

氏名 (生年月日) おおぎ たか し
扇 田 隆 司 (1987年2月26日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博 第148号

学位授与の日付 2014年3月15日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 (主査) 教授 小暮 健太郎

(副査) 教授 後藤 直正

(副査) 教授 藤室 雅弘

論文内容の要旨

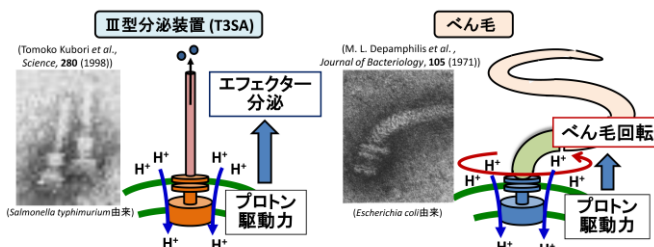
はじめに

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。これに対応するためには、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される。

細菌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。したがって、T3SA は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」という仮説を立てた (図1)。しかし、これまでに T3SA の回転を実際に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临床上の重要性が高い緑膿菌をモデル細菌として、T3SA の回転運動評価系を新たに構築し、T3SA が回転運動を行う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。



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。

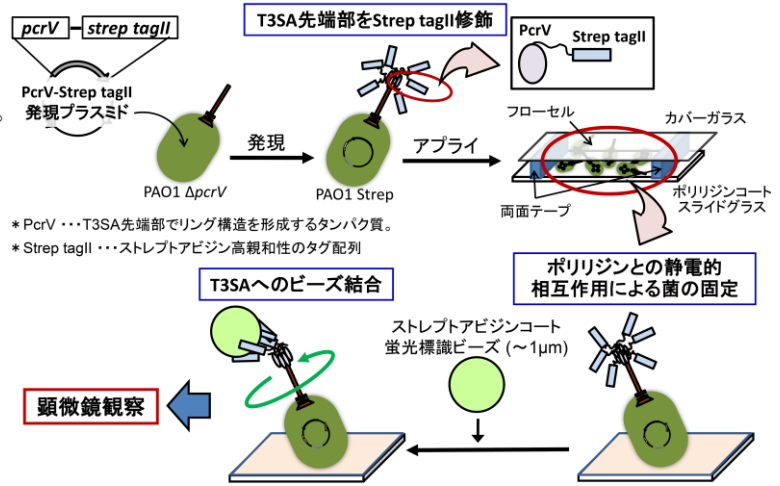
図1. 細菌べん毛との類似性に基づいたⅢ型分泌装置のエフェクター分泌機構仮説

1. 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、T3SAがプロトン駆動力を利用して回転することが示唆された。これに基づき、プロトン駆動力依存的なT3SAの回転がニードルのコンフォメーションを変化させてエフェクターを輸送するという「回転-分泌機構仮説」を提唱した。



2. III型分泌装置の回転-エフェクター分泌相関の検討

本章では、第一章にて観察された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。第一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が確認できた。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。

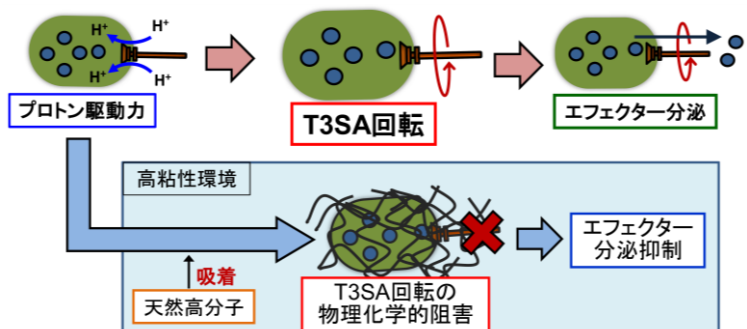
3. III型分泌装置の回転阻害を介したエフェクター分泌制御に関する可能性の検討

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回転阻害を介してエフェクター分泌が抑制され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。

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、

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



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。

審査の結果の要旨

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ため、新規抗菌薬の作用標的として有望であるが、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解明されていなかった。申請者は、T3SA と細菌べん毛との高い構造類似性と、T3SA によるエフェクター分泌がべん毛回転同様にプロトン駆動力を必要とする点に着目し、「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」という仮説を立て、検証を行った。本研究では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るとともに、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。まず、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、ビーズの動きに基づく T3SA 運動の評価系を構築した。その結果、エフェクター分泌条件でビーズがゆっくりと反時計回りに回転する様子の観察に世界で初めて成功した。この回転はプロトノフォア添加により停止したことから、T3SA がプロトン駆動力を利用した回転を行うことが示唆された。さらに、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た。さらに、回転を阻害しない PEG200 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。これらのことから、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、さらには T3SA 回転がエフェクター分泌過程に重要な役割を担っていることが示唆された。また、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が 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明らかにしたことから、バイオフィームやムチン層等の天然高粘性環境では 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。

以上、申請者は本研究において、細菌III型分泌装置 T3SA がプロトン駆動力を利用して回転していることを世界で初めて発見するとともに、粘性抵抗によって T3SA の回転とエフェクター分泌が抑制されることを明らかにすることに成功した。さらに、バイオフィーム等の天然高粘性環境において T3SA 回転の物理化学的阻害によるエフェクター分泌制御の可能性を見出すに至った。これらの知見は、これまで不明であった T3SA のエフェクター分泌機構解明につながる貴重な成果である。