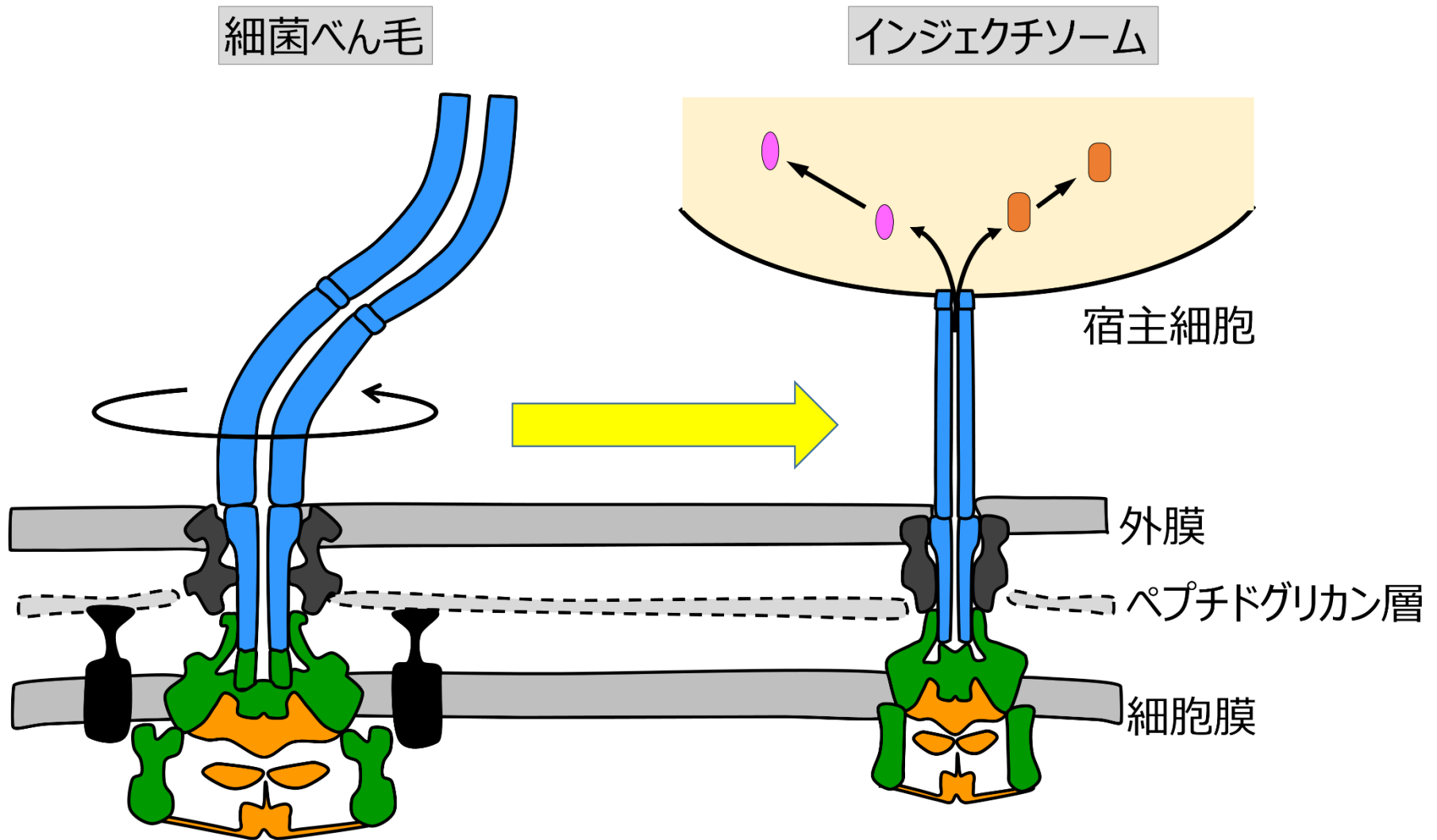


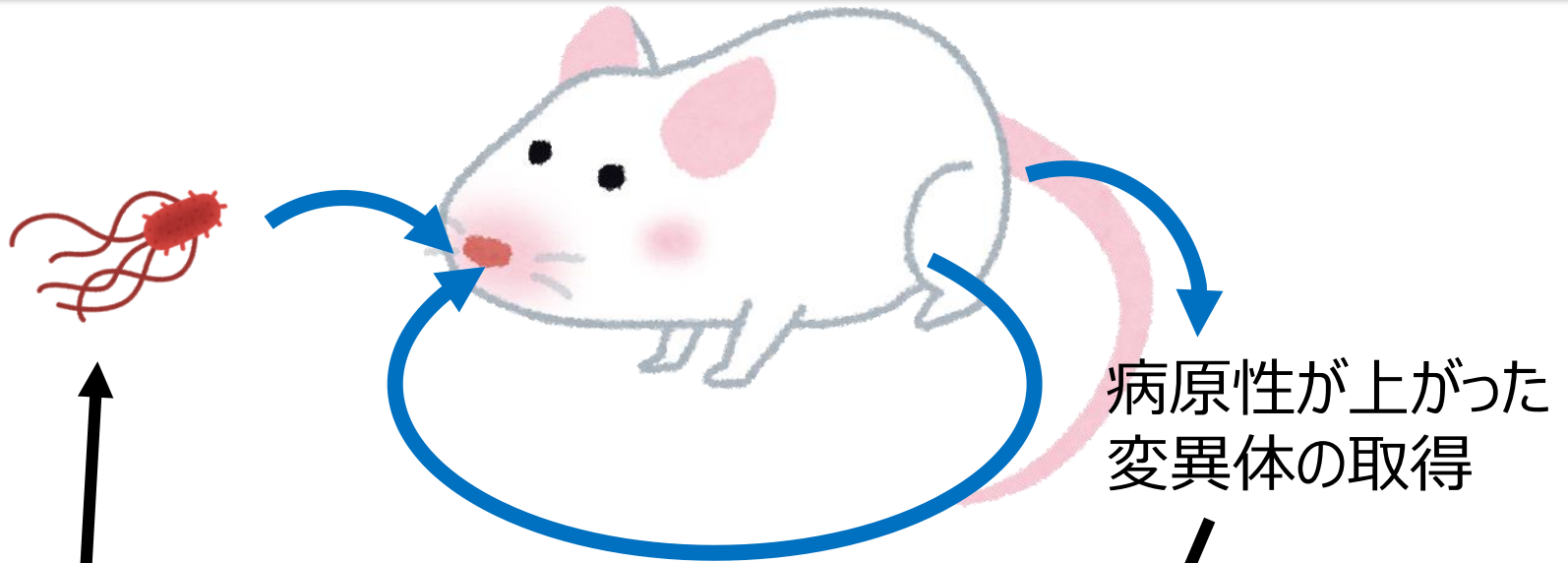
図2、細菌べん毛(左)とインジェクチソーム(右)の模式図。菌体表層上に緑色で示した基部構造が存在し、その内側に橙色のIII型分泌装置が存在している。

細菌べん毛からインジェクチソームへの進化



なにが起きて回転運動器官から分子注射器へと進化したのか？

人工進化実験



遺伝子操作

べん毛からインジェクチソームの病原性タンパク質が分泌されるようにしたサルモネラ菌変異体

繰り返し感染させる
(腸内での選択圧)

病原性が上がった
変異体の取得

ゲノム解析

どのような変異が起きると、べん毛からインジェクチソームへの進化が促進されるのか、実験的に証明する。