

細菌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

2013 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

扇田 隆司

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Takashi Ohgita, Naoki Hayashi, Susumu Hama, Hiroyuki Tsuchiya, Naomasa Gotoh, and Kentaro Kogure: A novel effector secretion mechanism based on proton-motive force-dependent type III secretion apparatus rotation. *FASEB J.*, **27**, 2862-2872 (2013). [第 2 章]
- 2) Takashi Ohgita, Naoki Hayashi, Naomasa Gotoh, and Kentaro Kogure: Suppression of type III effector secretion by polymers. *Open Biol.*, **3**, 130133 (2013). [第 3 章および第 4 章]

目次

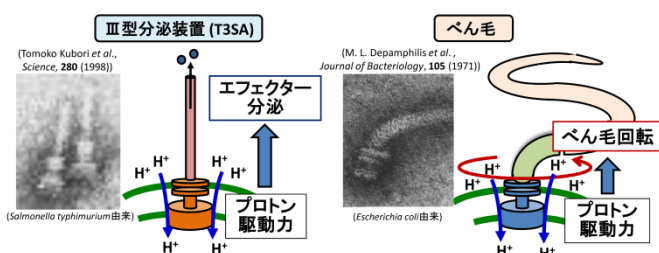
要旨	1~2
第1章 緒言	3~9
1-1. 細菌感染症と抗菌薬の現状	3
1-2. III型分泌装置の機能と未解決の問題	4
1-3. T3SA ニードル内でのタンパク質の移動に関するシミュレーション実験	6
1-4. 細菌べん毛との類似性に基づいた T3SA の回転の可能性と本研究の目的	8
第2章 III型分泌装置の回転運動評価系の構築	10~31
2-1. 序論	10
2-2. 実験方法	13
2-3. 結果	16
2-4. 考察	27
第3章 III型分泌装置の回転-エフェクター分泌関連の検討	32~47
3-1. 序論	32
3-2. 実験方法	33
3-3. 結果	34
3-4. 考察	43
第4章 高粘性環境におけるIII型分泌装置の回転阻害を介したエフェクター分泌制御 に関する可能性の検討	48~58
4-1. 序論	48
4-2. 実験方法	49
4-3. 結果	50
4-4. 考察	56
第5章 総括と今後の展望	59~69
5-1. 本研究の成果	59
5-2. 回転-分泌機構仮説は緑膿菌以外のIII型分泌やべん毛タンパク質輸送においても 成立するのか？	61
5-3. IV型分泌装置の回転運動の可能性	64
5-4. 抗 T3SA 抗体のワクチン効果と T3SA の回転阻害	65
5-5. 現在の T3SA 回転運動評価系の問題点と今後の改善策	66
謝辞	70
参考文献	71~76

要旨

1. 緒言

細菌感染症は抗菌薬の開発により治療可能となったが、既存抗菌薬が効かない薬剤耐性菌の出現が新たな問題となっている。これに対応するには、既存抗菌薬とは作用機序の異なる新規抗菌薬の開発が必要となる。III型分泌装置 (T3SA) は緑膿菌などのグラム陰性細菌が保有する注射器型タンパク質分泌装置であり、細菌感染に重要なエフェクタータンパク質の分泌に関与する。そのため、T3SA は新規抗菌薬の作用標的として有望であるが、T3SA のエフェクター分泌機構、特にニードル内でのエフェクター輸送機構は現時点では解明できていない。

T3SA は細菌べん毛と高い構造類似性を示す。また、T3SA を介したエフェクター分泌はべん毛回転と同様にプロトン駆動力を必要とする。このような T3SA とべん毛の構造・機能性の両面における高い類似性



T3SAとべん毛は構造、機能性の両面で高い類似性を示す。

(仮説)

T3SAはプロトン駆動力を利用してニードルを回転させることでエフェクター輸送の駆動力を産出しているのではないかと仮説を立てた。

図1. 細菌べん毛との類似性に基づいたIII型分泌装置のエフェクター分泌機構仮説

に基づき、著者は「T3SA はプロトン駆動力を利用して回転することで、エフェクター輸送の駆動力を産出するのではないかと仮説を立てた (図1)。しかし、これまでに T3SA の回転を観察したという報告はない。そこで本研究では日和見感染菌として臨床上の重要性が高い緑膿菌をモデル細菌として T3SA の回転評価系を新たに構築し、T3SA が回転することの立証を試みた。さらにエフェクター分泌過程における T3SA 回転の関与についても検討を行った。

2. III型分泌装置の回転運動評価系の構築

T3SA ニードルは細くて短いため、その動きを直接顕微鏡で観察することは難しい。また、T3SA は複数のサブユニットからなる複雑な装置であり、機能性を保持して人工膜に再構成することも困難である。そこで、本研究では緑膿菌細胞膜上の T3SA に回転観察用プローブとしてストレプトアビジンコート蛍光ビーズを特異的に結合させることで、T3SA の動きをビーズの動きとして観察できる評価系を構築した (図2)。

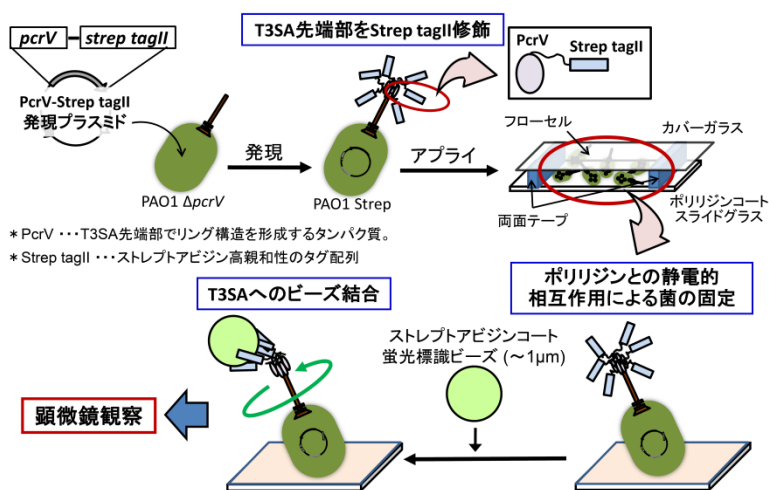


図2. T3SA の回転運動評価系

この評価系で観察を行ったところ、エフェクター分泌条件下でビーズがゆっくりと反時計回りに回転する様子が観察できた。この回転はプロトン駆動力を減少させるプロトノフォアの添加により停止した。以上より、エフェクター分泌条件下で T3SA がプロトン駆動力を利用した回転運動を行うことが示唆された。

3. III型分泌装置の回転-エフェクター分泌関連の検討

本章では、第2章にて観察された T3SA 回転がエフェクター分泌過程に関与するか否かを検討した。第2章で構築した評価系を用いて高粘性の PEG8000 は T3SA 回転を阻害するが低粘性の PEG200 は回転に影響しないことを見出し、T3SA 回転が粘性抵抗の増大により物理化学的に阻害されることを確認した。この際のエフェクター分泌量を評価したところ、回転を阻害した PEG8000 はエフェクター分泌量を減少させたが、回転を阻害しない PEG200 は分泌にも影響しなかった。さらに、PEG8000 の分泌抑制効果は培地粘性と高い相関を示した。一方で、PEG8000 よりも高い粘性を示すが、粗いネットワーク構造を形成するポリビニルピロリドンやポリビニルアルコールはエフェクター分泌を抑制しなかった。以上より、T3SA 回転がエフェクター分泌過程に重要な役割を担っており、回転を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌が抑制されることが示唆された。

4. 高粘性環境における III型分泌装置の回転阻害を介したエフェクター分泌制御に関する可能性の検討

緑膿菌の生活環に関わる天然高分子アルギン酸やムチンは菌表面に吸着する。したがって、これらを主成分とするバイオフィームやムチン層といった天然の高粘性環境では T3SA 回転の阻害を介してエフェクター分泌が抑制されている可能性が考えられた。この可能性について検討したところ、アルギン酸、ムチンともに T3SA 回転を阻害するとともにエフェクター分泌を抑制することを見出した。さらに、アルギン酸やムチンは培地粘性を増大させるだけでなく、T3SA ニードルと静電的相互作用を介して強く結合することで、より強力にエフェクター分泌を抑制していることが示唆された。以上より、バイオフィームやムチン層といった天然の高粘性環境では T3SA 回転の物理化学的阻害を介してエフェクター分泌が抑制されている可能性を見出した。

5. 総括

本研究において、T3SA の回転運動評価系を構築し、その回転を観察することに世界で初めて成功した。この評価系を用いることで、観察された回転がプロトン駆動力依存的であること、さらにはこの回転がエフェクター分泌過程に重要な役割を担うことを見出した。これらの結果から、T3SA がプロトン駆動力を利用

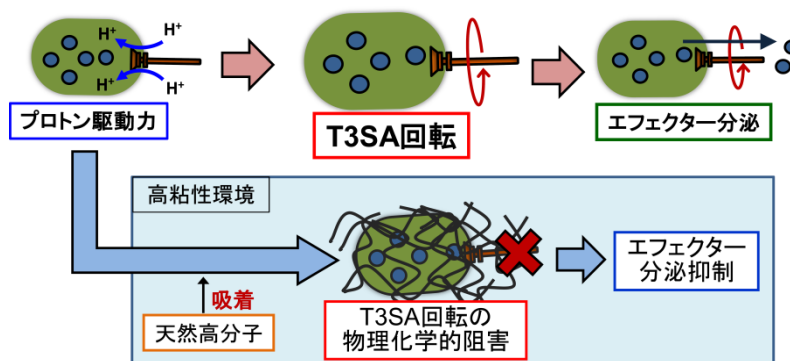


図3. エフェクター分泌過程における T3SA 回転の関与とこれを利用したエフェクター分泌の抑制

した回転運動を行うことでエフェクター分泌の駆動力を産出していることが示唆された (図3)。さらに、バイオフィームやムチン層といった天然の高粘性環境では T3SA 回転の物理化学的阻害を介してエフェクター分泌が抑制される可能性も見出した (図3)。これらの知見は T3SA の回転を観察することで初めて得られた重要な情報であり、III型分泌機構の解明に大きく寄与すると考えられる。

本研究で得られた知見に基づいて、今後さらに研究を進めることで、III型分泌機構の解明が大きく進展するとともに、T3SA を標的とする新規抗菌薬の開発に重要な知見が数多く得られることが期待される。

第1章 緒言

1-1. 細菌感染症と抗菌薬の現状

かつて世界中で多くの人々を死に至らしめた細菌感染症は、1929年のフレミングによるペニシリンの発見以降、数多くの抗菌薬が開発されて普及したことにより、一時は完全に克服されたかのように思われた。しかしながら、近年、日本を含む先進諸国では抗菌薬の過剰投与等によりメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）や多剤耐性緑膿菌（MDRPA）、カルバペネム耐性腸内細菌（CRE）などの既存抗菌薬が効かない多剤耐性菌が出現し、細菌感染症は再び猛威を振るい始めている。また、抗菌薬が十分に普及しておらず、衛生環境整備も不十分な発展途上国においてはコレラやペストなどの強毒性細菌が未だに存在しており、細菌感染症による死亡は今なお世界の死因別死亡率の上位を占めている。さらに、飛行機などの交通手段が発達して国際交流が盛んとなった現在では細菌が大陸を超えて拡散しうる。これにより、先進諸国で発生した多剤耐性菌と発展途上国に現存する強毒性細菌が接触すると、ファージ感染やプラスミド伝播を介して薬剤耐性遺伝子の水平伝播が起こり、既存抗菌薬が効かない強毒性細菌が出現する危険性がある。このような細菌が世界中に拡散すれば、かつてのペスト大流行を凌ぐ大規模なパンデミックが起こり、非常に重篤な事態となることが予想される（図1-1）[1-3]。また、遺伝子工学的手法が発達した現在では種々の抗菌薬に対する耐性を持つ強毒性細菌を人為的に作製することも可能である。このような細菌を用いたバイオテロが行われれば、現時点で有効な対応策はなく、世界中に大きな打撃を与えることになる。

このような事態に備えるためには既存抗菌薬とは異なる作用機序を有する抗菌薬の開発が重要である。本研究では新規抗菌薬のターゲット候補として細菌感染に重要な役割を担うⅢ型分泌装置に着目し、新規抗菌薬を開発する上での手がかりを得ることを目的に、その機能メカニズムの解析を試みた。

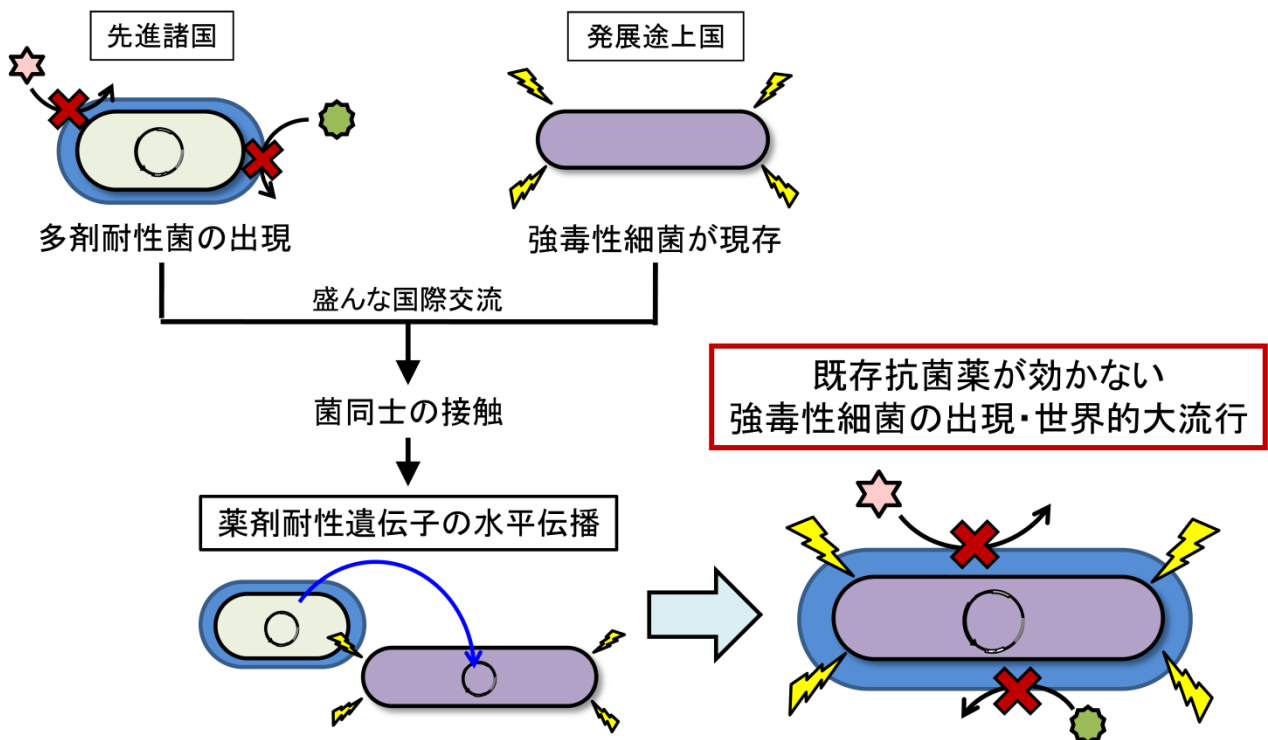


図1-1. 細菌感染症の現状と予想される抗菌薬耐性強毒性細菌の出現

：現在、先進諸国では多剤耐性菌が出現し、発展途上国では未だに強毒性細菌が現存する。国際交流が盛んな現代ではこれらの細菌が接触して既存抗菌薬が効かない強毒性細菌が出現し、世界的に拡散する危険性がある。

1-2. III型分泌装置の機能と未解決の問題

III型分泌装置 (Type III secretion apparatus; T3SA) は緑膿菌や赤痢菌などのグラム陰性細菌が保有する注射器型タンパク質分泌装置である。T3SA を保有する細菌は外膜から露出するニードルの先端部を宿主細胞膜に挿入し、エフェクターと呼ばれる一群のタンパク質を宿主細胞質内に直接注入する [4, 5]。細菌が産生するエフェクターの種類は菌種や菌株により異なるが、いずれも宿主細胞内で個々の機能 (細胞骨格の再重合促進作用、アポトーシス誘導作用など) を発揮することで細菌感染・毒性発現に重要な役割を担う (図 1-2) [6, 7]。T3SA を欠損させた細菌ではエフェクター分泌能および細胞毒性が著しく低下することから、T3SA は新規抗菌薬の作用標的として有望である [8]。

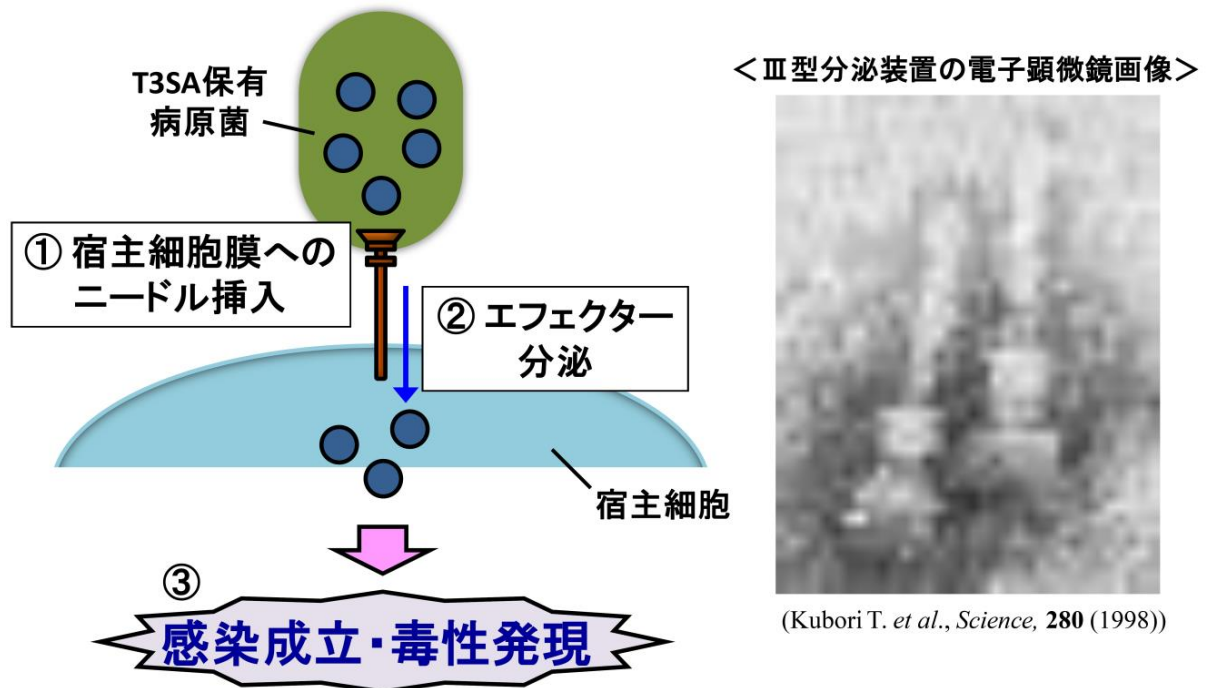


図 1-2. III型分泌装置の作用機序
: III型分泌装置は宿主細胞にエフェクタータンパク質を直接注入するために用いられる

しかしながら、III型分泌の分子メカニズムは現時点で完全には解明されていない。III型分泌は、①菌体内でのエフェクターの産生、②T3SA へのエフェクターの装填、③エフェクターの T3SA ニードル内輸送、および④宿主細胞内に到達したエフェクターの機能発現、という過程を経て起こる (図 1-3)。このうち、①、②、④の各過程に関わるエフェクター遺伝子の発現制御機構 [5, 9]、細胞質内シャペロンによる T3SA へのエフェクター装填機構 [10, 11]、および個々のエフェクターの機能性 [6, 7]については従来の研究で重点的に調べられており、詳細な分子機構が解明されつつある。一方で、③のエフェクターの T3SA ニードル内輸送機構に関してはほとんど調べられていない (図 1-3)。これは従来のIII型分泌に関する研究が、主に個々のIII型分泌関連タンパク質の機能性や分子間相互作用に着目して行われてきたためである。T3SA は多数の構成タンパク質から成る精巧で複雑な超分子ナノマシンであり、エフェクターのニードル内輸送は T3SA 全体が一つの装置として協同的に機能することで実行されると考えられる。そのため、従来の研究方法ではこの過程に関する情報がほとんど得られなかった。そこで、本研究では T3SA の機能性について超分子ナノマシンとしての観点から調べることで、T3SA ニードル内でのエフェクター輸送機構の解明を試みた。

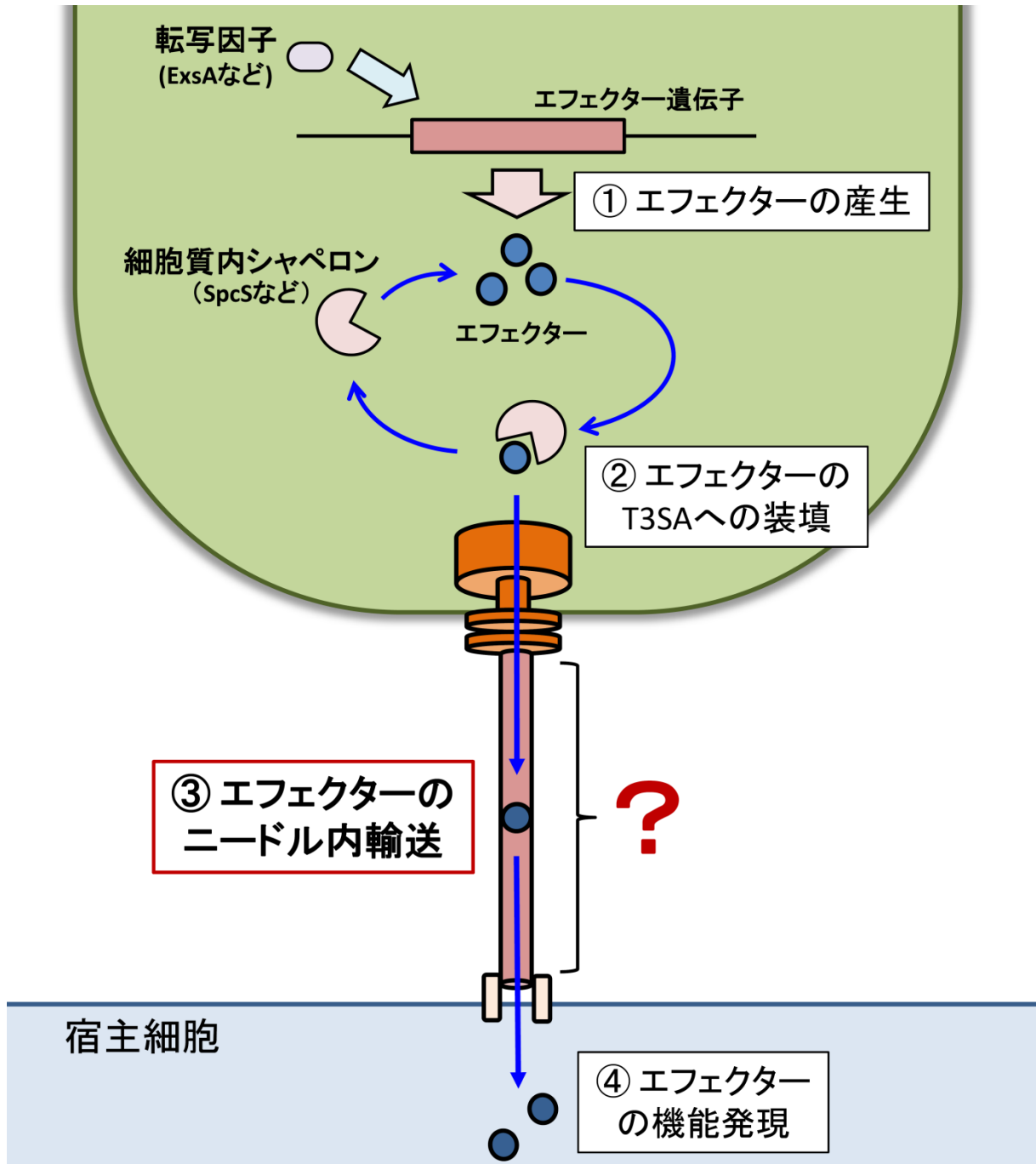


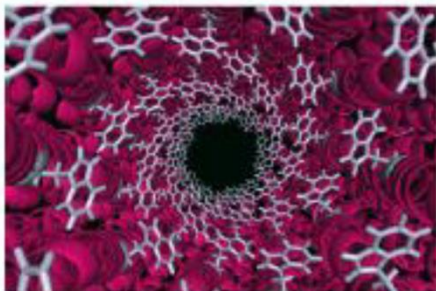
図 1-3. III型分泌機構によるエフェクター分泌の過程

: III型分泌は、①転写因子によるIII型分泌関連遺伝子群の発現、②細胞質内シャペロンによるエフェクターの T3SA への装填、③エフェクターのニードル内輸送、④宿主細胞質内でのエフェクター機能の発現、の各段階からなる。このうち、③のエフェクター分子の輸送機構についてはほとんど調べられていない。

1-3. T3SA ニードル内でのタンパク質の移動に関するシミュレーション実験

T3SA ニードル内でのタンパク質の移動に関して、2010年に Rathinavelan らが興味深いシミュレーション実験を行っている [12]。彼らは赤痢菌 *Shigella flexneri* の T3SA ニードル構成タンパク質 MxiH の結晶構造からニードル構造モデルを構築し、ニードル形成反応時に MxiH モノマーがニードル内を輸送される様子を Steered Molecular Dynamics (SMD) 法にてシミュレーション解析した。この解析の結果、T3SA ニードル構成因子間で菌種を超えて高度に保存されているアミノ酸配列 Trp10 がニードル内で螺旋状に配列しており、輸送基質である MxiH モノマーはこの螺旋に沿って回転しながらニードル内を前進することが示された (図 1-4)。さらに、この Trp10 の変異は T3SA ニードルの形成に影響することなく、エフェクター分泌を著しく阻害することも見出された [12]。以上の結果から、ニードル内部の Trp10 螺旋がエフェクター輸送のレールとして機能しており、この螺旋とエフェクターとの相互作用がニードル内部でのエフェクター輸送を引き起こすことが、この研究において示唆された。

A.

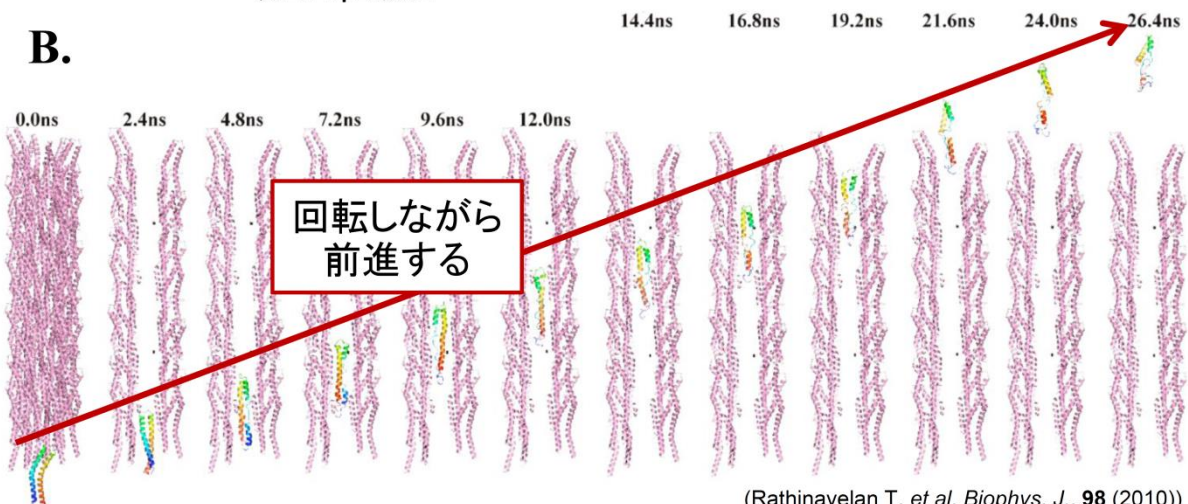


灰色: Trp10 残基

図 1-4. T3SA ニードル内でのタンパク質の移動に関する SMD シミュレーション

- A. 赤痢菌の T3SA ニードル構成因子 MxiH の結晶構造から構築したニードル構造モデルの内部。ニードル構成因子間で高度に保存されているアミノ酸残基 Trp10 が螺旋状に配列している。
- B. ニードル形成反応時の MxiH モノマーの T3SA ニードル内輸送に関する SMD シミュレーション。輸送基質である MxiH モノマーが T3SA ニードル内を Trp10 の螺旋に沿って回転しながら前進することが示唆された。

B.



しかしながら、SMD シミュレーションでは、① 観察対象である MxiH モノマー以外は固定されて動かない、② MxiH モノマーをニードル外に牽引する任意の外力を加える、という 2 つの重要な仮定が成されている。この任意の外力により、シミュレーションでは輸送基質がニードル内を一方向性に輸送された。そのため、エフェクター分泌がシミュレーションで示唆された機構で起こるとすれば、ここで想定されている外力が自然界ではどのようにして発生するのか、が問題となる。

T3SA ニードルは筒状のホモポリマー複合体である [8, 12]。したがって、ニードル構成因子がコンフォ

メーション変化を起こさないのであれば、螺旋上のいずれの Trp10 も同じエフェクター親和性を示すと考えられる。このとき、n 番目の Trp10 に結合しているエフェクターが次に (n+1) 番目の Trp10 に結合する確率と (n-1) 番目の Trp10 に結合する確率は等しいことから、ニードル内のエフェクターは前後に等確率で移動することになり、先のシミュレーションで想定されているようなエフェクターを一方向に牽引する外力は発生しないだろう (図 1-5 A)。

レールに沿ってエフェクターを一方向性に牽引する力を発生させるためには、ニードルの内側から外側に向かってエフェクター親和性が高くなるようにニードル構成因子のコンフォメーションを規則的に変化させる必要があるだろう (図 1-5 B)。MxiH の結晶構造には 2 種類のコンフォメーションが報告されていることから、このような機構によるエフェクター輸送が実際に起こっている可能性は高い [13]。しかしながら、タンパク質のコンフォメーション変化を誘起するためには ATP 結合や構成アミノ酸のプロトン化など何らかの外的要因が必要であるが、ニードル構成因子のコンフォメーション変換を誘起する要因は未だに同定されていない [4, 13]。それでは、T3SA ニードルの規則的なコンフォメーション変化を誘起してエフェクターを牽引する力を発生させるための外的要因とはいったい何であろうか？

A. T3SAニードルがコンフォメーション変化しない場合

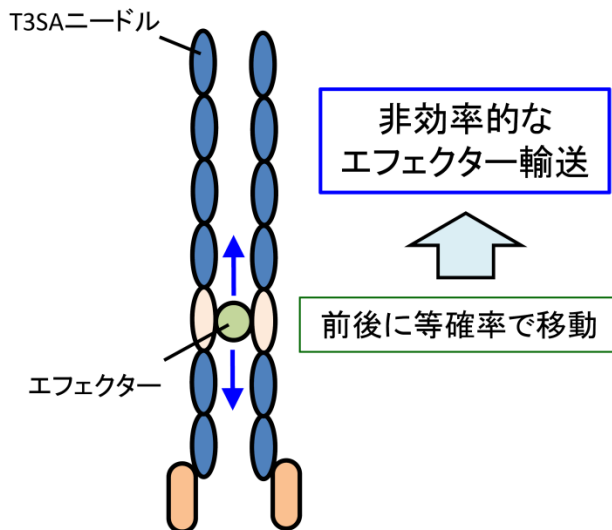
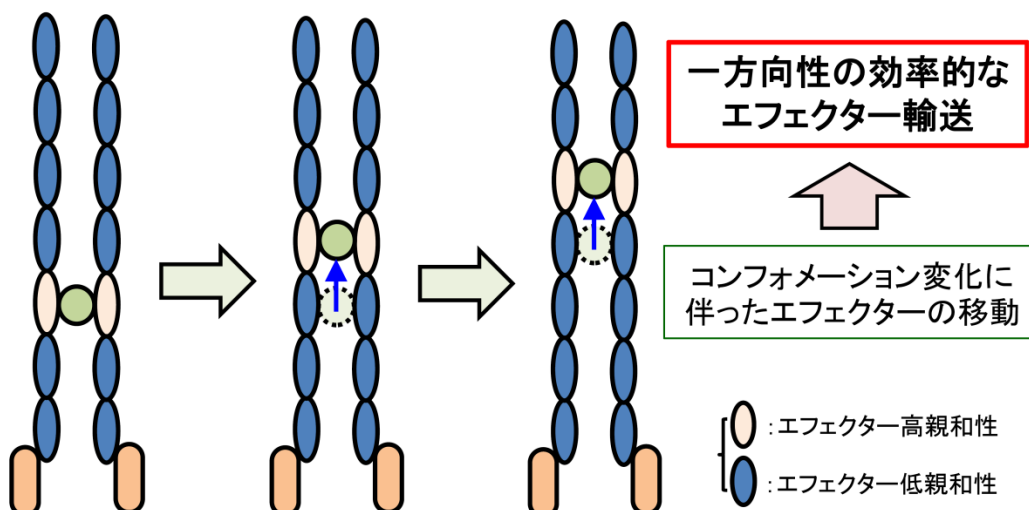


図 1-5. ニードル構成因子のコンフォメーション変化によるエフェクター輸送モデル

A. T3SA ニードル構成因子がコンフォメーション変化しない場合、エフェクターを一方向に牽引する力は発生せず、その輸送は確率論的なものになる。

B. T3SA ニードル構成因子が外側に向かってエフェクター親和性が高くなるように規則的なコンフォメーション変化を起こす場合、エフェクターを一方向に輸送する駆動力が発生する。

B. T3SAニードルのコンフォメーションが規則的に変化する場合



1-4. 細菌べん毛との類似性に基づいた T3SA の回転の可能性と本研究の目的

T3SA は細菌の遊泳運動に関わるべん毛と構造的および機能的に高い類似性を示すことが知られている。1998 年に Kubori らにより *Salmonella Typhimurium* 由来 T3SA が単離され、その複合体構造が電子顕微鏡にて初めて観察された [14]。これによると、T3SA は外膜表面から露出した長さ約 80 nm、幅 13 nm の筒状のニードルと、外膜および内膜を貫通する基部体（直径約 40 nm、高さ約 40 nm）で構成される注射器型複合体であった。また、*S. Typhimurium* のべん毛構造は 1985 年に Aizawa らにより撮影され、内膜と外膜を貫通する基部体（直径約 40 nm、高さ約 40 nm）と外膜から突出したフック、およびフックから伸びる長さ数 μm 、幅 25 nm の長いフィラメントから構成されることが確認されている [15]。このように、T3SA と細菌べん毛は外膜からの露出部が細くて短いニードルか、太くて長いフィラメントかの違いはあるものの、基部体の構造やサイズは類似している（図 1-6）。さらに、2003 年に行われた遺伝子系統樹解析では、T3SA と細菌べん毛の基部体構成因子が塩基配列およびタンパク質構造レベルでも高い相同性を示すことがわかり、両者が共通の祖先タンパク質複合体から分岐進化したものである可能性が示唆されている [16]。このように、T3SA とべん毛は複合体レベルでも個々の構成因子レベルでも高い構造類似性を示す（図 1-6）。

また、機能性の面においても T3SA が細菌べん毛と共通性を示すことが知られている。細菌べん毛は細胞膜内外のプロトン濃度勾配により発生するプロトン駆動力を利用してフィラメントを回転させる [17]。このプロトン駆動力が T3SA を介したエフェクター分泌にも利用されていることが 2004 年に Wilharm ら

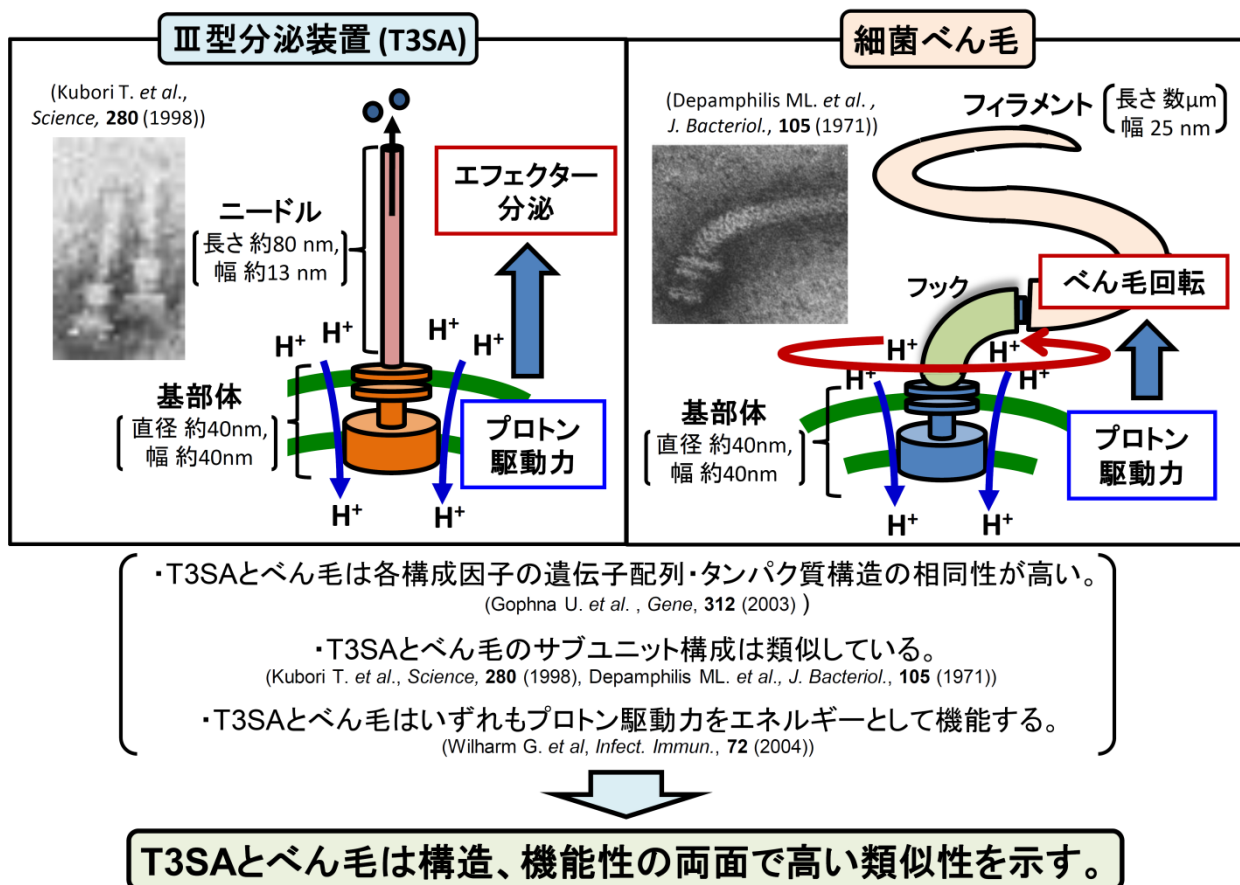


図 1-6. III型分泌装置と細菌べん毛の類似性

:T3SA および細菌べん毛の電子顕微鏡画像とこれを基に構築したモデル図、および両装置の既知の類似性。両者の基部体は構成タンパク質および複合体の両レベルで高い構造類似性を示し、いずれの装置もプロトン駆動力をエネルギーとして機能する。

により報告された (図 1-6)。彼らはプロトン駆動力を消失させる試薬であるプロトノフォア CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を添加することでエフェクター分泌が停止すること、さらに細菌べん毛においてプロトン駆動力からべん毛回転トルクを産出する MotAB 複合体を欠損させてもエフェクター分泌には影響がないことを見出し、T3SA が MotAB 非依存的な機構でエフェクター分泌にプロトン駆動力を利用していることを示した [18]。

以上のように T3SA と細菌べん毛が構造・機能性の両面で高い類似性を示す複合体であることに基づいて、著者は「T3SA がプロトン駆動力を利用した回転運動を行っており、この回転運動がニードル内でのエフェクター輸送の駆動力を産出しているのではないか」という仮説を立てた (図 1-7)。ニードルの回転は周期性のある運動であるため、1-3 節で想定したような規則的なニードルコンフォメーション変化を誘起しうる。このことから、T3SA は化学エネルギーであるプロトン駆動力を用いてニードルを回転させ、規則的なニードルコンフォメーション変化を誘起することでエフェクターのニードル内輸送に必要な駆動力を産出しているのではないかと著者は考える。

近年では T3SA の 1 種であるべん毛タンパク質輸送装置が、ATP を加水分解して回転する F1-ATPase と高い構造類似性を示すことも報告されており、T3SA が回転運動を行う可能性は高いと考えられた [19, 20]。しかしながら、これまでに T3SA の回転運動を実際に観察したという報告はない。また、現時点では細菌べん毛の MotAB 複合体に相当するユニットが T3SA では発見されていないことから、構造生物学者の間では T3SA は回転運動を行わず、別の機構でエフェクターを輸送しているのではないかとする意見もあった [21]。T3SA が回転するのか否かを明らかにするためには、実際に T3SA の動きを観察するのがよいだろうと著者は考えた。そこで、本研究では T3SA の運動を観察するための評価系を構築し、T3SA が回転運動を行うか否かについて検討することにした。さらに、エフェクター分泌と T3SA の回転運動との相関を評価することで、エフェクター分泌過程における T3SA 回転運動の関与について検討することにした。

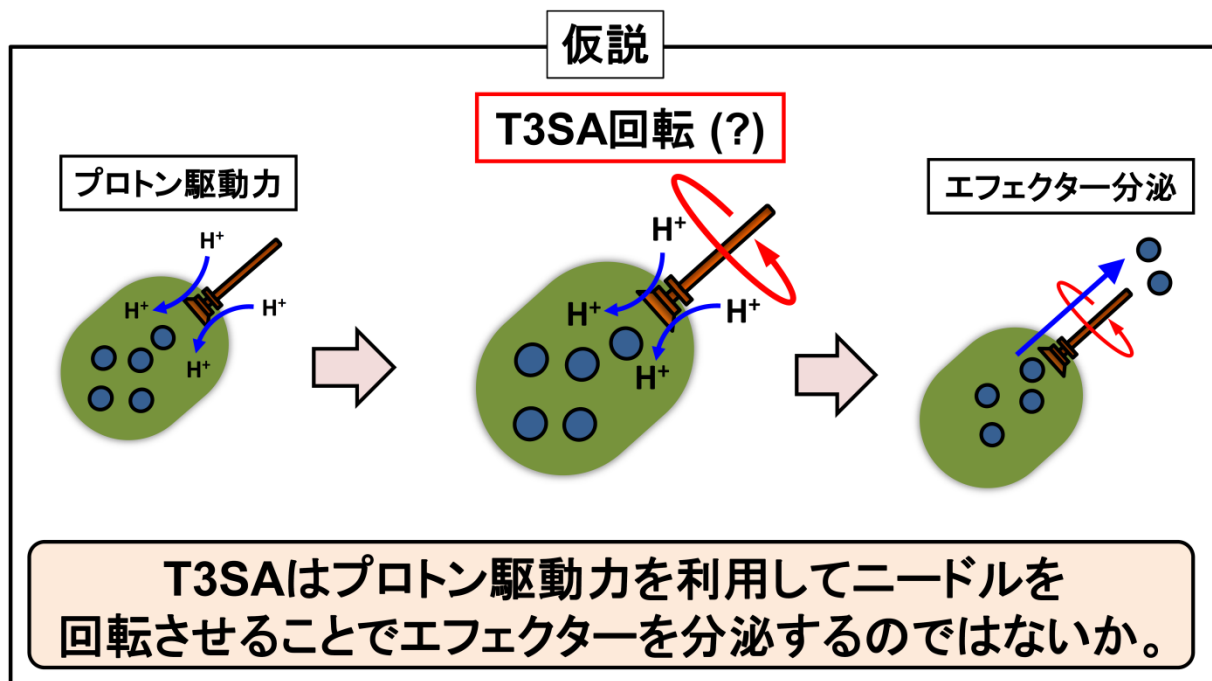


図 1-7. III型分泌装置のエフェクター分泌機構に関する仮説
: T3SA と細菌べん毛の高い類似性に基づき、「T3SA はプロトン駆動力をニードルの回転運動に変換することでエフェクターのニードル内輸送に必要な駆動力を産出しているのではないか」と考えた。

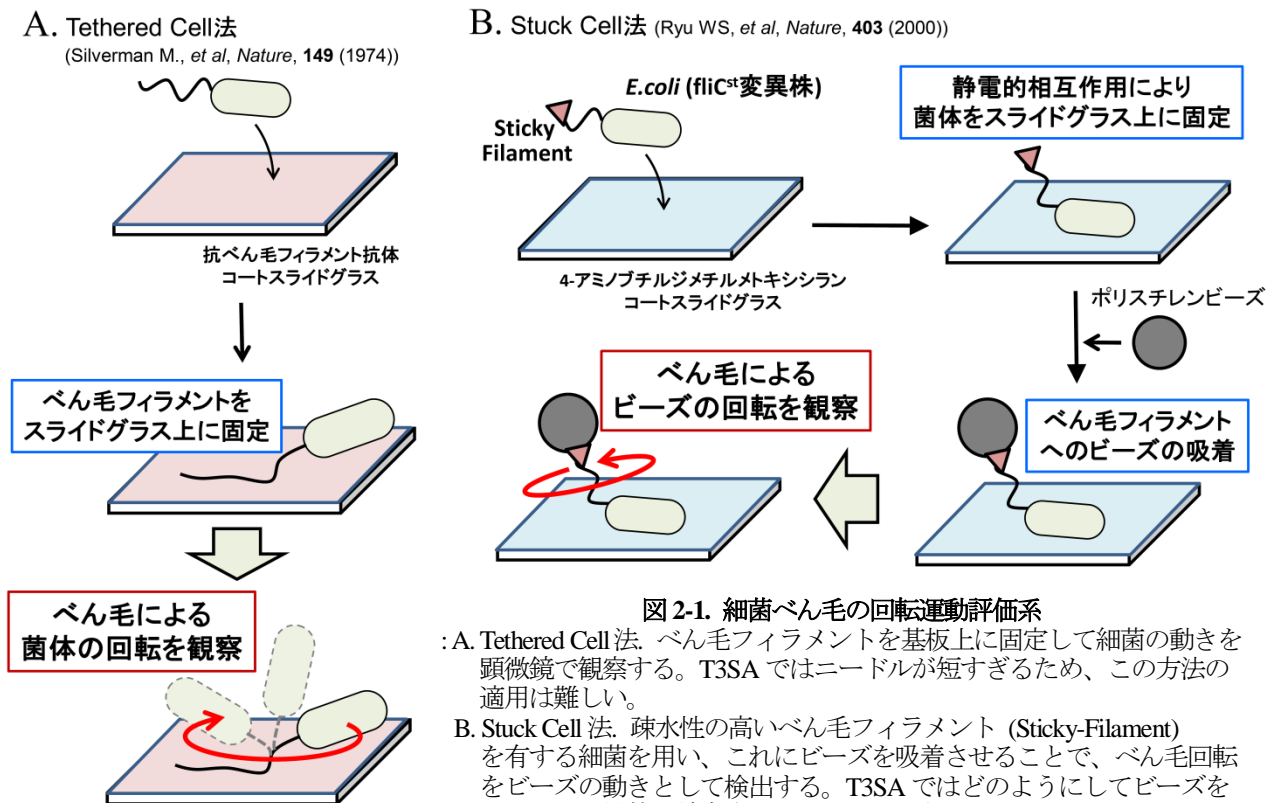
第2章 III型分泌装置の回転運動評価系の構築

2-1. 序論

図1-7に示した仮説を検証するため、まずはT3SAがプロトン駆動力を利用した回転運動を行うか否かについて調べることにした。これまでに回転運動が観察されている分子モーターとしては細菌べん毛とF1-ATPaseの2つがある[22-24]。そこで、これらの回転観察に用いられている方法を参考にしてT3SAの回転運動評価系を構築し、実際に観察することでT3SAが回転することの立証を試みた。

細菌べん毛の回転は1974年にSilvermanらにより、べん毛フィラメントを基板上に固定した際の菌体の動きを顕微鏡で観察することで初めて検出された(Tethered cell法;図2-1A)[22]。2000年には“Sticky Filament”という通常よりも高い疎水性を示すべん毛フィラメントを有する大腸菌株(*fliCst*変異株)を用い、静電的相互作用を介して菌体をスライドガラスに固定後、Sticky Filamentにポリスチレンビーズを結合させることでべん毛回転をビーズの動きとして検出する方法がRyuらにより開発された(Stuck cell法;図2-1B)[23]。

しかしながら、これらの方法をT3SAの回転観察にそのまま適用することは困難である。Tethered cell法では、検出される回転運動の半径は基板上に固定されていないフリーのフィラメント部分の長さで決まる。べん毛フィラメントは数 μm と十分に長いので、一部を基板上に固定してもなおフリー部分が十分な長さを有するので、この方法でも回転運動が検出できた。しかしながら、T3SA ニードルは約100 nmと短いため、これを固定して菌体の動きを観察しても回転半径が小さすぎて動きが検出できないか、あるいは菌体が基板と衝突して回転が阻害されてしまうだろう。また、Stuck cell法の場合にはビーズを観察対象に特異的に結合させる必要があるが、T3SA変異株でSticky Filament変異株に相当する“Sticky needle”変異株のようなものは見つかっておらず、如何にビーズをT3SA特異的に結合させるかが問題となる。



F1-ATPase の回転は、1997 年に Noji らによって初めて観察された [24]。彼らは大腸菌発現系を用いて回転に必要な α -、 β -および γ -サブユニットを単離精製し、これらを混合することで基板上に F1-ATPase を再構築した。F1-ATPase は β -サブユニットに修飾された His タグを介して Ni-NTA コートカバーガラスに固定された。回転子である γ -サブユニットはサイズが小さく、そのままでは動きを検出できない。そこで、彼らは γ -サブユニットをビオチン化し、ストレプトアビジン-ビオチン結合を介して Rhodamine-Phalloidin 染色ビオチン化アクチンフィラメントを結合させることで、 γ -サブユニットの回転をアクチンフィラメントの回転として蛍光顕微鏡で観察した (図 2-2)。これにより、F1-ATPase が ATP を加水分解して回転する分子モーターであることが立証された [24]。この方法で回転分子モーターの動きを観察するには、① 回転に必要なサブユニットが明らかであり、② これが単離精製でき、③ サブユニットを混合するだけで複合体が機能を保持したまま再構成される、ことが必要である。T3SA は複数のサブユニットから成る複雑な構造体であり、その機能発現には装置だけでなく、細胞内シャペロンなどとの協同的反応が必要になる。そのため、機能を保持した状態で T3SA を基板上に再構成することは非常に困難である。

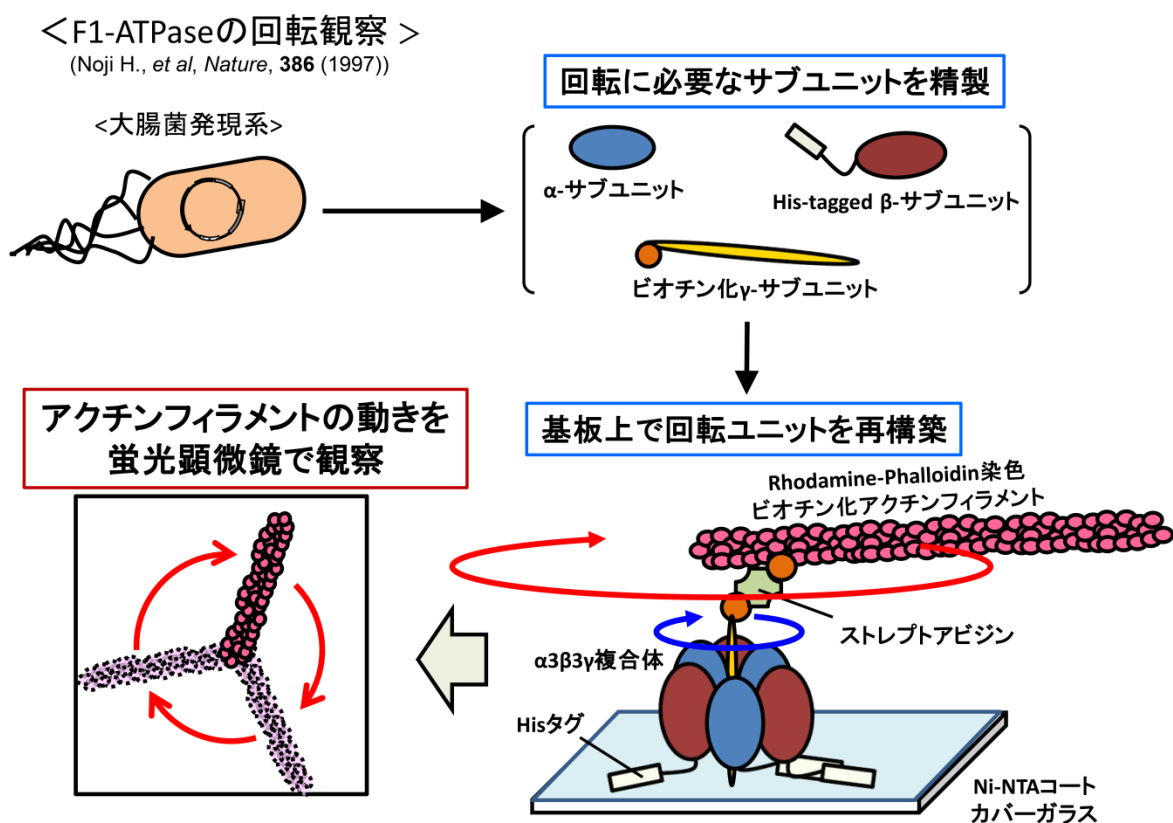


図 2-2. F1-ATPase の回転運動評価系

: 回転に必要なサブユニットを精製し、基板上で F1-ATPase を再構成する。その後、回転子である γ -サブユニットに蛍光標識アクチンフィラメントを結合させることで、回転運動をフィラメントの動きとして検出する。T3SA では装置の再構築が困難であるため、この方法は適用できない。

このように、従来の分子モーターの回転運動観察系をそのまま T3SA の回転観察に適用することは難しい。そこで、本研究ではこれらの方法を参考に、T3SA の回転運動観察に適した評価系を新規に構築することにした。研究には日和見感染菌として临床上の重要性が高く、III型分泌に関する情報が豊富な緑膿菌 PAO1 株をモデル細菌として用いることにした。機能を保持した状態での T3SA の単離方法は確立されていないため、本研究では生菌細胞膜上の T3SA の動きを *in situ* 評価系で観察することにした。*in situ* で T3SA

の動きを観察する場合、細菌を基板上に固定してブラウン運動を抑制しておく必要がある。このために基板にはポリリジンコートスライドガラスを用い、菌体との静電的相互作用を介して基板上に細菌を固定した。T3SA ニードルは通常の顕微鏡では観察できないサイズ (約 100 nm) であるため、その動きの観察にはニードルに回転観察用プローブを修飾する必要がある。緑膿菌の T3SA 先端部にはエフェクター分泌制御に関わる PcrV タンパク質がチップと呼ばれるリング状構造を形成して結合する [25, 26]。そこで、この PcrV にストレプトアビジン高親和性のタグ配列である Strep tagII [27] を遺伝子工学的手法により修飾することで、回転観察用プローブとしてのストレプトアビジンコート蛍光標識マイクロビーズを Strep tagII-ストレプトアビジン結合を介して T3SA 先端部に特異的に結合させることにした。プローブには通常の光学顕微鏡でも十分に観察可能な平均粒子径 1 μm のビーズを用いた。これにより、T3SA の動きをマイクロビーズの動きとして顕微鏡で観察できる評価系を構築することにした (図 2-3)。

以上のコンセプトに基づいた T3SA ニードル回転観察系の概略図を図 2-3 に示す。本章では、この回転運動評価系の構築とこれを用いた T3SA 回転運動の観察、および観察により明らかとなった T3SA の特性について述べる。

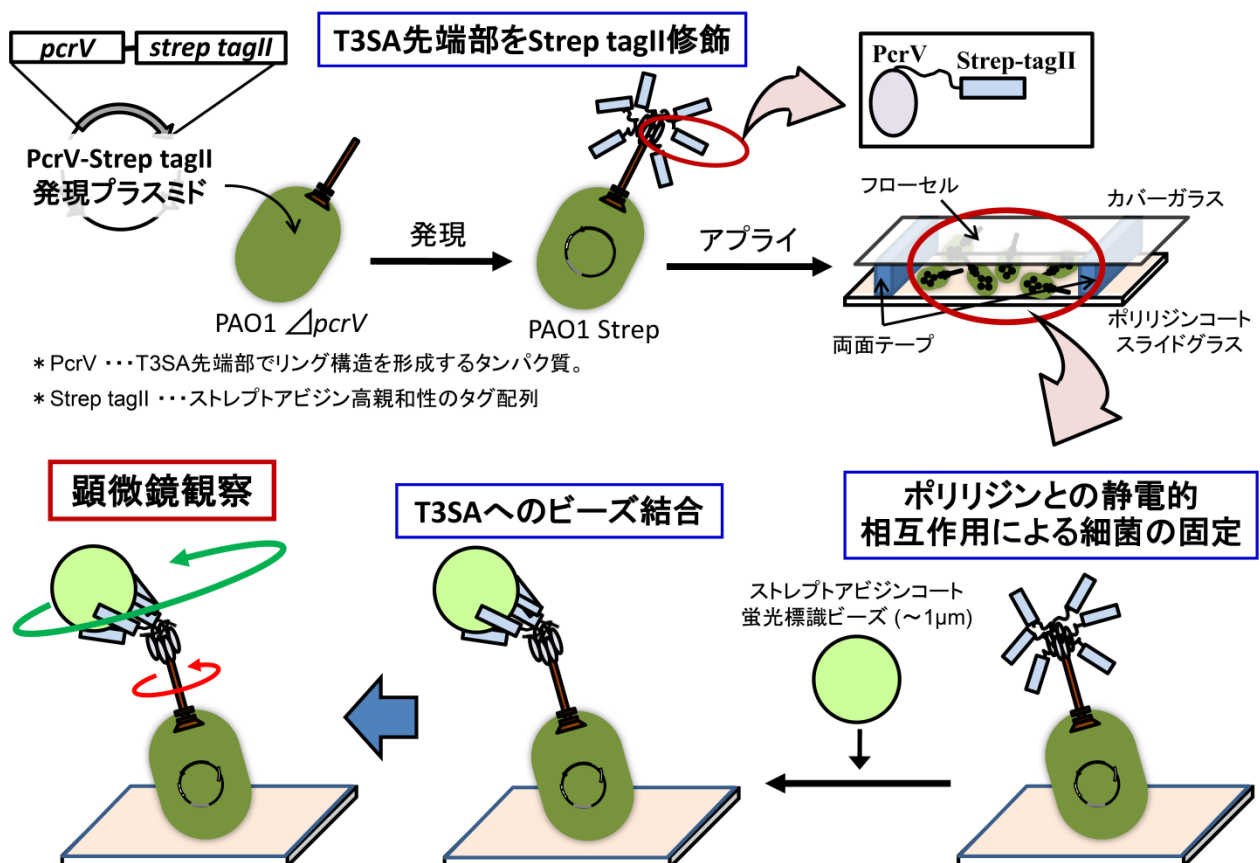


図 2-3. T3SA ニードルの回転運動を検出するための新規評価系

: T3SA の回転観察には T3SA ニードル先端部に結合する PcrV タンパク質にストレプトアビジン高親和性の Strep tagII を修飾した菌株 (PAO1 Strep 株) を使用する。PAO1 Strep 株を静電的相互作用を介して基板上に固定後、ストレプトアビジンコートビーズを Strep tagII を介して T3SA 先端部に結合させることで T3SA 回転をビーズの動きとして検出する。

2-2. 実験方法

2-2-1. 材料・試薬

Luria-Bertani (LB) brothはFunakoshi Co. Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。Ca²⁺キレート剤ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) はDojindo Molecular Technologies, Inc. (Kumamoto, Japan) より購入した。プロトノフォア carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) はWako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。その他、本章で用いた試薬は全て特級であり、それ以上精製することなく使用した。

2-2-2. 使用した細菌株およびプラスミド

本研究ではゲノム配列が既知の緑膿菌 PAO1 株 (PAO1 WT) を使用した [28]。本研究で使用したプライマーの塩基配列は表 2-1 に示した。 *pcrV* 遺伝子欠損 PAO1 株 (PAO1 Δ *pcrV*) は自殺ベクター pEX18Tc を用いて以下の手順で作製した [29]。ゲノム上 *pcrV* 遺伝子上流および下流約 500 bp の配列をそれぞれプライマーペア PA1706FF+ PA1706FR および PA1706BF+ PA1706BR を用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) 法にて増幅した。精製した 2 種類の PCR 産物を混合し、fusion PCR 法にて両者が融合した DNA 断片を作製した。この DNA 断片を pEX18Tc の制限酵素サイト EcoRI-BamHI に挿入することで *pcrV* 遺伝子欠損株作製用プラスミド Δ *pcrV*-pEX18Tc を作製した。このプラスミドをヒートショック法にて大腸菌 S17-1 株に形質転換後、PAO1 WT と混合することで、接合により Δ *pcrV*-pEX18Tc を PAO1 WT に導入した。これにより、プラスミド-ゲノム DNA 間での相同組換えを利用してゲノム上 *pcrV* 遺伝子が欠損した PAO1 株 (PAO1 Δ *pcrV*) を作製した。作製した PAO1 Δ *pcrV* はテトラサイクリン (80 μ g/mL) 含有 BM2 agar 上で分離培養を行うことで単離した。*pcrV* 遺伝子相補 PAO1 Δ *pcrV* 株 (PAO1 Δ *pcrV*/*pcrV*) および *pcrV*-*strep tagII* 遺伝子相補 PAO1 Δ *pcrV* 株 (PAO1 Strep) は PAO1 Δ *pcrV* およびプラスミドベクター pME6032 を用いて作製した [29]。 *pcrV* および *pcrV*-*strep tagII* 遺伝子断片は PAO1 WT のゲノム DNA を鋳型とし、それぞれプライマーペア PA1706F+ PA1706R および PA1706F+ PA1706RS を用いた PCR 法にて増幅した。これらの DNA 断片を pME6032 の EcoRI-NcoI サイトに挿入することで、PcrV および PcrV-Strep tagII 発現プラスミドをそれぞれ作製した。作製したプラスミドをエレクトロポレーション法にて PAO1 Δ *pcrV* 株に形質転換することで、PAO1 Δ *pcrV*/*pcrV* および PAO1 Strep を作製した。

Primer	Sequence
PA1706FF	5'-GCAGGAATTCAGCGGATTGGCCAATCCATTCGC-3'
PA1706FR	5'-ATGGATACCTCGTGATTCCTCAGATCAACAAGCC-3'
PA1706BF	5'-AGGAATCACGAGGTATCCATGAACCAGCCGACC-3'
PA1706BR	5'-GGCAGGATCCCGCGTTCAAGCGTTATCGGATTC-3'
PA1706F	5'-AGGAGAAATTCATGGAA GTCAGAAACCTTAATGC-3'
PA1706R	5'-ATGGCCATGGCTAGATCGCGCTGAGAATGTC-3'
PA1706RS	5'-TGCTCCATGGCTAATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTAG -CGATCGCGCTGAGAATG-3'

表 2-1. 本研究で使用したプライマーの塩基配列

2-2-3. SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング法による PcrV-Strep tagII の発現評価

PAO1 Δ pcrV/ pcrV および PAO1 Strep における PcrV および PcrV-Strep tagII の発現は以下の手順で Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加することで誘導した。各菌株を LB broth にて一晩培養後、この菌液を Ca^{2+} キレート剤 EGTA (5 mM) および IPTG (125 μM) を含む high-salt LB broth (LB broth + 200 mM NaCl, 0.5 mM CaCl_2 , and 10 mM MgCl_2) にて 300 倍希釈し、37 °C で 5 時間振とう培養した。培養後の菌液を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分画し、PcrV および PcrV-Strep tagII の発現を評価した。Strep tagII の有無は検出試薬である StrepTactin-horseradish peroxidase (HRP) (IBA GmbH, Göttingen, Germany) を用いたウエスタンブロッティング法にて評価した。

2-2-4. ウエスタンブロッティング法によるエフェクター分泌活性の評価

PAO1 のエフェクター分泌活性の評価はエフェクタータンパク質 ExoT の分泌量をウエスタンブロッティング法にて評価することで行った [30]。LB broth で一晩培養した PAO1 菌液を 5 mM EGTA 含有 high-salt LB broth で 300 倍希釈し、37 °C で 2.5 時間振とう培養した。この培養液 1.5 mL をマイクロチューブに分取し、遠心分離 (9000 rpm x 3 分間, 4 °C) にて菌ペレットを得た。上清は S1 画分として別のマイクロチューブに回収した。菌ペレットは各種試薬を含む high-salt LB broth 1 mL で再懸濁後、さらに 37 °C で 2.5 時間培養した。培養後、遠心分離 (9000 rpm x 3 分間, 4 °C) にて培地上清を回収し、これを S2 画分とした。菌ペレットはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1 mL にて再懸濁し、OD600 を測定した。S1 および S2 画分中のタンパク質は 10 % トリクロロ酢酸を用いて沈殿させた後、1x SDS Sample buffer にてサンプル間の OD600 値が等しくなるように再懸濁した。この再懸濁液を 95 °C, 5 分間熱処理後、ウエスタンブロッティング法により PAO1 が分泌した ExoT 量を評価した。1 次抗体には anti-ExoT rabbit IgG、2 次抗体には anti-rabbit goat IgG-HRP をそれぞれ使用した。バンドの検出には、ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) を用いた。検出された ExoT のバンド強度は画像解析ソフト Image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて数値化した。各サンプルにおける S2 画分のバンド強度を S1 画分のバンド強度で補正し、コントロールサンプルのバンド強度を 1.0 としたときの各サンプルの相対バンド強度をグラフに示した。

2-2-5. コロニーカウント法による生菌数の測定

各試薬処理による生菌数への影響はコロニーカウント法にて行った。2-2-4 と同様の方法で培養した各菌液を PBS にて希釈後、これを LB agar 上にプレーティングした。37 °C で一晩培養後に生じたコロニー数を計数し、Colony-forming units (CFUs/ mL) を算出した。

2-2-6. Strep tagII に対するストレプトアビジン-fluorescein isothiocyanate (FITC) の結合特異性評価

LB broth にて一晩培養した PAO1 の菌液を high-salt LB broth にて 300 倍希釈し、37 °C で 5 時間振とう培養した。OD600=0.3 に相当する菌ペレットを回収し、これを 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトアビジン-FITC を含む PBS にて再懸濁し、室温にて 30 分間インキュベートした。その後、遠心分離 (9000 rpm x 3 分間, 4 °C) にて菌ペレットを回収し、PBS で再懸濁した菌液の FITC 蛍光強度 (励起波長/ 蛍光波長=450 nm/ 518 nm) をマイクロプレートリーダー Infinite 200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) を用いて測定した。

2-2-7. 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いたストレプトアビジンコート蛍光標識マイクロビーズの PAO1 Strep への結合評価

AFM 画像は Nanoscope IIIa tapping mode atomic force microscope (Digital Instruments Inc., Santa Barbara, CA, USA) を用いて取得した。OD₆₀₀=0.25 に相当する菌液 20 μ L あるいは 2000 倍希釈したマイクロビーズ懸濁液 20 μ L をマイカ上にスポットし、室温にて 30 分間放置して風乾させた。これを大気中でタッピングモードにてスキャンすることで AFM 画像を取得した。

2-2-8. T3SA 回転運動の観察

T3SA の回転運動の観察はフローセル中で行った [24]。フローセルは poly-L-lysine (PLL) コートスライドガラス (75 x 75 mm²; Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan)、カバーガラス (25 x 60 mm²; Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan)、および両面テープを用いて 5 mm 幅で作製した。LB broth にて一晩培養した PAO1 Strep 菌液を 5 mM EGTA および 125 μ M IPTG を含む high-salt LB broth にて 300 倍希釈後、37°C で 5 時間振とう培養した。この菌液を OD₆₀₀=0.1 になるように PBS で希釈後、フローセルにアプライした。室温にて 30 分間インキュベート後、PBS で洗浄し、3% BSA in PBS をフローセルに導入して室温で 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、PBS にて 2000 倍希釈したマイクロビーズ懸濁液 (Streptavidin Fluoresbrite YG Microspheres, 1.0 μ m; Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) をフローセルにアプライした。室温にて 30 分間インキュベート後、PBS にて洗浄し、5 mM EGTA 含有 high-salt LB broth をフローセルにアプライして 37°C で 30 分間インキュベートした。30 分後、マイクロビーズの動きを蛍光顕微鏡 (IX-71 microscope; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

2-2-9. T3SA 回転運動の軌跡解析

観察されたビーズ運動の軌跡は軌跡解析ソフト Adobe After Effects Cs3 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) を用いて解析した。数値化された軌跡データは Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いてグラフ化した。

2-3. 結果

2-3-1. PcrV-Strep tagII 発現緑膿菌株 (PAO1 Strep 株)の作製

図 2-3 に示す T3SA 回転運動評価系を構築するため、まずは PcrV タンパク質にストレプトアビジン高親和性タグ配列 Strep tagII を修飾した緑膿菌株 (以下、PAO1 Strep 株) を作製した。PAO1 Strep 株の作製は、① PAO1 WT のゲノム上 *pcrV* 遺伝子を相同組み換えにより欠損させた緑膿菌株 (PAO1 Δ *pcrV*) を作製し、② これに PcrV-Strep tagII 発現プラスミドを形質転換して、③ IPTG 添加によりプラスミドからのタンパク質発現を誘導する、という手順で行った (図 2-4)。

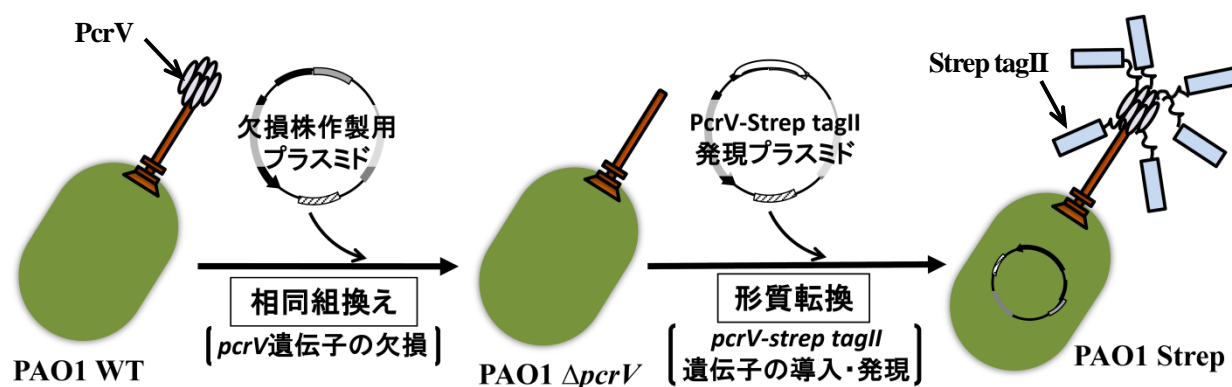


図 2-4. PAO1 Strep 株の作製

: PAO1 Strep 株の作製は、①相同組換えを利用してゲノム上 *pcrV* 遺伝子を欠損させた後、②PcrV-Strep tagII 発現プラスミドを形質転換し、③プラスミドから PcrV-Strep tagII の発現を誘導した。

作製した PAO1 Strep 株に対して SDS-PAGE および Strep tagII の検出試薬である StrepTactin-HRP を用いたウエスタンブロッティングを行うことで PcrV-Strep tagII の発現を評価した。その結果、IPTG を添加した PAO1 Strep 株において、PcrV-Strep tagII に相当するサイズ (約 34 kDa) に SDS-PAGE バンドおよび Strep tagII 由来のウエスタンブロッティングバンドが認められた (図 2-5 A, B)。このことから、作製した PAO1 Strep 株に IPTG を添加することで PcrV-Strep tagII の発現が誘導できていることが確認できた。

次に、Strep tagII の修飾が PcrV の機能を阻害していないかについて検討を行った。T3SA ニードル先端部に結合した PcrV リングは Ca^{2+} 濃度が高い条件では閉口してエフェクター分泌を抑制するが、EGTA の添加などにより Ca^{2+} 濃度が低下すると開口してエフェクター分泌を誘導する [25, 26, 30]。 *pcrV* 遺伝子の欠損は高 Ca^{2+} 濃度条件でのエフェクター分泌漏れを引き起こすことが報告されている [30]。これに基づいて、*pcrV* 遺伝子の欠損で起こる分泌漏れが PcrV-Strep tagII の発現により抑制されるか否かを検討することで、発現させた PcrV-Strep tagII が PcrV としての機能を保持しているかを評価した。その結果、*pcrV* 遺伝子欠損 PAO1 株 (Δ *pcrV*) において認められた高 Ca^{2+} 濃度条件でのエフェクター分泌漏れは PcrV-Strep tagII を発現させる (Δ *pcrV*/*pcrV-strep tagII*) ことで抑制されることが確認できた (図 2-5 C)。このことから、発現させた PcrV-Strep tagII が PcrV としての機能性を保持していることが確認できた。

以上の結果より、本研究で作製した PAO1 Strep 株では T3SA の機能に影響することなく、T3SA 先端部に Strep tagII が修飾されていることが確認できた。以降の実験では、この PAO1 Strep 株を用いて T3SA 回転運動評価系の構築を試みた。

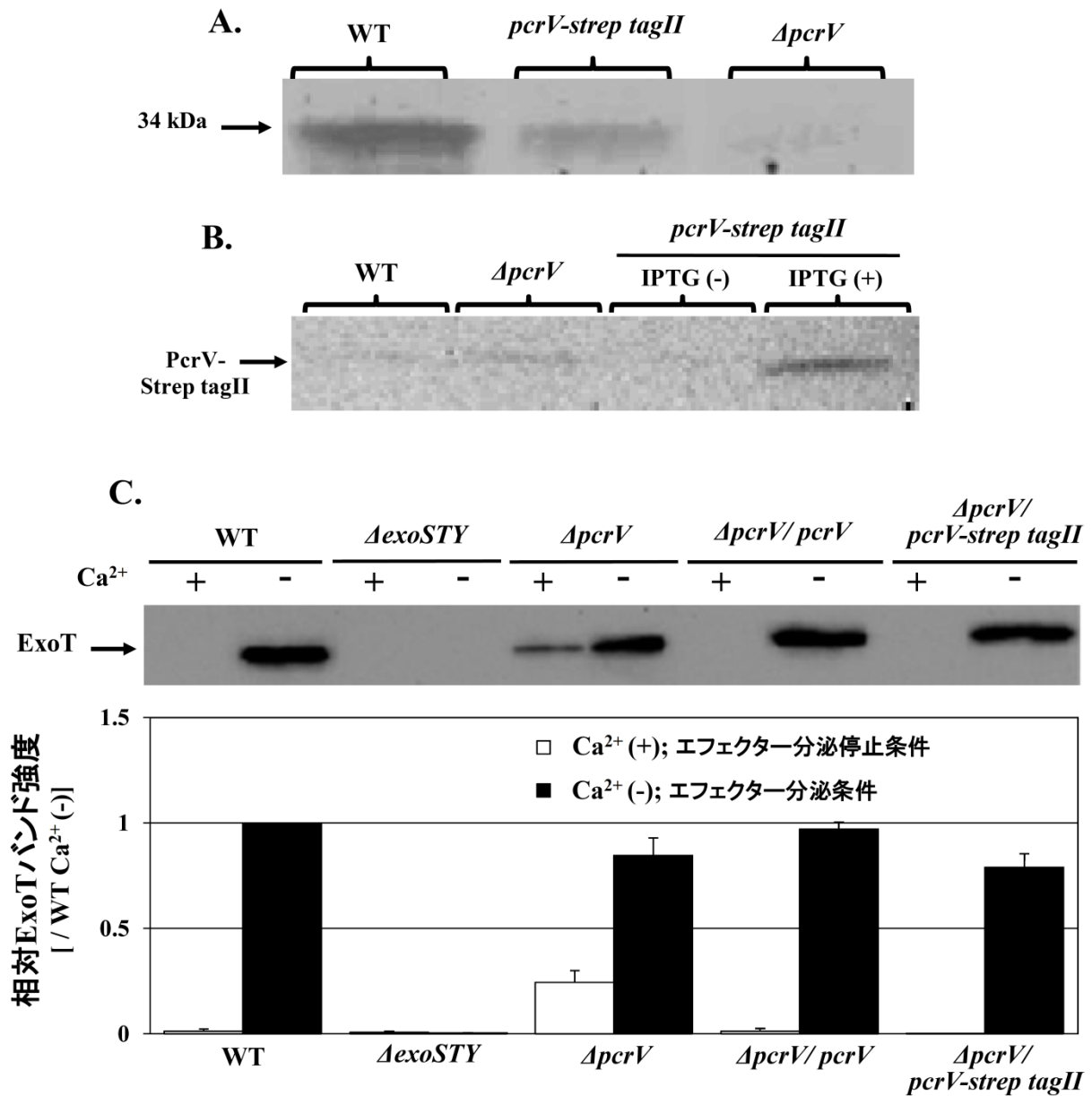


図2-5. 作製した PAO1 Strep 株における PcrV-Strep tagII の発現および機能性の評価
A. SDS-PAGE による PcrV-Strep tagII の発現評価. PcrV-Strep tagII 発現株において、PcrV タンパク質のサイズに相当する約 34kDa の位置にバンドが認められた。
B. ウェスタンブロッティングによる Strep tagII の検出. PcrV-Strep tagII 発現株においてのみ、Strep tagII 由来のバンドが検出された。
C. エフェクター分泌漏れからの PcrV の機能性評価. PcrV-Strep tagII 発現株において、 $\Delta pcrV$ 株で認められた Ca²⁺ 存在下での分泌漏れが抑制されていた。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。

2-3-2. ストレプトアビジンコート蛍光標識マイクロビーズの Strep tagII 特異的結合性の評価

T3SA の動きをプローブの動きとして捉えるためには、プローブが T3SA 特異的に結合している必要がある。そこで、本研究にて回転観察用プローブとして用いるストレプトアビジンコート蛍光標識マイクロビーズが PAO1 Strep 株の Strep tagII に対して特異的に結合するかについて検討を行った。

はじめに、ストレプトアビジンが PAO1 に対して非特異的に結合するか否かを蛍光標識ストレプトアビジン (ストレプトアビジン-FITC) を用いて確認した。ストレプトアビジン-FITC と PAO1 との結合は、両者を混合後、遠心分離した際の細菌ペレット中 FITC 蛍光強度を測定することで評価した。結果として、PAO1 WT では FITC 蛍光がほとんど確認できなかったのに対して、PcrV-Strep tagII 発現 PAO1 (PAO1 Strep; IPTG (+)) では WT の約 10 倍の蛍光が検出された (図 2-6)。このことから、ストレプトアビジンは PAO1 に非特異的には結合せず、Strep tagII 特異的に結合することが確認できた。

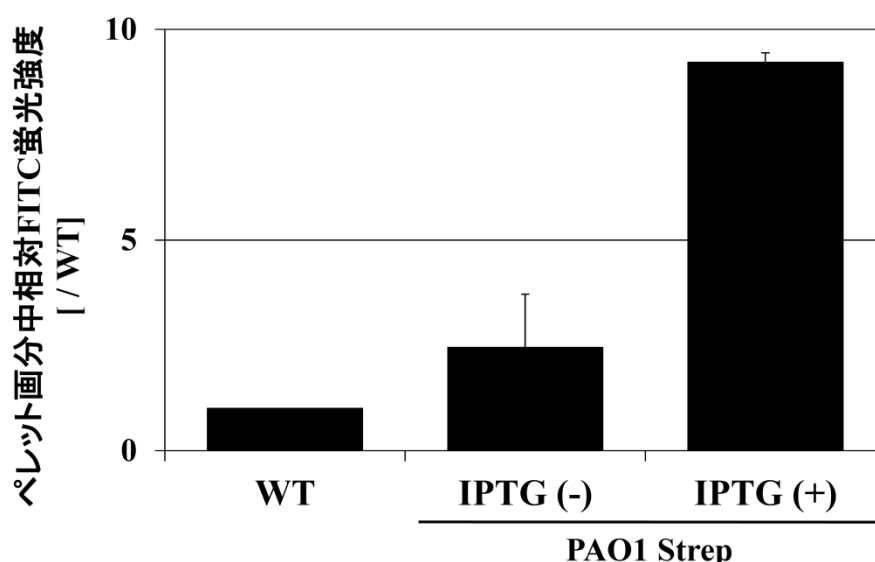


図 2-6. ストレプトアビジン-FITC の PAO1 への結合性評価
: T3SA 先端部を Strep tagII で修飾した PAO1 Strep 株では、未修飾の WT に比べて約 10 倍量のストレプトアビジン-FITC が結合した。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。

次に、ストレプトアビジンコート蛍光標識マイクロビーズが PAO1 Strep 株に結合することを確認するため、菌液とビーズ懸濁液を混合し、室温にて 30 分間インキュベートした後、その混合液を原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope; AFM) を用いて観察した。緑膿菌を AFM で観察すると、長径約 2 μm , 短径約 1.5 μm , 高さ約 500 nm のラグビーボール型構造体として認められ、観察条件によっては細菌の一端から長く伸びるべん毛まで観察できた (図 2-7 A)。また、マイクロビーズは、直径 1.5-2 μm , 高さ 250-500 nm 程度の球体として観察できた (図 2-7 B)。両者の混合液を AFM で観察したところ、ラグビーボール型の PAO1 Strep 株 (長径約 3 μm , 短径 1.5 μm , 高さ約 300 nm) の先端に球形のマイクロビーズ (直径 2 μm , 高さ 250 nm) が結合している様子が観察できた (図 2-7 C)。このことから、回転観察用プローブであるストレプトアビジンコート蛍光標識マイクロビーズが PAO1 Strep 株に結合していることを確認できた。

以上の結果より、ストレプトアビジンコート蛍光標識マイクロビーズが Strep tagII—ストレプトアビジン結合を介して PAO1 Strep 株の T3SA 特異的に結合することが確認できた。これにより、図 2-3 に示す評価系を構築することで T3SA の動きをマイクロビーズの動きとして観察できることが示唆された。

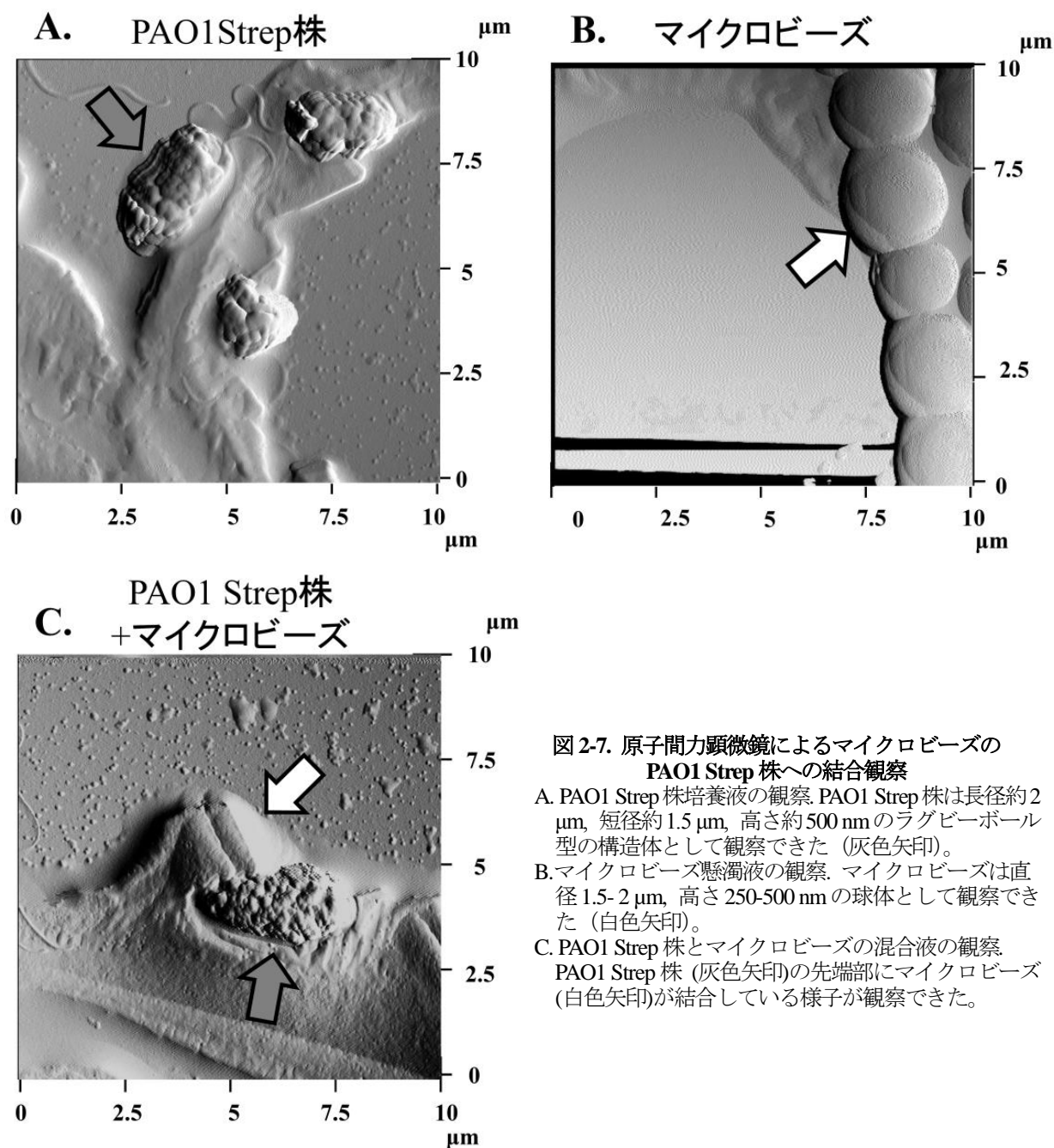


図2-7. 原子間力顕微鏡によるマイクロビーズのPAO1 Strep株への結合観察

- A. PAO1 Strep株培養液の観察. PAO1 Strep株は長径約2 μm, 短径約1.5 μm, 高さ約500 nmのラグビーボール型の構造体として観察できた (灰色矢印).
- B. マイクロビーズ懸濁液の観察. マイクロビーズは直径1.5-2 μm, 高さ250-500 nmの球体として観察できた (白色矢印).
- C. PAO1 Strep株とマイクロビーズの混合液の観察. PAO1 Strep株 (灰色矢印)の先端部にマイクロビーズ (白色矢印)が結合している様子が観察できた.

2-3-3. T3SA 回転運動の観察

2-3-2 項において、ストレプトアビジンコート蛍光標識マイクロビーズが PAO1 Strep 株の T3SA 特異的に結合することが確認できた。そこで、図 2-3 で示した観察系を実際に構築し、T3SA 回転運動の観察を試みた。Noji らによる F1-ATPase の回転観察で用いられた方法を参考に、T3SA 回転運動の観察はポリリジンコートスライドガラスとカバーガラス、および両面テープを用いて作製したフローセル中で行うことにした [24]。フローセルを用いることで観察対象を乾燥させることなく溶液中での動きを観察できるとともに、毛細管現象を利用してフローセル内部の溶液を交換することで種々の試薬を添加した際の回転運動への影響を評価することが可能となる。

まずは、フローセルに添加する細菌量およびビーズ量の検討を行い、T3SAの動きを観察するのに適した条件の確立を試みた。添加細菌量が多すぎると細菌同士が重なり合うため、T3SAの動きが干渉されてしまう。適切な添加細菌量を決定するためにPAO1 Strep 培養液を種々濃度で希釈してフローセルに導入したところ、5 mm 幅のフローセルにOD600=0.1の菌懸濁液を30 μ L 添加した場合に、細菌が適度な距離を保ってスライドガラス上に固定されることが確認できた(図2-8. 明視野)。ビーズ添加量についても同様に検討を行ったところ、作製したフローセルにビーズ懸濁液を導入すると細菌の有無に関わらずビーズがスライドガラスに非特異的に吸着することがわかった。これは、スライドガラスに固定されているポリリジン(正電荷)とビーズにコートされているストレプトアビジン(負電荷)とが静電的相互作用により非特異的に結合したためと考えられた[24]。そこで、この非特異的吸着を抑えるためにビーズを添加する前に3% BSA 溶液(負電荷)を添加してフリーのポリリジンをマスクし、その後、2000倍希釈したビーズ懸濁液を添加したところ、ビーズの非特異的吸着が十分に抑制できることが確認できた。以上の条件でPAO1 WT および Strep 株をスライドガラスに固定してビーズ懸濁液を添加したところ、固定されている細菌数は同程度にも関わらず、PAO1 Strep 株ではWTの約5倍量のビーズが観察された(図2-8)。このことから、上記の観察条件であれば、PAO1 Strep 株のT3SA先端部に結合したビーズの動きを効率よく観察できると考えられた。

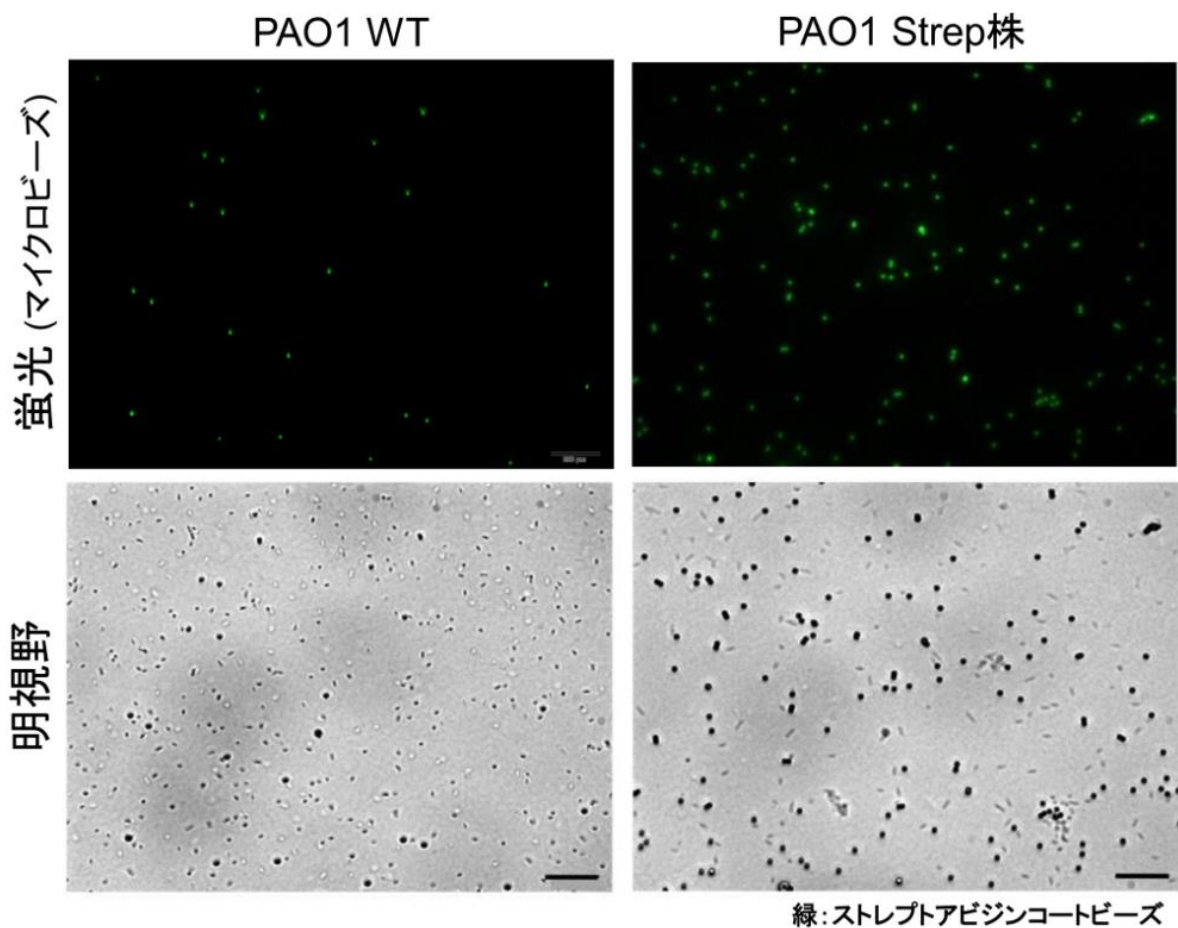


図2-8. 光学顕微鏡による細菌の固定とマイクロビーズの結合評価
 : 明視野…細菌およびビーズの結合評価、蛍光…ビーズ蛍光の観察。WT と Strep 株で同程度の細菌が固定されているにも関わらず、Strep 株でWTの約5倍量のビーズが認められた。スケールバー=20 μ m.

確立した観察条件でエフェクター分泌条件における T3SA の回転運動を実際に観察したところ、観察されたビーズの約 30-50 個のうち 1-2 個程度の割合で、一定の位置で振動するように動くビーズが認められた。ブラウン運動を行うビーズは数十秒～数分間にランダム方向に大きく移動するのに対して、これらのビーズは数分経過しても定位置から大きく外れることはなかった。したがって、このビーズの動きはブラウン運動とは異なり、T3SA の動きを反映したものであると考えられた。さらに、観察されたビーズの中には稀に 2 つのビーズが吸着したものが認められたが、このようなビーズが定位置でゆっくりと揺らぎながら反時計回りに回転する様子も観察できた (図 2-9)。このときのビーズの回転は約 25 秒間で 1 回転という、細菌べん毛や F1-ATPase の回転と比べると非常にゆっくりとした動きであった。

以上の結果より、T3SA の回転運動評価系を構築し、これを用いてエフェクター分泌条件における T3SA の回転運動を観察することに世界で初めて成功した。これにより、エフェクター分泌条件下で T3SA が回転運動を行う可能性が強く支持された。

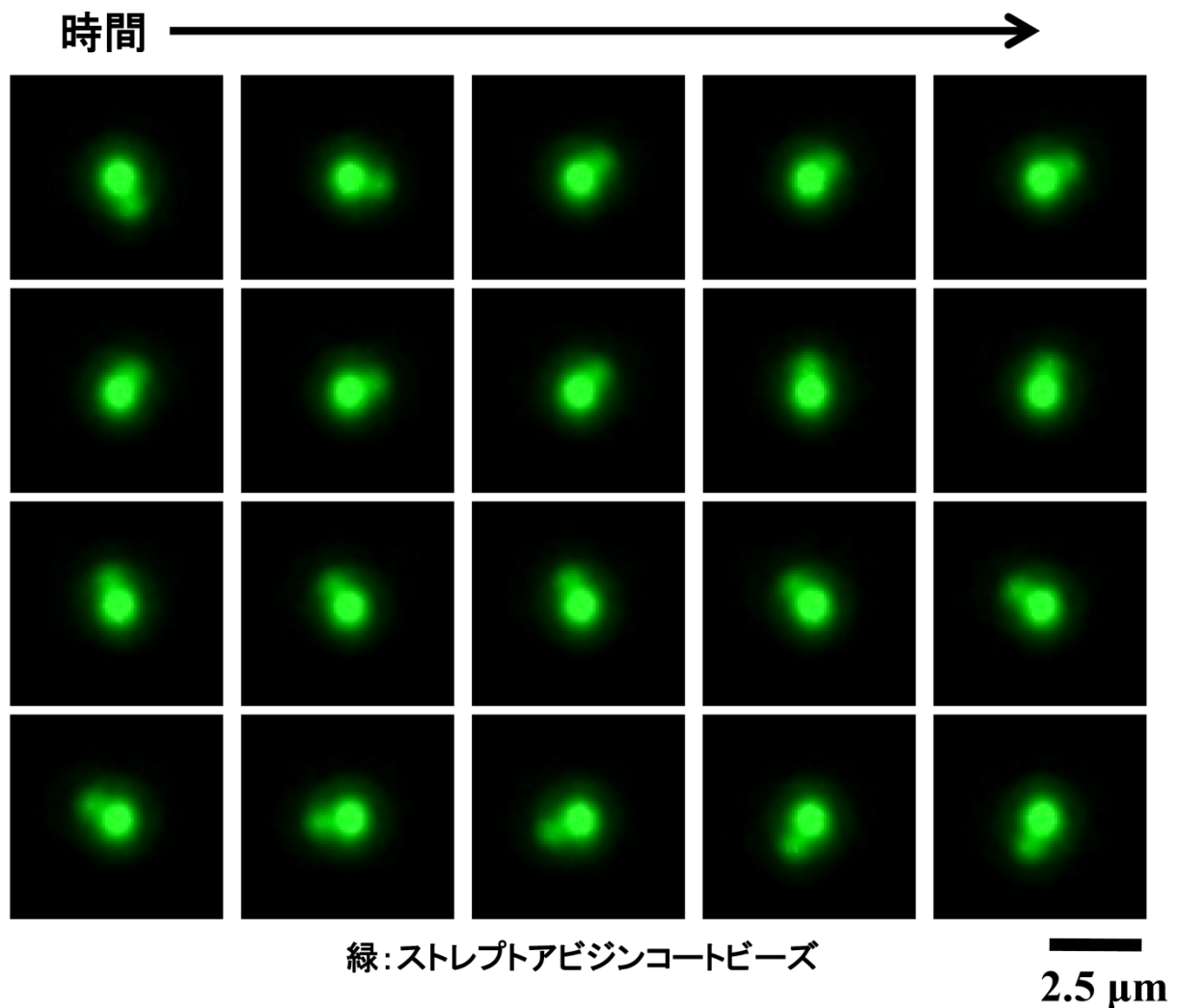


図 2-9. T3SA 回転運動の顕微鏡観察
: 2 つの吸着したビーズの回転観察結果を示す。エフェクター分泌条件において、ビーズがゆっくりと揺らぎながら反時計回りに回転する様子が観察できた。スケールバー=2.5 μm。

2-3-4. 回転運動の軌跡解析

2-3-3 項において、エフェクター分泌条件でビーズが定位置で揺動する様子、さらには2つの吸着したビーズが反時計回りに回転する様子 (図 2-9) が観察できた。観察されたビーズの動きの大部分は前者であることから、この動きが T3SA の動きを反映している可能性が高い。しかしながら、定位置でのビーズの揺動が図 2-9 のビーズの動きと同様に回転運動であるのかについては観察結果だけでは判断できなかった。そこで、ビーズ運動の軌跡を解析することで、これが回転運動であるか否かを検討することにした。軌跡解析には Adobe System の Adobe After Effects Cs3 を使用した。この解析の結果、観察されたビーズの揺動もまた回転運動であることが確認でき、T3SA が回転運動を行う可能性が強く支持された (図 2-10 A)。

一方で、この軌跡は正円形ではなく楕円形をしており、ビーズの中心点をプロットした軌跡は一定範囲内で揺らいでいることがわかった (図 2-10 B)。通常、ある一点を軸とする回転運動の軌跡は F1-ATPase の回転軌跡でも認められているように、回転軸を中心としたドーナツ型の軌跡となる [24]。したがって、本研究で観察されたビーズ運動では運動中に回転中心が揺らいでいると考えられた。

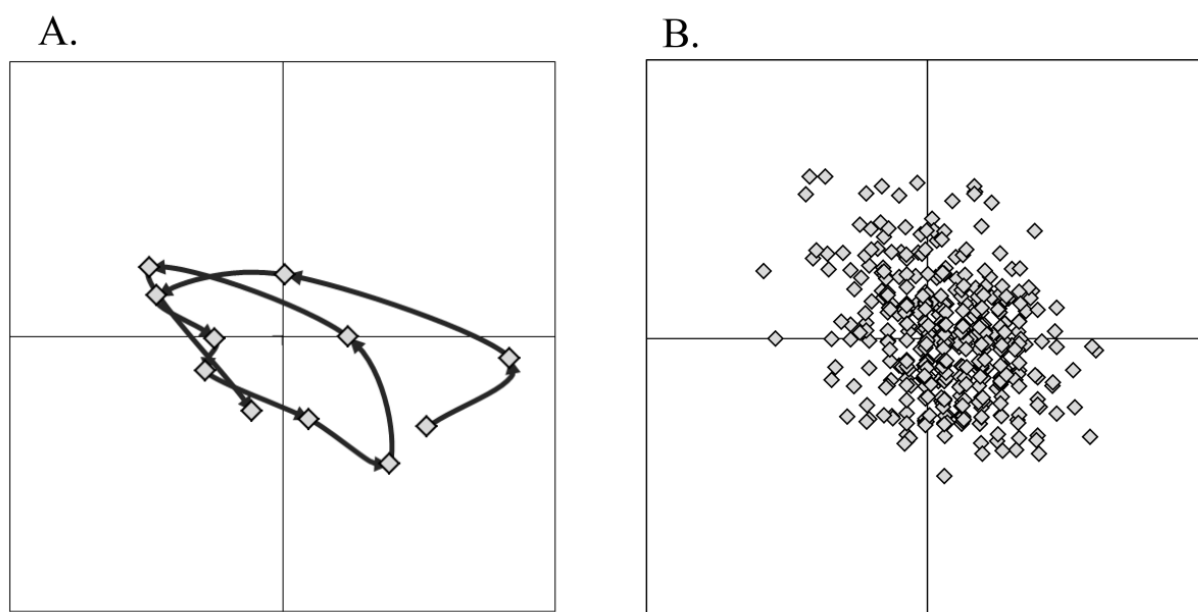


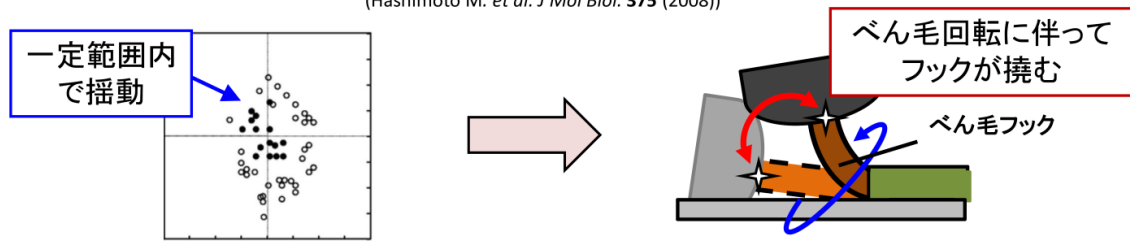
図 2-10. 観察されたビーズ運動の軌跡

- A. 短時間内でのビーズ運動の軌跡. 観察されたビーズ運動が回転運動であることが示唆された。
B. 観察時間内におけるビーズ中心の全プロット. T3SA の回転時にはビーズの中心が一定範囲内で楕円形に揺らいでいることが示唆された。

図 2-10 のような中心点が揺らぐ軌跡は、Tethered cell 法で観察されたべん毛フックの軌跡においても認められている。この軌跡パターンから Hashimoto らは、べん毛フックが回転に伴って撓む、柔軟な構造体なのではないかと推察している [31]。さらに、T3SA ニードル構成因子はべん毛フィラメントよりもべん毛フックの構成因子に類似した物理化学的性質を示すことも報告されている [32]。以上の報告に基づき、著者は図 2-10 の結果が、べん毛フックと同様に T3SA ニードルも回転運動に伴って撓む柔軟な構造体である可能性を示唆していると考えた (図 2-11)。

- ・べん毛回転時のフックの軌跡が一定範囲内で揺らいていることから、べん毛フックは回転運動に伴って曲がる柔軟な構造体である可能性が示唆されている。

(Hashimoto M. et al. *J Mol Biol.* 375 (2008))



- ・T3SAニードル構成因子の物理化学的性質はべん毛フック構成因子と類似している。

(Aizawa SI. *FEMS Microbiol Lett.* 202 (2001))

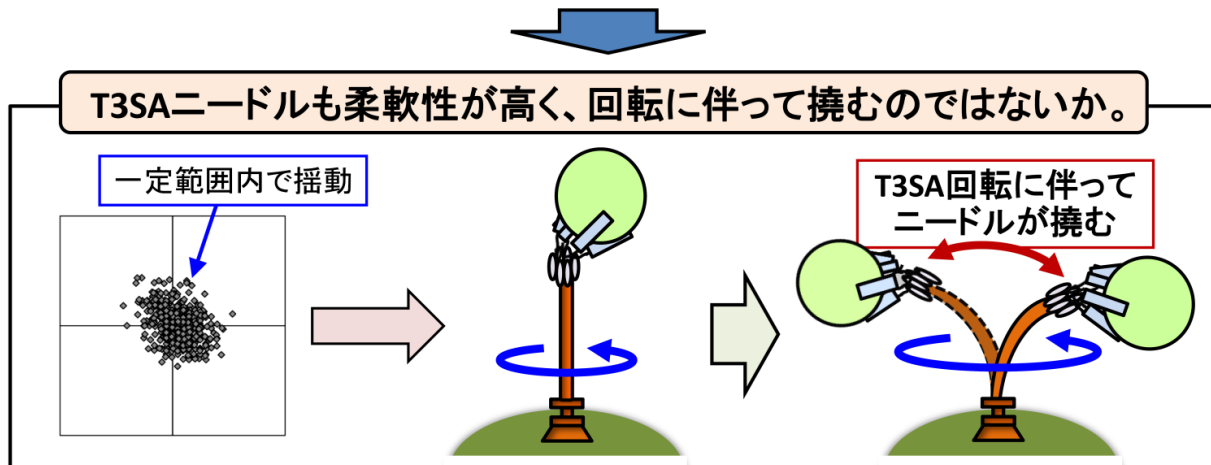


図 2-11. ビーズ運動の軌跡から推察される T3SA ニードルの柔軟性

：本研究で観察されたビーズ運動は明確な中心のない楕円形の軌跡を描いた (図 2-10)。同様の軌跡はべん毛回転時のフックの軌跡においても認められており、この結果からフックは柔軟な構造体であることが推察されている。また、T3SA ニードル構成因子の物理化学的性質はフックと類似していることも報告されている。したがって、図 2-10 の軌跡は T3SA ニードルが柔軟な構造体であり、回転に伴って撓む可能性を示唆しているものと考えられる。

2-3-5. T3SA 回転運動のプロトン駆動力依存性評価

Yersinia enterocolitica のⅢ型分泌にプロトン駆動力 (Proton Motive Force; PMF) が必要であることが Wilharm らにより報告されている [18]。PMF は細菌べん毛の回転エネルギーとしても利用されていることから、T3SA が PMF をエネルギーとしてニードルを回転させることでエフェクターを分泌しているのではないかと著者は考えた。しかしながら、本研究で用いた *P. aeruginosa* のⅢ型分泌にも PMF が関与するかについては、これまでに報告されていない。そこで、まずは *P. aeruginosa* のⅢ型分泌における PMF の関与について検討を行った。PMF を低下させる試薬であるプロトノフォア CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) を種々濃度で添加した際の PAO1 WT のエフェクター分泌量を評価したところ、CCCP 濃度依存的なエフェクター分泌量の減少が認められた (図 2-12)。このことから、PAO1 のエフェクター分泌にも PMF が利用されていることが確認できた。

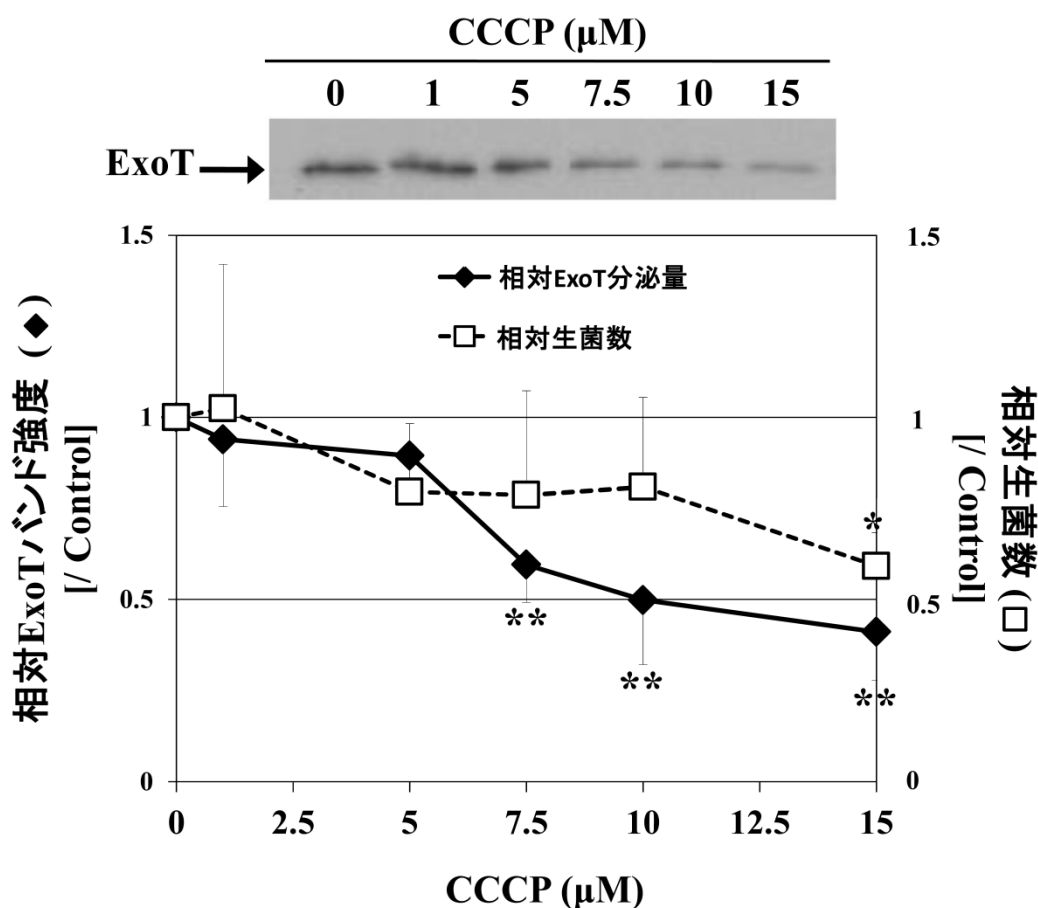


図 2-12. PAO1 のⅢ型分泌におけるプロトン駆動力依存性評価

: PMF を低下させる CCCP の濃度依存的にエフェクター分泌量が減少したことから、PAO1 のⅢ型分泌が PMF を必要とすることが示唆された。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。P* < 0.05, P** < 0.01.

次に、T3SA 回転運動の PMF 依存性を検討した。2-3-3 項の方法でビーズの動きを観察した後、観察培地を 10 μM CCCP+5 mM EGTa 含有 high-salt LB broth に置換したところ、ビーズの運動が速やかに停止した (図 2-13 A, B)。このとき、エフェクター分泌量の減少も同時に認められた (図 2-14)。このことから、T3SA の回転運動が PMF 依存的な運動であること、さらに、この回転運動とエフェクター分泌が相関している可能性が示唆された。また、ビーズと CCCP を同時添加した場合にはエフェクター分泌量が相乗的に減少することも確認できた (図 2-14)。これは CCCP による化学的な T3SA 回転阻害に加えてビーズ結合により物理化学的にも回転運動が阻害されたためと考えられる。したがって、本研究で観察された T3SA の回転運動がべん毛回転と同様に PMF をエネルギーとする運動であり、エフェクター分泌過程において重要な役割を担っている可能性が以上の結果から示唆された。

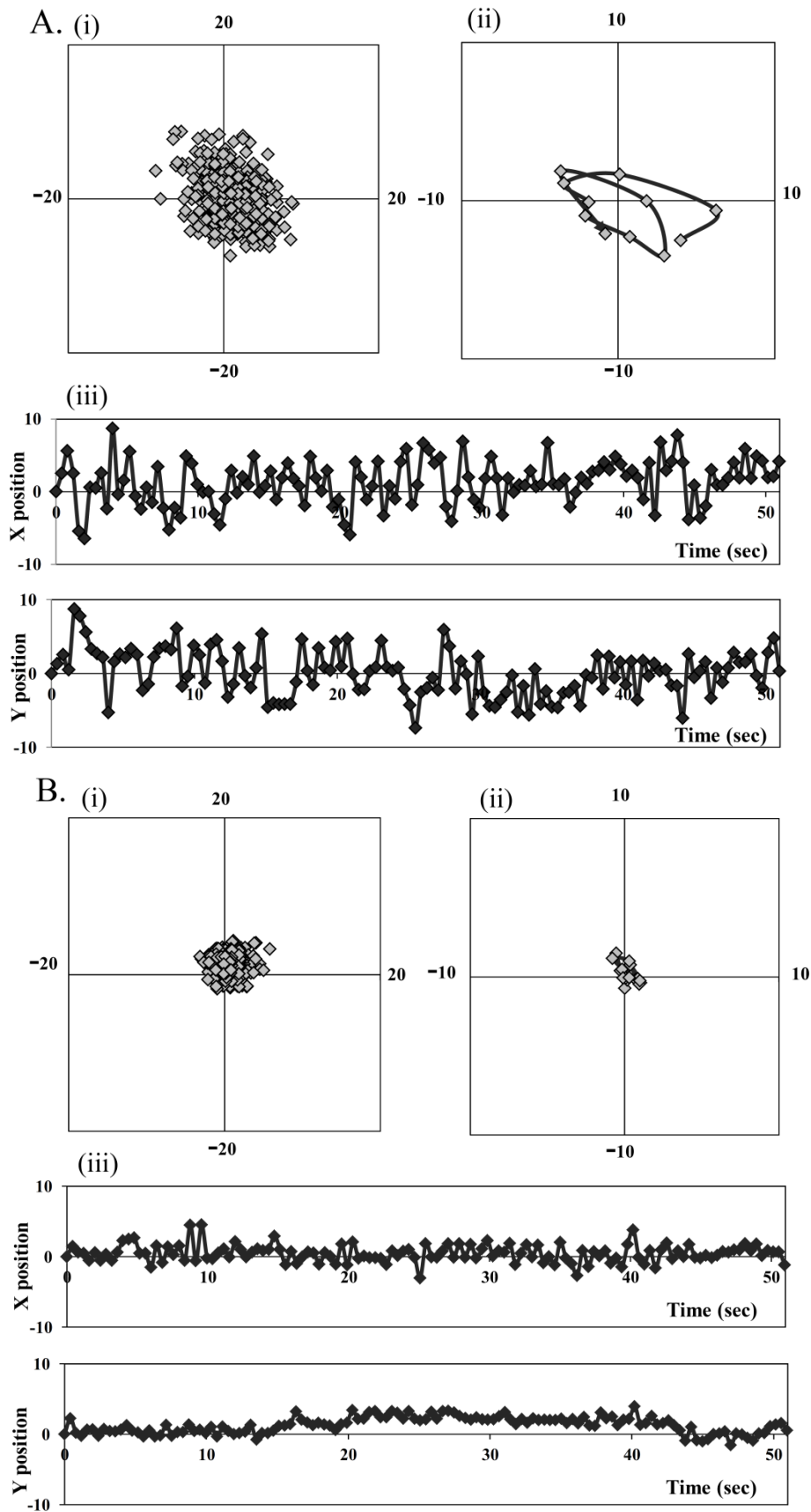


図 2-13. PAO1 Strep 株の T3SA 回転運動における PMF 依存性評価
 : CCCP 添加前 (A) および添加後 (B) のビーズ運動の軌跡. (i) 観察時間におけるビーズ中心のプロット.
 (ii) 短時間におけるビーズ運動の軌跡. (iii) 観察時間内のビーズ位置の x 座標および Y 座標の経時的変化.
 10 μ M CCCP の添加によりビーズ運動の停止が認められた。

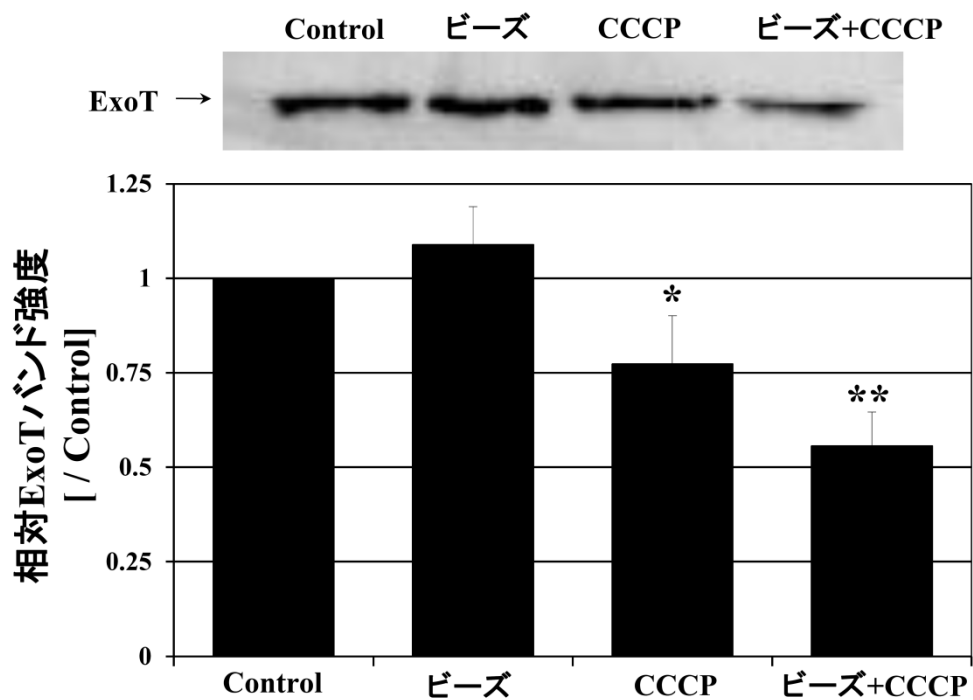


図 2-14. PAO1 Strep 株のⅢ型分泌における PMF 依存性評価

:マイクロビーズ存在下での PAO1 Strep 株のエフェクター分泌に対する CCCP の影響。PAO1 Strep 株のⅢ型分泌もプロトン駆動力に依存すること、およびビーズ共存下では CCCP 単独よりもさらに分泌が抑制されることが確認できた。CCCP は 10 μ M の濃度でを使用した。データは平均値 \pm 標準偏差の値を示す (n=3)。P* < 0.05, P** < 0.01.

2-4. 考察

本章において、T3SAの回転運動評価系を新規に構築し、エフェクター分泌条件下でT3SAが回転する様子の観察に世界で初めて成功した。また、回転の軌跡解析結果からT3SAニードルが回転に伴って撓む柔軟な構造体である可能性を見出した。さらに観察されたT3SAの回転運動がPMFに依存したものであり、エフェクター分泌過程に関与している可能性が示唆された。以上より、T3SAがPMFをエネルギーとしてニードルを回転させることでエフェクター分泌の駆動力を産出している可能性が示唆された(図2-15)。

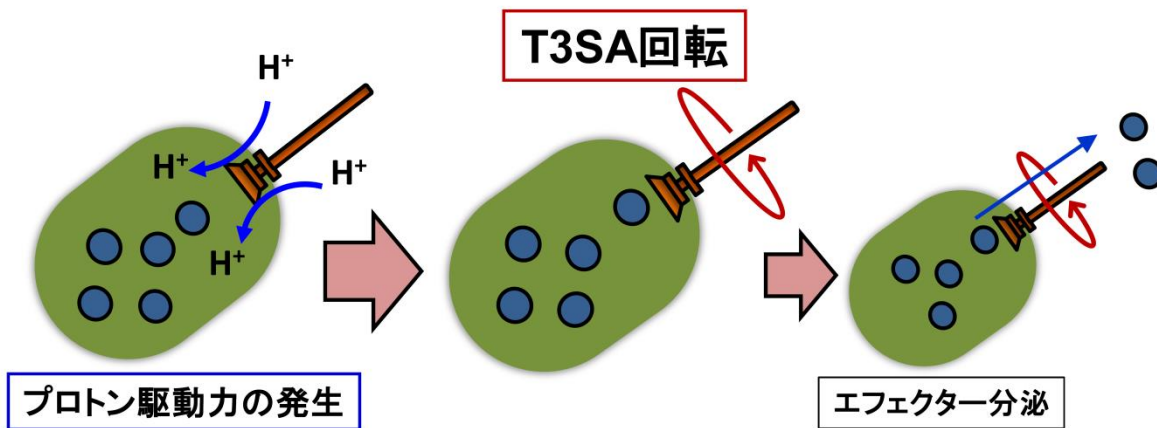


図2-15. プロトン駆動力を利用したT3SAの回転運動とエフェクター分泌
: 本章の結果から、T3SAがプロトン駆動力を利用した回転運動を行うこと、およびこの回転運動がエフェクター分泌過程に関与する可能性が示唆された。

しかしながら、今回構築した評価系では、観察された全ビーズのうち回転運動を示したビーズは数%程度と非常に少なかった。この原因としてはビーズの立体障害による回転の阻害など実験系の問題も考えられるが、仮に実験系に問題がないとすれば、この結果が何を意味するのかを考察してみる。細菌感染時には、通常1宿主細胞に対して1細菌のみが付着するというのではなく、多数の細菌が同時に宿主細胞に付着する。このとき、全ての細菌が一斉にエフェクターを注入する必要はなく、一部の細菌が宿主細胞にエフェクターを注入し、他の細菌はその反応を利用して感染する方が効率的である。例えば、緑膿菌はT3SAを介してエフェクターExoSを上皮細胞に注入し、タイトジャンクションを破綻させて細胞間隙を開くことで生体内に侵入するが[6]、ExoSを注入する細菌と開口した細胞間隙を通過する細菌は同一である必要はなく、両者が分担されている方が感染効率は良いと考えられる(図2-16)。このような役割分担が実際に存在するとすれば、エフェクターを分泌しない細菌に結合したビーズは動かず、エフェクター分泌を担う細菌のT3SA回転だけが検出される。したがって、一部のビーズしか回転しなかったという本研究の結果はこれを反映している可能性が考えられる。これについては現時点で推測の域を出ず、今後より詳細に解析する必要があるが、もしこれが事実であれば、未知の細菌間コミュニケーションの存在を示唆する非常に興味深い知見である。

また、図2-9で観察されたビーズの回転速度は細菌べん毛やF1-ATPaseの回転速度と比べると非常に遅かった。この原因としては、2つのビーズが結合したことによる回転抵抗の増大など実験的要因による可能性の他、エフェクター分泌のためのT3SAの回転運動は、細菌の駆動力を産出するためのべん毛回転やATP合成時のATP合成酵素の回転ほどの速度を必要としないという生理的要因に起因する可能性も考えられる。しかしながら、本研究で構築した回転運動評価系ではサイズが大きくて球状のマイクロビーズを回

ンフォメーション (Form B)の2種類が報告されている (図 2-17) [13, 33]。緑膿菌のニードル構成因子 PscF では1種類のコンフォメーションしか報告されていないが、ニードル構成因子間の構造類似性は高いことから、PscFにも2種類のコンフォメーションが存在する可能性は高い [13]。また、コンフォメーションの違いはタンパク質間相互作用に影響することから、両コンフォメーションではエフェクター分子に対する親和性が異なると推察される。

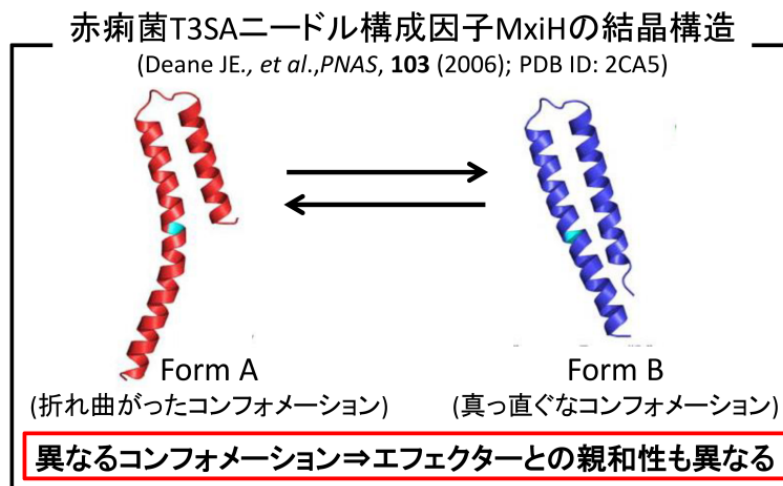


図 2-17. ニードル構成因子の2種類のコンフォメーション
: 赤痢菌の T3SA ニードル構成因子 MxiH では、C 末端 α -ヘリックスの位置が異なる2種類の結晶構造が報告されている。

しかしながら、両コンフォメーションがどのような条件で相互変換されるのかについては明らかにされていない。このコンフォメーション変化を誘起する要因として、本研究で見出した T3SA の回転運動に伴うニードルの撓みが寄与しているのではないかと著者は考えている。ニードルが撓むとニードル内に屈曲した領域と伸長した領域が生じる。これに伴う物理的な力によって屈曲領域では曲がったコンフォメーションである Form A が、伸長領域では真っ直ぐなコンフォメーションである Form B がそれぞれ優位になるのではないかと予想される (図 2-18)。実際に、AFM 探針を利用してタンパク質を牽引するなど、物理的な力でタンパク質のコンフォメーション変化を誘起できる [34-36] ことから、細菌がこのようなメカニズムでエフェクター輸送の駆動力を産出している可能性は十分にありうるだろう。しかしながら、物理的な力によるコンフォメーション変化の誘起が自然界で起こるという例はこれまでに報告されていないことから、この点については今後、慎重に検討する必要がある。

さらに、回転に伴うニードルの撓みは屈曲領域と伸長領域を周期的に相互転換する。このような周期性のあるニードルコンフォメーションの変化は、Trp10 螺旋上でのエフェクターの結合-解離の繰り返しの誘起するのではないかと予想される。さらに、Trp10 螺旋の向きと T3SA の回転方向が逆向きであれば、Trp10 螺旋から解離したエフェクターは、ニードルの回転に伴って Trp10 螺旋に沿ってニードル外方向へと輸送されるだろう。そして、ニードルコンフォメーションが再び変化すれば、エフェクターは Trp10 螺旋に再結合する (図 2-19)。これを繰り返すことで、1-3 節で述べた SMD シミュレーションで示されたような一方向性のエフェクター輸送が実現されているのではないかと著者は考えている。残念ながら、現時点では T3SA ニードル構成因子の配列が右巻きか左巻きかは明らかにされていないことから、Trp10 螺旋の方向も定かではない [37, 38]。また、本研究で構築した回転運動評価系では T3SA の回転方向を正確に評価するこ

とは困難である。したがって、この機構でのエフェクター輸送が実際に起こりうるか否かについては現時点では評価できない。今後、これらの問題が解決されて **Trp10** 螺旋の方向および **T3SA** の回転方向がわかれば、この仮説の妥当性についてより詳細な検討が可能になるだろう。

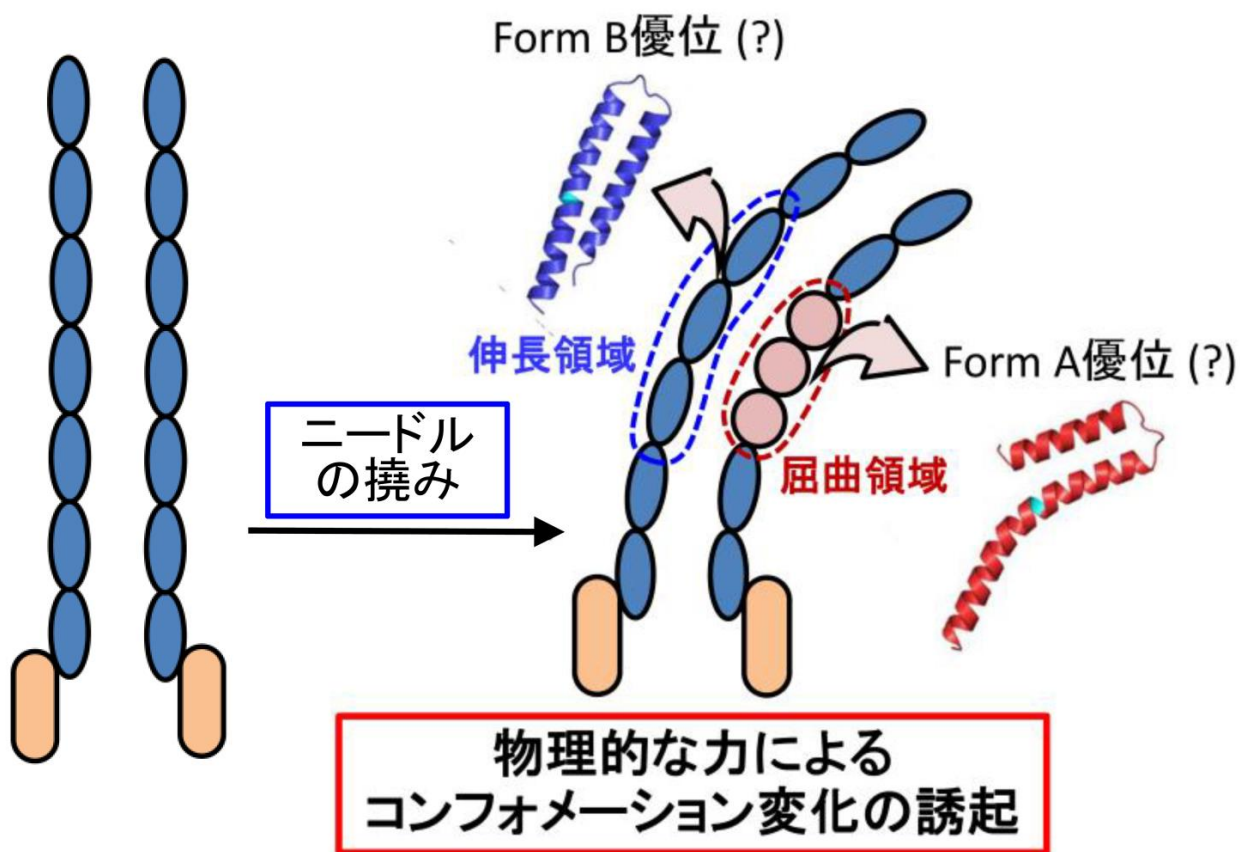


図 2-18. ニードルの撓みに伴う物理的なコンフォメーション変化の誘導
: T3SA の回転に伴うニードルの撓みは、物理的な力によってニードル構成因子の不均一なコンフォメーション変化を誘起しうると考えられる。

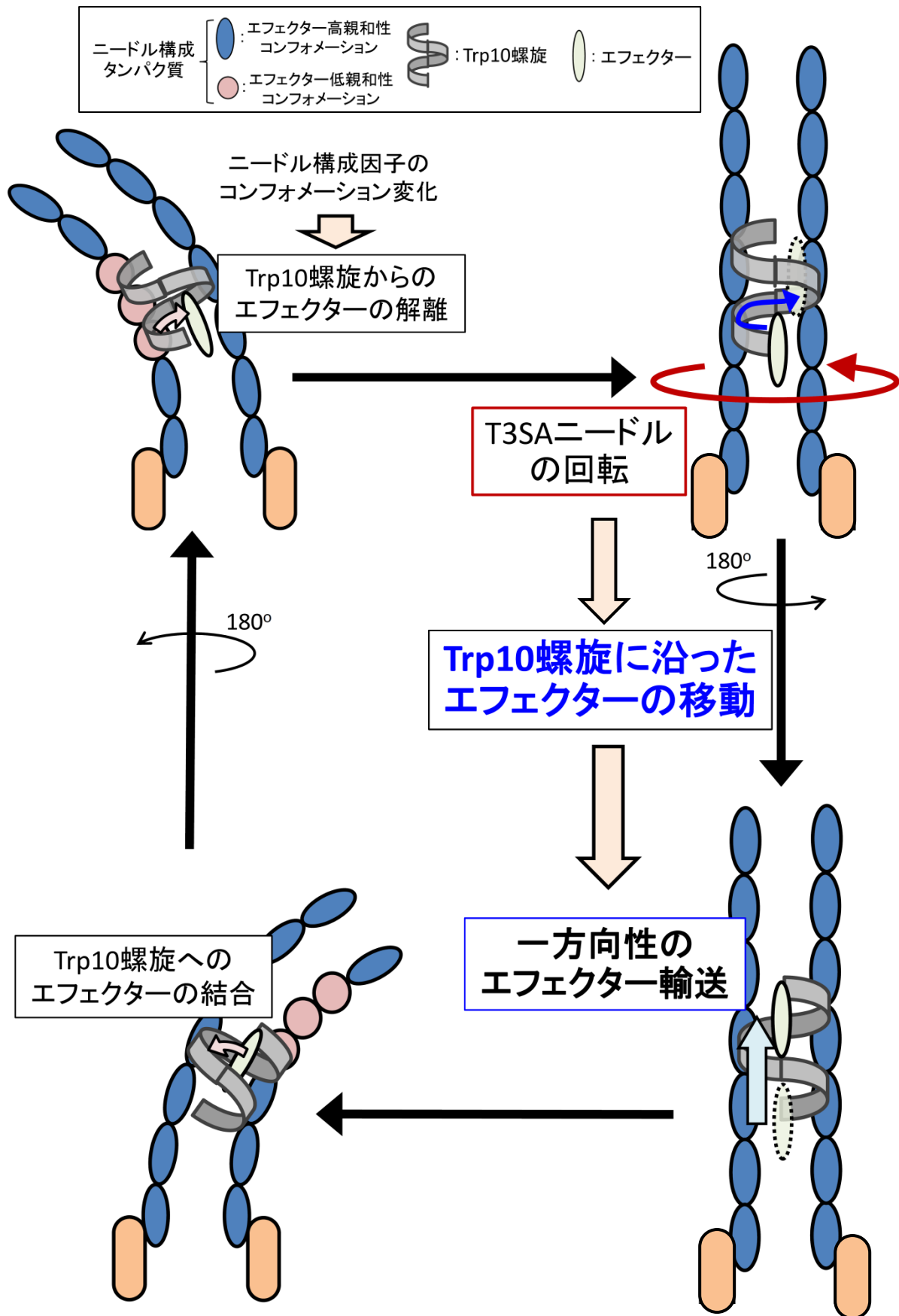


図 2-19. T3SA の回転によるエフェクターのニードル内輸送仮説モデル
 : T3SA の回転に伴うニードルの撓みは Trp10 螺旋からのエフェクターの解離を誘発しうる。さらに、T3SA の回転方向と Trp10 螺旋の向きが逆であれば、T3SA 回転に伴い、解離したエフェクターはニードル内を Trp10 螺旋に沿って一方方向に輸送されると考えられる。

第3章 III型分泌装置の回転-エフェクター分泌相関の検討

3-1. 序論

第2章にて T3SA がプロトン駆動力を利用した回転運動を行うことを見出した。さらに、この回転運動がニードル構成因子のコンフォメーション変化を誘起することでエフェクターのニードル内輸送に必要な駆動力を産出している可能性が示唆された。この可能性を検証するために、本章では T3SA の回転運動とエフェクター分泌との相関性についてより詳細な検討を行うことにした。

T3SA の回転運動がエフェクター分泌の駆動力を産出しているのであれば、回転運動はエフェクター分泌過程に必須であり、これを阻害すれば分泌も抑制されると考えられる (図 3-1)。実際に 2-3-5 項ではプロトン駆動力を低下させることで T3SA の回転運動を阻害すると、エフェクター分泌量が減少することを確認した (図 2-13, 2-14)。この際のエフェクター分泌の抑制が T3SA の回転運動の停止に起因するのであれば、他の方法で回転運動を阻害した場合にも同様に分泌の抑制が認められるだろう。

細菌べん毛や F1-ATPase といった既知の分子モーターの回転運動は高粘性高分子を添加して粘性抵抗を増大させることで物理化学的に阻害できる [37, 38]。したがって、細菌べん毛と類似の機構で回転すると予想される T3SA の回転運動もまた高粘性高分子により物理化学的に阻害できると考えられた。この際にエフェクター分泌の抑制も認められれば、T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程に関与することが強く支持される。この考えに基づき、本章では高粘性高分子の T3SA 回転運動およびエフェクター分泌への影響を評価することで、エフェクター分泌過程における T3SA 回転運動の関与について検討を行った (図 3-1)。

高粘性高分子としては、細胞毒性が低く、重合度により粘性等の物理化学的性質が変化する直鎖状の非荷電性親水ポリマーであるポリエチレングリコール (Polyethylene glycol; PEG) の高粘性重合体 PEG8000 を中心に用い [39]、これが T3SA の回転運動およびエフェクター分泌に与える影響を他の高分子と比較することで、T3SA 回転運動の物理化学的阻害がエフェクター分泌に及ぼす影響を評価することにした。

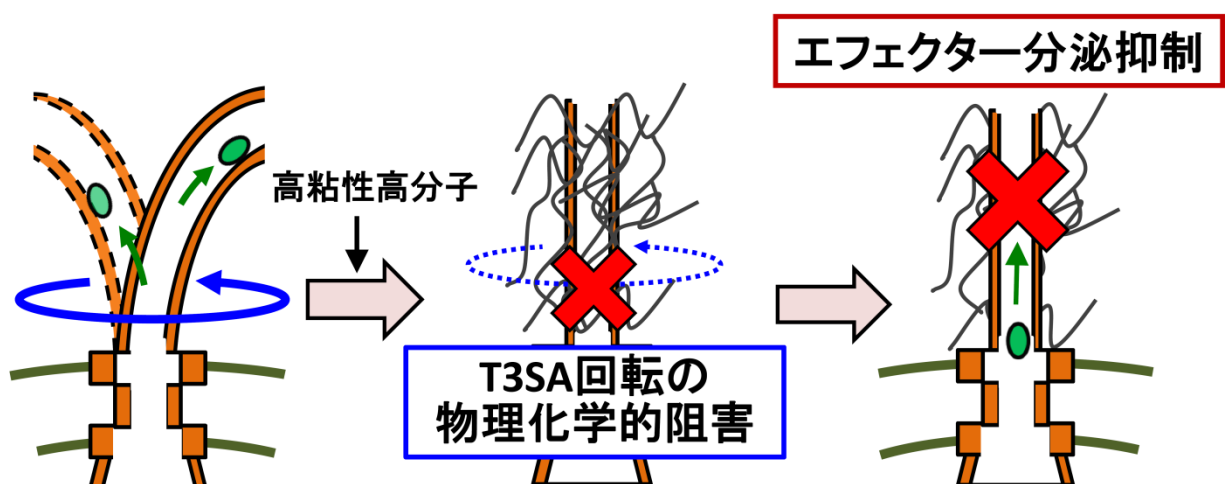


図 3-1. T3SA 回転運動の物理化学的阻害によるエフェクター分泌の抑制
:T3SA の回転運動がエフェクター分泌の駆動力を産出しているのであれば、この回転運動を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌は抑制されると考えられる。

3-2. 実験方法

3-2-1. 材料・試薬

PEG8000はMP Biomedicals (Tokyo, Japan) より購入した。PEG200 およびポリビニルピロリドン (平均分子量 360,000) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO) より購入した。ポリビニルアルコール (平均重合度 1,500-1,800) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。その他、本章で用いた試薬は全て特級であり、それ以上精製することなく使用した。

3-2-2. 使用した細菌株

本章で使用した菌株は第2章にて使用したものと同一である。

3-2-3. ウェスタンブロッティング法によるエフェクター分泌活性の評価

エフェクター分泌活性は2-2-4と同様の方法にて評価した。ポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンを用いた実験ではサンプル中タンパク質をメタノール-クロロホルム沈殿法にて沈殿させた。

3-2-4. コロニーカウント法による生菌数の測定

生菌数の測定は2-2-5と同様の方法で行った。

3-2-5. T3SA 回転運動の観察と軌跡解析

T3SAの回転運動は2-2-8と同様の方法で観察した。回転運動の軌跡解析は2-2-9と同様の方法で行った。

3-2-6. 溶液粘性および浸透圧の測定

各高分子溶液の粘性はSV-10 vibroviscometer (A&D Company, Tokyo, Japan) を用いて 35 °C の条件で測定した。浸透圧はVAPRO Vapor Pressure Osmometer 5600 (Wescor, South Logan, UT) を用いて室温で測定した。

3-2-7. リアルタイム Reverse Transcription-PCR 法による *exoT* 遺伝子発現レベルの評価

PAO1 WTをLB brothにて一晚培養後、培養液を5 mM EGTA含有high-salt LB brothで300倍希釈し、37 °C, 2.5 時間培養した。培養後の菌液3 mLを遠心分離 (9000 rpm x 3分間, 4°C) し、菌を回収した。菌ペレットを5 mM EGTA+20 % PEG8000含有high-salt LB broth 3 mLで再懸濁し、37 °C, 2.5 時間培養した。培養後、遠心分離にて細菌を回収し、RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いてTotal RNAを抽出した。このRNAを鋳型にランダムプライマー-nonadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)₉ (Takara Bio, Shiga, Japan) および逆転写酵素Super Script III Reverse Transcriptase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて逆転写PCR反応を行った。合成したcDNAを鋳型とし、Step One real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) およびSYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いてreal-time PCR反応を行った。内部標準にはDNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (*gyrB*)を使用し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法にて相対的mRNA発現量を評価した。*exoT*遺伝子の増幅には5'-TCTCAGCAGAACCCGCTTTTCGTGGCTGAG-3'および5'-AGCATCATCTGCTTGATCTCGGCGGCAGAG-3'、*gyrB*遺伝子の増幅には5'-TGCTGAAGGGGCTGGATGCCGTACGCAAGC-3'および5'-TATCCACCGGAATACCGCGTCCATTGTCGC-3'をそれぞれプライマーとして使用した [40]。

3-3. 結果

3-3-1. ポリエチレングリコールの T3SA 回転運動およびエフェクター分泌への影響評価

まずは、T3SA の回転運動が培地粘性の増大により、物理化学的に阻害できるか否かについて検討を行った。短鎖で低粘性の PEG200 および長鎖で高粘性の PEG8000 をそれぞれ添加した際の T3SA 回転運動への影響を評価したところ、PEG200 は回転運動に影響しなかったが、PEG8000 は回転運動を阻害することが確認できた (図 3-2, 3-3)。PEG200 と PEG8000 は同一%濃度では同数のモノマーユニット (エチレングリコール) を含むため、水素結合形成能やファンデルワールス相互作用などのエチレングリコール単位に由来する化学的性質は両者の間で同一であり、粘性等の物理化学的性質だけが異なる [41]。したがって、図 3-2 および 3-3 の結果は PEG8000 が培地粘性を増大させることで T3SA の回転運動を物理化学的に阻害したことを示唆すると考えられる。さらに、この条件でのエフェクター分泌量を評価したところ、T3SA の回転運動に影響しなかった PEG200 はエフェクター分泌にも影響しなかったが、回転運動を阻害した PEG8000 はエフェクター分泌量を有意に減少させた (図 3-4)。

以上の結果より、2-3-5 項で示したように PMF を低下させて化学的に T3SA の回転運動を阻害した場合だけでなく、粘性抵抗の増大により物理化学的に回転運動を阻害した場合にもエフェクター分泌が抑制されることがわかり、T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

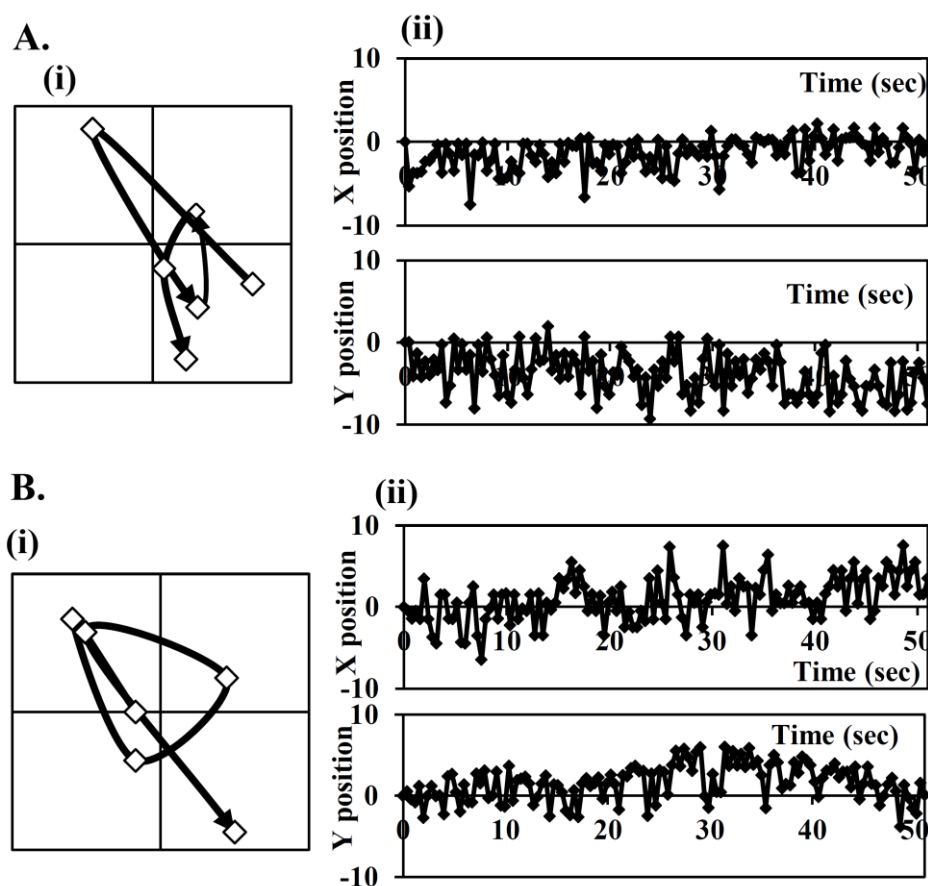


図 3-2. PEG200 の T3SA 回転運動への影響

: PEG200 添加前(A)および添加後(B)のビーズの軌跡. (i) 短時間内におけるビーズ運動の軌跡. (ii) 観察時間におけるビーズの x 座標(上)および y 座標(下)の変化. 5% PEG200 添加前後でビーズの動きに大きな変化は認められない。

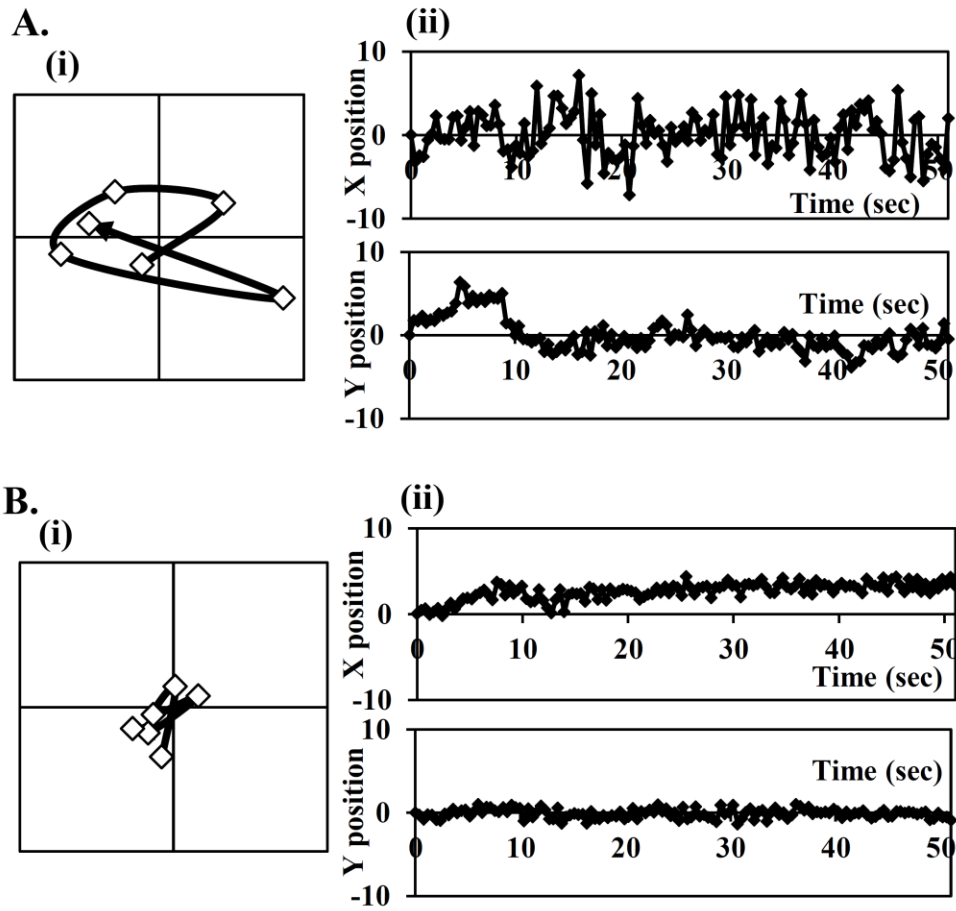


図 3-3. PEG8000 の T3SA 回転運動への影響

: PEG8000 添加前(A)および添加後(B)のビーズの軌跡. (i) 短時間内におけるビーズ運動の軌跡. (ii) 観察時間におけるビーズの x 座標(上)および y 座標(下)の変化. 5% PEG8000 の添加によりビーズの動きが阻害された。

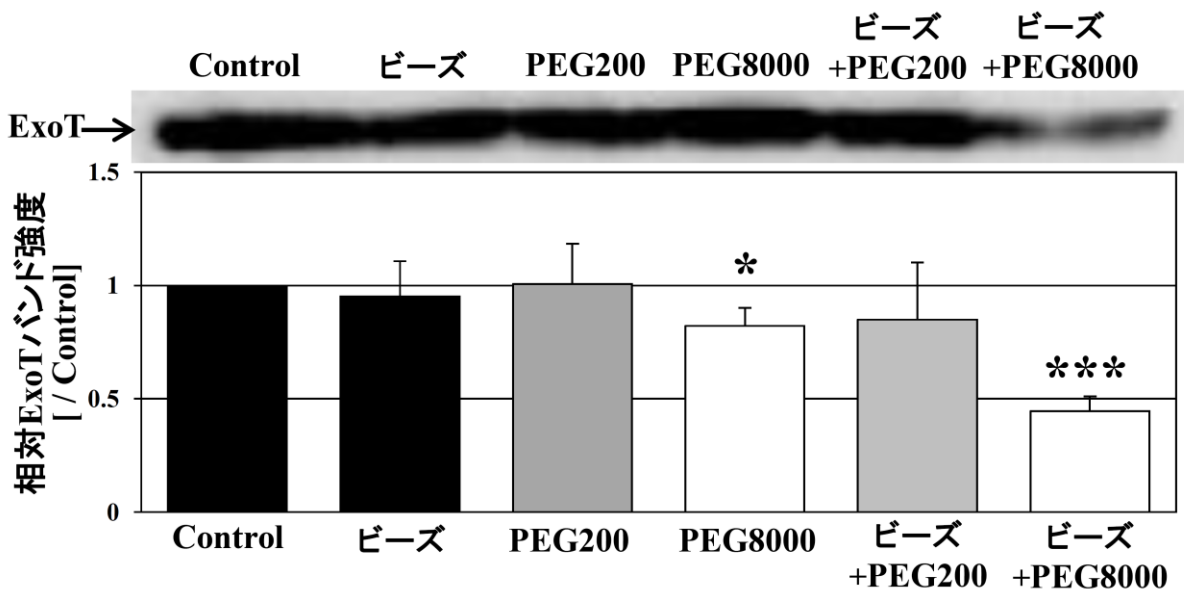


図 3-4. PEG200 および PEG8000 のエフェクター分泌への影響

: PEG200 および PEG8000 のエフェクター分泌への影響評価. 回転運動に影響しない PEG200 は分泌も抑制しなかったが、回転運動を阻害した PEG8000 は分泌も有意に抑制した。
各 PEG 溶液は 5% の濃度で使用した。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。P* < 0.05, P*** < 0.001.

3-3-2. PEG8000 のエフェクター分泌抑制効果における Strep tagII およびマイクロビーズの影響評価

3-3-1 項において T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程に関与している可能性が示唆された。しかしながら、この実験では T3SA 先端部に Strep tagII が修飾された緑膿菌 PAO1 Strep 株を用いており、これがエフェクター分泌に影響している可能性も考えられた。この可能性を検討するため、野生型 PAO1 (PAO1 WT) のエフェクター分泌に対する PEG200 および PEG8000 の影響を評価した。

各 PEG 溶液を 0-20 %濃度で添加したところ、PEG8000 溶液では生菌数の有意な減少は認められなかったが、10 %以上の PEG200 溶液では生菌数が著しく減少した (図 3-5 B)。これが分子数により変化する束一的性質である浸透圧の上昇に起因するのではないかと考え、各 PEG 溶液の浸透圧と生菌数との相関を評価したところ、両者が高い相関性を示す (相関係数= -0.969) ことが確認できた (図 3-5 C)。そこで、浸透圧による生菌数への影響を排除するために生菌数あたりのエフェクター分泌量を算出し、これに対する PEG200 および PEG8000 の影響を比較した。その結果、PAO1 Strep 株を用いた場合と同様に、低粘性の PEG200 はエフェクター分泌に影響しなかったが、高粘性の PEG8000 は添加濃度依存的にエフェクター分泌を抑制していた (図 3-5 D)。このことから、PEG8000 によるエフェクター分泌の抑制には Strep tagII の有無は無関係であり、PEG8000 は PAO1 WT の分泌に対しても抑制効果を示すことが確認できた。

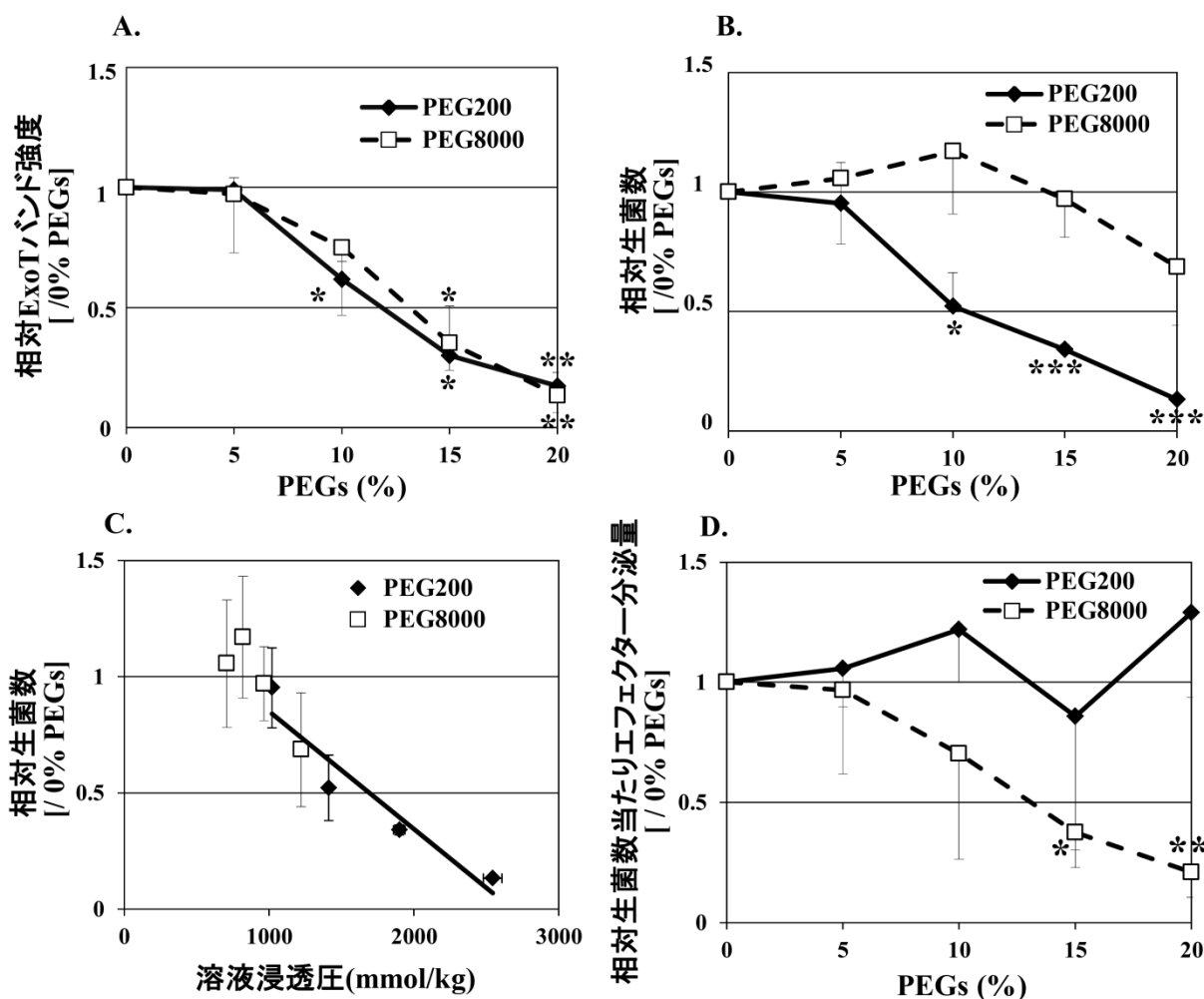


図 3-5. PAO1 WT のエフェクター分泌に対する PEG200 および PEG8000 の影響

A. PEG200 および PEG8000 添加時のエフェクター分泌量への影響 B. PEG200 および PEG8000 添加時の生菌数への影響 C. PEG 溶液の生菌数と浸透圧の相関図 D. 生菌数あたりのエフェクター分泌量に対する PEG200 および PEG8000 の影響 データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。P* <0.05, P** 0.01, P*** <0.001

3-3-3. PEG8000 のエフェクター分泌抑制効果と培地粘性との相関性評価

PEG8000 によるエフェクター分泌の抑制が培地粘性の増大に起因することを確かめるため、各 PEG 溶液の粘性を測定してエフェクター分泌量との相関性を評価した。その結果、PEG8000 のエフェクター分泌抑制効果は培地粘性の増大と高い相関性を示す (相関係数 = -0.944) ことが確認できた (図 3-6; PEG8000)。さらに、エフェクター分泌を抑制しない 0-20 % PEG200 溶液の粘性は 5 % PEG8000 溶液の値よりも低いことも確認できた (図 3-6 ; PEG200)。したがって、PEG8000 によるエフェクター分泌抑制効果には培地粘性の増大が大きく寄与していることが示唆された。

本研究で構築した T3SA 回転運動評価系では回転運動の有無は評価できるが、回転速度の変化まで評価することは困難である。そのため、T3SA の回転速度が培地粘性の増大に伴って減少しているかどうかは現時点では評価できない。しかしながら、細菌べん毛や F1-ATPase といった既知の分子モーターの回転速度は粘性抵抗の増大に伴って低下する [37, 38] ことから、T3SA の回転速度もまた培地粘性の増大に伴って低下している可能性は高い。したがって、図 3-6 の結果は PEG8000 によるエフェクター分泌の抑制が培地粘性の増大による T3SA 回転運動の物理化学的阻害を介して起こった可能性を支持するものと考えられる。

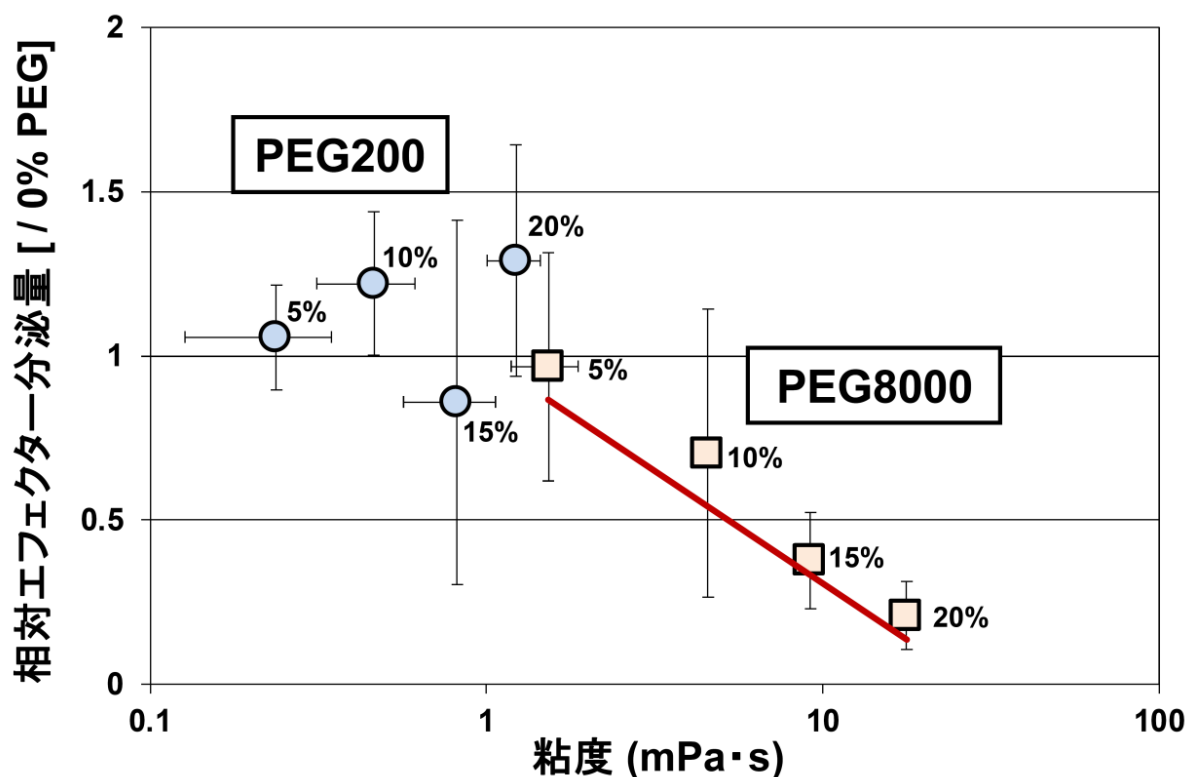


図 3-6. PEG200 および PEG8000 の培地粘性とエフェクター分泌抑制効果の相関図
：エフェクター分泌を抑制しない PEG200 添加時の培地粘性は低く、PEG8000 添加時の培地粘性とエフェクター分泌量は高い相関性を示した (相関係数 = -0.944)。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。

3-3-4. 菌体内エフェクター量に対する PEG8000 の影響

これまでの結果から、T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程に関与しており、PEG8000 はこの回転運動を物理化学的に阻害することで分泌抑制効果を示す可能性が示唆された。しかしながら、PEG8000 のエフェクター分泌抑制効果には回転運動の阻害以外の他の要因が寄与している可能性も考えられた。そのうちの一つとして、PEG8000 がエフェクター遺伝子発現を抑制した結果、菌体内エフェクター量が減少してエフェクター分泌速度の低下が引き起こされた可能性が挙げられる (図 3-7)。この可能性について検討するため、PEG8000 がエフェクター遺伝子発現および菌体内エフェクター量に及ぼす影響を評価した。

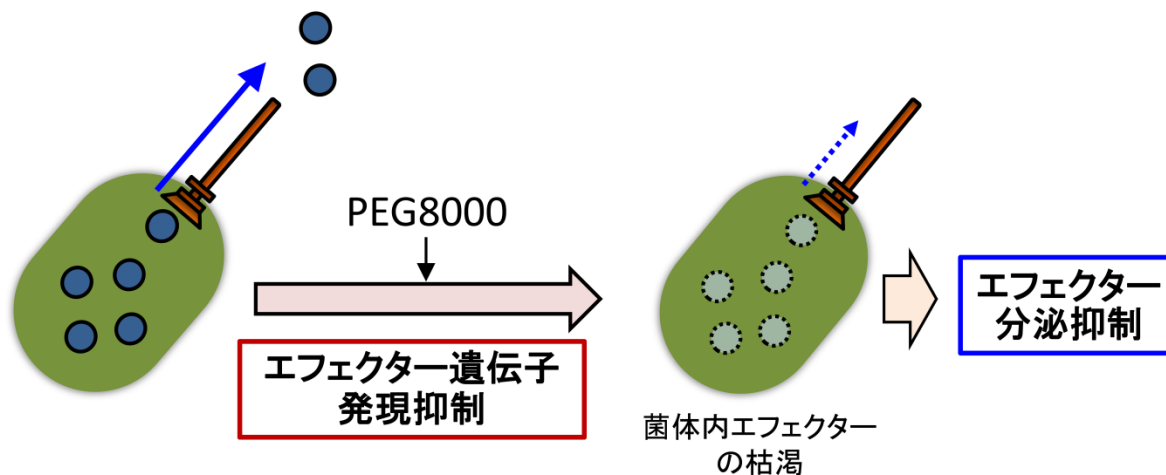


図 3-7. PEG8000 のエフェクター分泌抑制効果における遺伝子発現抑制の寄与の可能性
: PEG8000 がエフェクター遺伝子の発現を抑制する場合、菌体内エフェクター量が減少してエフェクター分泌速度が低下すると考えられる。

始めに、PEG8000 がエフェクター (ExoT) 遺伝子の発現に及ぼす影響を real-time RT PCR 法にて評価したところ、PEG8000 を添加することで *exoT* mRNA 量が増加することが確認できた (図 3-8)。このことから、PEG8000 はエフェクター遺伝子の発現を抑制するのではなく、むしろ亢進させることが示唆された。

さらに、PEG8000 添加時の培地上清中および菌体内エフェクター量をウエスタンブロッティング法にて評価した。その結果、PEG8000 非存在下では菌体内にエフェクターがほとんど検出されず、大部分は培地上清中に分泌されていたが、20% PEG8000 存在下では上清中エフェクター量が顕著に減少するとともに、菌体内エフェクター量が顕著に増加することが確認できた (図 3-9)。また、合計のエフェクター量は PEG8000 を添加することでやや増加することも確認できた (図 3-9)。このことから、PEG8000 は菌体内でのエフェクター産生を阻害しておらず、PEG8000 により分泌が阻害されたエフェクターは菌体内に蓄積していることが確認できた。

以上の結果より、PEG8000 のエフェクター分泌抑制効果は菌体内エフェクター量の枯渇に起因するものではないことが示唆された。

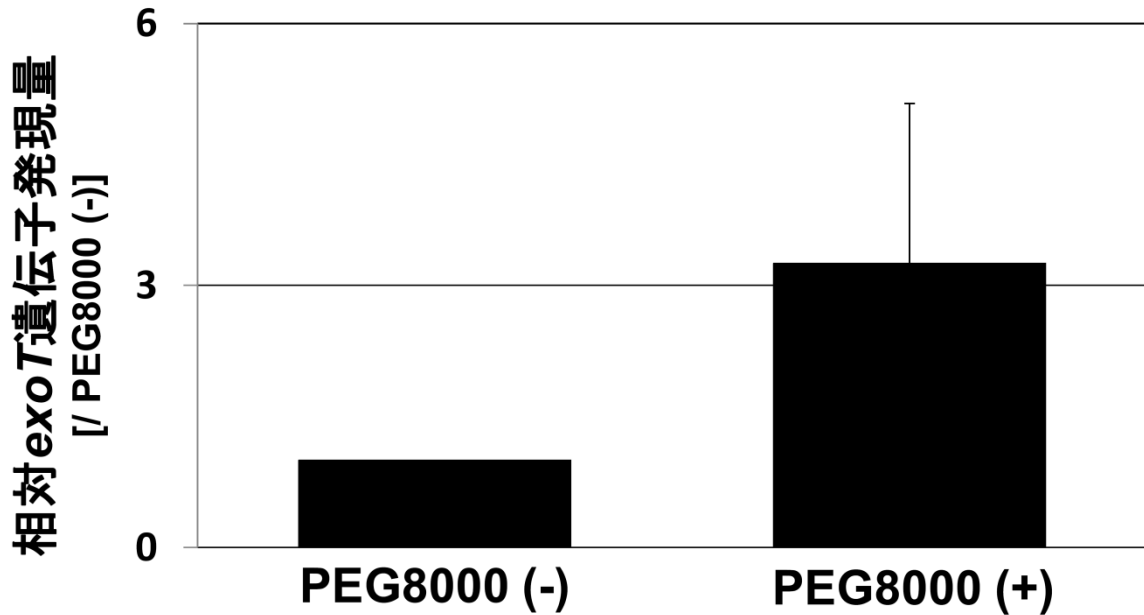


図3-8. リアルタイム RT-PCR 法による *exoT* 遺伝子発現に対する PEG8000 の影響評価
 : PEG8000 が *exoT* 遺伝子の発現に及ぼす影響を real-time RT PCR 法にて評価した。その結果、20% PEG8000 の添加は *exoT* 遺伝子の発現を亢進させることが確認できた。
 データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。PEG8000 添加前後の *exoT* 遺伝子の発現量に統計的な有意差は認められなかった。

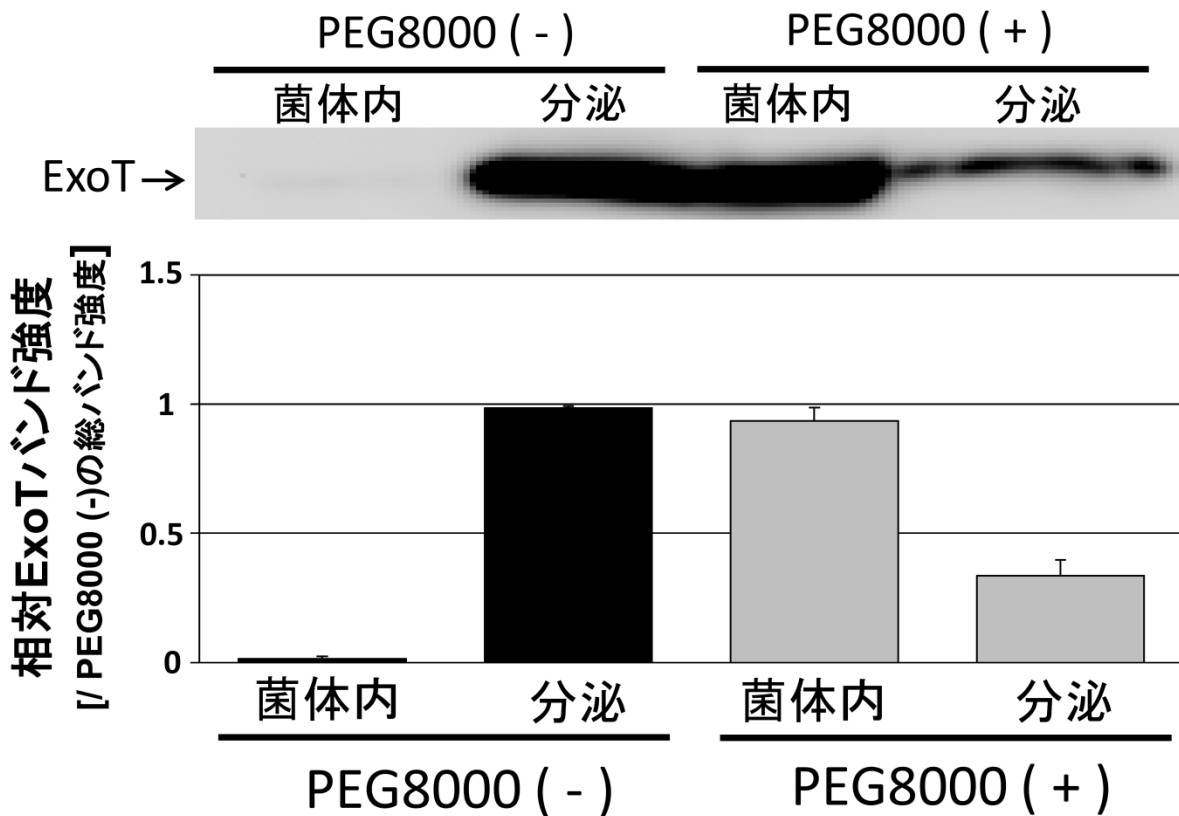


図3-9. ウェスタンブロッティング法による PEG8000 添加時の菌体内エフェクター量の評価
 : PEG8000 添加時の菌体内エフェクター量をウェスタンブロッティング法にて評価した。その結果、PEG8000 により分泌が阻害されたエフェクターは菌体内に蓄積していることが確認できた。
 菌体内画分は 20% PEG8000 処理後に回収した細菌ペレットを 1mg/ml リゾチームで処理し、SDS-Sample buffer を添加して 95°C、5 分間熱処理をすることで調製した。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。

3-3-5. PEG8000 の T3SA 傷害性の検討

PEG8000 が T3SA を傷害している場合にもエフェクター分泌は停止する。この場合、PEG8000 によるエフェクター分泌の抑制は不可逆的であり、PEG8000 を除去しても分泌は回復しないと予想される (図3-10)。一方、PEG8000 が T3SA を傷害することなく、回転運動を阻害することで分泌を抑制しているのであれば、PEG8000 を除去すると T3SA が再び回転してエフェクター分泌量は元通りに回復するだろう。

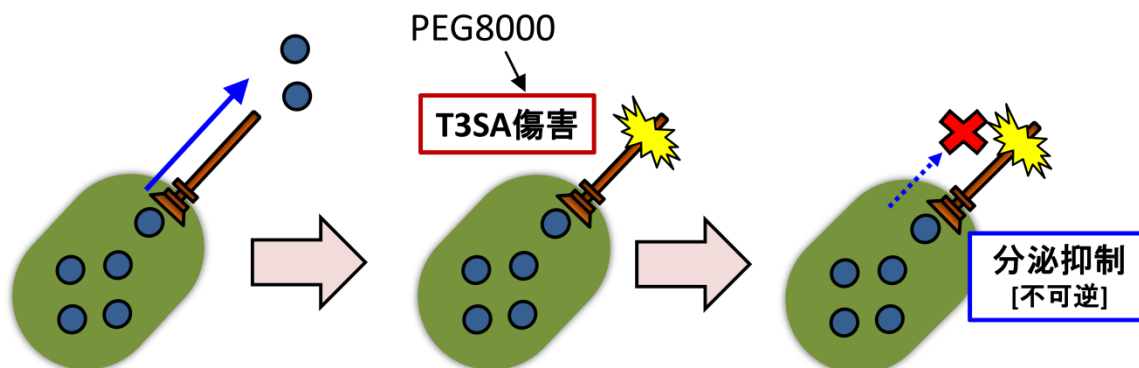


図 3-10. PEG8000 のエフェクター分泌抑制効果における T3SA 傷害の寄与の可能性
: PEG8000 が T3SA を傷害している場合、エフェクター分泌は不可逆的に抑制される。

PEG8000 が T3SA を傷害しているか否かを検討するため、PEG8000 を添加してエフェクター分泌を抑制した後、これを除去した際のエフェクター分泌量をウエスタンブロッティング法にて評価した。その結果、PEG8000 の添加により抑制されていたエフェクター分泌は PEG8000 を除去することで著しく回復することが確認できた (図 3-11)。このことから、PEG8000 によるエフェクター分泌の抑制は可逆的なものであり、PEG8000 は T3SA を傷害することなくエフェクター分泌を抑制していることが示唆された。

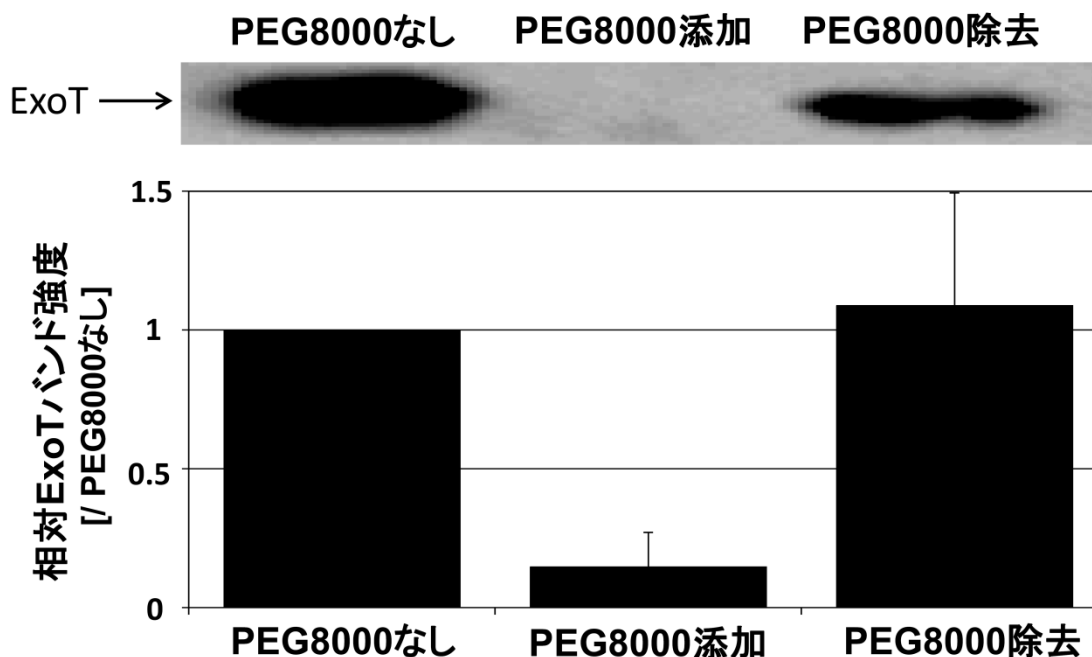


図 3-11. PEG8000 のエフェクター分泌抑制効果の可逆性検討
: PEG8000 により抑制されたエフェクター分泌は PEG8000 を除去することで著しく回復した。PEG8000 除去画分は 20% PEG8000 で処理後の菌ペレットを high-salt LB broth にて 3 回洗浄後、5 mM EGTA 含有 high-salt LB broth で再懸濁し、37°C、2.5 時間培養後の上清を回収することで調製した。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。

3-3-6. PEG8000 以外の高粘性高分子のエフェクター分泌抑制効果の検討

PEG8000 が培地粘性を増大させることでエフェクター分泌を抑制しているのであれば、PEG8000 と同程度の粘性を示す他の高粘性高分子を添加した場合にも同様のエフェクター分泌抑制効果が認められるだろうと考えられる (図 3-12)。そこで、この可能性を検討するため、PEG8000 と同様に高い粘性を示し、細胞毒性の低いポリビニルアルコール (Polyvinyl alcohol; PVA) およびポリビニルピロリドン (Polyvinyl pyrrolidone; PVP) のエフェクター分泌への影響を評価した。PVA および PVP は PEG8000 と同じく直鎖状の親水性ポリマーであるが、それぞれヒドロキシル基およびピロリドン基を側鎖として有するなど化学構造は PEG8000 と異なる (図 3-17)。

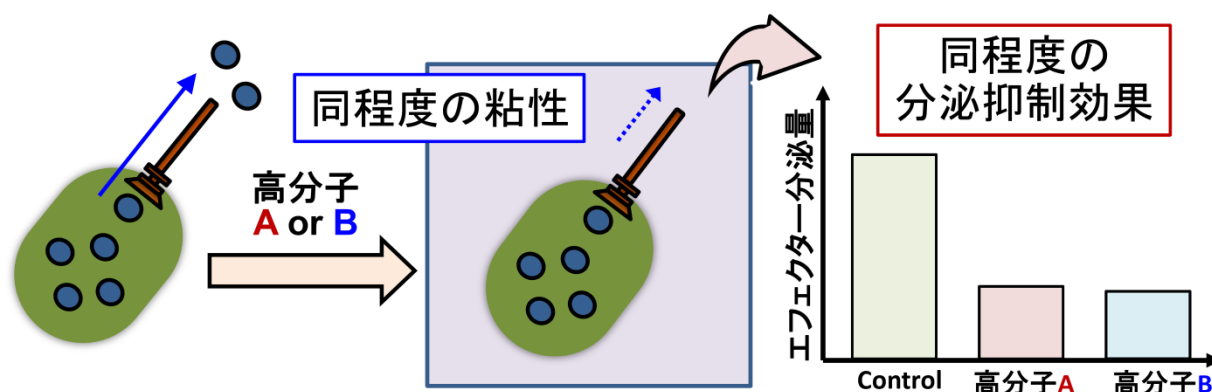


図 3-12. 培地粘性の増大によるエフェクター分泌の抑制
: 高分子によるエフェクター分泌の抑制が培地粘性の増大に起因するのであれば、同程度の粘性を示す高分子は同程度のエフェクター分泌抑制効果を示すと予想される。

5% PVA (約 30 mPa·s) および 5% PVP (約 50 mPa·s) は 20% PEG8000 (18.6 mPa·s) よりも高い粘性を示すことから、本研究では PVA および PVP を 0-5% の濃度範囲で使用した。その結果、PVA および PVP をこの濃度範囲で添加した場合には 20% PEG8000 添加時とは異なり、エフェクター分泌が抑制されることが確認できた (図 3-13, 3-14)。このことから、PEG8000 によるエフェクター分泌の抑制には単に培地粘性の増大だけが寄与しているわけではなく、PVA や PVP とは異なり PEG8000 だけが有する他の物理化学的特性も関与していることが示唆された。

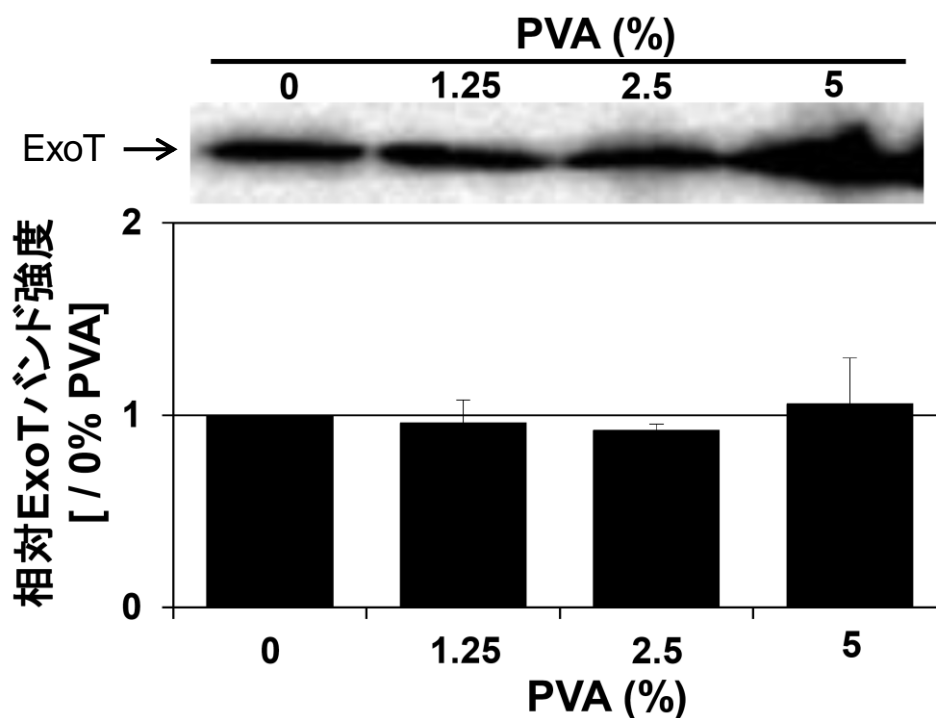


図3-13. ポリビニルアルコールのエフェクター分泌抑制効果の検討
: 20% PEG8000 以上の粘性を示す5%濃度であってもPVAはエフェクター分泌を抑制しなかった。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。

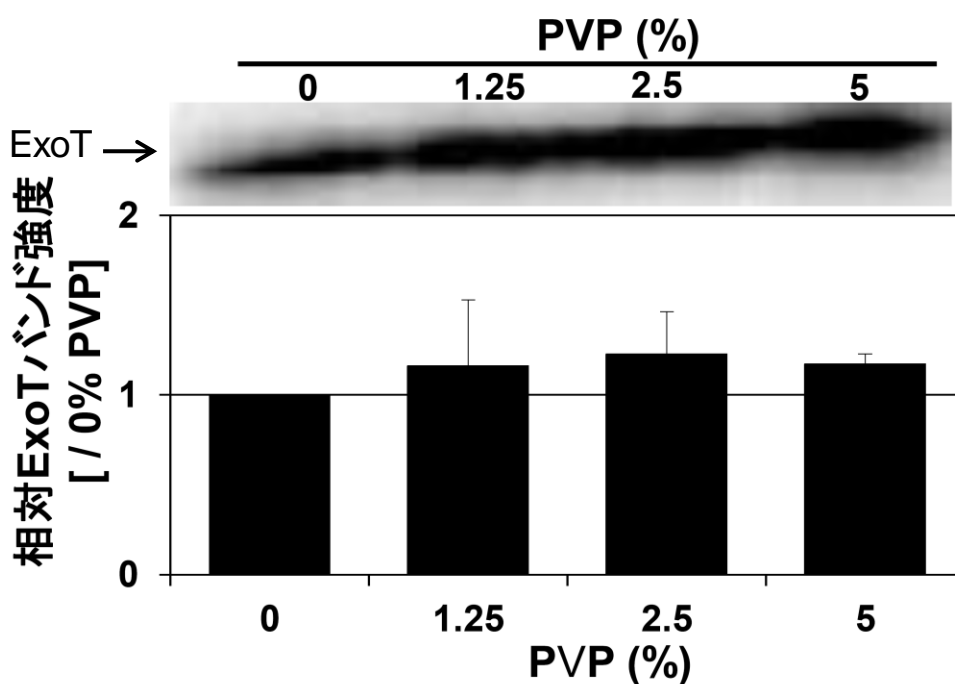


図3-14. ポリビニルピロリドンのエフェクター分泌抑制効果の検討
: 20% PEG8000 以上の粘性を示す5%濃度であってもPVPはエフェクター分泌を抑制しなかった。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。

3-4. 考察

本章において、高粘性高分子である PEG8000 が培地粘性を増大させることで T3SA の回転運動を物理化学的に阻害するとともにエフェクター分泌を抑制することを見出した。また、PEG8000 は菌体内エフェクター量の減少や T3SA の傷害は引き起こさなかったことから、エフェクター分泌抑制効果にこれらの要因は寄与していないことも確認できた。したがって、第 2 章で見出した T3SA の回転運動はエフェクター分泌過程に重要な役割を担っており、PEG8000 はこの回転運動を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌を抑制している可能性が強く支持された (図 3-15)。

しかしながら、PEG8000 と同程度の粘性を示す PVA や PVP ではエフェクター分泌は抑制されなかった (図 3-13, 3-14)。また、T3SA へのマイクロビーズの結合は回転抵抗を増大すると予想されるが、ビーズを添加してもエフェクター分泌量の減少は認められなかった (図 2-13 C および図 3-4)。これらの結果は、T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程に関与する、という結論と一見矛盾するように思われる。それでは、「T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程に関与する」という前提のもとで、これらの結果はどのように説明できるのか？ この点について以下に考察する。

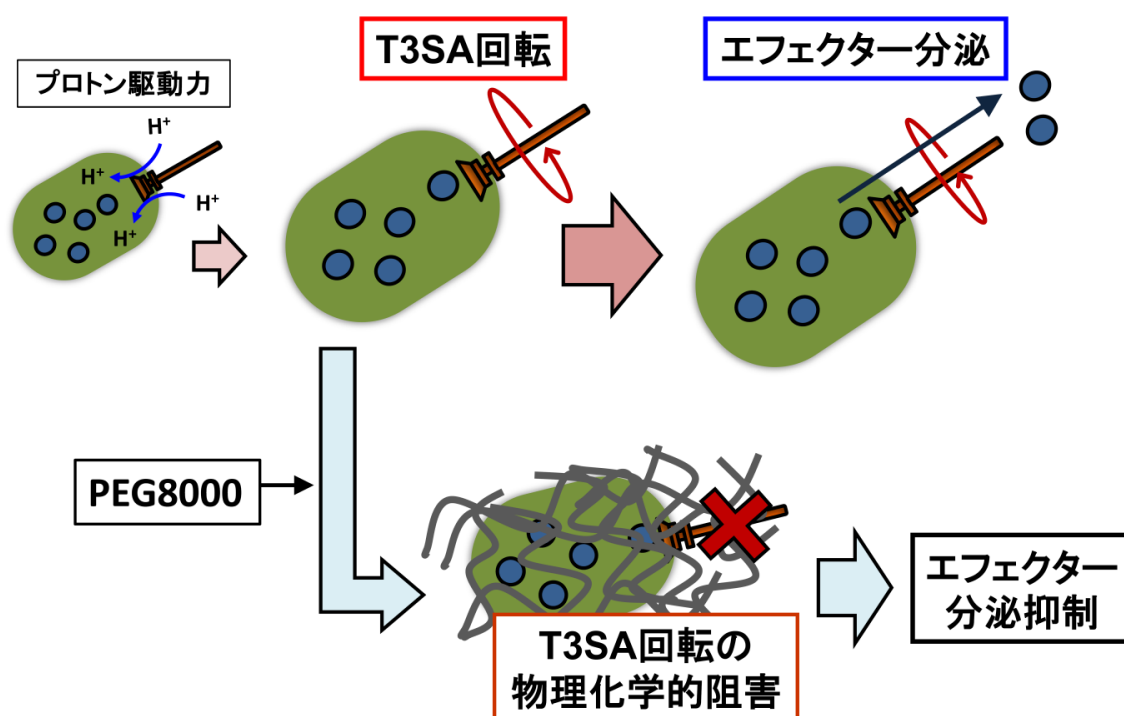
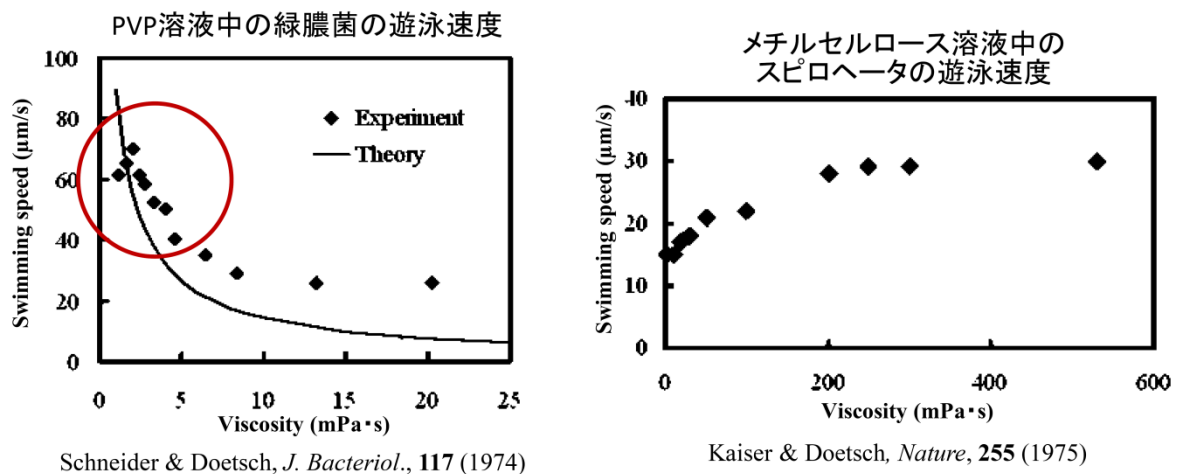


図 3-15. エフェクター分泌過程における T3SA 回転運動の関与とこれに基づいたエフェクター分泌の抑制：本章の結果より、エフェクター分泌過程に T3SA の回転運動が重要な役割を担っており、PEG8000 はこの回転運動を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌を抑制している可能性が示唆された。

① PVA や PVP は何故エフェクター分泌を抑制しなかったのか？

同程度の粘性条件において PEG8000 はエフェクター分泌を抑制したが PVA や PVP は抑制しなかったことから、PEG8000 によるエフェクター分泌の抑制には培地粘性の増大に加えて PVA や PVP とは異なり PEG8000 だけが有する他の物理化学的特性も関与していることが示唆された。これまでに、細菌の遊泳運動など μm オーダー以下の物体の高分子溶液中での運動には溶液粘性だけでなく高分子が形成するネットワーク構造も影響することが報告されている [42, 43]。例えば、PVP やメチルセルロースなどの線状高分子を添加すると、通常の濃度域では添加濃度依存的に培地粘性が増大してべん毛回転速度が低下すること

で細菌の遊泳速度も低下する。しかしながら、低濃度域では培地粘性の増大に伴ってべん毛回転速度が低下しているにもかかわらず、遊泳速度は上昇するという一見奇妙な現象が認められる [42]。この現象はべん毛が膜に覆われているスピロヘータでは特に顕著であり、培地粘性が増大するほどに遊泳速度は上昇する (図 3-16) [43]。この現象に対する理論として、1979 年に Berg らが「スケーティングバクテリア仮説」を提唱し [44]、2002 年には Magariyama らがその妥当性をシミュレーションにて検証した [45]。この仮説によると、低濃度域では PVP やメチルセルロースが疎なネットワーク構造を形成しており、これが細菌の移動におけるレールの役割を果たす。その結果、べん毛 1 回転あたりの細菌の一定方向への移動効率が向上するため、べん毛回転速度が低下しても見かけ上の細菌の遊泳速度は上昇したと考えられている (図 3-16)。この仮説により、高分子溶液中での μm オーダー以下の物体の運動には溶液全体の粘性だけでなく、高分子が形成するネットワーク構造も大きく影響することが示唆された。



低濃度域では高分子を添加して溶液粘度を向上させると、細菌の遊泳速度が上昇する。



スケーティング・バクテリア仮説

ゲルの網目が菌体よりも大きければ、ゲルがレールとして機能することで細菌の移動方向が一定となり、水中よりも細菌の移動効率がよくなる。
(Magariyama Y. et al, *Biophys J.*, 83 (2002), Berg HC et al, *Nature*, 278 (1979))

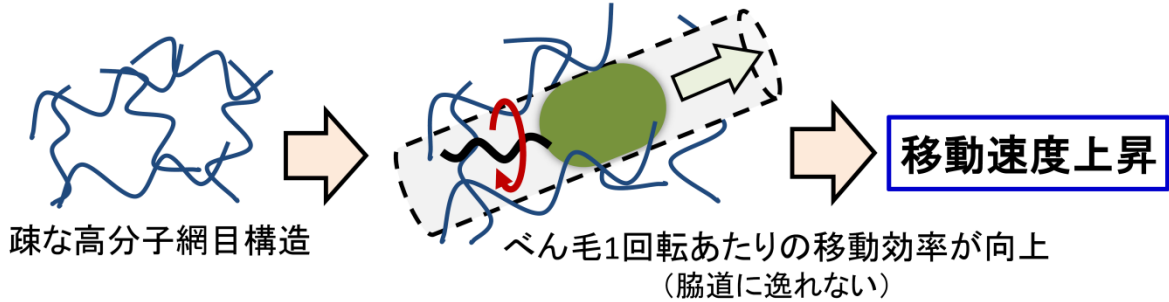


図 3-16. 高分子の添加による細菌の遊泳速度への影響とスケーティングバクテリア仮説
: 高分子化合物が形成する網目構造が菌体サイズよりも大きい場合、これがレールの役割を果たして細菌の移動方向が限定される。その結果、べん毛 1 回転あたりの移動効率がよくなり、見かけ上の細菌の遊泳速度が亢進する (スケーティングバクテリア仮説)。

この考えに基づくと、PEG8000 と PVA および PVP のエフェクター分泌に対する影響の違いはこれらの高分子が形成するネットワーク構造の違いに起因するのではないかと考えられる。PEG8000 は側鎖をもたない直鎖状ポリマーであり、分子内および分子間での立体障害が小さいことから、個々の分子鎖の柔軟性が高く、密なネットワーク構造を形成できると推察される。そのため、PEG8000 は T3SA ニードル近傍で密なネットワーク構造を形成することで T3SA の回転運動を効率的に阻害した結果、エフェクター分泌を有意に抑制したのではないかと考えられる (図 3-17 上)。これに対して、PVA や PVP はそれぞれヒドロキシル基やピロリドン基というかさ高い側鎖を有するため、分子内および分子間での立体障害が大きい。そのため、分子鎖の柔軟性は低く、分子間での立体障害により粗いネットワーク構造しか形成できないと推察される。このような粗いネットワークでは T3SA ニードルのような 100 nm 程度の物体の回転運動には十分に干渉できなかったため、PVA や PVP はエフェクター分泌を抑制できなかったのではないかと考えられる (図 3-17 下)。つまり、高分子によるエフェクター分泌の抑制には、溶液全体の粘性よりも T3SA ニードル近傍の局所粘性を増大させることによる T3SA 回転運動の物理化学的阻害が重要な役割を担っており、PVA や PVP は溶液全体の粘性は増大させるものの、T3SA の回転運動には十分に干渉できなかったため、エフェクター分泌を抑制できなかったと考えられる。

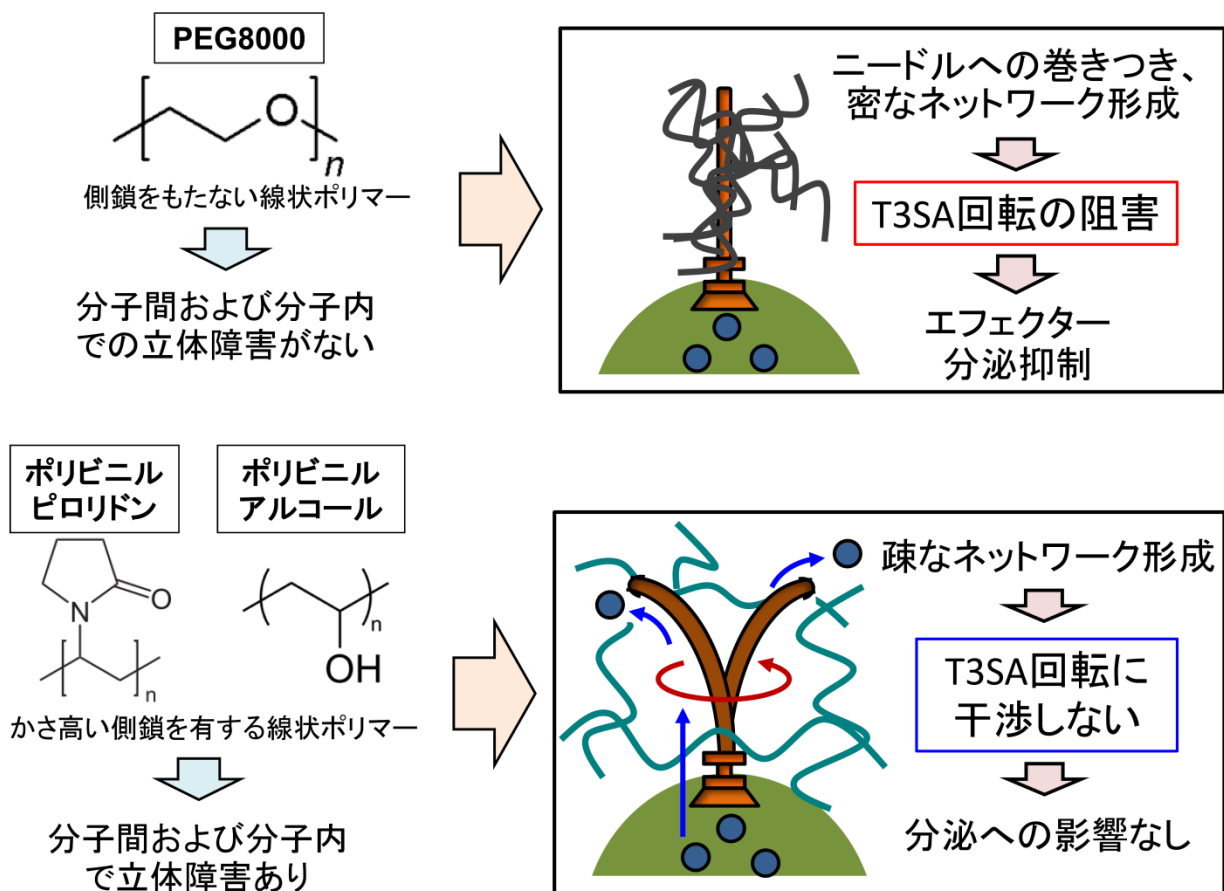


図 3-17. 高分子ネットワーク構造の違いから推察される PEG8000 と PVA および PVP のエフェクター分泌に対する影響の違い

上. PEG8000 は側鎖を持たないため、T3SA ニードル近傍で密なネットワークを形成できる。これにより T3SA 回転を効率的に阻害した結果、エフェクター分泌抑制効果を示したと考えられる。

下. PVA や PVP はかさ高い側鎖を有するため、ニードル近傍で疎なネットワークしか形成できない。このようなネットワークでは T3SA の動きに干渉できなかったため、分泌抑制効果を示さなかったと考えられる。

② T3SA へのマイクロビーズの結合がエフェクター分泌を抑制しなかったのは何故か？

T3SA へのマイクロビーズの結合は回転運動の抵抗を増大させるにも関わらず、ビーズを単独で添加した場合にはエフェクター分泌量の有意な減少は認められなかった (図 2-14, 図 3-4)。この原因として、著者はエフェクター分泌が抑制される回転速度に閾値が存在しており、T3SA の回転速度がこの値を超えて低下しない限り、エフェクター分泌には影響しないのではないかと考えている (図 3-18)。これを支持する結果として、CCCP や PEG8000 をマイクロビーズとともに添加した場合、これらを単独で添加した場合に比べてエフェクター分泌量がより減少したということが挙げられる (図 2-14, 図 3-4)。これらの結果について、T3SA の回転速度とエフェクター分泌との相関性の中に閾値が存在するという仮定のもと、以下に説明を試みる。マイクロビーズを T3SA に結合させた場合には T3SA の回転速度は低下するものの、その速度は依然として閾値を超えていたため、エフェクター分泌量の減少は認められなかったと考えられる。一方、CCCP や PEG8000 の添加は単独でも閾値を下回る速度にまで T3SA の回転運動を阻害しているため、エフェクター分泌量の有意な減少が認められたと予想される。したがって、CCCP や PEG8000 とマイクロビーズを同時に添加した場合には、各試薬の添加により T3SA の回転速度が閾値以下にまで低下している状態でビーズの結合により回転速度がさらに低下した結果、エフェクター分泌量の相乗的な減少が認められたのではないかと考えられる (図 3-18)。

本研究で構築した T3SA の回転運動評価系では回転速度までを評価することは困難であるため、T3SA の回転速度とエフェクター分泌量が直接的に相関しているのか、またこの相関にどの程度の閾値が存在するのかについては現時点では検討できない。ここで述べた可能性を検討するためには、今後、T3SA の回転速度まで評価可能な系を構築し、エフェクター分泌量との相関をより詳細に調べる必要があるだろう。

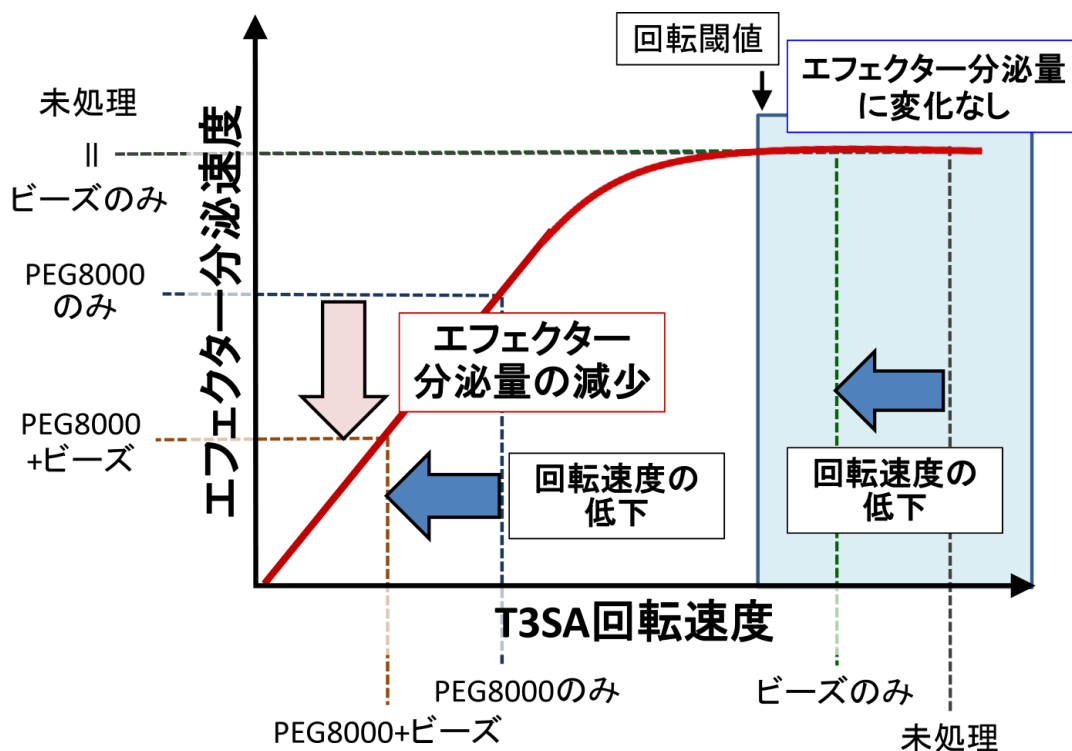


図 3-18. T3SA の回転-分泌相関における閾値の存在の可能性

: T3SA 回転速度とエフェクター分泌量の相関性の中に閾値が存在する場合、ビーズ単独での回転阻害ではエフェクター分泌量を減少させるのに不十分であったのに対して、PEG8000 を併用することで回転が閾値以下まで阻害された結果、相乗的な分泌抑制効果が認められたと考えられる。

以上のように、エフェクター分泌に対する高分子化合物やマイクロビーズの一見不可思議な影響も T3SA の回転-分泌相関に基づいて考えることで理論的に説明することが可能である。T3SA の回転-分泌相関を検証するためには、今後、これを 1 細菌レベルでより詳細に解析していく必要があるだろう。しかしながら、少なくとも本章で得られた結果は T3SA がプロトン駆動力を利用した回転運動を行うことでエフェクターのニードル内輸送に必要な駆動力を産出している可能性を強く支持しているものと思われる。

本研究では ExoT をモデルエフェクターとし、その分泌量から緑膿菌のエフェクター分泌能を評価したが、この知見が ExoT 以外のエフェクター (ExoS/Y/U) やニードル構成因子 (PscF) などの分泌にも適用されうるかどうかは不明である。この点については今後、実際に調べる必要があるだろう。しかしながら、エフェクターのニードル内輸送機構はエフェクターの種類によらず普遍的なものである可能性が高い。III 型分泌ではどのタイミングでどのタンパク質が分泌されるのか、その分泌ヒエラルキーは厳密に制御されているが、これは **Sorting Platform** と呼ばれる T3SA の細胞質内ユニットと、菌体内分子シャペロン (T3SS シャペロン) の相互作用を介した T3SA へのエフェクター装填過程で行われている [4, 10, 11, 46]。そのため、この次の段階であるニードル内輸送過程ではエフェクターの種類により分子機構を変更する必要性がないことから、一旦エフェクターが T3SA に装填されれば、その後はいずれのエフェクターも同一の分子機構でニードル内を輸送されると考えられる。したがって、本研究で得られた T3SA の回転-分泌相関に関する知見は ExoT だけでなく、他のエフェクターの III 型分泌においても適用されうる普遍的なものであると思われる。

第4章 高粘性環境におけるⅢ型分泌装置の回転阻害を介したエフェクター分泌制御に関する可能性の検討

4-1. 序論

第3章にて T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程に重要な役割を担っており、この回転運動を物理化学的に阻害できる高分子化合物はエフェクター分泌抑制効果を示すことを見出した。著者は「このような T3SA の回転-分泌相関を利用したエフェクター分泌の制御が自然界の高粘性環境でも行われているのではないかと考えた。

細菌の生活環には様々な高分子を主成分とする高粘性環境が密接に関与している。本研究でモデル細菌として用いた緑膿菌の場合にはバイオフィームやムチン層といった高粘性環境に関与する。バイオフィームは口腔内やカテーテルなどあらゆる場所を基盤として細菌が集合することで形成される高粘性構造体である。バイオフィーム中では細菌コロニーが細胞外多糖であるアルギン酸に包まれており、この中で細菌は抗菌薬や免疫機構の影響を回避しつつ徐々に増殖する [47, 48]。ムチン層はヒト腸管上皮細胞や角膜上皮細胞などが産生する糖タンパク質ムチンを主成分とする粘液層であり、細菌感染に対する宿主側の防御因子として機能する。細菌が感染する際にはこれを突破して宿主細胞に到達する必要がある(図 4-1) [49]。

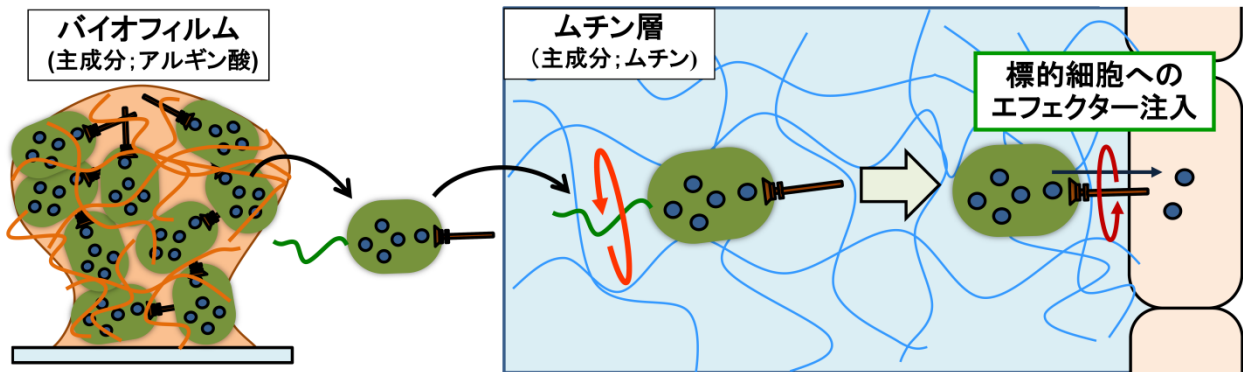


図 4-1. 緑膿菌の生活環に関わる高粘性環境

: 緑膿菌の生活環には細菌が集合して形成するバイオフィームや宿主細胞の感染防御因子であるムチン層などの高粘性環境に関与する。

これまでに報告されているエフェクター分泌制御機構としては Ca^{2+} 濃度依存的な制御機構がある [30, 50]。緑膿菌培養液に EGTA などのキレート剤を添加して Ca^{2+} 濃度を低下させると、Ⅲ型分泌関連遺伝子群の発現が亢進する [50] とともに、T3SA ニードル先端に結合したリング状のチップが開口する [30] ことで、エフェクター分泌が誘導される。バイオフィームの主成分であるアルギン酸やムチン層の主成分ムチンは EGTA と同様に Ca^{2+} をキレートする [51, 52] ことから、エフェクター分泌が Ca^{2+} 濃度でのみ制御されているのであれば、バイオフィームやムチン層内でも分泌が誘導されると考えられる。実際に、バイオフィーム中の緑膿菌ではエフェクター遺伝子の発現が亢進していることも近年報告されている [51]。しかしながら、少なくともこれまでに報告されているエフェクターはいずれも宿主細胞内で機能を発揮することから、それ以外の場所での分泌はエフェクター分子やエネルギーの浪費に繋がることが予想される。このような浪費は細菌が生存する上で致命的になりうる [47, 53, 54] ことから、これを回避する機構を細菌が備えているのではないかと著者は考えた。

このような機構の一つとして、T3SAの回転-分泌相関に基づいたエフェクター分泌の抑制が寄与している可能性が考えられる。アルギン酸とムチンはともに高い粘性を示す高分子であり、細菌表面に吸着することから [55-57]、これらの高分子はT3SA近傍の局所粘性を増大させてT3SAの回転運動を物理化学的に阻害できると思われる。したがって、バイオフィームやムチン層内では、主成分の天然高分子がT3SAの回転運動を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌が抑制されているのではないかと著者は考えた(図4-2)。この可能性について検討するため、本章では天然高分子アルギン酸およびムチンを添加した際のT3SA回転運動およびエフェクター分泌への影響を評価した。

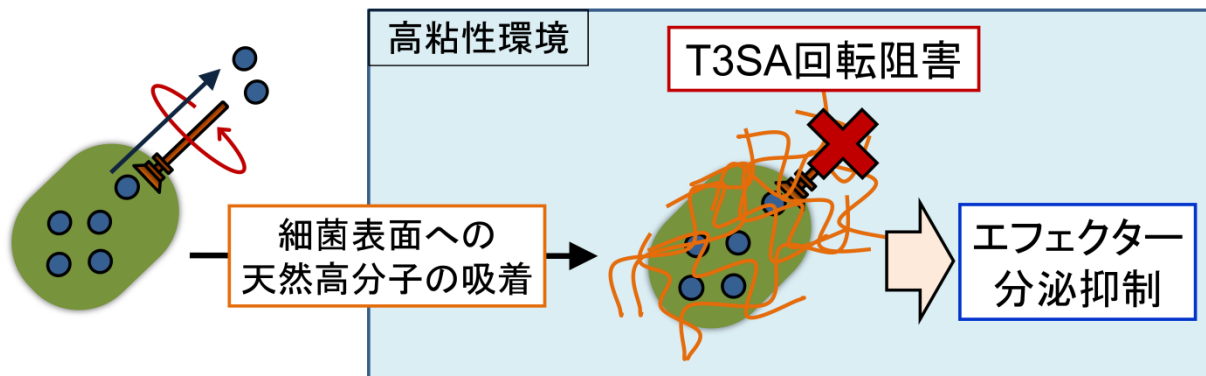


図4-2. 高粘性環境におけるT3SAの回転-分泌相関を利用したエフェクター分泌制御の可能性
: バイオフィームやムチン層といった高粘性環境では主成分である天然高分子が細菌表面に吸着してT3SAの回転運動を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌が抑制されている可能性がある。

4-2. 実験方法

4-2-1. 材料・試薬

アルギン酸ナトリウムおよびウシ顎下腺ムチンはSigma Aldrich (St Louis, MO) より購入した。サケ精液由来硫酸プロタミンはCalbiochem (La Jolla, CA) より購入した。その他、本章で用いた試薬は全て特級であり、それ以上精製することなく使用した。

4-2-2. 使用した細菌株

本章で使用した菌株は第2章にて使用したものと同一である。

4-2-3. ウエスタンブロッティング法によるエフェクター分泌活性の評価

エフェクター分泌活性は2-2-4と同様の方法で評価した。サンプル中タンパク質はメタノール-クロロホルム法にて沈殿させた。

4-2-4. コロニーカウント法による生菌数の測定

生菌数の測定は2-2-5と同様の方法で行った。

4-2-5. T3SA 回転運動の観察と軌跡解析

T3SA の回転運動は2-2-8 と同様の方法で観察した。回転運動の軌跡解析は2-2-9 と同様の方法で行った。

4-2-6. 溶液粘性の測定

各高分子溶液の粘性は3-2-6 と同様の方法で測定した。

4-3. 結果

4-3-1. アルギン酸およびムチンの T3SA 回転運動およびエフェクター分泌に対する影響評価

アルギン酸やムチンが T3SA 回転阻害効果およびエフェクター分泌抑制効果を示すか否かについてまずは検討を行った。バイオフィーム中の正確なアルギン酸濃度は不明であるが、非ムコイド型緑膿菌 PAO1 株に 1 % アルギン酸を外部から添加した際のエフェクター遺伝子の発現亢進やアルギン酸の分布パターンが、肺線維症患者から単離されたバイオフィーム形成能を有するムコイド型緑膿菌 FRD1 株のパターンと類似していることが報告されている [51]。そこで、本研究ではアルギン酸を 0-2 % の濃度範囲で用いることにした。また、ヒト腸管上皮でのムチン濃度は非感染時に 2 % 程度であり、細菌感染時にはさらに上昇する。したがって、ムチンは 0-2 % の濃度範囲で使用した [58]。

まずは、PAO1 Strep 株の T3SA 回転運動およびエフェクター分泌に対する各天然高分子の影響を評価した。その結果、いずれの高分子も PEG8000 と同様に T3SA の回転運動を阻害するとともにエフェクター分泌を強力に抑制することが確認できた (図 4-3、4-5)。さらに、PAO1 WT のエフェクター分泌に対する影響も評価したところ、アルギン酸、ムチンともに PAO1 WT のエフェクター分泌を添加濃度依存的に抑制することが確認できた (図 4-4、4-6)。

以上の結果から、アルギン酸やムチンも PEG8000 と同様に T3SA の回転運動を阻害するとともにエフェクター分泌を抑制できることが確認できた。したがって、これらの高分子を主成分とするバイオフィームやムチン層では T3SA 回転運動の物理化学的阻害を介してエフェクター分泌が抑制されている可能性が示唆された。

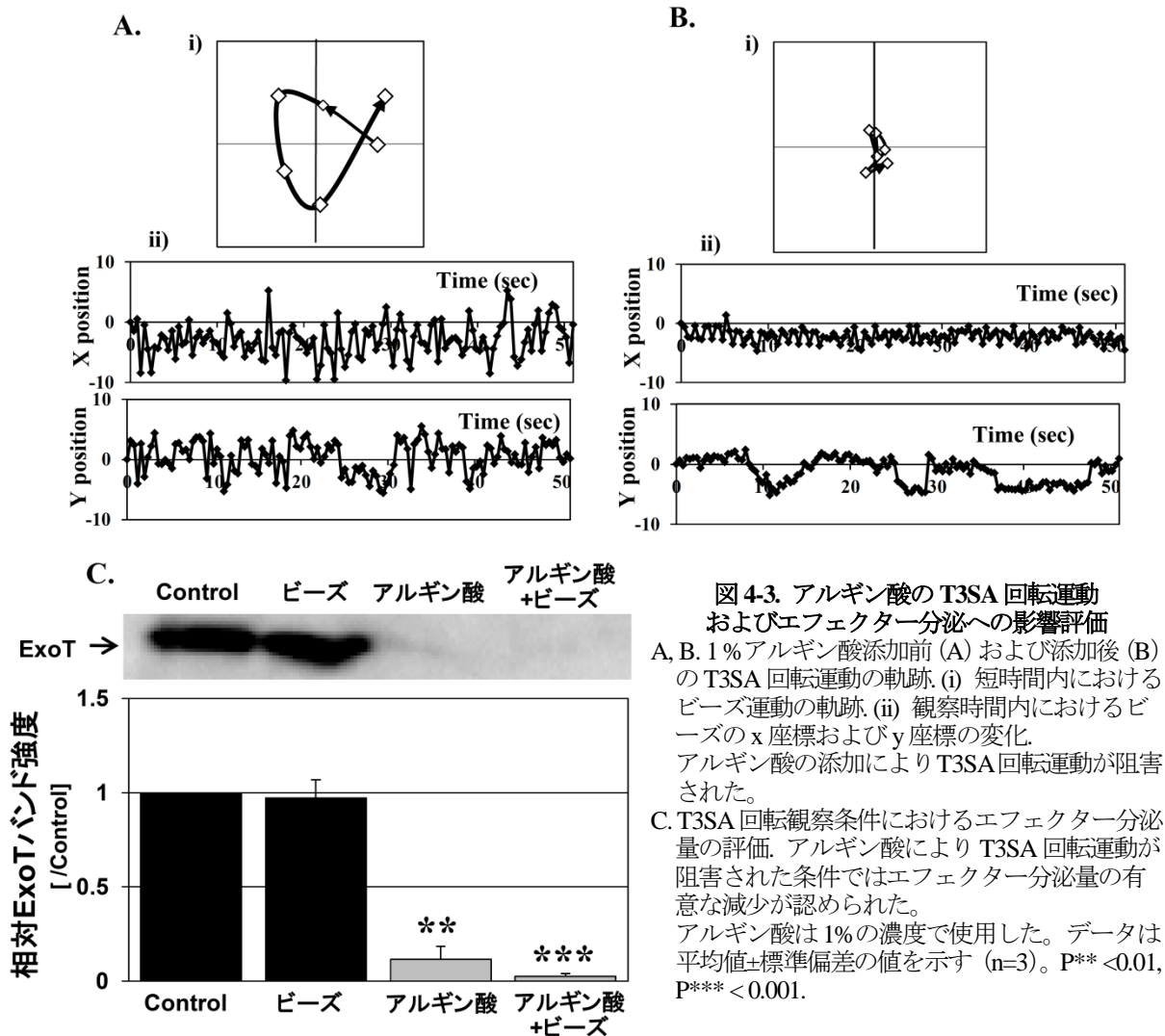


図4-3. アルギン酸のT3SA回転運動およびエフェクター分泌への影響評価
 A, B. 1%アルギン酸添加前 (A) および添加後 (B) のT3SA回転運動の軌跡. (i) 短時間内におけるビーズ運動の軌跡. (ii) 観察時間内におけるビーズのx座標およびy座標の変化. アルギン酸の添加によりT3SA回転運動が阻害された。
 C. T3SA回転観察条件におけるエフェクター分泌量の評価. アルギン酸によりT3SA回転運動が阻害された条件ではエフェクター分泌量の有意な減少が認められた. アルギン酸は1%の濃度で使用した。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3). P** < 0.01, P*** < 0.001.

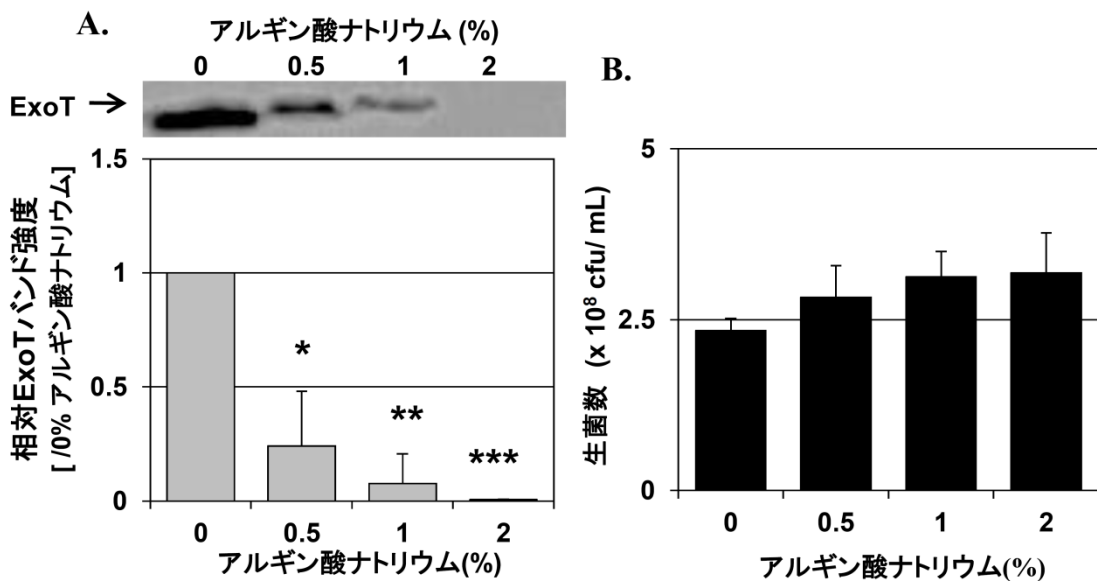


図4-4. アルギン酸による分泌抑制効果の濃度依存性検討
 A. PAO1 WTのエフェクター分泌に対するアルギン酸の影響評価. アルギン酸濃度依存的に分泌が抑制された。
 B. アルギン酸の生菌数への影響評価. 2%以下のアルギン酸は生菌数には影響しないことが確認できた。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3). P* < 0.05, P** < 0.01, P*** < 0.001.

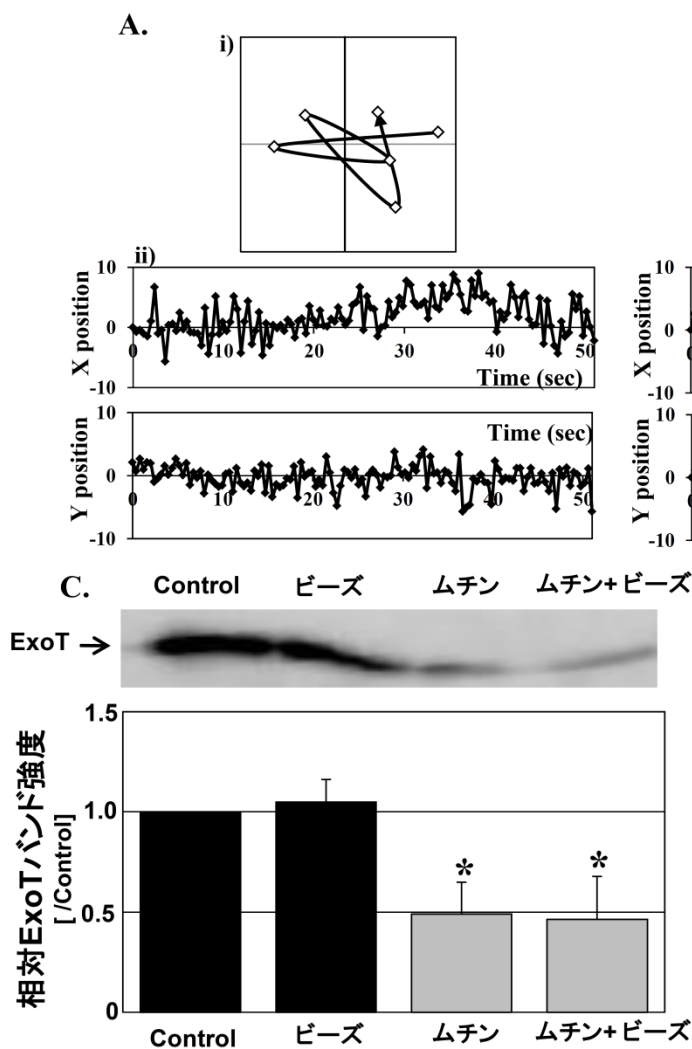


図 4-5. ムチンの T3SA 回転運動およびエフェクター分泌への影響評価

A, B. 1% ムチン添加前 (A) および添加後 (B) の T3SA 回転運動の軌跡. (i) 短時間内におけるビーズ運動の軌跡. (ii) 観察時間内におけるビーズの x 座標および y 座標の変化. ムチンの添加により T3SA 回転運動が阻害された。

C. T3SA 回転観察条件におけるエフェクター分泌量の評価. ムチンにより T3SA 回転が阻害された条件ではエフェクター分泌量の有意な減少が認められた。ムチンは 1% の濃度で使用した。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3). P* < 0.05.

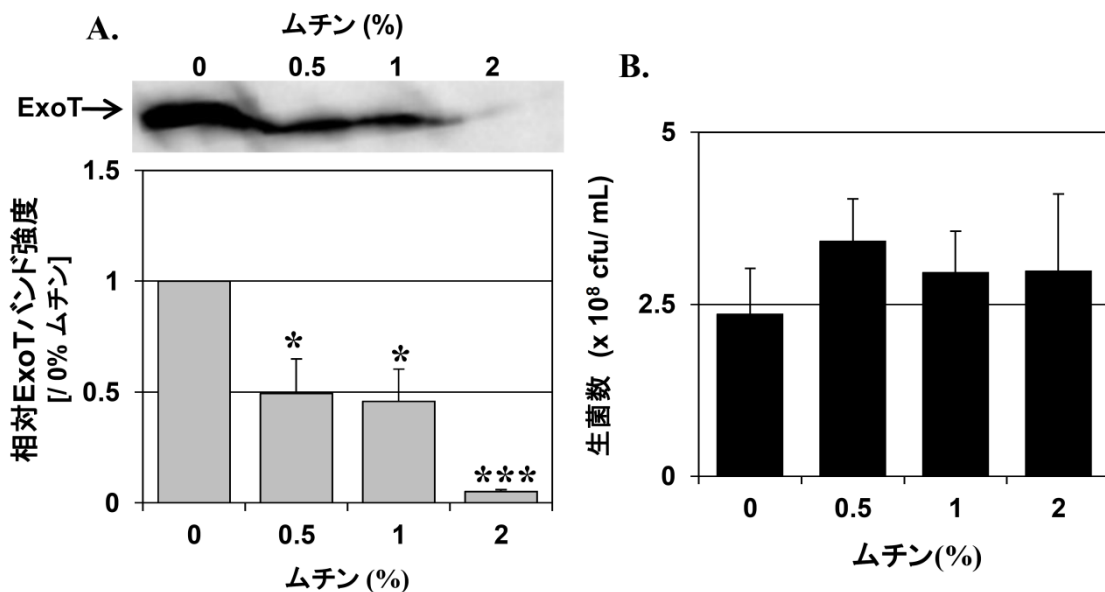


図 4-6. ムチンによる分泌抑制効果の濃度依存性検討

A. PAO1 WT のエフェクター分泌に対するムチンの影響評価. ムチン濃度依存的に分泌が抑制された。

B. ムチンの生菌数への影響評価. 2%以下のムチンは生菌数には影響しないことが確認できた。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3). P* < 0.05, P*** < 0.001.

4-3-2. 天然高分子のエフェクター分泌抑制効果と培地粘性との相関性評価

PEG8000 の場合と同様に、アルギン酸やムチンによるエフェクター分泌の抑制も培地粘性の増大に起因するの確かめるため、これらの溶液の粘性を測定し、エフェクター分泌量との相関を評価した。その結果、アルギン酸やムチンによるエフェクター分泌抑制効果も培地粘性と高い相関性を示す（相関係数=-0.819 [アルギン酸]、-0.981 [ムチン]）ことが確認できた。一方で、同一粘性においてはアルギン酸やムチンはPEG8000 よりも強力にエフェクター分泌を抑制していた（図4-7）。培地粘性の増大効果だけがエフェクター分泌の抑制に寄与しているのであれば、高分子の種類によらず、同一粘性では同程度の分泌抑制効果が認められるはずである。したがって、この結果からアルギン酸やムチンによる分泌抑制効果には培地粘性の増大効果に加えて他の要因も関与している可能性が示唆された。

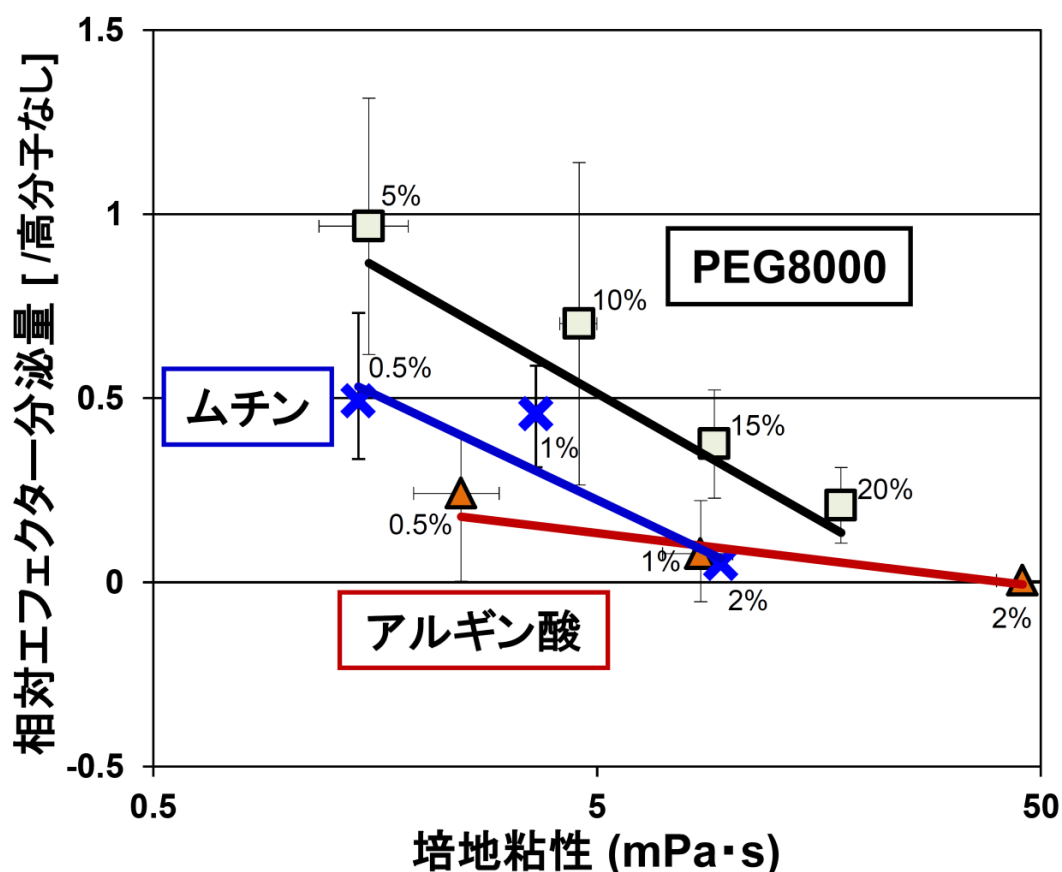


図4-7. アルギン酸およびムチンの培地粘性とエフェクター分泌抑制効果の相関図

:アルギン酸およびムチンの分泌抑制効果はPEG8000の場合と同様に培地粘性と高い相関性を示したが、同一粘性においてはPEG8000よりも強力にエフェクター分泌を抑制していた（相関係数=-0.944 [PEG8000]、-0.819 [アルギン酸]、-0.981 [ムチン]）。このことから、アルギン酸やムチンの分泌抑制効果には培地粘性の増大に加えて他の要因も寄与することが示唆された。データは平均値±標準偏差の値を示す（n=3）。

4-3-3. 天然高分子のエフェクター分泌抑制効果における T3SA ニードルとの静電的相互作用の影響評価

4-3-2 項にて、アルギン酸やムチンのエフェクター分泌抑制効果には培地粘性の増大効果に加えて他の要因も関与していることが示唆された。この要因について、PEG8000 とアルギン酸およびムチンの構造を比較することで考察した。ここで、PEG8000 は電荷的に中性であるのに対してアルギン酸やムチンは構造中に負電荷を有しており、その負電荷密度の大きさがエフェクター分泌抑制効果の強さと対応していることに着目した (図 4-8) [39, 59, 60]。2012 年には T3SA ニードル構成因子の N 末端 NH₂ 基がニードル表面に露出しており、ニードル表面が正電荷を帯びている可能性が Loquet らにより示唆されている [61]。したがって、アルギン酸やムチンは T3SA ニードルと静電的相互作用を介して結合することで、PEG8000 よりも強力に T3SA の回転運動を物理化学的に阻害した結果、PEG8000 よりも強いエフェクター分泌抑制効果を示したのではないかと予想された (図 4-8)。

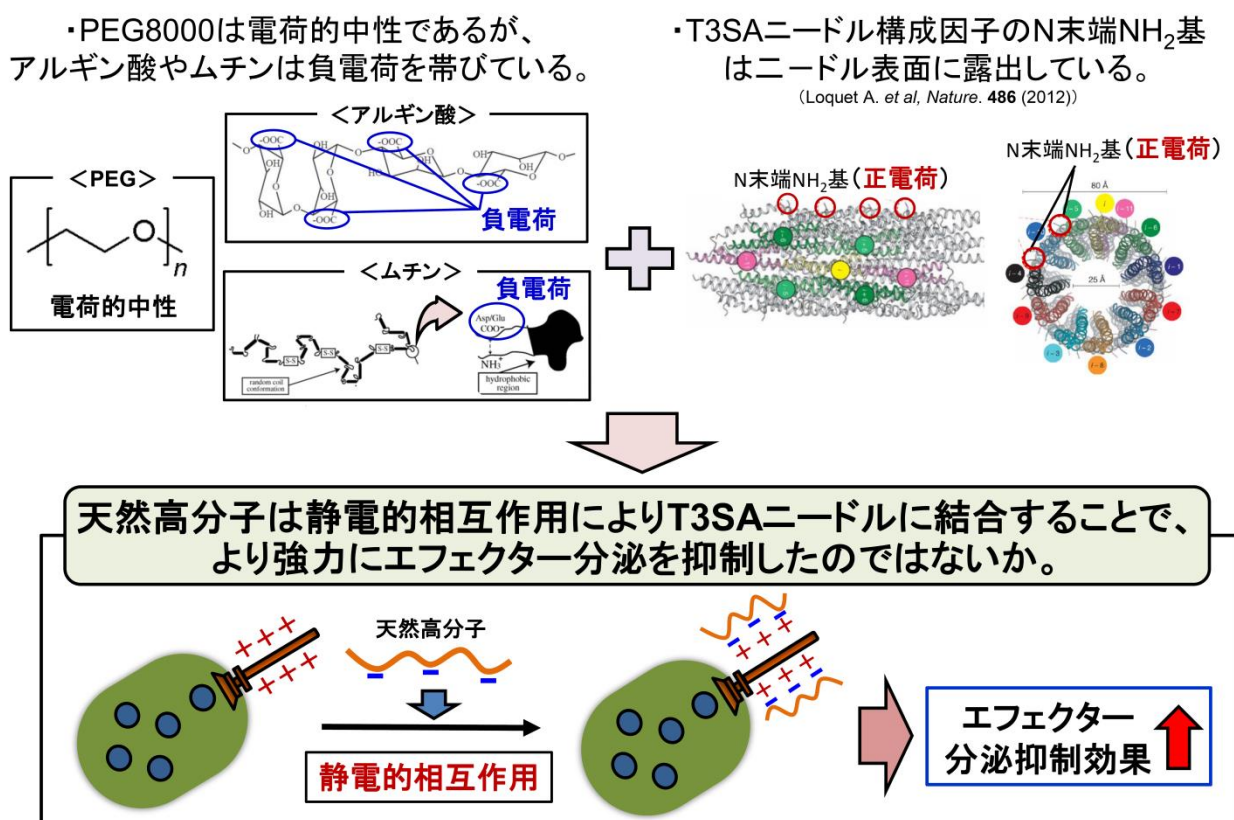


図 4-8. アルギン酸およびムチンのエフェクター分泌抑制効果における T3SA ニードルとの静電的相互作用の関与：アルギン酸およびムチンは PEG8000 とは異なり、構造中に負電荷を有する。また、T3SA ニードル表面は正電荷を帯びている可能性が示唆されている。したがって、アルギン酸やムチンは T3SA ニードルと静電的相互作用を介して結合することで PEG8000 よりも強力にエフェクター分泌を抑制した可能性が考えられた。

そこで、天然高分子のエフェクター分泌抑制効果における T3SA ニードルとの静電的相互作用の寄与について検討することにした。正電荷ポリマーであるプロタミンは約 30 アミノ酸からなるアルギニンに富むペプチドであり、アルギン酸と静電的相互作用を介して複合体を形成する (図 4-9A) [62-64]。したがって、アルギン酸のエフェクター分泌抑制効果にニードルとの静電的相互作用が関与しているのであれば、アルギン酸によって分泌が抑制された細菌をプロタミン含有培地で洗浄することで、プロタミンとの静電的相

相互作用により T3SA からアルギン酸が外れてエフェクター分泌が有意に回復すると考えられた。これを実験で確認したところ、アルギン酸の添加により抑制されたエフェクター分泌は細菌を単に LB 培地で洗浄しただけでは回復しなかったが、プロタミン含有 LB 培地で洗浄すると顕著に回復することが確認できた (図 4-9B)。この結果から、天然高分子、少なくともアルギン酸のエフェクター分泌抑制効果においては培地粘性の増大効果に加えて T3SA ニードルとの静電的相互作用が関与している可能性が強く示唆された。

A. サケ精子由来プロタミンのアミノ酸配列

1 P | R R R R | — S | S S R P V R R R R R | P | R | — V S | R R R R R | R G G | R R R R |
 5 10 15 20 25 30 35

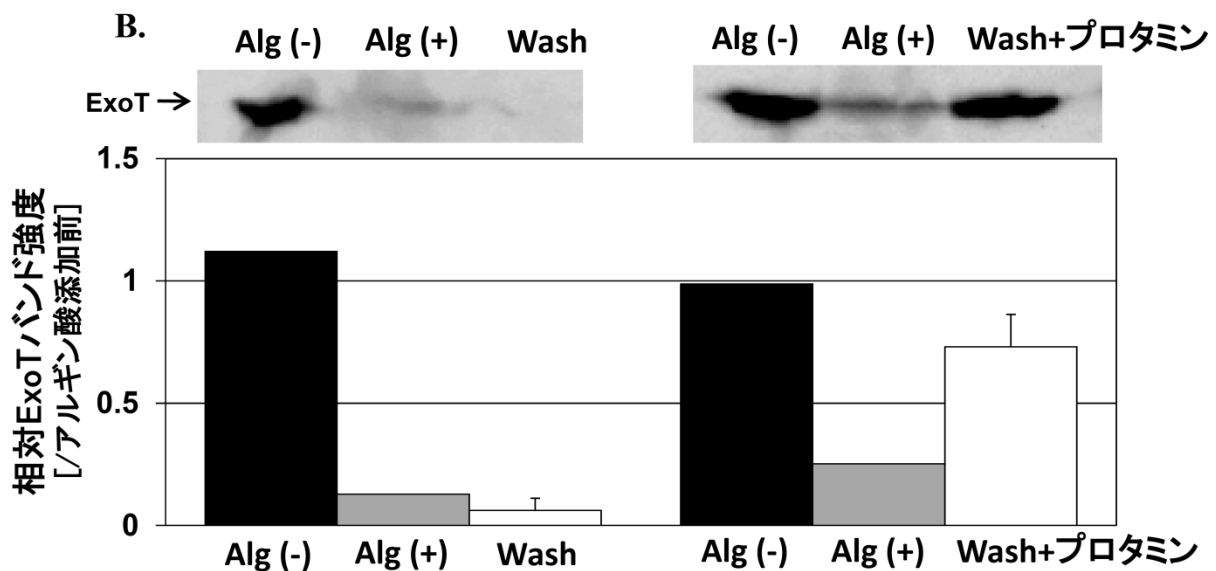


図 4-9. アルギン酸により抑制されたエフェクター分泌のプロタミン添加による回復の検討

: A. 実験に用いたプロタミンのアミノ酸配列. B. アルギン酸によるエフェクター分泌の抑制と LB 培地 (左) またはプロタミン含有 LB 培地 (右) で洗浄した際の分泌の回復. アルギン酸により抑制された分泌は LB 培地での洗浄では回復しなかったが、プロタミン含有培地で洗浄することで顕著に回復した。Wash 画分は 0.5% アルギン酸添加後 2.5hr 培養した菌のペレットを 0.25% プロタミン含有もしくは非含有 high-salt LB broth にて 3 回洗浄後、5 mM EGTA 含有 high-salt LB broth で再懸濁し、37°C、2.5 時間培養後の培地上清を回収することで調製した。データは平均値±標準偏差の値を示す (n=3)。

4.3. 考察

本章において、アルギン酸やムチンといった天然高分子が PEG8000 と同様に T3SA の回転運動およびエフェクター分泌を阻害することがわかった。さらに、天然高分子の場合には、エフェクター分泌抑制効果に培地粘性の増大だけでなく、静電的相互作用を介した T3SA ニードルへの吸着も寄与することで、その効果が増強されていることが示唆された。以上の結果から、アルギン酸やムチンを主成分とするバイオフィームやムチン層内では、これら高分子が T3SA の回転運動を積極的に阻害することでエフェクター分泌が強力に抑制されている可能性が示唆された。

このような T3SA の回転-分泌相関を利用したエフェクター分泌制御機構の存在は細菌にとってどのような利点があるのであろうか？ この制御機構の存在意義についての考察を以下に述べる。

一つには 4-1 節で述べたように、バイオフィームやムチン層内でのエフェクター分泌はエネルギーやエフェクター分子の浪費につながるため、このような浪費を回避するための機構として機能していることが考えられる (図 4-10)。この機構での分泌抑制は単に T3SA の回転運動を物理化学的に阻害するだけのシンプルなものであることから、高分子が除去されれば T3SA が再び回転し始めてエフェクター分泌が速やかに誘導されるだろう。したがって、この機構での分泌制御は細菌が宿主細胞に到達するまではエフェクターを貯蔵しておき、到達すると速やかに分泌を誘導することを可能にすることから、エフェクター分泌の効率的な誘導に適していると考えられる (図 4-10)。

また別の観点からも、この分泌制御機構は宿主細胞へのエフェクター注入の効率化に寄与しうる。近年、バイオフィーム内ではアルギン酸が Ca^{2+} をキレートして、菌体内でのエフェクター産生を亢進させることが報告されている [51]。この報告と本研究で見出したアルギン酸が物理化学的にエフェクター分泌を抑制するという知見を併せて考えると、「アルギン酸は分泌を停止させた状態でエフェクター産生を亢進することで、菌体内にエフェクターを貯蔵させている」と考えられる (図 4-10)。EGTA によりエフェクター分泌を誘導すると、分泌は速やかに開始するのに対してエフェクター遺伝子の発現亢進にはタイムラグが存在することからも、菌体内に予めエフェクターが貯蔵されている可能性は示唆されている [50]。また、バイオフィーム内では、細菌が抗菌薬や免疫系の影響を回避しつつ安定に増殖できる [47, 48] ことから、このような環境下でエフェクターを蓄積しておくというのは合理的である。したがって、T3SA の回転-分泌相関を利用した分泌抑制機構は、バイオフィーム内において細菌が宿主への感染に備えて予めエフェクターを蓄積しておくための機構としても機能しているのかも知れない (図 4-10)。

細菌が宿主細胞に感染するためには宿主の感染防御因子であるムチン層を突破して宿主細胞に到達する必要があるが、この際にはべん毛の回転運動に依存した細菌の遊泳運動が重要な要因の一つとなる [65, 66]。T3SA と細菌べん毛はともにプロトン駆動力をエネルギーとして利用する [17, 18] ことから、著者は「ムチン層内では T3SA の回転運動が物理化学的に阻害されることで、細菌は T3SA に利用していたプロトン駆動力を細菌べん毛に回してべん毛回転力を亢進させ、ムチン層を効率的に突破しているのではないか」と考えている (図 4-10)。近年ではプロトン駆動力を利用して機能する ATP 合成酵素を欠損させた細菌では遊泳運動能が亢進していることが Terashima らにより報告されていることから [67]、分子装置間でのプロトン駆動力の譲受は実際に起こりうる。このような譲受は限られたエネルギーを効率的に利用する上で重要であることから、細菌がこれを可能にするように進化したというのは合理的である。

それでは細菌がムチン層を突破して宿主細胞に到達した後、エフェクター分泌はどのようにして誘導さ

れるのだろうか？近年、ムチン層における粘性勾配の存在が示唆されている。腸上皮細胞は重炭酸イオンを分泌するが、ムチンはこのイオンの透過を妨げるため、ムチン層内では管腔側から腸上皮近傍に向かってpHが上昇するpH勾配が生じている [68, 69]。また、ムチンの粘性はpHの上昇に伴って低下する [70]。したがって、ムチン層の粘性は腸上皮に近づくほどに低下することが予想された。この可能性は別の実験でより直接的に示唆されている。2007年にSwidsinski A.らは、近位結腸における腸管常在菌 *Enterobacter cloacae* の分布からムチン層の粘性分布を評価した。その結果、細菌の大部分はムチン層の腸管腔側境界域に留まっており、一部の細菌だけが腸陰窩の基底部に観察された。このとき、ムチン層の中間層には細菌がほとんど認められなかったことから、ムチン層は腸管腔側が最も粘性が高く、腸上皮近傍の粘性は低いことが示された [71]。この粘性分布に従えば、細菌がムチン層に侵入した最初の段階ではT3SAの回転運動が阻害されているが、ムチン層を突破して腸上皮に近づくにつれて回転運動が徐々に回復し、宿主細胞に到達するとT3SAが完全に回転してエフェクター分泌が誘導されるということが起こりうる (図4-10)。

以上のように、T3SAの回転-分泌相関を利用したエフェクター分泌制御機構は、細菌感染の効率化に大きく寄与しうると考えられる。しかしながら、本研究では浮遊状態の細菌にアルギン酸やムチンを添加しているため、実際のバイオフィームやムチン層とは環境面でいくつか異なる点がある。例えば、バイオフィーム中の細菌は固相表面に付着して集合体の状態で存在しているが、本研究の実験系では分散された浮遊状態で存在する [47, 48]。また、天然のムチン層は上皮細胞側と管腔側とでpHや粘性が異なることが報告されているが、本研究の実験系はこれを再現できていない [68-71]。したがって、本研究の結果だけでは、天然のバイオフィームやムチン層でもT3SAの回転-分泌相関を利用したIII型分泌の制御が行われているとは断定できない。バイオフィームやムチン層については未だ不明な点が多いが、近年、既知の特性を再現できるように工夫された様々な実験系が構築されている [72-74]。今後、このような実験系を用いた場合でも本研究と同様の結果が認められるかを検討し、さらに *in vivo* での検討を行うことで、上記の考察の妥当性について検証する必要があるだろう。

しかしながら、このような機構が存在する可能性を見出したのは、本研究にてT3SAが回転運動を利用してエフェクターを分泌することを示した故である。今後、回転-分泌相関の観点からT3SAを調べることによって、今まで解明できなかった他の問題についても解決できるかもしれない。

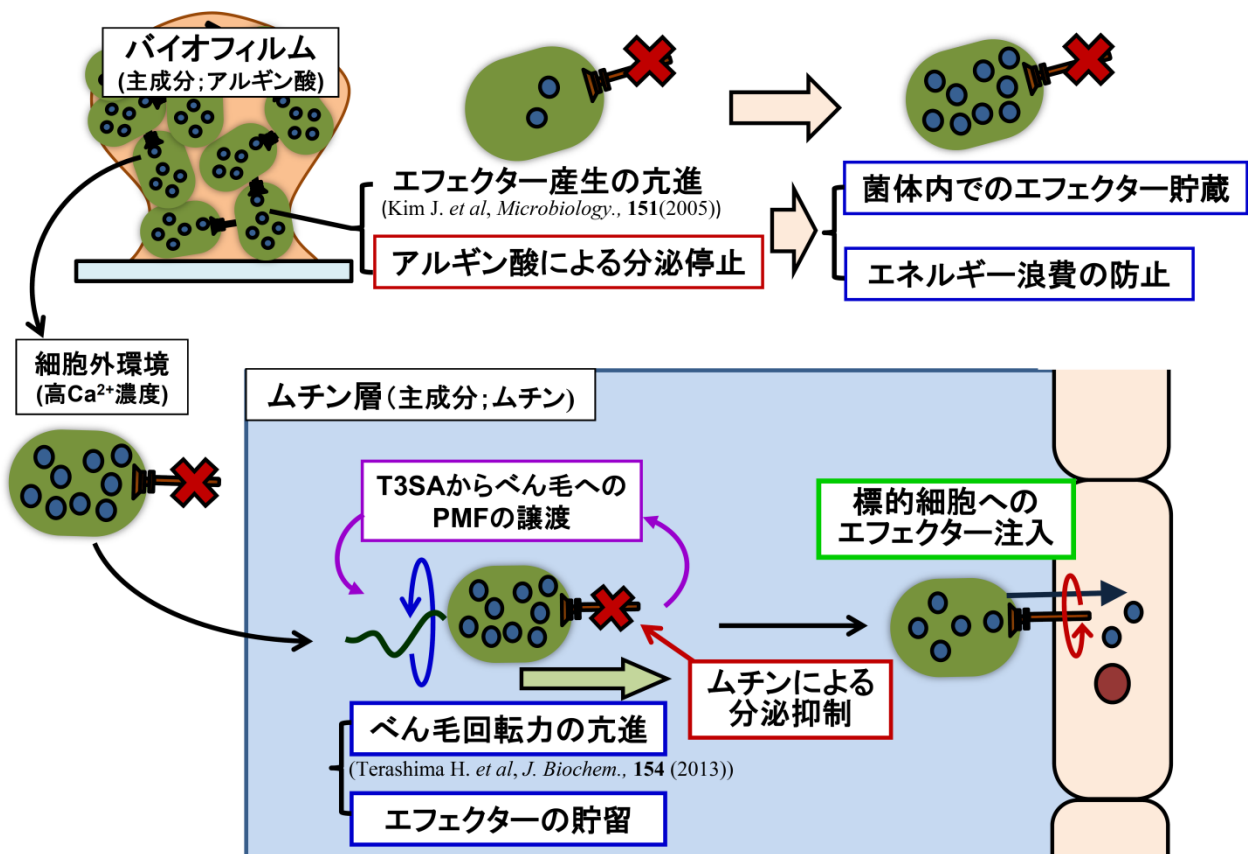


図 4-10. T3SA の回転-分泌相関を利用したエフェクター分泌制御機構の存在意義

: バイオフィルムやムチン層ではエフェクター分泌は不要であるため、エネルギーやエフェクターの浪費を防ぐために T3SA 回転運動の物理化学的阻害を介して分泌が抑制されているのかもしれない。さらに、バイオフィルム中ではエフェクターの菌体内への貯蔵、ムチン層内ではべん毛回転の亢進にもこの機構は寄与する。

第5章 総括と今後の展望

5-1. 本研究の成果

本研究ではⅢ型分泌の重要な過程の一つであるエフェクターの T3SA ニードル内輸送の分子機構を解明すべく研究を行った。第1章では、T3SA ニードル内でのタンパク質輸送に関するシミュレーション実験での報告および T3SA と細菌べん毛の高い類似性から「T3SA がプロトン駆動力をエネルギーとする回転運動を行うことで、エフェクターのニードル内輸送に必要な駆動力を産出しているのではないか」という仮説を立てた。この仮説を検証すべく、第2章では T3SA の回転運動を観察するための評価系を新規に構築し、実際にエフェクター分泌条件で T3SA が回転する様子の観察に世界で初めて成功した。さらに、この回転運動がプロトン駆動力をエネルギーとすることも見出した。第3章では、この回転運動を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌が抑制されることを見出し、観察された T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程に関与していることを示した。さらに第4章では、バイオフィームやムチン層など天然の高粘性環境では、主成分である高分子が T3SA の回転運動を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌が抑制されている可能性を示した。以上の結果から、T3SA がプロトン駆動力を利用してニードルを回転させることでエフェクター分泌の駆動力を産出していること、さらに自然界では T3SA の回転運動を物理化学的に阻害することでエフェクター分泌が抑制されている可能性が示唆された (図5-1)。

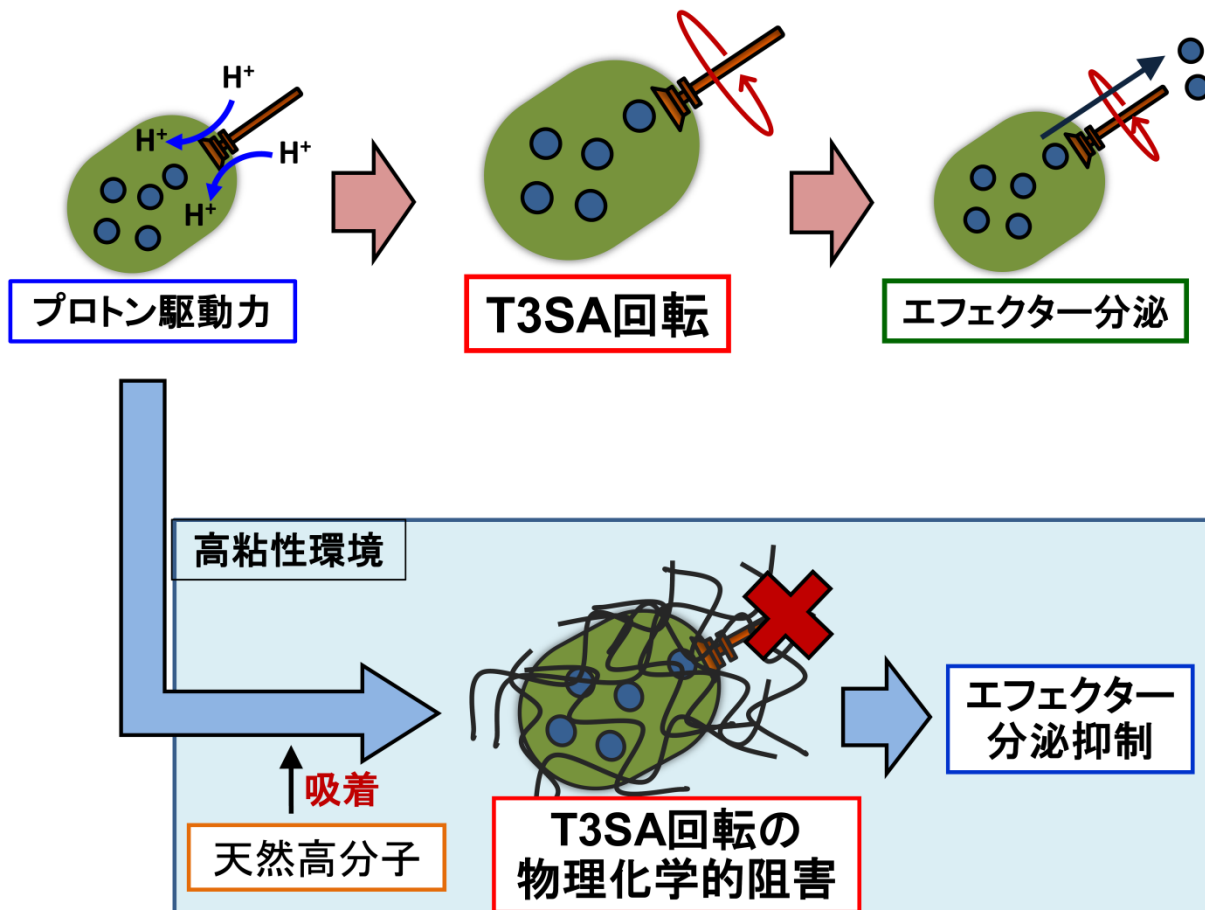


図5-1. 本研究の結果から推察される T3SA のエフェクター分泌機構とこれを利用した分泌の制御 : 本研究において、T3SA がプロトン駆動力を利用して回転することでエフェクターを分泌していること、および自然界の高粘性環境では T3SA の回転運動が物理化学的に阻害されることでエフェクター分泌が抑制されている可能性が示唆された。

T3SA の回転運動を示唆する間接的な情報は結晶構造解析も含めてこれまでも報告されていた [12, 18, 20]が、実際に回転運動を観察したという報告はなかった。また、これまでに解析された T3SA の構造中に回転駆動力を産出するユニットが見つからないことから、T3SA は回転しないのではないかと意見もあった [21]。したがって、T3SA の回転運動を観察することに世界で初めて成功し、これにより T3SA が回転運動を行うことを示したという点で本研究の意義は大きい。T3SA の回転駆動力を産出するユニットについては、今後、構造生物学的手法が発展し、より高感度での構造解析が可能になることで発見されることが期待される。

本研究で得られた知見を基に、著者は T3SA ニードルにおけるエフェクター輸送機構として、プロトン駆動力を利用した T3SA の回転運動がエフェクター輸送の駆動力を産出するという「回転-分泌機構仮説」を新たに提唱する (図 5-2)。この仮説では、①化学エネルギーであるプロトン駆動力を利用して T3SA が回転すると、②これがニードルの撓みという物理現象を誘起する。これにより、③ニードル構成因子の不均一なコンフォメーション変化が力学的に誘起され、④ニードル内壁-エフェクター分子間相互作用の不均一性を生み出す。このコンフォメーション状態が回転に伴い、周期的に変化していくことで⑤ニードル内をエフェクターが輸送されていき、⑥最終的にエフェクターが分泌される、と考えている。この仮説を検証するためには、今後、回転-分泌相関についてより詳細に解析するとともに、回転に伴ってニードルが撓むことを立証する必要があるだろう。

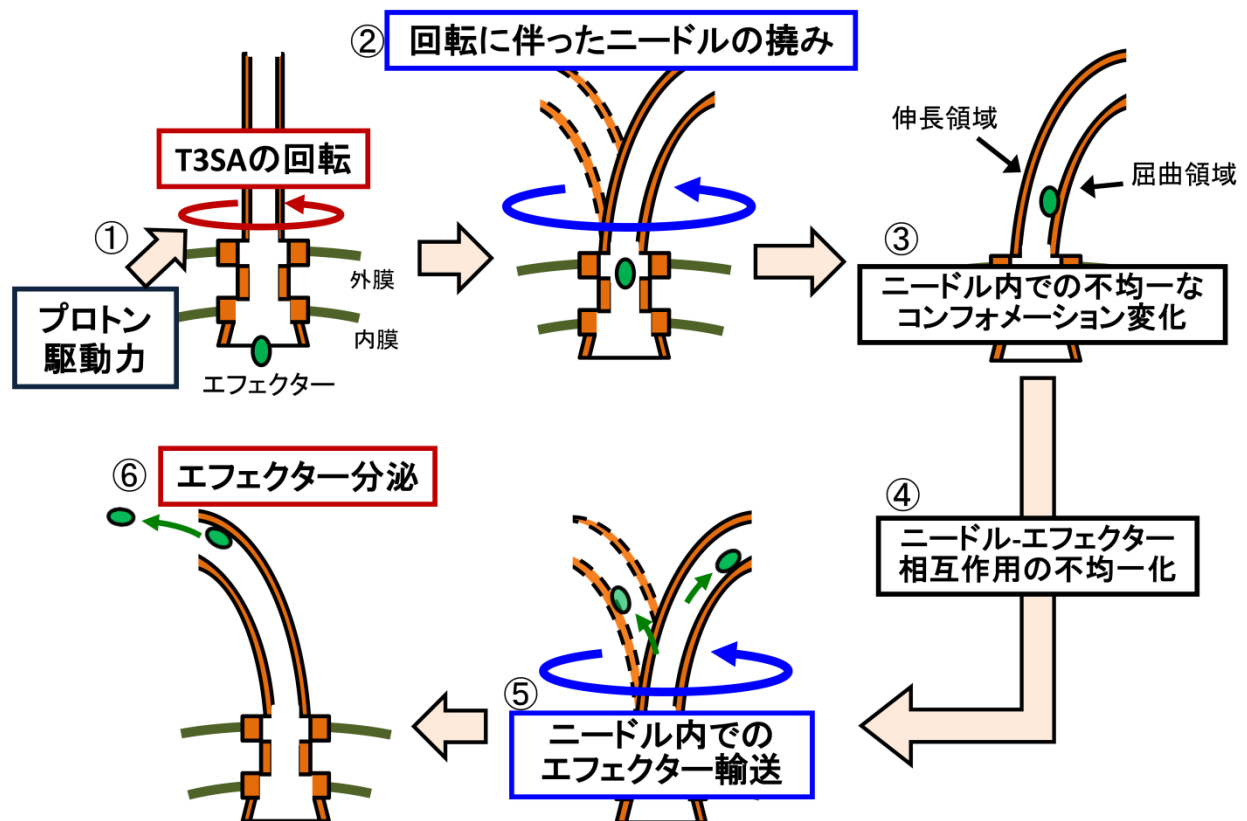


図 5-2. III型分泌装置の回転-分泌機構仮説

: これまでに得られた知見を基に、III型分泌機構仮説として新規に「回転-分泌機構仮説」を提唱する。
 ①プロトン駆動力を利用して T3SA が回転する。これにより、②T3SA ニードルが撓み、③ニードル構成因子の不均一なコンフォメーション変化が物理的に誘起される。その結果、④ニードル内壁-エフェクター間相互作用に不均一性が生じ、さらに⑤T3SA 回転に伴って、このコンフォメーション状態が周期的に変化することでニードル内にエフェクター輸送の駆動力が発生する。そして最終的に⑥エフェクターが菌体外に分泌される。

さらに、T3SA の回転運動を 1 菌体レベルで実際に観察することで、T3SA ニードルの柔軟性や回転分泌相関における回転閾値の存在、細菌感染過程における菌体間での役割分担の存在の可能性など、これまで見出されていなかった興味深い知見を得ることができた。今後も、回転分泌相関について調べていくことで、従来の研究では得られなかった知見が数多く得られることが期待される。

以下 3 節では、回転分泌機構仮説に関連した、特に重要と思われる 3 つの命題について考察する。

5-2. 回転分泌機構仮説は緑膿菌以外のⅢ型分泌やべん毛タンパク質輸送においても成立するのか？

本研究ではモデル細菌として緑膿菌を用いて T3SA の回転運動がエフェクター分泌過程に関与する可能性を示した。T3SA の構造や機能性はべん毛と同じく菌種を超えて高い相同性を示すことから、本研究で得られた知見は基本的には他の細菌の T3SA においても成り立つと推察される [4]。しかしながら、腸管病原性大腸菌 (EPEC) や腸管出血性大腸菌 (EHEC)、植物病原菌 (*Pseudomonas Syringae* など) といった一部の細菌の T3SA では外膜露出部の構造が緑膿菌 T3SA とは異なる。EPEC や EHEC の T3SA では長さ 100 nm 前後のニードルの先端に、60-700 nm の鞘状構造体が結合している [75]。また、植物病原菌の T3SA ではニードルが長さ約 2 μm の Hrp pili に置換されている (図 5-3) [76, 77]。このような T3SA においても回転分泌機構仮説は成立しうるのだろうか？

また、べん毛フィラメント形成時にはフィラメント構成因子であるフラジェリンがⅢ型分泌と同様に細菌べん毛内を輸送される [19, 20, 78] が、この輸送においても回転分泌機構仮説は成り立つのであろうか？

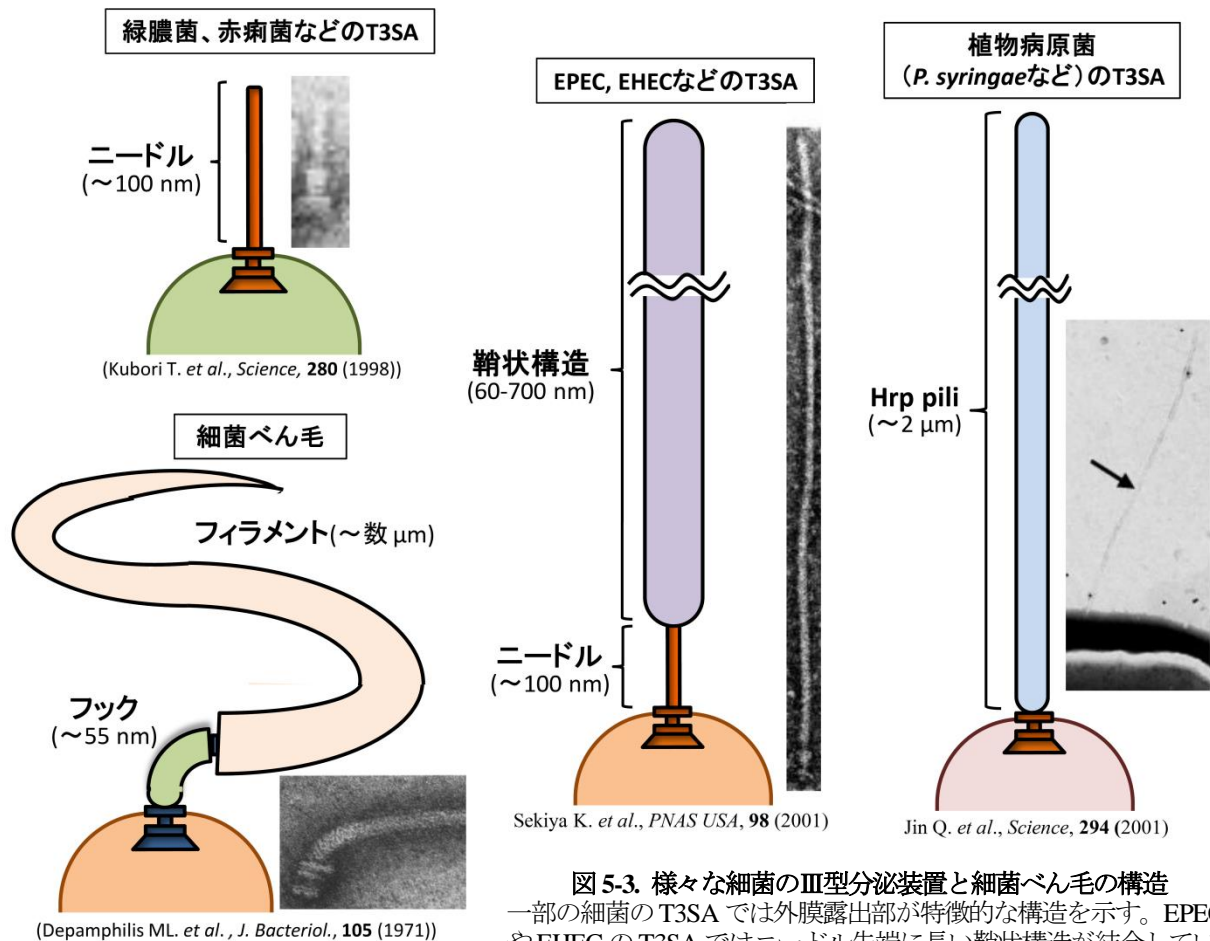


図 5-3. 様々な細菌のⅢ型分泌装置と細菌べん毛の構造
一部の細菌の T3SA では外膜露出部が特徴的な構造を示す。EPEC や EHEC の T3SA ではニードル先端に長い鞘状構造体が結合している。植物病原菌ではニードルの代わりに長い Hrp pili が存在する。

これらの問題について、べん毛フィラメント形成時のフラジェリン輸送に関する報告を基に考察する。従来、フラジェリンの輸送は ATP をエネルギーとして起こると考えられていたが、2008 年に Minamino らは ATP がべん毛タンパク質輸送装置にフラジェリンを装填する段階でのみ利用されており、その後のフラジェリンのべん毛内輸送には主にプロトン駆動力が利用されていることを報告した [78]。また、べん毛フィラメント内でのフラジェリン輸送機構については 2011 年に Tamer らが押し出しモデルを提唱し、シミュレーション実験にてその妥当性を示した [79]。このモデルではフラジェリンが基部体からフィラメント内へ次々と送り込まれることにより、押し出されるような形でフィラメント内を輸送される (図 5-4B)。

しかしながら、フラジェリン輸送においてプロトン駆動力がどのような形で利用されているのかは不明であり、また、押し出しモデルではべん毛フックにおけるフラジェリン輸送は考慮されていない。べん毛フックは長さ約 55 nm の柔軟な構造体であり、T3SA ニードルと類似した物理化学的性質を示す [32] (図 5-3)。以上の報告と本研究で得られた知見に基づき、著者は「べん毛タンパク質輸送におけるプロトン駆動力はフック領域でのフラジェリン輸送に利用されており、この部分では T3SA と同じく回転分泌機構によりフラジェリンが一方向性に輸送されているのではないかと考えている (図 5-4B)。もし、フラジェリンがべん毛装置全体に渡って押し出し機構にて輸送されるのであれば、基部体が停止すると輸送途中のフラジェリンが逆流してしまうだろう。そのため、フラジェリンを輸送するには基部体がフラジェリンを常に送り続けなければならない。一方、フラジェリンが基部体によりフックの入り口に装填された後、回転分泌機構にてフック内をフィラメントの入り口まで運ばれ、その後、押し出し機構にてフィラメント内を輸送されるのであれば、基部体でのフラジェリン装填が停止しても一度送り込まれたフラジェリンはフィラメント入口で留まり、逆流することはないだろう (図 5-4B)。したがって、輸送効率を考慮すると、フック領域ではフラジェリンが回転分泌機構により輸送されている可能性は十分にありうるだろう。

同様の方法で、EPEC や EHEC などの鞘状構造を有する T3SA における回転分泌機構の関与についても説明できる。これらの T3SA が有する鞘状構造は、粘液層を突破して T3SA 先端部を宿主細胞に到達させるための構造であると考えられている [75]。そのため、鞘状構造はニードルとは異なり、粘液層を貫くために比較的硬い構造をしていると推察される。このような硬い構造体では回転分泌機構仮説で想定されているような撓みは生じにくいいため、少なくともこの部分でのエフェクター輸送は回転分泌機構には依らないと思われる。しかし、鞘状構造の根本には通常の T3SA ニードルに相当するネックと呼ばれる領域が存在する [75]。したがって、鞘状構造を有する T3SA の場合には、ネック部分では緑膿菌 T3SA と同様に回転分泌機構にて一方向性にエフェクターが輸送され、鞘状構造内ではべん毛フィラメント内と同様に押し出し機構にてエフェクターが輸送されるのではないかと考えられる (図 5-4C)。

植物病原菌の T3SA の場合にはフックやニードルに相当する領域が現時点では発見されていないことから、回転分泌機構が適用されるのか否かについては不明である [76, 77]。今後、植物病原菌由来 T3SA の構造解析が進展してニードルに相当するユニットが発見されれば、EPEC や EHEC の T3SA と同様に一部回転分泌機構を適用している可能性が考えられる。このようなユニットがなければ、植物病原菌の T3SA は動物病原菌の T3SA とは異なる分子機構にて機能している可能性が示唆されるだろう。

以上の考察に対する実験的根拠は現時点ではほとんどない。しかし T3SA は菌種を超えて高い相同性を示すことから、著者は T3SA の回転分泌機構は緑膿菌だけでなく、他の細菌においても共通する分子機構であろうと考えている。回転分泌機構の普遍性については今後詳細に検討していく必要がある。

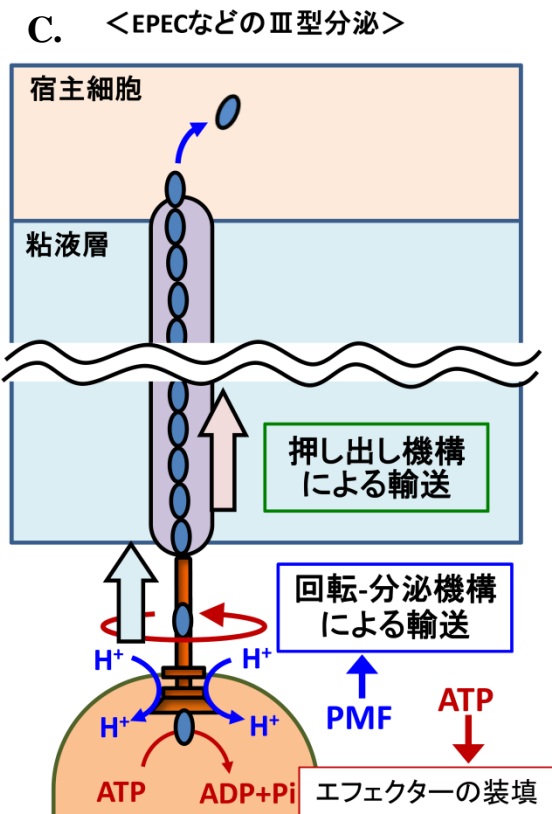
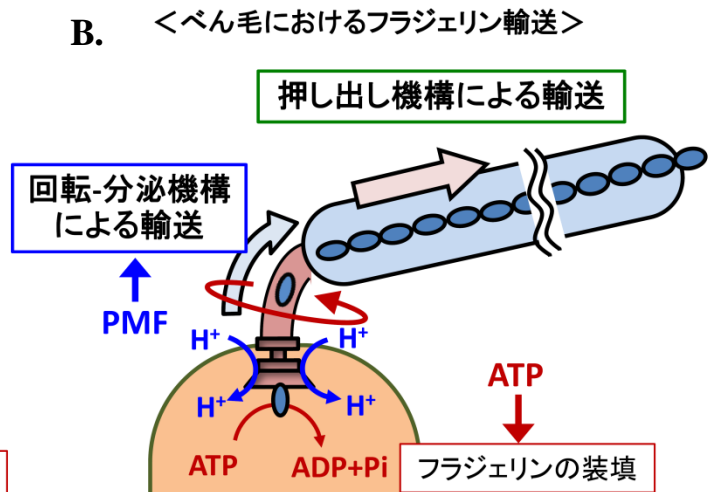
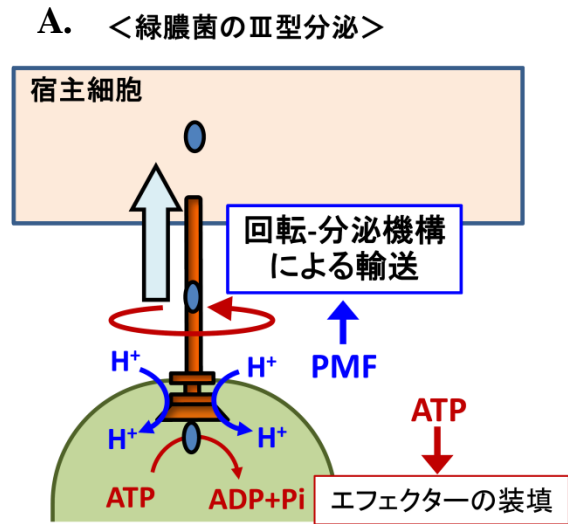


図 5-4. 回転-分泌機構仮説に基づいたⅢ型分泌およびフラジェリン輸送の分子機構モデル

A. 本研究において、緑膿菌などのⅢ型分泌はプロトン駆動力 (PMF) を利用した T3SA の回転を駆動力として起こることが示唆された。

B. べん毛フィラメント形成時のフラジェリン輸送における回転-分泌機構の関与の可能性。べん毛フックでのフラジェリン輸送は回転-分泌機構で起こり、続くフィラメント内輸送は押し出し機構で起こるのかもしれない。

C. 鞘状構造を有する T3SA における回転-分泌機構の関与の可能性。鞘状構造を有する T3SA の場合、べん毛のフラジェリン輸送と同様に、ネック部分では回転-分泌機構、鞘状構造内では押し出し機構によりエフェクターが輸送されるのかもしれない。

5-3. IV型分泌装置の回転運動の可能性

細菌のタンパク質分泌装置として現在I~VII型の7種類が知られている [80]。そのうちIII型 (T3SA) とIV型 (T4SA) は多くの病原細菌に存在し、いずれもエフェクターの宿主内注入に關与する [4, 81]。T4SAはT3SAと同じく内膜および外膜を貫通する2つのリングと外膜から露出するニードル (ただし、T4SAでは約2 μmの長い線毛様構造) から成る注射器型複合体であり、T3SAと類似のサブユニット構成を示す (図5-5A) [81-83]。一方で、T3SAはべん毛と起源を同じくするがT4SAは接合線毛と高い相同性を示す、T4SAはエフェクター以外にDNAも分泌し、外来DNAの菌体内取り込みにも關与するなど、起源や機能性はT3SAと一部異なる [4, 81]。このようなT4SAはT3SAと同様に回転-分泌機構で機能するのだろうか？

T4SAはサイズが大きくてコピー数が少ないので単離精製が難しく、構造学的研究はあまり進展していない。そのため、構造学的見地からT4SAの機能メカニズムを推察することは現時点では難しい。しかし、近年、T4SAと起源を同じくするF線毛が線維の伸長-縮退反応時に回転する様子が觀察され、線毛が回転すること、さらに線毛線維が柔軟で回転に伴って撓むことが示された [84]。このような特性は本研究で見出した回転-分泌機構を適用する条件を満たす。したがって、回転メカニズムまでT3SAと共通するかは不明であるが、少なくともT4SAが回転-分泌機構にて物質輸送を行う可能性は十分にあり得ると思われる。もしこれが事実であれば、他細胞へのDNA注入と外来DNAの菌体内取り込みというT4SAの相反する2つの機能の切り替えは単に回転方向を切り替えるだけで実現できるため、非常に効率的である (図5-5B)。

T4SAが回転-分泌機構を適用しているか否かは超分子ナノマシンの運動-機能性相関を考える上で非常に興味深い。本研究で用いた手法をT4SAに適用すれば、T4SAが回転運動を行うか否かは評価できることから、今後、T4SAの分泌機構に関する研究も進展していくことが期待される。

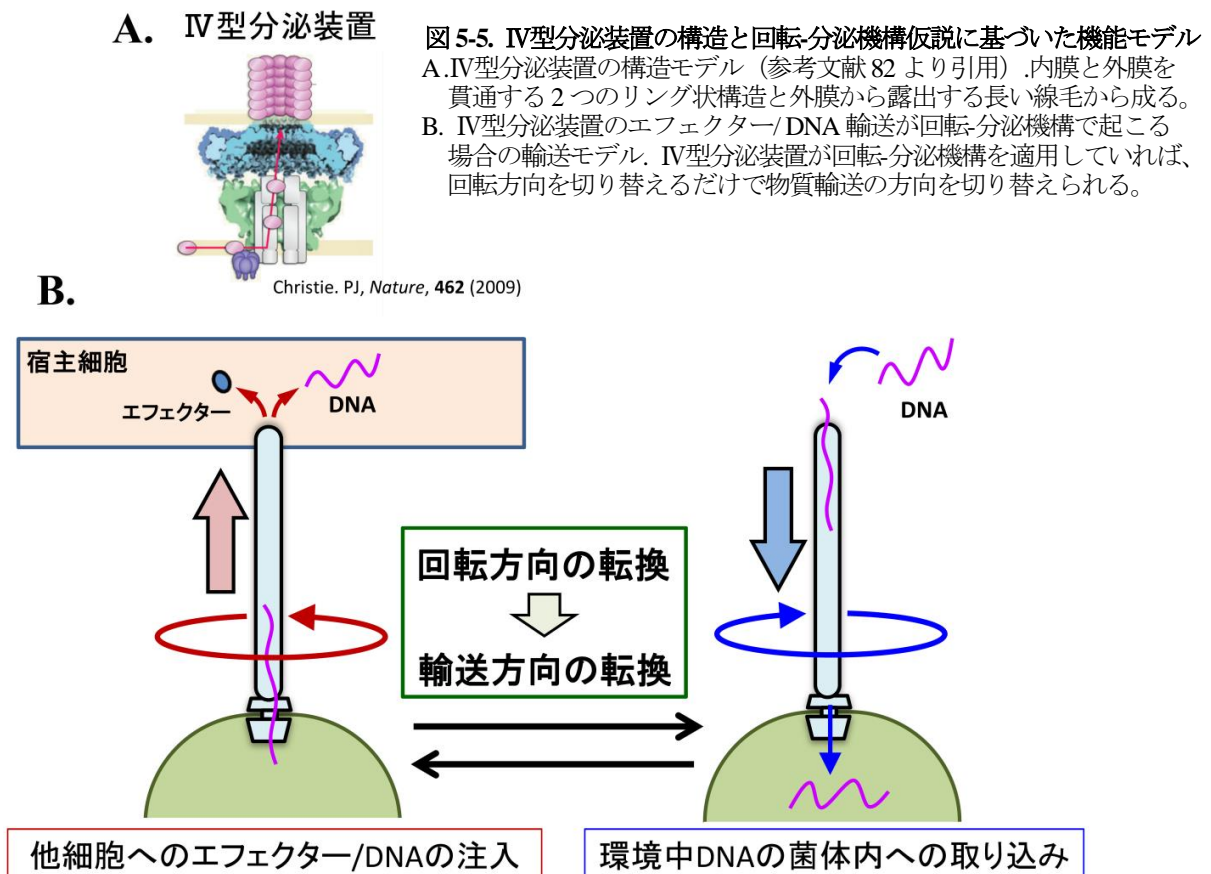


図5-5. IV型分泌装置の構造と回転-分泌機構仮説に基づいた機能モデル

A. IV型分泌装置の構造モデル (参考文献 82 より引用)。内膜と外膜を貫通する2つのリング状構造と外膜から露出する長い線毛から成る。

B. IV型分泌装置のエフェクター/DNA輸送が回転-分泌機構で起こる場合の輸送モデル。IV型分泌装置が回転-分泌機構を適用していれば、回転方向を切り替えるだけで物質輸送の方向を切り替えられる。

5-4. 抗 T3SA 抗体のワクチン効果と T3SA の回転阻害

T3SA を介して宿主細胞内に注入されるエフェクターは細菌の病原性に深く関わることから、T3SA は抗菌薬開発の標的として注目されている。特に、T3SA ニードルの先端部に結合し、細菌と宿主細胞をつなぐ孔を形成する V 抗原（緑膿菌では PcrV）は高いワクチン効果を示すことが知られており、ヒト化抗 PcrV 抗体などは現在臨床応用に向けて研究が進められている [85, 86]。抗 PcrV 抗体の作用機序としては、① PcrV のニードル先端部への結合を阻害する、② PcrV のリング状構造形成を阻害する、③ 宿主細胞膜上のトランスロケーションポアと PcrV リングとの結合を阻害する、などのメカニズムが考えられているが、現時点では不明である。また、近年では *Yersinia* 属細菌の T3SA ニードル構成因子 YscF で免疫したマウスが *Yersinia pestis* 感染に対して抵抗性を示すことも報告されている [87]。

本研究の結果を踏まえると、これらの抗体が T3SA 回転の物理化学的阻害を介して機能している可能性が考えられる。また、T3SA の回転-分泌相関に基づけば、これらの抗体に長鎖 PEG など回転抵抗の大きいものを結合させると、抗体自体の効果に加えて T3SA の回転運動が物理化学的に阻害されることにより抗体の治療効果が向上することが期待される（図 5-6）。これにより抗体の投与量を低減化できれば、抗体医薬の問題点の一つである大量投与の必要性とそれに伴う高コスト化が回避できるかもしれない。このように、本研究で見出した「T3SA 回転運動の物理化学的阻害がエフェクター分泌を抑制する」という知見は今後の抗菌薬開発の手がかりとなりうるだろう。

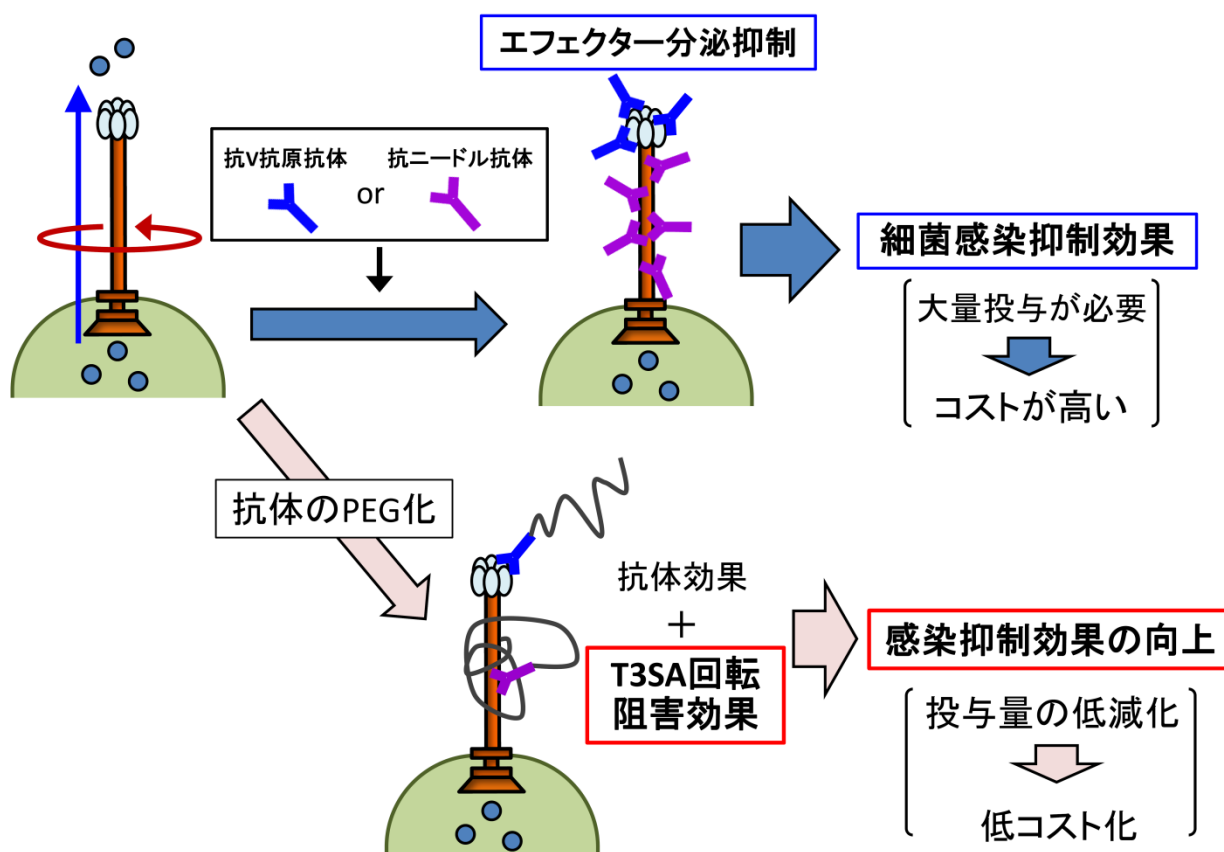


図 5-6. T3SA の回転-分泌相関に基づいた抗 T3SA 抗体の作用増強の可能性

：抗 V 抗原抗体や抗ニードル抗体は T3SA の外膜露出部に結合する。したがって、T3SA の回転-分泌相関に従えば、これらの抗体に PEG などの T3SA の回転運動を阻害しうる物質を結合させれば、抗体本来の T3SA 阻害効果に加えて T3SA 回転の物理化学的阻害によりエフェクター分泌が抑制されることで、抗体効果の向上が期待される。これにより、抗体の投与量を減らすことができれば、抗体治療の低コスト化が実現できるかもしれない。

5-5. 現在の T3SA 回転運動評価系の問題点と今後の改善策

以上のように、T3SA の回転-分泌機構仮説は既知の知見に対しても大きく矛盾する点はないことから、妥当性の高い仮説であると思われる。また、この仮説に基づいて考察することで、いくつかの興味深い新たな問題が提起されるとともに新規抗菌薬開発の手がかりとなりうる知見も得られた。しかし、T3SA の回転-分泌機構仮説を立証するためには本研究の結果だけでは不十分である。このためには今後、T3SA の回転速度および分泌速度を 1 菌体レベルで正確に定量評価する方法を確立し、その相関性について生物物理学的手法により詳細に解析していく必要があるだろう。この目的を達成する上での現在の T3SA 回転運動評価系の問題点とその改善策について以下に述べる (図 5-3、5-4)。

① 細菌の固定方向が制御できていないため、T3SA 回転運動の観察方向が一定ではない。

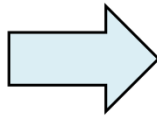
本研究では菌体表面が負に帯電していることを利用して、正電荷をもつポリリジンをコートしたスライドガラス上に静電的相互作用を介して細菌を固定した。しかしながら、細菌表面の電荷には特定の偏りがないため、この方法では固定方向の制御ができていない。そのため、観察方向に対して T3SA ニードルが必ずしも真上を向いているとは限らず、動きを観察しているニードルの向きが観察ごとに異なっている可能性が高い (図 5-3)。これはビーズ運動の軌跡がいずれも円形～楕円形ではあるものの、軌跡の分布範囲の大きさや形状が観察ごとに異なることから推測される (図 2-13, 3-2, 3-3, 4-3, および 4-5)。

回転速度や回転方向を正確に観測するためには常に同一方向から対象の動きを観察する必要がある。このような固定を実現するために、著者は極部局在性膜タンパク質を利用することを考えている。近年、一部の膜タンパク質の細胞膜上での分布には偏りがあることが報告されており、緑膿菌では IV 型線毛などが菌体極部に局在している [88, 89]。したがって、IV 型線毛に対する抗体をコートしたスライドガラスを用い、その上に緑膿菌培養液を添加すれば、IV 型線毛を介して細菌が方向性を制御した状態で固定されることが期待できる (図 5-3)。

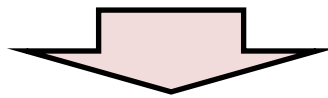
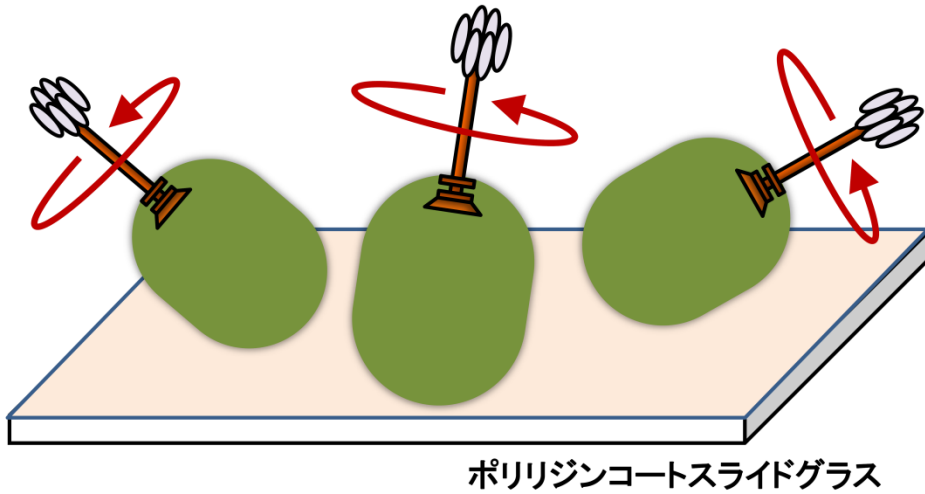
T3SA を一定方向から常に観察するためには、細菌を一定方向で固定するだけでなく、T3SA 自体も一定の位置に局在している必要がある。しかしながら、T3SA が細菌べん毛と同様に PAO1 極部に局在しているのか、それとも非選択的に細胞表面に分布しているのかは現時点では不明であり、また 1 菌体あたりの T3SA の本数も定かではない。そのため、単に細菌の固定方向を制御するだけで T3SA 回転運動の観察方向を制御できるか否かは現時点では不明である。今後、これらの情報が得られれば、より厳密に T3SA の方向性を制御して細菌を固定することが可能になるだろう。

＜本研究で用いた方法＞

静電的相互作用による
非特異的な細菌の固定

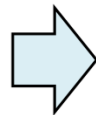


固定方向が
制御できない



＜今後の改善策＞

極部局在性タンパク質
を介した細菌の固定



方向性を制御した
細菌の固定

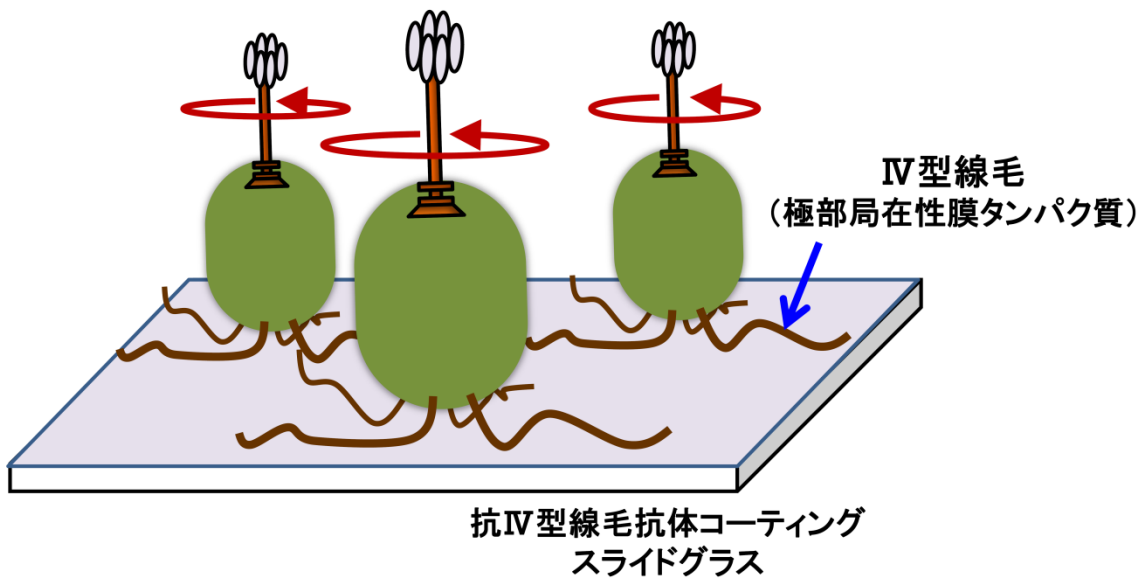


図 5-3. 現在の T3SA 回転観察系の細菌の固定法における問題点とその改善策
：本研究で構築した T3SA 回転運動観察系では菌体とポリリジンとの静電的相互作用を介して細菌を固定しているため、固定方向の制御はできていない。この改善策として、今後、IV型線毛など極部局在性膜タンパク質を介して細菌を固定することで、方向性を制御した細菌の固定を試みる。

②マイクロビーズは回転方向や回転速度を評価するためのプローブには適さない。

本研究で回転観察用プローブとして用いたマイクロビーズは、表面積が大きいので Strep tagII に結合しやすい、 μm オーダーのサイズなので通常の光学顕微鏡でも観察できるという利点がある。そのため、今回構築した系では特殊な操作や装置を必要とせず、簡便に T3SA の回転運動の有無を検出できた。一方で、T3SA の回転運動を生物物理学的により詳細に解析するためには、プローブとしてマイクロビーズを用いることは不適切であると思われる。その理由としては、①球形であるため、回転方向や回転速度の評価が難しい、②ビーズのサイズが大きすぎるため、T3SA の動きにビーズの粘性抵抗が影響している可能性がある、という点が挙げられる (図 5-4)。

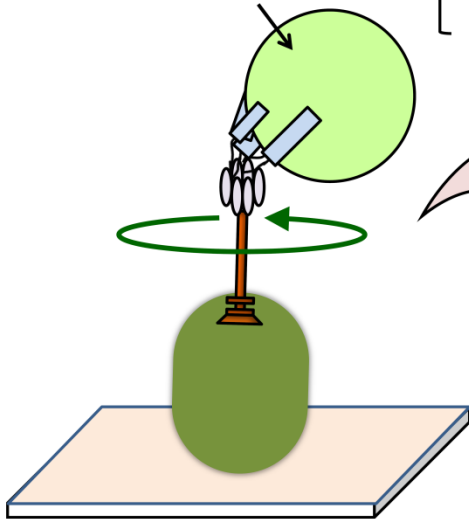
そこで、T3SA の回転運動に関してより詳細な解析を行うためには、回転観察用プローブを異方性のある、より小さなものに変更する必要がある。このようなプローブとして著者は近年報告されている量子ロッドに着目している。量子ロッドは蛍光プローブとして近年広く用いられるようになった量子ドットを棒状に成形したものであり、数十 nm と非常に小さいサイズでありながら高い量子収率を示し、高輝度かつ長時間蛍光を発することができるプローブである [90-92]。さらに量子ロッド表面にはタンパク質などをコーティングできることから、ストレプトアビジンをコートすれば Strep tagII を介して PAO1 Strep 株の T3SA 先端部に量子ロッドを特異的に結合させることが可能である [93, 94]。このような高輝度、小サイズかつ異方性のある蛍光プローブを用いることで、T3SA の回転速度が評価可能になることが期待できる (図 5-4)。

このように本研究で構築した T3SA 回転運動評価系については改善すべき点はいくつかある。今後、これらの点を改善することで、速度論的解析を含めたより詳細な T3SA 回転運動メカニズムの解析が可能になるだろう (図 5-3, 5-4)。また、本研究で用いたエフェクター分泌の評価方法についても改善すべき点がある。本研究では T3SA の回転運動は顕微鏡にて 1 菌体ごとの動きを観察しているのに対して、エフェクター分泌量はウエスタンブロッティング法にて統計的に評価している。そのため、CCCP や PEG8000 等の試薬処理により T3SA の回転速度が低下した細菌においてエフェクター分泌量が減少しているのかについては厳密には評価できていない。T3SA の回転-分泌相関についてより直接的に調べるためには、1 菌体あたりのエフェクター分泌量を評価できる系を構築し、T3SA 回転運動評価系と組み合わせることで、回転-分泌相関を 1 菌体レベルで評価していく必要がある。今後、これらの問題点を解決した 1 細菌レベルでの T3SA の回転-分泌相関解析系を構築することで、T3SA の機能メカニズムに関する研究は大きく進展するだろう。さらに、この解析系を用いて緑膿菌以外の細菌の III 型分泌についても検討を行うことで、T3SA を標的とした幅広い抗菌スペクトルを示す新規抗菌薬の開発に有益な知見が得られることが期待される。

以上、本研究において T3SA が回転運動を行う様子の観察に世界で初めて成功し、この回転運動が T3SA ニードルにおけるエフェクター輸送の駆動力を産出している可能性を見出した。さらに、自然界で T3SA の回転-分泌相関を利用してエフェクター分泌が制御されていることも示唆された。T3SA の回転-分泌相関に関する研究がさらに進展することで、III 型分泌機構について従来の研究では見いだせなかった新たな知見が多数得られるとともに、これに基づいた新規抗菌薬が開発されることが期待される。

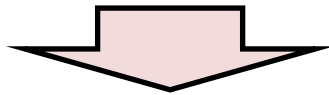
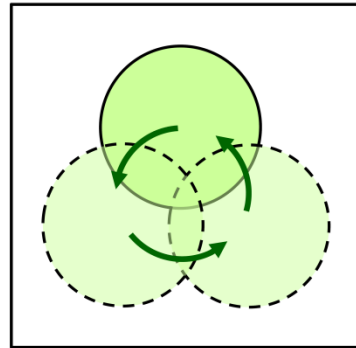
<本研究で用いた方法>

回転観察用プローブとして
マイクロビーズを使用



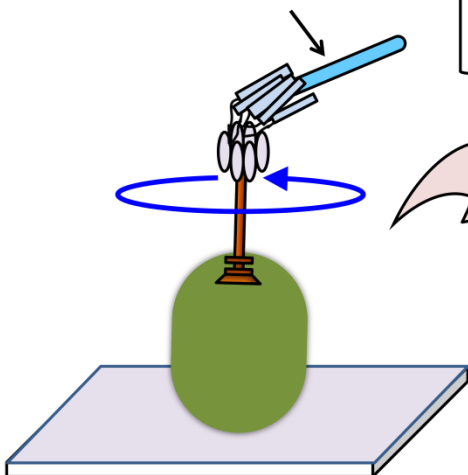
- ・形状は球形 → 回転方向・速度の評価が困難
- ・サイズが大きい (約 $1\mu\text{m}$) → 回転運動への干渉が大きい

<上から見た図>



<今後の改善策>

回転観察用プローブを
異方性のある量子ロッドに変更



- ・形状は棒状 → 回転方向・速度の評価が可能
- ・サイズが小さい (数十nm) → 回転に干渉しにくい
- ・蛍光輝度が強い → 高感度に検出可能
- ・蛍光が褪色しにくい → 長時間の観察が可能

<上から見た図>

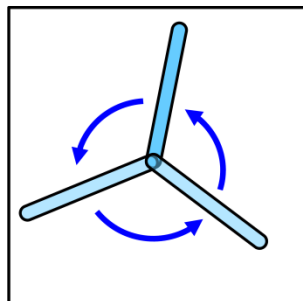


図 5-4. 現在の T3SA 回転観察系の回転観察用プローブにおける問題点と改善策

: 本研究で構築した T3SA 回転運動観察系では回転観察用プローブとして球形でサイズの大きいマイクロビーズを用いているため、回転方向や速度の評価は困難である。この改善策として、今後、プローブを小さいサイズでも十分な蛍光を示す棒状の量子ロッドに変更することで、回転方向および速度の評価を試みる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究計画の立案から実験の遂行、論文の作成に至るまで時に厳しく時に優しく、丁寧かつ熱心に御指導いただき、また、社会人としての態度や学部学生の指導方法等、研究者・教育者としての在り方についても御指導御鞭撻を賜りました京都薬科大学薬品物理化学分野 小暮健太郎教授に心より感謝致します。

本研究の遂行に際して多大なる御支援と終始暖かい御激励を賜り、また、微生物学の専門家としての視点から有益な御意見を数多くいただきました京都薬科大学微生物・感染制御学分野 後藤直正教授に心より感謝致します。本論文の審査を担当して頂いたことにつきましても重ねて御礼申し上げます。

本論文の審査を担当して頂き、有益な御助言を賜りました京都薬科大学細胞生物学分野 藤室雅弘教授に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行する上で技術面における直接的な御指導や有益な御意見を賜るとともに、博士課程での生活における不安や悩みに対して本学の先輩としての的確な御助言を頂きました京都薬科大学微生物・感染制御学分野 林直樹助教に心より感謝致します。

本研究を遂行する上で有益な御助言を賜り、また、研究生活での不安や悩みの相談に応じていただき、暖かい御激励を賜りました京都薬科大学薬品物理化学分野 濱進講師に心から御礼申し上げます。

本研究に対して有益な御助言を賜りました元京都薬科大学薬品物理化学分野講師(現ユタ大学博士研究員) 土谷博之博士に深く感謝致します。

研究室生活を支えてくださった京都薬科大学薬品物理化学分野 元教育補助臨時職員 石塚文緒様、並びに現教育補助臨時職員 富岡佳代様に深く感謝致します。

研究の遂行に必要な測定機器の貸与を快諾して頂いた広島大学大学院医歯薬保健学研究院基礎生命科学部門生体材料学研究室の加藤功一教授、平田伊佐雄助教に深く感謝致します。

研究生活を共に過ごし、互いに叱咤激励し合えた京都薬科大学薬品物理化学分野大学院生 池田義人修士、板倉祥子修士、中村伊吹修士、並びに卒業生、学部学生の皆様に心より御礼申し上げます。

大学院生活における経済的支援を賜りました独立行政法人日本学生支援機構奨学金並びに京都薬科大学 Research Assistant 制度に深く御礼申し上げます。

最後に、日々の生活を支え、研究に集中できる環境を与えてくれました家族に心より感謝致します。

参考文献

1. McKenna M.: Antibiotic resistance: the last resort. *Nature.*, **499**, 394-396 (2013).
2. Hirsch EB. and Tam VH.: Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert. Rev. Pharmacoecon. Outcomes. Res.*, **10**, 441-451 (2010)
3. Morens DM., Folkers GK., and Fauci AS.: The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature.*, **430**, 242-249 (2004)
4. Cornelis GR.: The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 811-825 (2006)
5. Hauser AR.: The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 654-665 (2009)
6. Engel J. and Balachandran P.: Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr. Opin. Microbiol.*, **12**, 61-66 (2009)
7. Ogawa M., Handa Y., Ashida H., Suzuki M., and Sasakawa C.: The versatility of *Shigella* effectors. *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 11-16 (2008)
8. Pastor A, Chabert J., Louwaqie M., Garin J., and Attree I.: PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **253**, 95-101 (2005)
9. Yahr TL. and Wolfgang MC.: Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.*, **62**, 631-640 (2006)
10. Lara-Tejero M., Kato J., Wagner S., Liu X., and Galán JE.: A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science.*, **331**, 1188-1191 (2011)
11. Deane JE., Abrusci P., Johnson S., and Lea SM.: Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 1065-1075 (2010)
12. Rathinavelan T., Zhang L., Picking WL., Weiss DD., De Guzman RN., and Im W.: A repulsive electrostatic mechanism for protein export through the type III secretion apparatus. *Biophys. J.*, **98**, 452-461 (2010)
13. Blocker AJ., Deane JE., Veenendaal AK., Roversi P., Hodgkinson JL., Johnson S., and Lea SM.: What's the point of the type III secretion system needle? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 6507-6513 (2008)
14. Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lala-Tejero M., Sukhan A., Galán JE, and Aizawa SI.: Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, **280**, 602-605 (1998)
15. Aizawa SI., Dean GE., Jones CJ., Macnab RM., and Yamaguchi S.: Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **161**, 836-849 (1985)
16. Gophna U., Ron EZ., and Graur D.: Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene.*, **312**, 151-163 (2003)
17. Gabel CV. and Berg HC.: The speed of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* varies linearly with protonmotive force. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 8748-8751 (2003)
18. Wilharm G., Lehmann V., Krauss K., Lehnert B., Richter S., Ruckdeschel K., Heesemann J., and Trülsch K.: *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect. Immun.*, **72**, 4004-4009 (2004)

19. Imada K., Minamino T., Tahara A., and Namba K.: Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 485-490 (2007)
20. Ibuki T., Imada K., Minamino T., Kato T., Miyata T., and Namba K.: Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 277-282 (2011)
21. Büttner D.: Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **76**, 262-310 (2012)
22. Silverman M. and Simon M.: Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature*, **249**, 73-74 (1974)
23. Ryu WS., Berry RM., and Berg HC.: Torque-generating units of the flagellar motor of *Escherichia coli* have a high duty ratio. *Nature*, **403**, 444-447 (2000)
24. Noji H., Yasuda R., Yoshida M., and Kinosita K Jr.: Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, **386**, 299-302 (1997)
25. Gébus C., Faudry E., Bohn YS., Elsen S., and Attree I.: Oligomerization of PcrV and LcrV, protective antigens of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.*, **283**, 23940-23949 (2008)
26. Mueller CA., Broz P., Müller SA., Ringle P., Erne-Brand F., Sorg I., Kuhn M., Engel A., and Cornelis GR.: The V-antigen of *Yersinia* forms distinct structure at the tip of injectosome needles. *Science*, **310**, 674-676 (2005)
27. Schmidt TG., Koepke J., Frank R., and Skerra A.: Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.*, **255**, 753-766 (1996)
28. Stover CK., Pham XQ., Erwin AL., Mizoguchi SD., Warren P., Hickey MJ., Brinkman FS., Hufnagle WO., Kowalik DJ., Lagrou M., Garber RL., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody LL., Coulter SN., Folger KR., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong GK., Wu Z., Paulsen IT., Reizer J., Saier MH., Hancock RE., Lory S., and Olson MV.: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa*, PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.*, **406**, 959-964 (2000)
29. Okuda J., Hayashi N., Okamoto M., Sawada S., Minagawa S., Yano Y., and Gotoh N.: Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tract is mediated by the binding of ExoS to an Na, K-ATPase regulator, FXYD3. *Infect. Immun.*, **78**, 4511-4522 (2010)
30. Lee PC., Stopford CM., Svenson AG., and Rietsch A.: Control of effector export by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion proteins PcrG and PcrV. *Mol. Microbiol.*, **75**, 924-941 (2010)
31. Hashimoto M., Mashimo T., Hirano T., Yamaguchi S., and Aizawa S.: Functional roles of the hook in a rotating tethered cell. *J. Mol. Biol.*, **375**, 367-375 (2008)
32. Aizawa SI.: Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **202**, 157-164 (2001)
33. Deane JE., Roversi P., Cordes FS., Johnson S., Keniale R., Daniell S., Booy F., Picking WD., Picking WL., Blocker AJ., and Lea SM.: Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 12529-12533 (2006)
34. Idiris A., Alam MT., and Ikai A.: Spring mechanics of alpha-helical polypeptide. *Protein Eng.*, **13**, 760-770 (2000)
35. Wang T., Arakawa H., and Ikai A.: Force measurement and inhibitor binding assay of monomer and engineered dimer of bovine carbonic anhydrase B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 9-14 (2001)
36. Kitta M., Ide T., Hirano M., Tanaka H., Yanagida T., and Kawai T.: Direct manipulation of a single potassium channel gate with an atomic force microscope probe. *Small.*, **7**, 2379-2383 (2011)

37. Magariyama Y., Sugiyama Y., and Kudo S.: Bacterial swimming speed and rotation rate of bundled flagella. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **199**, 125-129 (2001)
38. Spetzler D., Ishmukhametov R., Hornung T., Day LJ., Martin J., and Frasch WD.: Single molecule measurements of F1-ATPase reveal an independence between the power stroke and the dwell duration. *Biochemistry*, **48**, 7979-7985 (2009)
39. Drury JL. and Mooney DJ.: Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials.*, **24**, 4337-4351 (2003)
40. Okuda J., Okamoto M., Hayashi N., Sawada S., Minagawa S., and Gotoh N.: Complementation of the *exoS* gene in the *pvdE* pyoverdine synthesis gene-deficient mutant of *Pseudomonas aeruginosa* results in recovery of the *pvdE* gene-mediated penetration through the intestinal epithelial cell barrier but not the *pvdE*-mediated virulence in silkworms. *J. Infect. Chemother.*, **18**, 332-340 (2012)
41. Luangtana-anan M., Nunthanid J., and Limmatvapirat S.: Effect of molecular weight and concentration of polyethylene glycol on physicochemical properties and stability of shellac film. *J. Agric. Food. Chem.*, **58**, 12034-12940 (2010)
42. Schneider WR. and Doetsch RN.: Effect of viscosity on bacterial motility. *J. Bacteriol.*, **117**, 696-701 (1974)
43. Kaiser GE. and Doetsch RN.: Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments. *Nature.*, **255**, 656-657 (1975)
44. Berg HC. and Turner L.: Movement of microorganisms in viscous environments. *Nature.*, **278**, 349-351 (1979)
45. Magariyama Y., Kudo S.: A mathematical explanation of an increase in bacterial swimming speed with viscosity in linear-polymer solutions. *Biophys. J.*, **83**, 733-739 (2002)
46. Büttner D.: Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **76**, 262-310 (2012)
47. Hall-Stoodley L., Costerton JW., and Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 95-108 (2004)
48. Boyd A. and Chakrabarty AM.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol.*, **15**, 162-168 (1995)
49. McGuckin MA., Lindén SK., Sutton P., and Florin TH.: Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 265-278 (2011)
50. Kin J., Ahn K., Min S., Jia J., Ha U., Wu D., and Jin S.: Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.*, **151**, 3575-3587 (2005)
51. Horsman SR., Moore RA., and Lewenza S.: Calcium chelation by alginate activates the type III secretion in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One.*, **7**, e46826 (2012)
52. Kuver R., and Lee SP.: Calcium binding to biliary mucins is dependent on sodium ion concentration: relevance to cystic fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 330-334 (2004)
53. Yoon SS., Hennigan RF., Hilliard GM., Ochsner UA., Parvatiyar K., Kamani MC., Allen HL., DeKievit TR., Gardner PR., Schwab U., Rowe JJ., Iglewski BH., McDermott TR., Mason RP., Wozniak DJ., Hancock RE., Parsek MR., Noah TL., Boucher RC., and Hassett DJ.: *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell.*, **3**, 593-603 (2002)

54. Nadell CD., Xavier JB., and Foster KR.: The sociobiology of biofilms., *FEMS. Microbiol. Rev.*, **33**, 206-224 (2009)
55. Xu X., Stewart PS., and Chen X.: Transport limitation of chlorine disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* entrapped in alginate beads. *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 93-100 (1996)
56. Branda SS., Vik S., Friedman L., and Kolter R.: Biofilms: the matrix revisited., *Trends. Microbiol.*, **13**, 20-26 (2005)
57. Ramphal R. and Pyle M.: Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect. Immun.*, **41**, 339-344 (1983)
58. Bansil R., Stanley E., and LaMont JT.: Mucin biophysics. *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 635-657 (1995)
59. Bansil R. and Turner BS.: Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.*, **11**, 164-170 (2006)
60. Sandberg T., Blom H., and Caldwell KD.: Potential use of mucins as biomaterial coatings. I. Fractionation, characterization, and model absorption of bovine, porcine, and human mucins. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **91**, 762-772 (2009)
61. Loquet A., Sqourakis NG., Gupta R., Giller K., Riedel D., Goosmann C., Griesinger C., Kolbe M., Baker D., Becker S., and Lange A.: Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature.*, **486**, 276-279 (2012)
62. Callanan MJ., Carroll WR., and Mitchell ER.: Physical and chemical properties of protamine from the sperm of salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Biol. Chem.*, **229**, 279-287 (1957)
63. Sautière P., Briand G., Gusse M., and Chevallier P.: Primary structure of the protamine isolated from the sperm nuclei of the dog-fish *Scyliorhinus caniculus*. *Eur. J. Biochem.*, **119**, 251-255 (1981)
64. Tiourina OP. and Sukhorukov GB.: Multilayer alginate/ protamine micro-sized capsules: encapsulation of alpha-chymotrypsin and controlled release study. *Int. J. Pharm.*, **242**, 155-161 (2002)
65. Liu Z., Miyashiro T., Tsou A., Hsiao A., Goulian M., and Zhu J.: Mucosal penetration primes *Vibrio cholera* for host colonization by repressing quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 9769-9774 (2008)
66. Hayashi N., Matsukawa M., Horinishi Y., Nakai K., Shoji A., Yoneko Y., Yoshida N., Minagawa S., and Gotoh N.: Interplay of flagellar motility and mucin degradation stimulates the association of *Pseudomonas aeruginosa* with human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *J. Infect. Chemother.*, **19**, 305-315 (2013)
67. Terashima H., Terauchi T., Ihara K., Nishioka N., Kojima S., and Homma M.: Mutation in the α -subunit of F(1)F(0)-ATPase causes an increased motility phenotype through the sodium-driven flagella of *Vibrio*. *J. Biochem.*, **154**, 177-184 (2013)
68. Williams SE. and Turnberg LA.: Demonstration of a pH gradient across mucus adherent to rabbit gastric mucosa: evidence for a 'mucus-bicarbonate' barrier. *Gut.*, **22**, 94-96 (1981)
69. Bahari HM., Ross IN., and Turnberg LA.: Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. *Gut.*, **23**, 513-516 (1982)
70. Celli JP., Turner BS., Afdhal NH., Ewoldt RH., McKinley GH., Bansil R., and Erramilli S.: Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules.*, **8**, 1580-1586 (2007)
71. Swidsinski A., Sydora BC., Doerffel Y., Loening-Baucke V., Vaneechoutte M., Lupicki M., Scholze J., Lochs H., and Dieleman LA.: Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota., *Inflamm. Bowel. Dis.*, **13**, 963-970 (2007)
72. Lebeaux D., Chauhan A., Rendueles O., Beloin C.: From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related

- infections. *Pathogens*, **2**, 288-356 (2013)
73. Johansson ME., Gustafsson JK., Sjöberg KE., Petersson J., Holm L., Sjövall H., and Hansson GC.: Bacterial penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One*, **5**, e12238 (2010)
74. Yang Y., Tsifansky MD., Shin S., Lin Q., and Yeo Y.: Mannitol-guided delivery of Ciprofloxacin in artificial cystic fibrosis mucus model. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 1441-1449 (2011)
75. Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C., and Abe A.: Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 11638-11643 (2001)
76. Jin Q. and He SY.: Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science*, **294**, 2556-2558 (2001)
77. Büttner D. and He SY.: Type III protein secretion in plant pathogenesis bacteria. *Plant Physiol.*, **150**, 1656-1664 (2009)
78. Minamino T. and Namba K.: Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature.*, **451**, 485-488 (2008)
79. Tanner DE., Ma W., Chen Z., and Schulten K.: Theoretical and computational investigation of flagellin translocation and bacterial flagellum growth. *Biophys J.*, **100**, 2548-2556 (2011)
80. Tseng TT., Tyler BM., and Setubal JC.: Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.*, **9** (2009)
81. Cascales E. and Christie PJ.: The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 137-149 (2003)
82. Christie PJ.: Structural biology: Translocation chamber's secrets. *Nature*, **462**, 992-994 (2009)
83. Fronzes R., Christie PJ., and Waksman G.: The structural biology of type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 703-714 (2009)
84. Clarke M., Maddera L., Harris RL., and Silverman PM.: F-pili dynamics by live-cell imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 17978-17981 (2008)
85. Sawa T., Yahr TL., Ohara M., Kurahashi K., Gropper MA., Wiener-Kronish JP., and Frank DW.: Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat. Med.*, **5**, 392-398 (1999)
86. Baer M., Sawa T., Flynn P., Luehrsen K., Martinez D., Wiener-Kronish JP., Yarranton G., and Bebbington C.: An engineered human antibody fab fragment specific for *Pseudomonas aeruginosa* PcrV antigen has potent antibacterial activity. *Infect Immun.*, **77**, 1083-1090 (2009)
87. Matson JS., Durick KA., Bradley DS., and Nilles ML.: Immunization of mice with YscF provides protection from *Yersinia pestis* infections. *BMC Microbiol.*, **5** (2005)
88. DeLange PA., Collins TL., Pierce GE., and Robinson JB.: PilJ localizes to cell poles and is required for type IV pilus extension in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.*, **55**, 389-395 (2007)
89. Skerker JM. and Berg HC.: Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 6901-6904 (2001)

90. Rothenberg E., Kazes M., Shaviv E., and Banin U.: Electric field induced switching of the fluorescence of single semiconductor quantum rods. *Nano. Lett.*, **5**, 1581-1586 (2005)
91. Fu A., Gu W., Boussert B., Koski K., Gerion D., Manna L., Le Gros M., Larabell CA., and Alivisatos AP.: Semiconductor quantum rods as single molecule fluorescent biological labels. *Nano. Lett.*, **7**, 179-182 (2007)
92. Hu J., Li Ls., Yang W., Manna L., Wang Lw., and Alivisatos AP.: Linearly polarized emission from colloidal semiconductor quantum rods. *Science.*, **292**, 2060-2063 (2001)
93. Yong KT., Qian J., Roy I., Lee HH., Bergey EJ., Trampusch KM., He S., Swihart MT., Maitra A., and Prasad PN.: Quantum rod bioconjugates as targeted probes for confocal and two-photon fluorescence imaging of cancer cells., *Nano. Lett.*, **7**, 761-765 (2007)
94. Chen Y., Ren HL., Liu N., Sai N., Liu X., Liu Z., Gao Z., and Ning Ba.: A fluoroimmunoassay based on quantum dot-streptavidin conjugate for the detection of chlorpyrifos. *J. Agric. Food. Chem.*, **58**, 8895-8903 (2010)