

Thermus thermophilus の線毛伸縮に関わるとされる *pilF*, *pilT1*, *pilT2* 遺伝子の機能解析
Functional analysis of the *pilF*, *pilT1* and *pilT2* genes for pilus extension and retraction in *Thermus thermophilus*

常泉賢司, 玉腰雅忠, 山岸明彦

Kenji Tsuneizumi, tamakoshi masatada, yamagishi akihiko

(東京薬科大学)

(Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci.)

e-mail: s048053@educ.ls.toyaku.ac.jp

(背景、目的)

4 型線毛(Tfp)はグラム陰性細菌の細胞表面にある繊維状の構造物であり、病原性細菌の宿主への接着、固相表面上での移動現象(gliding または twitching)、DNA の取り込みによる自然形質転換、ファージ感染、自己凝集、バイオフィルムの形成などに関わっている。線毛関連現象には Tfp の伸縮が重要であるがその分子機構は不明な点が多い。*Pseudomonas* 属や *Neisseria* 属など他のモデル生物種の線毛収縮に関わるとされる *pilT* 遺伝子の破壊株は野生株に比べて線毛が過剰に見られるようになるが、twitching が見られなくなり、自然形質転換能がなくなる事が報告されている。我々は線毛形成に必須の *pilQ* 遺伝子（線毛の外膜貫通チャネルを形成するタンパク質、セクレチンをコードする）を人為的に破壊し、その表現型を解析することで *T. thermophilus* HB27 と HB8 が Tfp 依存的に twitching motility、自然形質転換、ファージ感染を起こす事を見いだしている。HB27 と HB8 ではファージの特異性に違いが見られ、HB8 ではさらにバイオフィルム形成や自己凝集が見られる。全ゲノム解析結果の比較から HB8 と HB27 の細胞表層の構造が異なるという報告があり、細胞表層構造の違いが線毛関連現象の違いを反映していると考えられる。*T. thermophilus* のゲノム内には線毛の収縮に関わるとされる遺伝子として *pilT1* 遺伝子 (HB27 locus_tag=TTC1621, HB8 locus_tag=TTHA0364) と *pilT2* 遺伝子 (HB27 locus_tag=TTC1415, HB8 locus_tag=TTHA1774) がある。*pilT1* 遺伝子は *pilF* 遺伝子のすぐ下流に位置し、同一オペロン内にあるが、*pilT2* 遺伝子はそれらとは離れた場所に存在する。これら 3 つの遺伝子産物はヌクレオチド結合ドメインを持ち、ATP の駆動力を用いて線毛の伸縮に関わると想定される。本研究では *T. thermophilus* HB8 と HB27 の *pilF*, *pilT1*, *pilT2* 遺伝子破壊株および *pilT1*, *pilT2* 両遺伝子の破壊株の表現型を野生株と比較し、これらの遺伝子の機能解析をする事を目的とする。

(実験結果)

野生株 HB27 では電子顕微鏡観察において 1 種類の線毛が見られた。一方野生株 HB8 には太さの異なる 2 種類の線毛が見られた。

以下線毛の種類及びその量、twitching 能、ファージ感染、バイオフィルム形成、自己凝集、自然形質転換能を野生株と変異株で比較した結果を示す。HB27 の *pilF* 遺伝子の破壊株では線毛構造は見られなかった。一方 HB8 の *pilF* 遺伝子の破壊株では細い線毛のみ見られた。またどちらの *pilF* 遺伝子の破壊株においても野生株で見られる線毛関連現象はすべて見られ

なかった。HB27, HB8 の *pilT1* 遺伝子の破壊株と *pilT1*, *pilT2* 両遺伝子の破壊株は野生株と比較して線毛の種類や量に違いは見られなかったが、twitching が見られなくなり、ファージ感染能が低下し、バイオフィーム形成の増加が見られた。自己凝集については野生株と変わらなかった。形質転換能は他の生物種と違って完全になくなるという事はなかった。HB27, HB8 の *pilT2* 遺伝子の破壊株は野生株と比較して線毛の種類や量に違いは見られなかったが、twitching 能の低下、バイオフィーム形成の増加が見られた。その他の表現型は野生株と比較して変わらなかった。

(考察)

T. thermophilus の遺伝子破壊株の解析から自然形質転換には *pilF* 遺伝子は必須だが *pilT1* 遺伝子、*pilT2* 遺伝子は必須でない事が考えられる。これまで調べられた他の生物種の自然形質転換には *pilT* 遺伝子が必須とされているが、*T. thermophilus* では形質転換能が消失しないことから、これらの生物種とは異なる形質転換のメカニズムが存在すると思われる。

バイオフィーム形成において *pilF* 遺伝子は必須であると考えられる。*pilT1* 遺伝子、*pilT2* 遺伝子の欠損はバイオフィーム形成を強化する可能性がある。これまで HB8 が持つラージプラスミドがバイオフィーム形成に必須とされていたが、今回の結果からゲノム上の遺伝子もバイオフィーム形成に関与している事が示された。

固相表面での移動現象において *pilF* 遺伝子、*pilT1* 遺伝子は必須であり、*pilT2* 遺伝子は補助的な役割をしていると考えられる。またファージ感染では *pilF* 遺伝子は必須であり、*pilT1* 遺伝子は補助的な働きをし、*pilT2* 遺伝子は必須でないと考えられる。

他のグループにより PilF タンパク質が線毛の収縮に関わると思わせる結果が報告されている。しかしそのアミノ酸配列を比較すると、*pilT1* 遺伝子や *pilT2* 遺伝子よりも N 末が長く、C 末にテトラシステインモチーフという配列を持つこと（この特徴は他の生物種において線毛の伸張に関わるとされる PilB タンパク質と同じである）、HB27 の *pilF* 遺伝子破壊株では線毛が見られず、HB8 の *pilF* 遺伝子破壊株では細い線毛のみ見られること、HB27, HB8 の両方の *pilF* 遺伝子破壊株で線毛関連現象が見られなくなることから、以前の報告とは違って *pilF* 遺伝子は線毛の伸張に関わっていると考えられる。

HB8 の *pilF* 遺伝子破壊株では線毛関連現象は見られず、また細い線毛のみ観察されたことから HB8 の線毛関連現象に細い線毛は必須ではないと考えられる。