

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20860

研究課題名(和文) 藍藻及び原始植物葉緑体の表層膜安定化機構の解明とその進化的関連性の解析

研究課題名(英文) Studies on outer membrane stability and permeability of primitive chloroplasts and its evolutionary relationships between Gram-negative bacteria

研究代表者

児島 征司 (KOJIMA, Seiji)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：20745111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体の起源は原始真核細胞に細胞内共生した藍藻(酸素発生型光合成を行うグラム陰性細菌)である。葉緑体へと変換する過程で藍藻の細胞表層機能の改変は不可避であるが、その具体的過程は全く不明であった。本研究では、最も原始的な植物の一つとされる灰色藻の葉緑体の外膜に多量に存在する新奇外膜チャンネル蛋白質 CppS/F を発見した。アミノ酸配列解析から、これらは藍藻とは異なる細菌系統 Planctomycetes 門に由来することが示唆された。藍藻の外膜蛋白質は植物系統内に保存されていなかった。本成果は、藍藻が葉緑体へ変換する過程で藍藻の主要外膜蛋白質が消失し、CppS/F と入れ替わったことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：During the course of evolution from an endosymbiotic cyanobacterium to the chloroplast, the function of the outer membrane changed from permeability barrier to an interface that connects two metabolic entities, the chloroplast and host cell. In order to know how this functional alteration was possible, I studied on the outer membrane of primitive chloroplast (chloroplast of *Cyanophora paradoxa*). I discovered two dominant proteins from the outer membrane of *C. paradoxa* chloroplast, and named them CppS and CppF. They function as non-specific diffusion channel. Surprisingly, their amino acid sequences showed no evolutionary linkage to cyanobacteria. My findings suggest that *C. paradoxa* chloroplast adopted the non-cyanobacterial proteins as its main outer membrane components, providing a diffusion route for various small substances across the outer membrane.

研究分野：細菌および葉緑体の膜生化学

キーワード：細胞壁ペプチドグリカン チャンネル 外膜 グラム陰性細菌 葉緑体 灰色藻 藍藻

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は藍藻（酸素発生型光合成を行うグラム陰性細菌）の原始真核細胞への細胞内共生により生じた。自然環境中で棲息する藍藻が細胞小器官（葉緑体）へと変化する過程には、現在の我々に未だ知り得ない自然の叢智が詰め込まれている。本過程には、(i) 宿主細胞と同調して分裂増殖すること、(ii) 宿主細胞との物質的やり取りを可能にするための表層膜の機能変換、(iii) 藍藻 DNA の宿主細胞核への大規模移行、の三つが要求される。(i)、(iii) に関しては研究が進んでいるが、(ii) に関する知見は乏しい。

藍藻を含むグラム陰性細菌の細胞表層は内膜、細胞壁ペプチドグリカン (PG)、外膜で構成される。外膜は生育阻害物質の細胞内への流入および細胞内成分の細胞外への漏出を阻止する透過障壁としての機能を持つ。一方、外膜の安定的維持には細胞あたり 10^6 分子程度の外膜 - PG 間接着蛋白質を必要とする。従って藍藻が葉緑体へと変換する過程では、外膜の安定性を保持しつつ、宿主との物質的やり取りを可能にするための外膜機能の変換が必要である (図 1)。しかしながら、この変換過程に関与する因子は研究開始当初には全く不明であった。



図 1. 藍藻から原始葉緑体への変換過程で要求される外膜機能変換。外膜の安定性を保持しつつ、宿主との物質的やり取りを可能にするための外膜機能の変換が必要である。

2. 研究の目的

藍藻および葉緑体の最外層を形成する外膜に焦点を当て、葉緑体への変換過程で外膜にどのような変化があったかを解明することを目的とした。藍藻モデル種 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis*) 及び、藍藻と類似する表層構造を持つ、最も原始的な葉緑体とされる灰色藻 *Cyanophora paradoxa* の葉緑体 (藍藻由来の PG を有し、cyanelle と呼ばれる) を研究対象とした。本研究では、*Synechocystis* 及び cyanelle における外膜 - PG 間接着蛋白質の単離・同定し外膜安定化機構を解明すること、及び外膜透過性に関与する蛋白質の同定・性質解明を行って外膜物質透過機構を解明することを具体的目標とした。これにより、藍藻と原始的葉緑体の外膜維持機構及び物質透過機構が比較できるようになり、藍藻 - 葉緑体への変換過程における外膜機能変換の詳細な理解が得られる。

3. 研究の方法

(1) Cyanelle の外膜 - PG 間接着蛋白質の探索・単離精製

Cyanelle を *C. paradoxa* から単離し、超音波破碎した後、超遠心 ($100,000 \times g$ 、1 時間、 $4^\circ C$) で粗膜画分を得た。これを不連続シヨ糖密度勾配遠心 (60%, 55%, 50%, 45%, 40% シヨ糖、SW41Ti ローターで 30,000 rpm、18 時間、室温) に供して外膜 - PG 画分を密度 1.22 g/cm^3 の位置から分取した。これを 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 存在下で $37^\circ C$ 、15 分間インキュベートして、超遠心 ($100,000 \times g$ 、1 時間、室温) により不溶性画分 (PG および外膜 - PG 間接着蛋白質) を得た。CppS/F の分離精製には、まず 0.1% β -mercaptoethanol を含む 2% LDS 中で $37^\circ C$ 、15 分間インキュベートすることにより CppS/F を可溶化した。さらに、システイン残基のランダムな再酸化を防ぐために 0.5 M iodoacetamide 中でインキュベートしてチオール基をアルキル化した。その後、ゲル濾過 HPLC により CppS/F を分離した。HPLC 条件: Eluent, 0.1% lithium dodecyl sulfate (LDS) + 0.4 M LiCl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5); flow rate, 0.5 ml/min; column, Superdex 200 increase 10/300 GL。

(2) CppS/F 再構成リポソームを用いたチャネル活性測定

解析対象の試料として、PG 結合状態、可溶化後、分離精製後の CppS/F を使用した。これらを phosphatidyl choline と dicetylphosphate で構成したリポソームに再構成し、チャネル活性を測定した。方法は Nikaido et al. (1991, *J. Biol. Chem.* 266:770) に従った。

(3) CppS/F の遺伝子同定と配列解析

質量分析法と N 末端および内部アミノ酸配列分析を併用して CppS/F 遺伝子を同定した。まず、CppS/F を CnBr 処理により断片化し、SDS-PAGE でペプチド断片を分離した後、内部アミノ酸配列をプロテインシーケンサーを用いて決定した。EST データベースを検索し、決定したアミノ酸配列をコードする mRNA 配列 (断片) を得た。本断片配列の 5' 側および 3' 側配列を、Rapid amplification of cDNA end (RACE) 法により決定し、全長 cDNA 配列を決定した。また、CppS/F を SDS-PAGE 後、ゲル内 trypsin 消化に供し、ペプチド断片を溶出後、TOF-MS 解析によりペプチド質量スペクトルを決定した。本スペクトルは cDNA 配列に対応するアミノ酸配列から計算される質量スペクトルと一致することを確認した。

(4) *Synechocystis* の外膜 - PG 間接着蛋白質の単離・同定

Cyanelle の外膜 - PG 間接着蛋白質の単離・同定法と同様に行った。

4. 研究成果

(1) Cyanelle の PG を覆うように多量に存在する新奇蛋白質 CppS、CppF の発見

外膜の安定的維持には、PG 接着作用をもつ外膜蛋白質の存在が必須である。しかしながら *C. paradoxa* のゲノム配列からは既知の外膜 - PG 間接着蛋白質や PG 結合ドメインは検出されないため、生化学的手法による探索を行った。探索は一般的なグラム陰性細菌で用いられる方法を適用した。すなわち、cyanelle の外膜 - PG 画分をショ糖密度勾配遠心法により分取し、各種界面活性剤処理を穏和な条件（低濃度、常温 ~ 37 °C）で行い、不溶性画分（PG 画分）に分画された蛋白質を外膜 - PG 間接着蛋白質候補とした。その結果、42 および 40 kDa の蛋白質が候補として得られた（図 2）。候補蛋白質を可溶化後、精製 PG と混合すると PG に結合したことから、これらを CppS、CppF (cyanelle peptidoglycan-associated protein) と名付けた。CppS/F は外膜に最も多量（cyanelle 一個あたり 3×10^6 分子）に存在する蛋白質であることから、外膜表面積の大部分は CppS/F により覆われていると考えられた。CppS/F - PG 画分の超薄切片の電子顕微鏡観察を行ったところ、CppS/F は予想通り PG を覆う単層状の構造物として観察された（図 2）。

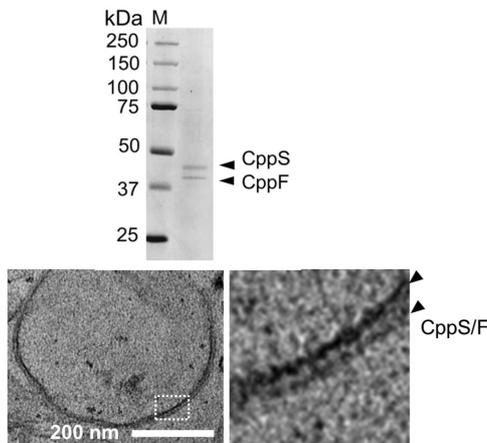


図 2. (上)単離精製した CppS/F の SDS-PAGE 写真。M は分子量マーカー。(下) CppS/F-PG 画分の超薄切片の電子顕微鏡観察像。CppS/F は PG (arrowhead で示した) を覆うように存在する。

(2) CppS/F は非特異的外膜チャンネルとして機能する

CppS/F は cyanelle 表層を形成する単なる構造蛋白質なのか、それとも外膜透過性に関与する蛋白質なのかが興味の焦点となった。機能解析のため、CppS/F をリボソームに再構成し各種アミノ酸や糖を基質としてチャンネル活性を測定した。その結果、CppS/F は基質非特異的な拡散チャンネルを形成することがわかった（結果は省略）。チャンネル活性はシステイン残基の再酸化防止処理（アルキル化）を行うことで最大化した。チャンネルサイズの排除限界はおおよそ分子量 1,000 程度と見積もられた。CppS/F を分離精製して

チャンネル活性を測定すると同様の結果が得られたことから、CppS と CppF はそれぞれ単独でチャンネル活性を持つことが明らかになった。Cyanelle 外膜の大部分は CppS/F で覆われているため、本外膜の透過性は CppS/F のチャンネル活性に大きく依存すると予想された。外膜をリボソームに再構成し透過性を測定した結果、予想通り分子量約 1,000 以下の低分子を非特異的に透過することがわかった。

(3) 藍藻外膜との比較 CppS/F は非藍藻系統に由来する

N 末端および内部アミノ酸配列解析と質量分析法を併用し、CppS/F 蛋白質を同定した。これを基に *cppS/F* 遺伝子を同定し、配列解析を行った。CppS/F は互いに相同（同一性 30%）な遺伝子であったが、既知ドメインや機能解析済みの蛋白質との相同性は見いだされなかった。また、いずれも Planctomycetes 門細菌の表層蛋白質と弱い相同性 (25% identity) を示すのみで、藍藻門からは相同蛋白質は全く検出されなかった。藍藻外膜との比較解析のため、Synechocystis より外膜 - PG 間接着蛋白質を単離・同定した。その結果、3 つの相同な外膜蛋白質 Slr0042, Slr1841, Slr1908（それぞれ同一性 70% 程度）が得られた（図 3）。これらの系統分布を調べたところ、いずれも藍藻門内で広く保存されていることが分かったが、藍藻門外および植物系統からは相同蛋白質は検出されなかった。このことから、藍藻由来の外膜 - PG 間接着蛋白質は植物系統内に持ち込まれておらず、CppS/F は非藍藻系統にその起源を持つと推察された。

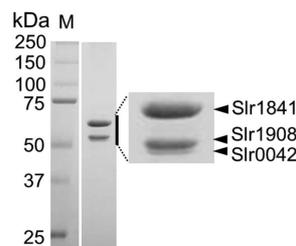


図 3. Synechocystis の外膜 - PG 間接着に作用する蛋白質 Slr0042/1841/1908 の SDS-PAGE 写真。

(4) 結論

藍藻から原始葉緑体への変換には、(A) 外膜透過障壁性の解消のための外膜チャンネル、(B) 外膜の安定的維持のための、外膜 - PG 間接着蛋白質の存在が必須である。本研究では、cyanelle の外膜におよそ 3×10^6 分子存在し、外膜 - PG 間接着蛋白質であると同時に拡散チャンネルとしての機能を有する新規蛋白質 CppS/F を発見した。CppS/F は上記した (A)、(B) の性質を満たす機能をもつことから、藍藻から葉緑体への進化過程における外膜機能変換に深く関与する蛋白質であると推察した。一方で驚くことにその起源は非藍藻系統にあると考えられ、葉緑体成立過

程における外来因子の関与が強く示唆された。本研究は、葉緑体外膜の維持と物質透過に、非藍藻系統由来の蛋白質が関与することを示した初めての例となった(図4)。

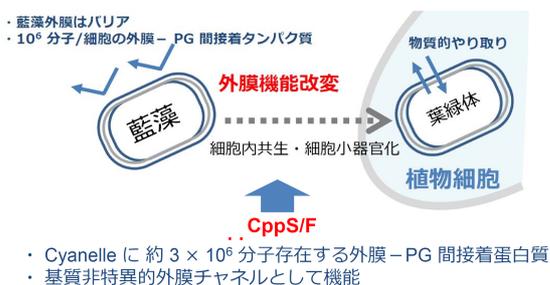


図 4. 本研究で得られた成果概要図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kojima S., Muramoto K., Kusano T.
Outer Membrane Proteins Derived from Non-cyanobacterial Lineage Cover the Peptidoglycan of *Cyanophora paradoxa* Cyanelles and Serve as a Cyanelle Diffusion Channel. *J. Biol. Chem.* 査読有、291 巻、2016、20198-20209

Kojima S., Hayashi K., Tochigi S., Kusano T., Kaneko J., Kamio Y.
Peptidoglycan-associated outer membrane protein Mep45 of rumen anaerobe *Selenomonas ruminantium* forms a non-specific diffusion pore via its C-terminal transmembrane domain. *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読有、2016、80 巻、1954-1959.
児島征司、グラム陰性細菌の多剤耐性 β -lactam 系抗生物質の外膜透過・排出速度の測定結果を例に理解する、*化学と生物*、査読有、2016、54 巻、80-82

〔学会発表〕(計 10 件)

Kojima S.、「Bifunctional outer membrane protein of ruminant bacteria that acts as a diffusion channel via its C-terminal region and as an anchor binding to the peptidoglycan via its N-terminal region.」

『Protein & Peptide Conference-2017』、2017 年 3 月 22 日、ヒルトン福岡シーホーク(福岡)

Kojima S.、「Outer membrane permeability and stability of Gram-negative bacteria, in the context of multi-drug resistance and generation of primitive chloroplast.」

『Thirteenth International Conference on Flow Dynamics』、2016 年 10 月 11 日、仙台国際センター(仙台)

児島征司、「グラム陰性細菌及び原始的葉緑体の外膜の基本機能とその構造的安定性に関する研究」、『日本農芸化学会東北

支部奨励賞受賞講演』、2016 年 10 月 9 日、山形大学農学部(鶴岡)

Kojima S., K. Muramoto, and T. Kusano、

「Proteins originated from a non-cyanobacterial lineage constitute the dominant peptidoglycan-associated outer membrane protein in *C. paradoxa* cyanelle and serve as non-specific diffusion channel.」

『Bacterial Cell Surfaces, Gordon Research Conferences.』、2016 年 6 月 24 日、West Dover, USA

木幡光、栃木佐枝子、高橋秀幸、児島征司、「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 外膜の有機炭素及び無機イオン透過性の解析」、『日本農芸化学会 2017 年大会』、2017 年 3 月 19 日、京都女子大(京都)

林華奈子、金子淳、栃木佐枝子、草野友延、神尾好是、児島征司、「偏性嫌気性細菌 *Selenomonas ruminantium* の主要外膜蛋白質 Mep45 は C 末端側 341 残基で拡散チャンネルを形成する」、『日本農芸化学会東北支部第 151 回大会』、2016 年 10 月 9 日、山形大学農学部(鶴岡)
児島征司、村本光二、草野友延、「灰色藻の葉緑体外膜に存在する非藍藻系統由来の細胞壁ペプチドグリカン結合型外膜チャンネル」、『日本植物学会第 80 回大会』、2016 年 9 月 16 日、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

児島征司、村本光二、草野友延、「原始葉緑体が保持する細胞壁ペプチドグリカン結合型外膜チャンネル」、『日本農芸化学会 2016 年度大会』、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

児島征司、村本光二、草野友延、「灰色藻葉緑体が保持する N-アセチルプロレン含有型細胞壁ペプチドグリカンに結合する蛋白質の単離と機能解析」、『日本ポリアミン学会第 7 回年会』、2015 年 11 月 14 日、京都工芸繊維大学(京都)

児島征司、村本光二、草野友延、「灰色藻葉緑体の細胞壁ペプチドグリカン結合蛋白質は非藍藻系統に由来する」、『日本植物学会第 79 回大会』、2015 年 9 月 8 日、新潟コンベンションセンター(新潟)

〔その他〕

研究代表者のホームページ

http://www.ige.tohoku.ac.jp/tekio/wordpress/wp-content/themes/lsab_wp/img/Kojima_HP/kojima.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児島 征司 (KOJIMA, Seiji)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：20745111