

「小胞状構造体」の形成に関わる細菌細胞膜のダイナミクス

●村田幸作 ◆橋本 渉

京都大学大学院農学研究科

〈研究の目的と進め方〉

細胞表層は、細胞と外界との境界面であり、細胞形態の維持、物質の輸送(取り込みと排出)、及び情報の受容と伝達などの機能を果たしている。特に、細胞膜は、細胞間結合タンパク質、有機物輸送タンパク質、イオン輸送チャネル、シグナル物質受容体タンパク質を含んでおり、細胞表層の中核として重要である。原核細胞(細菌)の細胞表層は、グラム陽性と陰性とで異なるが、細胞膜(細胞質(内)膜)を含んでいる点は共通している。細菌細胞表層に関して、枯草菌(*Bacillus subtilis*)を始めとするグラム陽性細菌は、細胞膜が細胞質中に深く陥入して形成される小胞状構造体「メソソーム」を持つことが知られている。「メソソーム」は、細胞膜の動的構造・流動性及び細胞表層機能を理解する上で極めて重要であり、真核細胞におけるエンドサイトーシスの原始的モデルとして捉えることができる。本研究では、グラム陰性細菌(*Sphingomonas* sp. A1:A1株)において、細胞膜の陥入により細胞表層に形成される孔(「体腔」)が、細胞外の高分子物質を濃縮すること、及び「体腔」と連動する細胞膜局在性の「ABCトランスポーター」が高分子物質を細胞内に輸送することを明らかにしている(新概念「超チャネル」=「体腔」+「ABCトランスポーター」)(図1,2)。本研究では、A1株、及びゲノム解読枯草菌について、プロテオーム解析により「体腔」と「メソソーム」形成関連遺伝子群を特定し、両菌の「小胞状構造体」形成に関わる遺伝子産物の機能・構造解析により、細胞膜流動に関わる遺伝子ネットワーク、及び枯草菌「メソソーム」の生理機能を明らかにする。

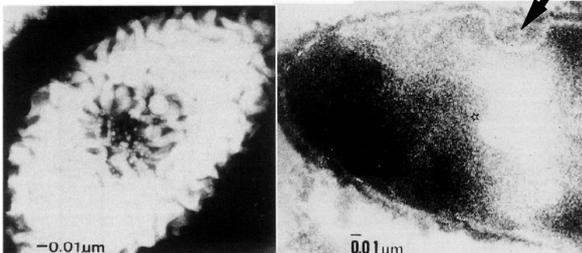


図1 A1株における「体腔」形成と細胞膜流動

〈研究開始時の研究計画〉

枯草菌を種々の条件下(培地成分、温度、pH、通気量などの影響)で培養し、「メソソーム」を形成する培養条件を設定する。「メソソーム」の形成は、培養菌体集菌・凍結後超薄切片を調製し、透過型電子顕微鏡観察により確認する。「メソソーム」形成及び非形成条件下での枯草菌培養菌体について、細胞質と細胞膜を含む細胞壁画分に分ける。「メソソーム」形成及び非形成菌の各画分のタンパク質を2次元電気泳動により分離後、電気泳動像をイメージアナライザーで解析し、データベース化する。

A1株は、アルギン酸存在下で、その細胞表層に「体腔」を形成する。「体腔」形成(アルギン酸：有)及び非形成(アルギン酸：無)条件下でのA1株の培養菌体について、細胞質、ペリプラズム、細胞(内)膜、外膜画分に分ける。「体腔」形成及び非形成菌の各画分のタンパク質を2次元電気泳動により分離後、電気泳動像をイメージアナライザーで解析し、データベース化する。

構築したデータベースを用いて、「メソソーム」及び「体腔」形成細菌に特異的に発現しているタンパク質群を分離し、N末端アミノ酸配列、及びペプチド分解後質量分析に供する。得られたアミノ酸配列、及びペプチド分子量情報を枯草菌及びA1株ゲノムデータベースに各々照合し、その遺伝子群を検索する。定法の組換えDNA実験に従い、枯草菌及びA1株の各遺伝子破壊株と相補株を作製し、それらの「メソソーム」及び「体腔」形成能を解析することにより、「メソソーム」及び「体腔」形成タンパク質とその遺伝子群を同定する。さらに、各遺伝子破壊株を用いて、「メソソーム」及び「体腔」形成遺伝子群の発現レベ

ルをノーザン解析により調べ、遺伝情報の流れ(シグナル伝達経路)を確定する。これにより、「メソソーム」及び「体腔」形成に必要な細胞膜流動ダイナミクスに関わる遺伝子ネットワークを解明する。また、「メソソーム」形成能欠損株と野生株との比較生化学的実験を行い、「メソソーム」の生理機能を解析する。

〈研究期間の成果〉

1.プロテオーム解析(A1株)

2次元電気泳動によるディファレンシャル解析により、8種類のA1株細胞表層タンパク質[p1-p4,TonB-依存外膜トランスポーター-p5-p6,フラジェリン-p7,機能不明リポタンパク質-p8,顆粒結合タンパク質(ホモロジー解析による推定)]が、アルギン酸存在下で顕著に発現していた(1)。これらのタンパク質における体腔の形成と機能との相関を明らかにするために、各遺伝子破壊株を作製し、そのアルギン酸培地での増殖能を調べた。p5及びp7を除いて、各遺伝子破壊株はアルギン酸培地で有意な生育遅延を示した。しかし、生育遅延を示した遺伝子破壊株も生育が阻害されることはなく、培養時間が経過するにつれ、その生育は野生株とほぼ同じようになった。このことからアルギン酸取り込みには、各遺伝子がコードするタンパク質と他のタンパク質が協調的に機能していると考えられた(1)。

2.フラジェリンホモログ

一般に、フラジェリンは、細胞外で鞭毛のフィラメントを形成し、プロペラ(羽とシャフト)として機能する。しかし、A1株は鞭毛を形成しない。また、p5とp6が互いに相同性を示し構造的に微量発現していること、及びp5とp6の二重遺伝子破壊株が育種できないことから、A1株のフラジェリンホモログは互いに機能を相補可能であるが、生育に重要なタンパク質であることが示唆された(1,3)。

p6遺伝子破壊株は、野生株と比較して、細胞表層において、不鮮明な髪構造と不完全な「体腔」を示した。このことから、p6は、細胞表層において、髪構造の構築と「体腔」の形成に関与していることが示唆された。p5は、免疫電顕により細胞表層に点在することが示された。p5が細胞表層に点在することから、フラジェリンホモログのアルギン酸結合能を表面プラズモン共鳴法により解析した。p5はアルギン酸と結合性を示し、そのアルギン酸との解離定数は $K_d \sim 10^{-9}M$ と算出されたため、p5とアルギン酸との結合が強固であることが分かった。nMレベルの解離定数を示すタンパク質には、シグナル伝達に関与する細胞表層レセプターが知られている。従って、アルギン酸と高い結合性($K_d=10^{-9}M$)を示すA1株の細胞表層フラジェリンホモログは、「超チャネル」(「体腔」、「ABCトランスポーター」、及び代謝酵素)の発現を制御するシグナル伝達に関わるレセプターとして機能する可能性が考えられた(1)。

3.リポタンパク質とアルギン酸結合タンパク質

グラム陰性のリポタンパク質は、N末端にある脂肪酸残基で外膜と相互作用し、C末端でペプチドグリカン層と相互作用している。そのため、リポタンパク質と相同性を示すp7は、「体腔」とペプチドグリカン層を架橋するタンパク質として機能していると思定された(1)。

p8は、グラム陰性細菌の顆粒結合タンパク質と相同性を示す。p8は、p5と同様、アルギン酸と結合するが、同時に解離する性質も認められた。その解離定数(K_d)は、 $\sim 10^{-7}M$ と決定された。また、p8は、アルギン酸カルシウム顆粒にも結合性を示し、p8分子内に認められる疎水性度の高い領域が、顆粒結合に関与している可能性が示唆された(4)。p8がペリプラズム局在性アルギン酸結合タンパク質(AlgQ1,AlgQ2)と同等のアルギン酸解離定数を示すため(5,6)、p8が細胞外のアルギン酸を体腔に濃縮する役割を担っていると考えられた。

4.TonB-依存トランスポーター

p1-p4は、互いに一次構造が類似しており、グラム陰性細菌の外膜に局在するTonB-外膜依存トランスポーターと相同性を示した。ホモロジーモデリングにより、p3はβバレル構造から成る円いトンネル状の構造をとっていることが明らかになったため、p1、p2及びp4も同様の構

造を持つことが示唆された。グラム陰性細菌のTonB-依存外膜トランスポーターは、細胞内膜タンパク質複合体(TonB-ExbB-ExbD)の産出するエネルギーを用いて、基質を細胞外からペリプラズムに取り込む。これまでに、鉄イオン(Fe³⁺)-シデロフォア、抗生物質、或いはビタミンB12を基質とするTonB-依存外膜トランスポーターの存在が明らかにされている。アルギン酸は鉄イオンを強力にキレートするため、p1-p4がアルギン酸をシデロフォアとして鉄イオンを取り込むトランスポーターである可能性が示された(1)。

5. 「体腔」の分子移植

ダイオキシン分解菌(*Sphingomonas wittichii* RW1:RW1株)に、A1株の「体腔」と連動するABCトランスポーターシステム遺伝子を導入することによって、構造的に「体腔」を形成し、野生株よりも高効率でダイオキシンを取り込み・分解する「スーパー細菌」を創成することができた(7)。

まとめ

上記の知見に基づいて、A1株の細胞表層における新規な構造と機能を提唱した(図2)。細胞表層に構造的に発現しているフラジェリンホモログはレセプターとして機能し、細胞外のアルギン酸を認識・結合すると、「超チャネル」の形成を促すためのシグナルを発信する。シグナル伝達・応答が行われると、p1-p8が細胞表層に、アルギン酸結合タンパク質(AlgQ1, AlgQ2)がペリプラズムに、ABCトランスポーター(AlgM1-AlgM2/AlgS-AlgS)が細胞内膜に、アルギン酸リアーゼ(A1-I, A1-II, A1-III, A1-IV)が細胞質に各々誘導発現する(3,8,9)。フラジェリンホモログ(p5とp6)は体腔形成を促し、リボタンパク質(p7)が体腔構造の安定化に寄与する。アルギン酸結合タンパク質(p8)が細胞外のアルギン酸を体腔に濃縮した後、TonB-依存外膜トランスポーター(p1-p4)がアルギン酸をペリプラズムに輸送する。

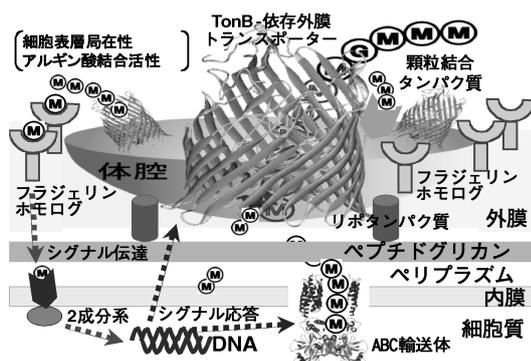


図2 A1株細胞表層モデル

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究は、細菌細胞膜に焦点を当て、その流動による「小胞状構造体」の形成機構を、ゲノム解読細菌を用いて明らかにすることを特色とする。グラム陽性細菌の「メソソーム」の形成機構や生理機能は不明である。また、グラム陰性のA1株は、微生物学史上初めて見出された「体腔」形成細菌であり、「体腔」を介して高分子物質を細胞外から細胞質に直接取り込む。また、A1株の鞭毛非依存フラジェリンの局在性と機能に関する新たな知見は、原始運動器官である鞭毛の起源と進化を明らかにする手掛かりとなる。細胞膜の流動に関して、真核細胞で特定物質を取り込むクラスリン依存性エンドサイトーシスが解析されているが、不特定物質を対象とするピノサイトーシスの形成機構は明らかにされていない。最近、ブドウ球菌や乳酸菌を抗菌性薬剤で処理すると「メソソーム」が形成されることが報告されているが、その形成機構や生理機能に関する研究は、国内外を問わず殆どなされていない。従って、細菌細胞膜の流動による「小胞状構造体」の形成機構を解析した本研究は、原核から真核細胞に至る生物細胞の全般的な膜(細胞膜のみならず細胞内小器官膜)の流動性、及び「小胞状構造体」の形成機構と生理機能の理解に繋がる。

「体腔」の他の細菌への分子移植により、従来の代謝工学を凌駕する大規模細胞改変技術(分子移植工学)を確立した。これにより、微生物を用いたバイオレメディエーションの実用的な展開に途を拓き、その成果は多数の新聞・テレビなどのマスメディアに取り上げられた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

枯草菌「メソソーム」の形成に関して、種々培養条件を検討し、その形成条件を探索しているが、条件設定には至っていない。現在、引

き続き条件設定を行っている。「メソソーム」の生理機能が不明であるため、その形成誘導条件の設定を暗中模索の状態で行わなければならない現状である。

〈今後の課題〉

プロテオーム解析だけでは、微量発現タンパク質遺伝子を含めた網羅的解析は困難であるため、今後、A1株を始めとするゲノム解読細菌(枯草菌、ブドウ球菌など)について、トランスクリプトーム(網羅的遺伝子発現)とプロテオーム(局在性・生体分子間相互作用)解析に基づいた「小胞状構造体」形成に関わる遺伝子群の特定、及びそれらの翻訳産物の機能・構造解析による細菌細胞膜流動に関わる情報ネットワークと「小胞状構造体」の形成機構並びに生理機能の解明が必要である。また、そのネットワークについて比較ゲノム解析を行い、細胞膜流動の普遍性と進化について考察することも興味深い。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
 1. 0601271542 Hashimoto, W., He, J., Wada, Y., Nankai, H., Mikami, B., and Murata, K., Proteomics-based identification of outer-membrane proteins responsible for import of macromolecules in *Sphingomonas* sp. A1: alginate-binding flagellin on the cell surface. *Biochemistry*, 44(42), 13783-13794 (2005).
 2. 0503270854 Hashimoto, W., Yamasaki, M., Itoh, T., Momma, K., Mikami, B., and Murata, K., Super-channel in bacteria: structural and functional aspects of a novel biosystem for the import and depolymerization of macromolecules. *J. Biosci. Bioeng.*, 98(6), 399-413 (2004).
 3. 0601271602 Hashimoto, W., Momma, K., Maruyama, Y., Yamasaki, M., Mikami, B., and Murata, K., Structure and function of bacterial super-biosystem responsible for import and depolymerization of macromolecules. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69(4), 673-692 (2005).
 4. 0503270848 He, J., Nankai, H., Hashimoto, W., and Murata, K., Molecular identification and characterization of an alginate-binding protein on the cell surface of *Sphingomonas* sp. A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322(3), 712-717 (2004).
 5. 0403271651 Mishima, Y., Momma, K., Hashimoto, W., Mikami, B., and Murata, K., Crystal structure of AlgQ2, a macromolecule (alginate)-binding protein of *Sphingomonas* sp. A1, complexed with an alginate tetrasaccharide at 1.6-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 278(8), 6552-6559 (2003).
 6. 0503270943 Momma, K., Mishima, Y., Hashimoto, W., Mikami, B., and Murata, K., Direct evidence for *Sphingomonas* sp. A1 periplasmic proteins as macromolecule-binding proteins associated with the ABC transporter: molecular insights into alginate transport in the periplasm. *Biochemistry*, 44(13), 5053-5064 (2005).
 7. in press Aso, Y., Miyamoto, Y., Harada, K.M., Momma, K., Kawai, S., Hashimoto, W., Mikami, B., and Murata, K., Engineered membrane superchannel improves bioremediation potential of dioxin-degrading bacteria. *Nat. Biotechnol.*, (2006).
 8. 0503270842 Miyake, O., Ochiai, A., Hashimoto, W., and Murata, K., Origin and diversity of alginate lyases of families PL-5 and -7 in *Sphingomonas* sp. strain A1. *J. Bacteriol.*, 186(9), 2891-2896 (2004).
 9. 0503270915 Hashimoto, W., Miyake, O., Ochiai, A., and Murata, K., Molecular identification of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyase (A1-IV) as a member of novel polysaccharide lyase family 15 and implications in alginate lyase evolution. *J. Biosci. Bioeng.*, 99(1), 48-54 (2005).
- 2) データベース 該当無し
- 3) 特許 該当無し
- 4) その他 該当無し