

研究成果報告書

研究テーマ (和文) AB		病原性大腸菌等の V 型分泌装置による毒性発現機構の解析			
研究テーマ (欧文) AZ		Analysis of the molecular mechanism of the type-V secretion system of EHEC.			
研究氏 代表 者	カタカナ CC	姓) シオタ	名) タクヤ	研究期間 B	2018年～ 2019年
	漢字 CB	塩田	拓也	報告年度 YR	2019年
	ローマ字 CZ	Shiota	Takuya	研究機関名	宮崎大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		宮崎大学テニュアトラック推進機室・准教授			
概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)					
<p>病原性大腸菌等のグラム陰性菌は、感染に必要な毒素の分泌を種々の分泌装置によって行う。V 型分泌装置に分類される毒素群は通常、タンパク質の N 末端側が毒素ドメイン、C 末端側が β バレル膜タンパク質ドメインから構成される。V 型分泌装置による分泌は、β バレルドメインが、外膜に存在する BAM 複合体と呼ばれる分子装置を介して外膜に組込まれ、その後、毒素ドメインが自身の β バレルの内孔を利用して外膜透過を行い、細胞外へと輸送される。V 型分泌装置の効果的な阻害剤をデザインするためには、これら各ステップの詳細な分子機構の理解が欠かせない。</p> <p>本研究では、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の V 型分泌装置、EspP をモデル基質として、分泌に関わる分子機構の解析を行った。まず、EspP の膜組込みを高い時間分解能で解析できる <i>in vitro</i> 再構築実験系を開発した。BAM 複合体には、機能に必須な BamA と BamD のふたつのサブユニットと、BamB、C、E の補助因子が存在する。我々の解析から EspP の外膜組込みには、必須因子のみが必要である事が明らかになった。また、ペプチドライブラリーを用いた阻害実験から、EspP の外膜組込みを阻害できる 17 アミノ酸残基のペプチドを 4 種類単離する事に成功した。阻害効果があったペプチド配列と、EspP のアミノ酸配列を比較する事により、EspP には BAM 複合体に認識される配列が 2ヶ所に存在する事が示唆された。</p> <p>β バレル型膜タンパク質は、グラム陰性菌だけでなく、ミトコンドリア外膜にも存在する。ミトコンドリアでは、β バレル型膜タンパク質は、TOM 複合体、small Tim タンパク質そして、SAM 複合体を介して外膜に組込まれる。今回、京都産業大学の遠藤斗志也教授らとの共同研究により、クライオ電子顕微鏡を用いて TOM 複合体の立体構造を 3.8Å の分解能で決定した。さらに、相互作用解析から TOM 複合体が small Tim タンパク質が直接相互作用しており、β バレル型膜タンパク質が効率的に輸送できうることを明らかにした。</p>					
キーワード FA	V 型分泌装置	β バレル	BAM 複合体	TOM 複合体	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Structure of mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths.							
	著者名 ^{GA}	Araiso, Y., Shiota, T., Endo, T. 他	雑誌名 ^{GC}	Nature					
	ページ ^{GF}	395~401	発行年 ^{GE}	2	0	1	9	巻号 ^{GD}	575
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

Gram-negative bacteria secrete toxin proteins using molecular machines termed secretion systems. Proteins belonging in the Type-V secretion system are composed of a N-terminus passenger domain, the "toxin domain", and a C-terminus beta-barrel domain. The type-V secretion system secretes the passenger domain through a multi-step process. First, the beta-barrel domain is assembled into the outer membrane by the BAM complex. Second, the passenger domain traverses the outer membrane via the interior of the beta-barrel domain and is then secreted. Understanding the molecular mechanism of each step of the type-V secretion systems is necessary to design a drug targeting type-V secretion systems.

We optimized conditions to employ EspP, the type-V secretion system of EHEC, as a substrate protein for our in vitro assembly assay. The BAM complex is composed of two essential subunits, BamA and BamD and accessory proteins, BamB, C, E. Our in vitro assembly assay revealed that the accessory proteins of the BAM complex are not necessary for EspP assembly. We identified four different inhibitor peptides of EspP assembly from our systematically designed peptide library. A sequence comparison between inhibitor peptides and EspP implies that EspP has several signals recognized by the BAM complex.

Beta-barrel membrane proteins exist not only bacterial outer membrane but the mitochondrial outer membrane. At the mitochondria, beta-barrel membrane proteins are assembled by the TOM complex, small Tim proteins, and SAM complex. We reported the structure of the yeast TOM complex at 3.8Å resolution with Toshi Endo's lab. Our crosslinking study revealed that the TOM complex interacts with small Tim proteins directly, enabling the transfer of the substrate protein efficiently