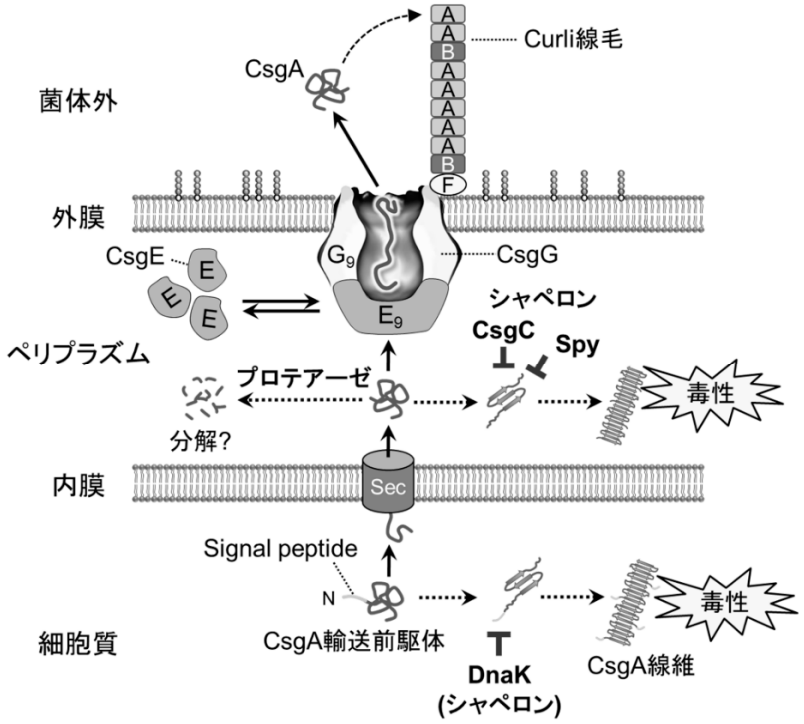
140　VIII型分泌装置の作動原理の解明	杉本　真也

【目的】細菌は多様なタンパク質分泌装置（I〜IX 型）を有する。なかでも、VIII 型分泌装置はタンパク質の分泌と Curli 線毛と呼ばれる菌体外アミロイド線維の形成が共役したユニークな分泌装置である。Curli 線毛は、大腸菌やサルモネラなどの腸内細菌科細菌において“バイオフィルム”と呼ばれる菌の集合体の形成と宿主への付着に重要な役割を担う。そのため、VIII 型分泌装置の作動原理の理解は細菌感染症の予防や治療にも繋がると考えられる。しかし、Curli 線毛を構成するタンパク質が菌体内でアミロイド線維を形成しないようにどう制御されているかは不明である。本研究では、Curli 線毛構成タンパク質の細胞内における品質管理機構を明らかにすることを目指した。

【方法】大腸菌一遺伝子欠損株ライブラリーを用いて、Curli 線毛の産生に必須な分子シャペロン・プロテアーゼ遺伝子を探索した。Curli 線毛の産生の有無は、Congo Red 含有平板培地による呈色試験、Western blotting、透過電子顕微鏡観察により評価した。試験管内タンパク質合成システム（PURE System）を用いて、タンパク質のフォールディングや凝集に与える分子シャペロンの効果を評価した。蛍光タンパク質を融合した Curli 線毛構成タンパク質（CsgA-sfGFP）を発現させることで、大腸菌細胞内での動態を可視化した。表面プラズモン共鳴法やペプチドスキャン法を用いて、分子間相互作用を詳細に解析した。

【結果】Curli 線毛の産生に必須な因子として、細胞質においてタンパク質のフォールディングを助ける分子シャペロン DnaK を同定した。DnaK は Curli 線毛の産生に必須な転写因子 RpoS および CsgD のフォールディングを助けることで VIII 型分泌装置の遺伝子発現を正に制御することが分かった。また、DnaK は凝集しやすい性質を持つ CsgA のシグナル配列の N 末端数アミノ酸を認識して結合することで、細胞質での凝集体形成を抑制し、ペリプラズムへの輸送を促進することが分かった。さらに、ペリプラズムでは、複数の分子シャペロンとプロテアーゼが CsgA の質と量を制御することを見出した。以上より、VIII 型分泌装置の細胞内における品質管理機構の一端を明らかにした。さらに詳細な分子機構を明らかにすることで、バイオフィルムに関連した感染症の予防・治療法の開発に繋がると期待される。

VIII 型分泌装置の品質管理機構



140. VIII 型分泌装置の作動原理の解明

杉本　真也

東京慈恵会医科大学 医学部 細菌学講座

Key words：Curli 線毛，アミロイド線維，VIII 型分泌装置，分子シャペロン，プロテアーゼ

緒　言

地球上の生物は、細胞膜で囲まれた細胞を生命の基本単位としており、その中で様々な生理機能を担う中心はタンパク質である。タンパク質が生体内で適切に機能するためには、タンパク質の合成の場である細胞質から各細胞内小器官へと運ばれたり、細胞外へ分泌されたりする必要がある。タンパク質の輸送・分泌についての理解を深めることは、細菌からヒトまで共通した基本的な生命現象を理解する上で極めて重要である。細菌は多様なタンパク質分泌装置を保有しており、これまでに細菌からヒトまで保存された Sec トランスロコンに加え、9 つの分泌装置がグラム陰性菌・陽性菌において報告されている［1］。それらの機能は菌体外酵素の分泌、毒素の産生と宿主細胞への注入、DNA の取り込み、薬剤耐性プラスミドの伝播など多岐に渡る。なかでも、VIII 型分泌装置はタンパク質の分泌と Curli 線毛と呼ばれる菌体外アミロイド線維の形成が共役したユニークな分泌装置である［2］。Curli 線毛は、大腸菌やサルモネラ菌などの腸内細菌科細菌において“バイオフィルム”と呼ばれる菌の集合体の形成と宿主への付着に重要な役割を担う。そのため、VIII 型分泌装置の作動原理の理解は、細菌感染症の予防や治療にも繋がると考えられる。しかし、Curli 線毛を構成するタンパク質が菌体内でアミロイド線維を形成しないようにどのように制御されているかは不明である。本研究では、Curli 線毛構成タンパク質の細胞内におけるタンパク質品質管理機構を明らかにすることを目指した。

方法および結果

1. バイオフィルム形成および Curli 線毛の産生に必須な分子シャペロン・プロテアーゼ遺伝子の探索

大腸菌 BW25113 株およびその一遺伝子欠損株ライブラリー（Keio collection）［3］を用いて、バイオフィルム形成および Curli 線毛の産生に必須な分子シャペロン・プロテアーゼ遺伝子を探索した。大腸菌を YESCA 培地（1% Tryptone, 0.1% Yeast Extract）で 7 日間、30℃で培養し、96 ウェルプレートの壁面に形成されたバイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色し、定量した［4，5］。Curli 線毛の産生は、Congo Red 呈色試験・抗 CsgA 抗体を用いたウェスタンブロッティング・透過型電子顕微鏡観察で評価した［4，5］。その結果、細胞質に局在する分子シャペロン DnaK と ATP 依存性プロテアーゼ Lon および ClpP がバイオフィルム形成に重要であり、特に DnaK をコードする遺伝子の欠損により、Curli 線毛の産生が顕著に低下することを見出した（図 1）。一方、その他の分子シャペロンやプロテアーゼ遺伝子の欠損は Curli 線毛の産生に大きく影響しないことがわかった。これらの結果より、細胞質では DnaK が Curli 線毛の遺伝子発現や構成タンパク質の品質管理に特に重要な役割を果たすと考えられる。

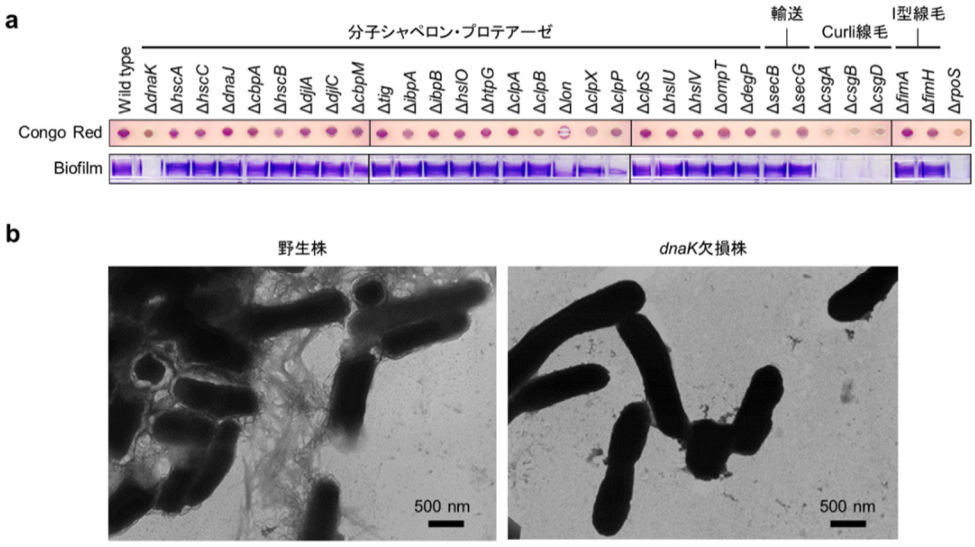


図 1. 大腸菌のバイオフィルム形成および Curli 線毛の産生

a) 野生株および遺伝子欠損株のバイオフィルム形成と Curli 線毛の産生 (Congo Red の呈色)。

b) 透過電子顕微鏡像。

2. VIII 型分泌装置の遺伝子発現における DnaK の役割

マイクロアレイおよび定量的 RT-PCR を用いて、BW25113 野生株と *dnaK* 欠損株における VIII 型分泌装置関連遺伝子の発現を比較した。マイクロアレイの測定結果、*dnaK* 欠損株では σ^S により制御を受ける多数の遺伝子の転写産物が減少し、σ^{32} により制御を受ける遺伝子の転写産物は増加していた (図 2)。σ^S により制御を受ける多数の遺伝子には、VIII 型分泌装置に関わる *csgABCDEFG* も含まれ、特に *csgA* mRNA および *csgB* mRNA の顕著な減少が認められた (図 2)。定量的 RT-PCR 解析においても同様に、*csgA* mRNA および *csgD* mRNA の減少が見られた (図 2)。これらより、DnaK が *csg* 遺伝子群の発現を正に調節する σ^S の量および質をコントロールする可能性が示唆された。

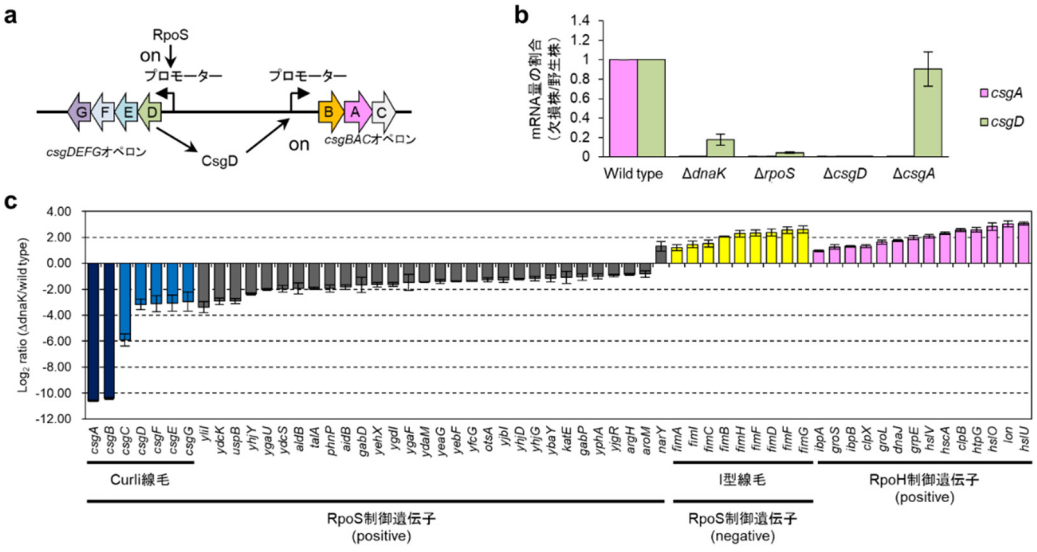


図 2. 野生株と *dnaK* 欠損株の遺伝子発現の比較

a) *csg* 遺伝子群の発現調節機構。b) 定量的 RT-PCR による *csgA* mRNA および *csgD* mRNA の測定。c) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現の解析 (結果の一部を示す)。

3. RpoS の品質管理における DnaK の役割

YESCA 培地で培養した大腸菌を集菌し、超音波処理により菌体を破砕後、遠心分離により可溶性画分を得た。遠心分離前の画分と可溶性画分を SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロッティングにより σ^S を検出した。その結果、*dnaK* 欠損株では遠心分離前の画分に含まれる σ^S が若干減少し、可溶性の σ^S が顕著に減少した（図 3）。このことから、DnaK は σ^S のフォールディングを助けることが示された。

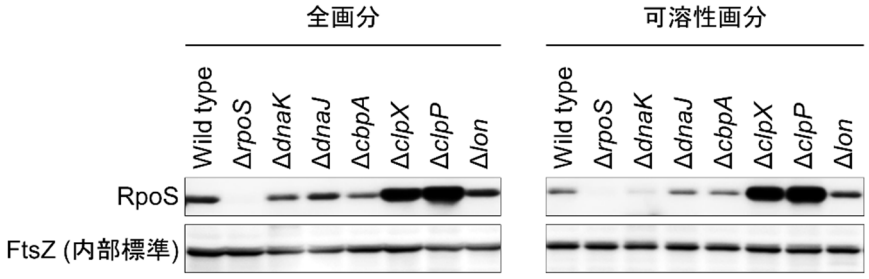


図 3. 野生株と *dnaK* 欠損株における σ^S の量と質の比較
全画分と可溶性画分に含まれる σ^S をウェスタンブロッティングで検出した。

4. CsgD の品質管理における DnaK の役割

dnaK 欠損株では CsgD の発現が著しく低下するため（図 2）、CsgDEFG を強制的に共発現する系を用いて、CsgD の品質管理における DnaK の役割を解析した。CsgDEFG を強制的に発現させた *dnaK* 欠損株は、*dnaK* 欠損株と同様にバイオフィルムを形成できず、Curli 線毛の産生も見られなかった（図 4）。この株では、CsgD は合成されているものの、その大部分が不溶性凝集体を形成していた（図 4）。無細胞タンパク質合成系（PURE System）を用いた CsgD のフォールディング実験の結果、DnaK シャペロンシステム（DnaK とその補因子 DnaJ および GrpE から成る）の添加により可溶性で DNA 結合活性のある CsgD が合成されることが分かった。

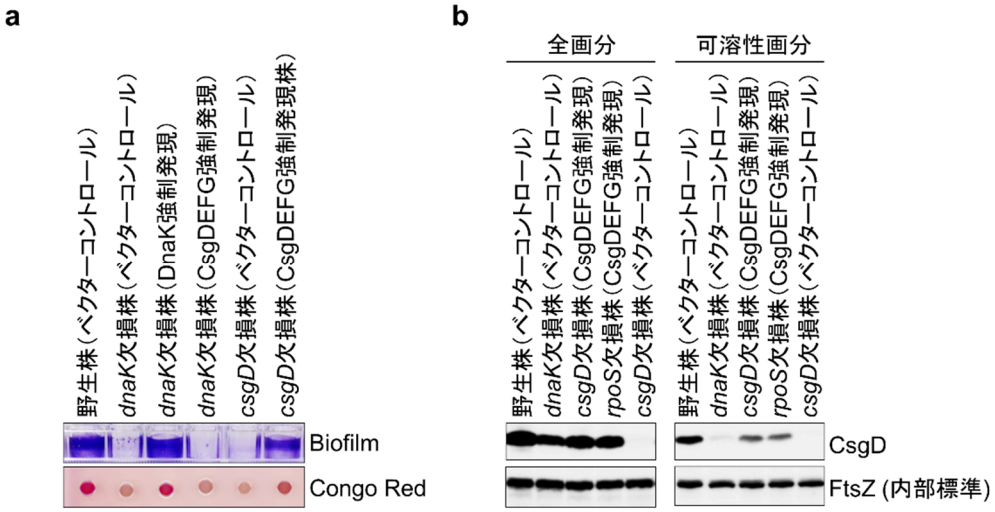


図 4. CsgD のフォールディングにおける DnaK の役割
a）各菌株のバイオフィルム形成と Curli 線毛の産生（Congo Red による呈色）。
b）各菌株での全画分と可溶性画分に含まれる CsgD をウェスタンブロッティングで検出。

5. CsgA の品質管理および輸送における DnaK の役割

菌体外でアミロイド線維を形成する CsgA はリボソームで合成された後、Sec トランスロコンを通過して細胞質からペリプラズムへ輸送される。これらのタンパク質が正しく輸送されるためには、細胞質で凝集体を形成することを抑制する必要がある。そこで、DnaK が細胞質での CsgA の品質管理と輸送における役割を解析した。CsgA がペリプラズムに輸送された際に菌の縁が緑に光るように設計した大腸菌（CsgA-sfGFP を発現する）を用いて、*dnaK* 遺伝子欠損の影響を調べた。その結果、野生株では菌の縁が光り、*dnaK* 欠損株では細胞質に多数の輝点（凝集体）が観察された（図 5）。細胞分画によって野生株では CsgA-sfGFP がペリプラズムへ輸送されたことと、*dnaK* 欠損株では CsgA-sfGFP が細胞質で凝集していることが確認された。PURE System を用いた解析結果から、DnaK は CsgA の凝集を抑制するが、他の分子シャペロン（GroE、SecB）にはそのような効果は見られなかった。変異体解析の結果から、CsgA の凝集しやすい性質はアミロイド線維を形成する部分（Ser 43～Tyr 151）ではなく、N 末端のシグナル配列（Lys 2～Ala 20）が規定することを見出した。また、表面プラズモン共鳴法を用いて DnaK と CsgA の相互作用を解析したところ、DnaK は CsgA のシグナル配列（Lys 2～Ala 20）に強く結合することが示された（K_D = 2.19 nM）。さらに、ペプチドスキャン法により DnaK の認識配列を詳細に解析したところ、CsgA のシグナル配列のうち N 末端領域（Lys 2～Ile 9）を認識することが分かった。これらの結果より、細胞質で凝集しやすいという CsgA の性質はシグナル配列に依存しており、DnaK はその部分に特異的に結合することで CsgA の凝集を抑え、ペリプラズムへの輸送を助けるという予想外の知見を得ることができた。

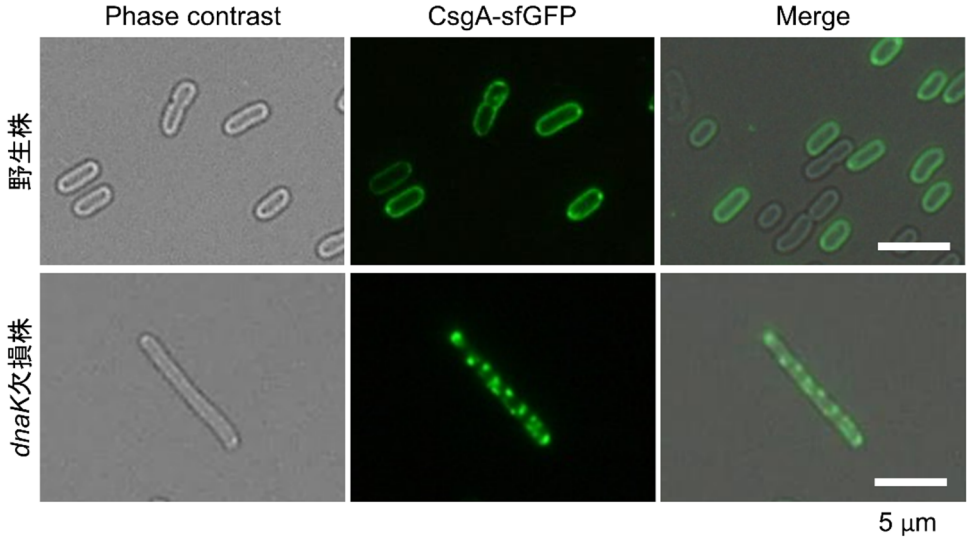


図 5. CsgA のペリプラズムへの輸送と凝集体形成の可視化
野生株と *dnaK* 欠損株で CsgA-sfGFP を発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。CsgA-sfGFP がペリプラズムへ輸送されると菌の縁が緑に光り、凝集体を形成すると輝点が観察される。

6. ペリプラズムにおける Curli 線毛構成タンパク質の品質管理

ペリプラズムに局在する分子シャペロンおよびプロテアーゼ遺伝子の単独遺伝子欠損は Curli 線毛の産生に影響を与えなかったことから、タンパク質の品質管理に関わる複数の因子が相補的に機能する可能性が考えられた。そこで、Wanner らの手法［6］を用いてペリプラズムに局在する分子シャペロンおよびプロテアーゼをコードする遺伝子の多重欠損株を作製し、Curli の産生を評価した。その結果、これまで試験管内で CsgA のアミロイド線維形成を抑制することが報告されている CsgC［7］および Spy［8］を含む複数のペリプラズムシャペロンを同時に欠損すると Curli 線毛の産生が著しく低下することを見出した。また、ペリプラズムに局在する 22 個のプロテアーゼのうち、2 種類のプロテアーゼを同時に欠損すると Curli 線毛の産生が促進することが分かった。これらの結果より、ペリプラズムに局在する複数のシャペロン・プロテアーゼが相補的に機能することで、Curli 線毛構成タンパク質の質と量が制御されていることがわかった。

考　察

本研究成果により、VIII 型分泌装置の作動原理、特に Curli 線毛を構成するタンパク質が細胞質とペリプラズムというグラム陰性菌の異なる細胞区画においてどのように品質管理を受けているのか、そのメカニズムの一端を解明することができた。特に細胞質における DnaK の役割については分子レベルでの詳細なメカニズムを明らかにすることができた［5］。細胞質では DnaK という分子シャペロンが多面的に機能することで、その大部分の役割を担っていることが示されたが、ペリプラズムでは複数の分子シャペロンやプロテアーゼが関与する複雑な制御システムが存在することが分かった。何故、ペリプラズムではより複雑な制御を必要とするのか、その生物学的意義や VIII 型分泌装置の作動原理の全体像の把握は今後の課題であり、更なる研究の進展に期待したい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学細菌学講座の水之江義充、熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野の小椋光、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門の佐藤主税である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Chagnot C, Zorgani MA, Astruc T, Desvaux M. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. Front Microbiol. 2013 Oct 14;4:303. doi: 10.3389/fmicb.2013.00303

2) Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S, Hultgren SJ. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. Science. 2002 Feb 1;295(5556):851-5. DOI: 10.1126/science.1067484.

3) Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol. 2006;2:2006.0008. Epub 2006 Feb 21. DOI: 10.1038/msb4100050.

4) Arita-Morioka K, Yamanaka K, Mizunoe Y, Ogura T, Sugimoto S. Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jan;59(1):633-41. doi: 10.1128/AAC.04465-14. Epub 2014 Nov 17.

5) Sugimoto S, Arita-Morioka K, Terao A, Yamanaka K, Ogura T, Mizunoe Y. Multitasking of Hsp70 chaperone in the biogenesis of bacterial functional amyloids. Commun Biol. 2018 May 31;1:52. DOI: 10.1038/s42003-018-0056-0. eCollection 2018.

6) Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6640-5. DOI: 10.1073/pnas.120163297.

7) Evans ML, Chorell E, Taylor JD, Åden J, Götheson A, Li F, Koch M, Sefer L, Matthews SJ, Wittung-Stafshede P, Almqvist F, Chapman MR. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. Mol Cell. 2015 Feb 5;57(3):445-55. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.025. Epub 2015 Jan 22.

8) Evans ML, Schmidt JC, Ilbert M, Doyle SM, Quan S, Bardwell JC, Jakob U, Wickner S, Chapman MR. *E. coli* chaperones DnaK, Hsp33 and Spy inhibit bacterial functional amyloid assembly. Prion. 2011 Oct-Dec;5(4):323-34. doi: 10.4161/pri.18555. Epub 2011 Oct 1.