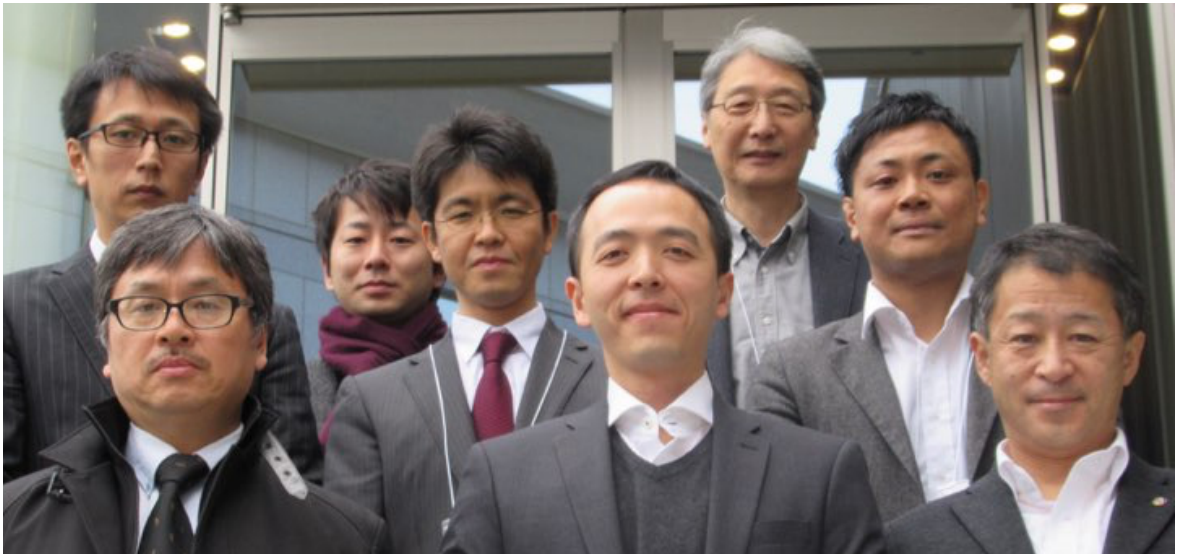


第 90 回日本細菌学会総会シンポジウム 「最近の細菌線毛研究」 報告記

第 90 回日本細菌学会総会が、平成 29 年 3 月 19 日から 21 日の 3 日の日程で、仙台国際センター展示棟で開催されました。最終日の午前中のセッションとして、新学術領域共催シンポジウム「最近の細菌線毛研究」が開かれました。中山浩次先生（長崎大学）と宮田真人領域代表（大阪市立大学）がコンビーナを務められました。国内外の 6 人の著名な研究者の方々から最新の線毛研究のご講演をいただき、活発な討論がなされました。本領域の最後を飾るに相応しいシンポジウムとなりました。

報告記の執筆は、シンポジストでもある庄子幹郎先生、木下佳昭先生にお願いしましたので、お二人の記事をお楽しみください。



(前列左から：堀、Chang、宮田、中列：中村、庄子、林、後列：木下、中山。敬称略)

改めて申し上げるまでもありませんが、中山浩次先生が、平成 29 年度細菌学会浅川賞を受賞されました。中山先生、誠におめでとうございます。

前半担当：庄子幹郎

今回の発表は、恩師である中山先生から薦められて、シンポジウムの発表となりました。発表は、会期の終了日の午前中に行われ、各シンポジストから線毛研究の最新成果について聞くことができ、とても勉強になりました。発表後、学会場の中にある喫茶店で、皆で食事をしながらの歓談は楽しかったです。



S21-1 庄子幹郎（長崎大学・院医歯薬・口腔病原微生物学分野）

『The type V pili in the Bacteroidia class bacteria: novel assembly mechanism』

P. gingivalis の線毛主要構成タンパク質はリポタンパク質として菌体表面に分泌された後、Arg-gingipain により N 末端側の限定分解が起こり、重合が開始すると報告していた。しかし

ながら、その形成機構については不明であった。Bacteroidia 綱細菌の線毛タンパク質 20 個について構造解析を行った。それらはイムノグロブリン様構造が 2 個連なる形をしており、多くのものは C 末端 β ストランドが内向きに折れ曲がっていた。次に、*P. gingivalis* を用いて線毛形成機構を調べた。その結果、Arg-gingipain により N 末端 β ストランドが除去されるとそこに空隙が生じ、C 末端 β ストランドが外向いた状態になり、さらに N 末端 β ストランドが除去された空隙に次の線毛タンパク質の C 末端 β ストランドが嵌入するという重合メカニズム（プロテアーゼ依存性ドナー・ストランド交換メカニズム）が示唆された。このメカニズムはこれまでに報告されている他の線毛形成機構とは全く異なることから 5 型線毛と命名しました。

S21-2 堀克敏先生（名古屋大学・工・生物機能）

『AtaA, a new trimeric autotransporter adhesion mediating strong and nonspecific adhesion of bacterial cells』

アシネトバクター属の Tol5 株は、プラスチック、ガラス、ステンレス等においてバイオフィルムを形成することができる。それに関わる分子が AtaA タンパク質である。AtaA は単量体で約 300 kDa であるが、菌体表面では 3 量体が絡み合いながら約 200 nm のまっすぐなファイバー構造を形成する。また、その C 末端には β バレル構造があり 5 型分泌装置で分泌される。AtaA の passenger domain の構造を明らかにする為にプロテアーゼサイトを挿入して、その部分を精製しタンパク質の性質を調べた。CD スペクトラム解析で 80°C 以下では正常なファイバー構造であるが、90°C 以上ではファイバー構造がなくなる。しかしながら、酸、アルカリ、pH の変化などではファイバー構造は変化しないらしい。passenger domain は Nhead、Nstalk、Chead、Cstalk からなる。接着に必要な構造として、Nhead、Nstalk が関わると思われる。基質特異性はどうなっているのか興味がある。

S21-3 中村昇太先生（大阪大学・微生物病研究所）

『毒素原性大腸菌由来 IV 型線毛の構造と形成機構 Type IV pilus structure and assembly of human enterotoxigenic *Escherichia coli* 』

腸管毒素原性大腸菌の Type IV 線毛について、線毛主要タンパク質は CofA であり Type IVb 型に属する。また、Tip タンパク質は CofB である。今回、CofA、CofB の結晶構造解析を明らかにした内容を発表された。CofA の構造解析については、カナダの L. Craig 先生のグループと競争になったとの事。L. Craig 先生のグループよりも中村先生のグループのほうが高解像度で、硫黄原子の異常散乱を用いた特殊な解き方をしたことから、結晶学の専門誌のジャーナルの表紙にも採用されたそうである。CofB についても同じグループと競争になったとの事。彼らは CofB が単量体で Tip に存在すると論文に報告しているそうであるが、中村先生のグループは 3 量体で存在すると主張していた。今回、米国から来られた Chang 先生も 3 量体説を支持している文章を論文に報告していたそうである。Type IVa 型も Tip タンパク質は 3 量体で

あることだそうなので、3 量体説が真実だと思われる。また、CofB が無くなると線毛はできなくなることから、線毛形成には CofB は必須の分子であるそうである。CofB がどのように CofA を繋げているのか興味がある。

後半担当：木下佳昭

今回の発表は恩師の 1 人である宮田先生からの直々のお願いで、私にとっては 2 度目のシンポジウム発表となりました。実は、前日に学位授与式があり、新幹線内で発表の練習をするなど久しぶりに焦りながら発表を迎える形となりました・・・



S21-4 木下佳昭 (学習院大学・理学部・物理)

『Detection of rotation and steps of the archaellum in the swimming halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*』

私は光学顕微鏡下でのアーキアの運動についてお話ししました。遊泳性のアーキアは細胞表面に 10 nm 程度の細い繊維を有しており、これをアーキアべん毛と呼びます。アーキアべん毛は IV 型線毛を構成するタンパク質と同様の遺伝子配列を持っていますが、直線運動ではなく回転運動を示します。このべん毛繊維はビオチン・アビジン結合を介して蛍光標識が可能であり、回転を蛍光顕微鏡で捉えることができます。蛍光観察の結果から、べん毛繊維は右巻きのらせん構造であり、時計・反時計方向に 23 Hz 程度で回転していることがわかりました。また、テザードセルに観察において、6 個もしくは 10 個の停止点を持つこともわかりました。アーキアべん毛を構成する FlaI (6 回転対称) と FlaH (10 回転対称) が、トルク発生に重要であると考えています。

今回初めて細菌学会でお話しする機会でしたが、不安がありましたが、“べん毛繊維のスイッチングはどうなっているのか”や“何故、バクテリアとアーキアのべん毛は異なるのか”など質問があり安心しました。しかし、英語で上手く伝えることができず課題は残りました・・・

S21-5 林直樹先生 (京都薬科大学・薬学部・微生物・感染制御学分野)

『*Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into host cells through a retraction of type IV pili』

林先生は緑膿菌である *Pseudomonas aeruginosa* を研究対象としており、IV 型線毛と III 型分泌装置の関係性に関する研究をお話しされた。*Pseudomonas aeruginosa* は敗血症の原因菌とされており、上皮細胞表面の結合能並びに破壊能が重要とされているみたいである。林さんはこのプロセスにおいて、以下の 5 個のステップが関係していると考えている。(i) 上皮細胞の認識 (ii) 上皮細胞への接近 (iii) 上皮細胞への接着 (iv) 透過経路の形成 (v) 基底部の移動。このプロセスを明らかにするために、3 μm の穴 (フィルター) が複数開いているプレートを用いた“ペネトレーションアッセイ”と呼ばれる実験を行っていた。プレート上に上皮細胞を固定し菌体を混ぜた後、フィルターを透過した細胞の数を数えるというものらしい。この実

験から、以下の3つのことが明らかとなった。(i) IV型線毛は上皮細胞の接着に関係ない (ii) 上皮細胞のオクルジンの低下など上皮細胞の破壊にIV型線毛は関係 (iii) Δ exoS (エキソトキシンS)は、細胞上皮から基底部への侵入ができない。エキソトキシンSは上皮細胞の結合を壊す外毒素である。林さんはexoS/blaM (β -lactamase)を発現させた株を作製して、CCF2-AM標識された細胞表面の蛍光観察を行った。(CCF2-AMは基質が切断されていないと緑色で、切断後は青色を発する蛍光物質である。) WTでは緑色の青色の蛍光も検出することができたが、線毛繊維の収縮に関わるpilTとpilUを欠損させた株では緑色のみを検出していた。これは、IV型線毛の運動がIII型分泌装置におけるエキソトキシンの分泌に重要であるということを示すものであった。

S21-6 Yi-Wei Chang 先生 (California Institute of Technology)

『Architecture of type IVa and IVb pilus machines』

Changさんはクライオ電子顕微鏡を用いて、ミキソコッカスのIV型a線毛とコレラ菌のIV型b線毛のお話をされた。Changさんの実験方法は2つの手法を取っている。(i) タンパク質の欠損株と野生株の線毛の構造をクライオ電顕で比較を行い、タンパク質の局在を決定する。(ii) タンパク質にタグを導入することで、デンシティの変化からタンパク質の局在を決定する。というものである。タンパク質の欠損株を観察する利点は、1つのタンパク質がなくなることによって他のタンパク質が形成されるか否かも確認できることである。すなわち、線毛運動装置複合体がどのような順序をたどりながら形成されるかもわかるという点である。この方法は10個以上のタンパク質1つ1つを欠損させた株を作製して観察するといものであり、かなりの力技である。サイエンスの論文を見た時に非常に大変な実験だなと感じていたが、Chang先生は楽しそうにさらっと話していたのが印象的だった。

今回の発表まで、恥ずかしながらIV型b線毛の存在を知らなかった。IV型b線毛は、9個のタンパク質から構成されており、その内の5個がIV型a線毛と相溶性が高い。Chang先生は線毛の重合の有/無の線毛モーター基部を確認したところ、数ナノメートル高さ方向に構造変化していることを明らかにした。クライオ電顕によりIV型b線毛をIV型a線毛と比較したところ、以下の4つのことを明らかにした。(i) Stem構造に2ナノメートル太い (ii) Upperリングとmidリングがタイトに相互作用 (iii) 細胞質リングの欠損 (iv) b線毛では繊維の重合により外膜と内膜が2ナノメートル近づく一方で、a線毛では2ナノメートル離れる。また、IV型b線毛の全体構造はIV型a型線毛よりもII型分泌装置と非常に似ている。興味深いことに、IV型b線毛を構成するTcpQはIV型分泌装置のVirB7と似ている点である。これらの結果から、IV型b線毛はII型分泌装置と進化的に近く、IV型分泌装置の1部を取り入れながら独自に発展してきたものと、Chang博士は推測していた。