

細菌Ⅲ型分泌機構の解明を目指したエフェクター分泌の定量評価

○扇田 隆司<sup>1</sup>, 上川 翼<sup>1</sup>, 粉山 京子<sup>1</sup>, 林 直樹<sup>1</sup>, 後藤 直正<sup>1</sup>, 小暮 健太郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京都薬大)

**[目的]** 緑膿菌は注射器型のⅢ型分泌装置(T3SA)を宿主細胞膜に挿入して細菌感染に寄与するエフェクタータンパク質を宿主細胞に注入するが、T3SA内でのエフェクター輸送機構は不明である。この機構の解明はエフェクター分泌阻害を機序とする細菌感染抑制薬開発への展開が期待できる。以前我々は、T3SAがプロトン駆動力依存的に回転しており、これがエフェクター分泌に関与することを見出した[Ohgita T 他 *FASEB J*(2013)]。また、T3SA ニードル内壁には疎水アミノ酸が螺旋状に配列しており、螺旋の欠損は分泌を著しく阻害すると報告されている。そこで我々は「T3SAはニードル内疎水螺旋と逆回転することでエフェクターを輸送するのではないか」と考えた。これに基づけばエフェクター分泌速度とT3SA回転速度は比例する。この検証のため、本研究ではエフェクター分泌速度の定量を試みた。

**[方法]** 本研究では緑膿菌 PAO1 株を用いてエフェクター(ExoT)の分泌を評価した。ExoTを定量するため、蛍光試薬 FIAsh が特異的に結合するテトラシステインタグ(TC)を ExoT に修飾した。ExoT-TC 含有上清に FIAsh を添加して蛍光強度を測定することで、分泌 ExoT-TC 量の定量を試みた。

**[結果・考察]** FIAsh 蛍光の測定では TC タグを nM オーダーで定量できた。しかし、PAO1 を 3 時間培養後の上清中 ExoT-TC 量を本方法で評価したところ ExoT-TC は検出できなかった。また、ExoT 分泌の時間変化をウエスタンブロット法で評価したが、分泌量は 30-60 分で飽和に達し、以降の分泌量は増加しなかった。以上より、ExoT の飽和分泌量は 1 nM 以下であり、ExoT 分泌の経時的追跡は、より高感度な検出系を必要とすることがわかった。現在、エピトープタグ(3xFLAG)を ExoT に修飾し、ELISA 法にて分泌 ExoT 量の定量を試みており、これについても報告する。