

報道関係者 各位

鳥取大学医学部
令和5年2月6日

感染症抑制や抗生剤開発に活用可能な バクテロイデーテス門細菌の運動機構を解明

日頃より、鳥取大学医学部の教育・研究活動へのご理解・ご協力をいただき、誠にありがとうございます。

このたび、本学部医学科・細菌学分野の柴田敏史講師らのグループが、バクテロイデーテス門に分類される細菌の移動メカニズムを解明しましたのでお知らせします。

つきましては、取材についてご理解とご協力を賜りますようお願い申し上げます。

【概要】

ヒトを含め生物は動くことでよりよい環境を見つけ、増殖し生存範囲を広げていきます。これは肉眼では見ることができないほど小さな細菌にも言えることであり、多くの病原性細菌は動き回ってヒト体内に侵入し組織に辿り着き感染します。

このたび、本学部医学科・細菌学分野の柴田敏史講師（研究開始当時：長崎大学歯薬学総合研究科特任研究員）らのグループが、今まで解明されていなかったバクテロイデーテス門に属する細菌独自の滑走運動機構を明らかにしました。バクテロイデーテス門には様々な特徴を持った細菌が属し、ヒト細菌叢内で善玉菌として働く種、組織の上を這い回る様に滑走運動しながら感染し病気を引き起こす種などもあります。この研究成果によってバクテロイデーテス門細菌の運動機構を標的にした感染抑制法や抗生剤の開発への応用が期待されます。また、小さな細菌の運動機構はヒト体内で薬などを運ぶ分子機械（ナノマシン）として利用できる可能性もあります。

本研究結果は、令和5年1月23日付で Communications Biology において発表されました。研究の詳細については別紙をご覧ください。

【研究について】	【取材について】
鳥取大学 医学部 医学科 感染制御学講座 細菌学分野 講師 柴田 敏史(しばた さとし) TEL:0859-38-7580 E-mail:sshibata@tottori-u.ac.jp	鳥取大学米子地区事務部総務課広報係 TEL:0859-38-7037 FAX:0859-38-7029 E-mail:me-kouhou@adm.tottori-u.ac.jp

**感染症抑制や抗生剤開発に活用可能な
バクテロイデーテス門細菌の運動機構を解明**
-バクテロイデーテス門細菌が這い回るためのユニークな運動機構-

<概要>

バクテロイデーテス門に分類される細菌の中にはヒト組織などに付着し、その表面を這い回るように滑走運動するものがあります。滑走運動は病原性バクテロイデーテス門細菌が感染する組織にたどり着くために重要ですが、細菌がスムーズに滑走する仕組みは解明されていませんでした。我々は菌体表面で滑走運動のキャタピラとして機能する SprB 分子の個々の動きとそれを反映した菌体の回転運動を分子 1 個の動きが観察できる全反射照明蛍光顕微鏡を用いて解析し、さらに電子顕微鏡によって細菌内部にキャタピラが動くためのレール状構造体を発見しその構成分子の特定にも成功しました。これらにより、SprB が菌体内のループ状のマルチレール構造に沿って動き、菌体を滑走させる機構を明らかにしました。この滑走運動機構は他の門に分類される細菌にはみられない独自のものです。本研究の成果は「Communications Biology」に 2023 年 1 月 23 日付けで発表されました。

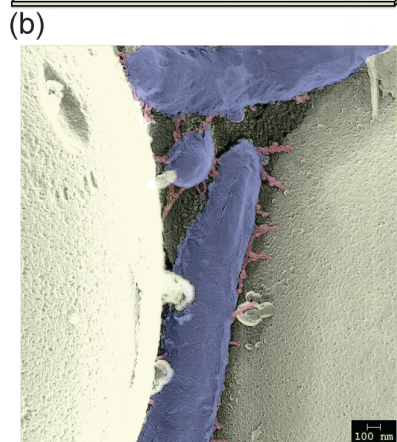
<研究の背景と経緯>

ヒトを含め生物は動くことでより良い環境を見つけ、増殖しその生存範囲を広げていきます。顕微鏡でようやく見ることでできる数マイクロメートル(1mm の千分の一)の大きさの細菌も様々な運動機構を駆使して運動します。また病原性細菌では細菌の運動が感染過程で重要な役割を果たします。バクテロイデーテス門には様々な特徴を持った細菌が属し、ヒト細菌叢に含まれ善玉菌として働く種、滑走運動能力を持ちヒトの歯周病や犬猫の咬み傷を発端とするカプノサイトファーガ感染症を引き起こす種もいます。また魚に感染する種は水産業に甚大な被害を与えます。細菌がどのような仕組みで運動しているか解明しそれを抑制できれば感染症制御につながり、また、細菌が持つ極小の運動機構を人工的に再現できれば将来分子機械(ナノマシン)として応用できる可能性もあります。

バクテロイデーテス門細菌は組織やガラスなど環境中の固体に付着し、その表面で行ったり来たり(スイッチバック)、立ち上がって向きを変える(フリッピング、ピボットイング)動きを組み合わせると約 1~5 μm /秒の速さで滑走運動を行います(図 1a)。一方、大腸菌などが得意とする液体中での遊泳運動はできません。この運動能力はバクテロイデーテス門に分類される細菌群が進化の過程でモノに付着し生き延びることを選択し、獲得した能力です(参考文献 1)。



図 1 バクテロイデーテス細菌の滑走運動様式とキャタピラとして機能する SprB。



(a) 固体表面を滑走する菌体は多様な動きを組み合わせ方向を変えながら移動する。
 (b) 菌体表面の繊維状 SprB(赤)。菌体表面を動く SprB が固体表面に付着すると、菌体(紫)を押し出し滑走する。電子顕微鏡写真を擬似的に着色した。

バクテロイデーテス門に属する *Flavobacterium johnsoniae*(ジョンソニエ菌)は滑走運動の分子メカニズムを解明するためのモデル細菌^{注釈1}としてよく研究され、Gld や Spr と名づけられたタンパク質群が滑走運動に関わることが明らかになっています。そして、それら滑走関連タンパク質がどのように機能し、滑走運動装置を形成するのか？どのように滑走運動装置が動き菌体が滑走するのか？滑走運動機構の解明に向けた研究が長年行われてきました。我々の研究グループもこれまで滑走運動関連タンパク質が菌体外に病原性タンパク質などを輸送するための IX 型分泌機構(T9SS)^{注釈2}を兼ねていることや(参考文献 2)、ジョンソニエ菌の菌体表面の付着性分子である 6,497 個のアミノ酸からなる付着性繊維状タンパク質 SprB が(図 1b, 参考文献 3)細菌の滑走運動の速度と同程度の速さでキャタピラのように菌体表面を旋回運動することで菌体を押し出し滑走する「らせんループ軌道」モデルを提案してきました(参考文献 4)。しかしながら、多数(数百分子～)の SprB が菌体上で滞りなく動き、それがスムーズで多様な滑走運動パターンを生み出すための菌体内の滑走運動装置の構造やメカニズムは不明でした。

<研究の内容>

今回の研究ではまず、菌体表面の SprB 分子の動きと、それによって推進され滑走する菌体の動きの解析を行いました。SprB 分子は菌体表面に多数あるため、その中で 1、2 個の分子を限定的に免疫蛍光染色^{注釈3}し長時間追跡する、菌体表面に露出し固定された膜タンパク質(Fjho_0697)を免疫蛍光染色しその動きを追跡し菌体の動きを解析するなどの工夫を凝らしました(図 2)。解析の結果、SprB はらせんループ軌道モデルと一致し菌体表面を左巻きらせんループに沿って動くことが確かめられました(動画 1)。さらに SprB の中には途中スピードが変化するもの、遅い速度で動く SprB を追い抜くもの、ループの途中で U ターンするものなどが観察されました。一方、菌体は SprB の左巻きらせんループ状の動きを反映し、進方向に向かって反時計回り

に回転しながら滑走運動していることが確かめられました(動画 2)。滑走する菌体の動きと SprB の動きの関係性をから、固体面に接着した一部の SprB のみが菌体を推進させていることも判明しました。これらのことから SprB が菌体表面で回転寿司の皿のような単純な周回運動をしていないことがわかりました。そこで、らせんループ軌道に複数のレーンが存在すれば複雑な SprB の動きが説明できると考え、そのような動きを生み出す滑走装置が菌体内に存在するのか？滑走装置の可視化を試みました。

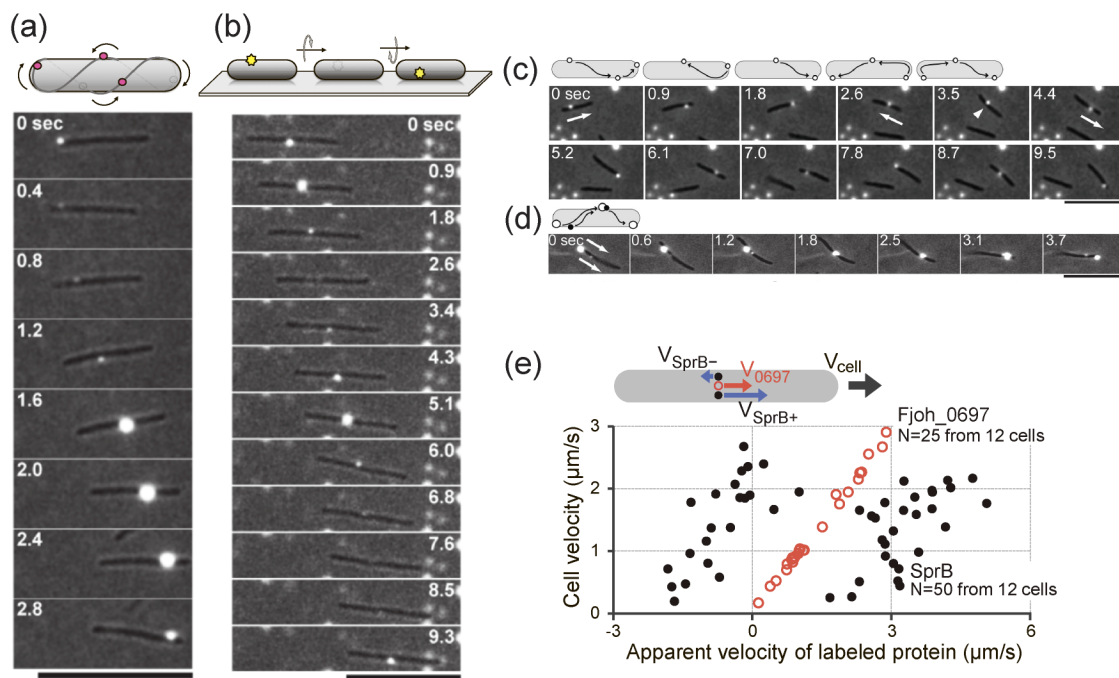


図 2 菌体表面の SprB と滑走する菌体の動き

(a) SprB は菌体表面上を左巻きらせんループに沿って循環している。(b) 菌体表面で固定された Fjho_0697 を蛍光標識して観察すると、菌体上で輝点の位置は変化しないまま、進方向に向かって反時計回りに回転することが観察できた。つまり菌体は回転しながら滑走していることが判明した。(c) 循環の途中で U ターンする SprB。2.6 秒後と 4.4 秒後で SprB の進行方向が変わる(矢印)。(d) SprB の追いつき。早く動く大きい SprB 輝点のが、ゆっくり動く小さい SprB 輝点を追いつく。全反射照明蛍光顕微鏡を用いると“らせん”の巻き方向や回転の向きが判別できる。(e) 滑走する菌体と SprB の動きの関係。SprB(黒丸)と Fjho_0697(赤丸)の見た目の移動速度(横軸)と菌体の滑走速度(縦軸)の関係性を示した。Fjho_0697 の見た目の速度は菌体の滑走速度と相関している。一方 SprB は動く速度にばらつきがあるためか、滑走速度との相関性が弱い(点が散在する)。ガラス面に付着し推進力を生み出している SprB は止まって見える。スケールバーの長さは 10 μm を示す。

浸透圧ショック法、急速凍結活断レプリカ法、クライオ電子線トモグラフィーなど様々な電子顕微鏡解析法を用いてジョンソニエを観察すると、予想したように菌体内にマルチレール構造の存在

が明らかになりました(図 3)。急速凍結活断レプリカ法で菌体を割って外膜の内側を見ると、複数レーンの存在とレーンの合流点のような構造を見ることもできました(図 3C)。また、菌体そのままを立体的に観察できるクライオ電子線トモグラフィーによりマルチレール構造が左巻きらせん構造であることも判明しました。加えて、マルチレール構造は Gld タンパク質欠損株で消失し、膜タンパク質 GldJ を認識する抗体が構造に反応することから GldJ タンパク質から構成された構造であることも明らかになりました。マルチレール構造はジョンソニエ菌だけでなく遠縁の海洋性バクテロイデーテス門細菌 *Saprospira grandis* (グランディス菌) にも存在するため、バクテロイデーテス門細菌の滑走 運動に関わる共通の構造であるといえます。

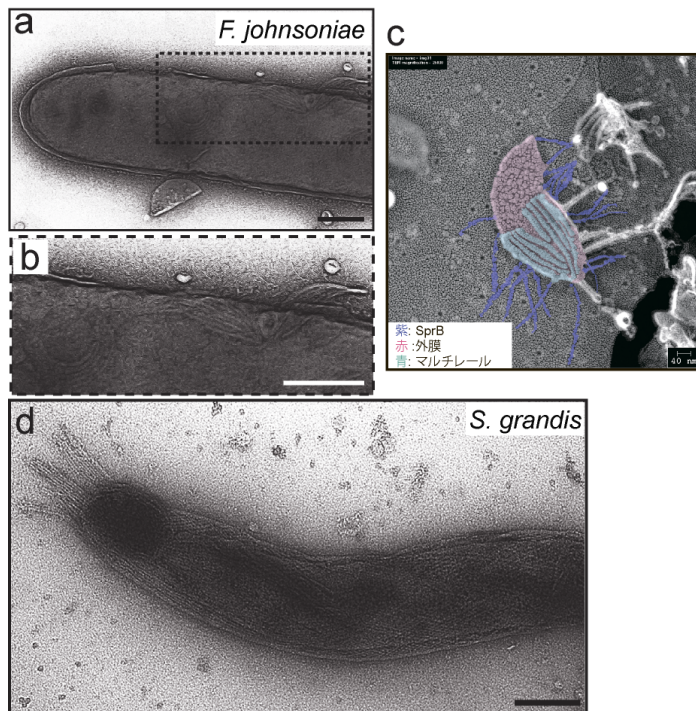


図 3 電子顕微鏡で可視化された滑走運動装置

(a)ジョンソニエ菌の膜内部見られたマルチレール構造。浸透圧ショック法により細胞質を菌体から放出させると、菌体が透けて見える。(b) a の拡大像。(c) 急速凍結活断レプリカ像。固体表面に付着した菌を急速凍結してナイフで割り、外膜の内側に存在するマルチレール構造と付随する SprB を観察した。マルチレール構造内のレーンの合流点を見ることができた。色は擬似色。(d) グランディス菌のマルチレール構造。ジョンソニエと違い菌体全面にマルチレール構造が見られる。a,b,d 内スケールバーは 200 nm を示す。

今回の研究で様々な速度で動く SprB を渋滞させることなく循環させるだけでなく、レーンチェンジなどで SprB の軌道を変化させることもできる巧妙な構造をしたマルチレール構造が菌体内部に存在することが明らかになりました。このような滑走装置によって推進された菌体は様々な動きを伴って滑走し、より遠くへ移動できると考えられます(図 4)。

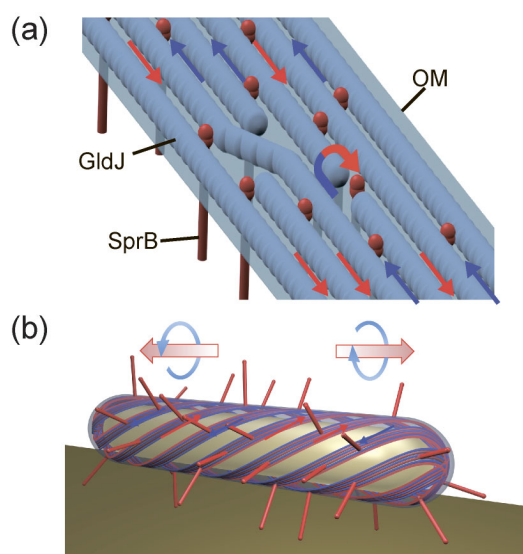


図 4 マルチレール構造のモデル

(a)外膜(OM)内側には GldJ から構成されるマルチレール構造があり、それに沿って SprB が動く。各レーンで SprB が進む向きは決まっているがレーンの切れ目で車線変更やUターンすることができると思われる。(b)菌体外膜内に左巻らせんループ状のマルチレール構造が複数配置されているモデルを提案する。

構造に沿って動く SprB が固体表面に付着すると菌体を回転させながら押し出し滑走運動する。双方向に進む SprB があるので前後どちらへも滑走することができる。

<参考文献>

- (1) Miyata, M. et al. Tree of motility – A proposed history of motility systems in the tree of life. *Genes to Cells* 25, 6–21 (2020). <https://doi.org/10.1111/gtc.12737>
- (2) Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa H, Shoji M, McBride MJ, Rhodes RG, Nakayama K: A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107:276–281 (2010). DOI: 10.1073/pnas.0912010107.
- (3) Katayama E, Tahara Y.O, Bertin C, Shibata S: Application of spherical substrate to observe bacterial motility machineries by Quick-Freeze-Replica Electron Microscopy. *Sci Rep* 9, 14765 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51283-w>
- (4) Nakane D, Sato K, Wada H, McBride MJ, Nakayama K: Helical flow of surface protein required for bacterial gliding motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110:11145–11150, (2013). <https://doi.org/10.1073/pnas.1219753110>

<注釈>

- (1)モデル細菌: 培養、遺伝子操作が容易にでき、研究材料の代表して使用される細菌。
- (2)IX 型分泌機構(T9SS): 細菌が病原性タンパク質などを分泌(放出)するための器官。分泌様式によって分類されており、9 番目に見つかったことから IX(ローマ数字 9)型と名付けられた。
- (3)免疫蛍光染色: 抗体と蛍光色素を使って、対象分子のみを染色し光らせて観察する方法。

<動画>

(1) https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs42003-023-04472-3/MediaObjects/42003_2023_4472_MOESM10_ESM.mov



(2) https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs42003-023-04472-3/MediaObjects/42003_2023_4472_MOESM9_ESM.mov



<研究支援>

本研究は日本学術振興会の新学術領域研究「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」JP24117006(平成 24~28 年度)及び、JSPS 科研費 JP25293375, JP17K17085 の支援を受けて行いました。

<論文情報>

論文名: Filamentous Structures in the Cell Envelope are Associated with the Bacteroidetes Gliding Machinery.

著者: Satoshi Shibata*, Yuhei O. Tahara, Eisaku Katayama, Akihiro Kawamoto, Takayuki Kato, Yongtao Zhu, Daisuke Nakane, Keiichi Namba, Makoto Miyata, Mark J. McBride, and Koji Nakayama*
(*:責任著者)

掲載誌: Communications Biology

DOI(書誌情報): 10.1038/s42003-023-04472-3

論文閲覧用 URL: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04472-3>