

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18570131
 研究課題名（和文）
 原核生物である粘液細菌を用いた新規 cAMP 情報伝達機構の解明
 研究課題名（英文）
 Elucidation of novel cAMP signal transductions in myxobacteria
 研究代表者
 木村 義雄（KIMURA YOSHIO）
 香川大学・農学部・教授
 研究者番号：10243750

研究成果の概要：

粘液細菌より cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PKA)の検索を試みた結果、PKA の特異的基質を最もよい基質とし、PKA の特異的阻害剤によって活性阻害を受ける SpkA キナーゼを得たが、真核生物の PKA で見られる cAMP と調節サブユニットによる酵素活性調節は見られなかった。

また、本菌の cAMP 分解酵素は、その変異株より、胞子の発芽時の浸透圧ストレス応答に関与していると推定し、また、酵素学的諸性質の検討から、基質特異性の広い新規性の高い酵素であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：微生物生理学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：PKA、セリン/スレオニンプロテインキナーゼ、cAMP、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

従来、原核生物と真核生物の情報伝達機構は大きく異なると考えられていたが、真核生物でのみ報告されていたタンパク質のリン酸化による情報伝達系(セリン/スレオニン/

チロシンプロテインキナーゼあるいはホスファターゼなど)が原核生物である細菌に存在することが、逆に原核生物特有と考えられていたヒスチジンプロテインキナーゼによるHis-Asp情報伝達系が真核生物である酵母、

かび、植物にも存在し、ストレス適応などにおいて重要な役割を有しているという事例も報告され始めた。これらのことは、細菌において、ヒスチジンキナーゼ及びセリン/スレオニン/チロシンキナーゼが作られ、細菌はHis-Asp情報伝達系に加え、真核生物様セリン/スレオニン/チロシンプロテインキナーゼあるいはホスファターゼによる複雑な情報伝達機構が存在することが想像された。細菌での真核生物様セリン/スレオニンプロテインキナーゼの酵素学的諸性質や機能などの詳細については解明がなされておらず、重要な課題であり、また、これらの研究は情報伝達機構の進化や真核生物の情報伝達機構の研究にも知見を与えられることが考えられた。

2. 研究の目的

我々は既に粘液細菌において cAMP が分化や浸透圧調整において重要な役割を有していることを明らかにしている。本菌はゲノム解析より 99 個のセリン/スレオニンプロテインキナーゼを有していること、また、我々は cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PKA)の調節サブユニットホモログタンパク質を本菌から既に得ていることなどから、本菌は細菌ではまだ報告されていない PKA を有していると考え、本菌から PKA 触媒サブユニットの検索を行うことを目的とした。

また、細菌においても cAMP は重要な働きを有すると考えられているが、細胞内の cAMP 濃度を調節する cAMP 分解酵素については細菌では報告例が少ない。そこで我々は、本菌のゲノム解析より、cAMP 分解酵素を 3 つ検索し、それらの遺伝子破壊株を作製し、細胞内での機能を明らかにするとともに、発現酵素を用いて酵素学的諸性質についても研究を行った。

3. 研究の方法

(1) SpkA, SpkB の発現 *spkA* 及び *spkB* 遺伝子を発現ベクターに連結後、mRNA 合成、昆虫の無細胞タンパク質発現系にてタンパク質を合成した後、精製した酵素を用いて酵素学的諸性質の検討を行った。

(2) *pdeA*, *pdeB*, *pdeC* 変異株の作製及び表現型の解析 *pdeA-C* 遺伝子にカナマイシン分解遺伝子を挿入後、*M. xanthus* 細胞にエレクトロポレーション法により導入し、相同組換えにより、カナマイシン耐性株を分離した。分離した変異株を用いて増殖、分化、各種ストレス耐性実験などに用いた。

(3) PdeA, B の発現 *pdeA* 及び *pdeB* 遺伝子を発現ベクターに連結後、大腸菌で発現、精製した酵素を用いて酵素学的諸性質の検討を行った。

4. 研究成果

真核微生物のPKA触媒サブユニットのアミノ酸配列を用いたホモロジー検索により、PKA触媒サブユニットとして機能している可能性が高いと考えられる *M. xanthus* の 2 種類のセリン/スレオニンプロテインキナーゼ(SpkA, SpkB)を選択し、無細胞タンパク質合成システムを用いてそれぞれのタンパク質の発現を行った。尚、SpkA, SpkB とヒトのPKA触媒サブユニットとの相同性は27%前後であった。精製したSpkA, SpkBを用いて酵素学的諸性質の検討を行った結果、SpkAはPKAの特異的基質であるKemptideを最もよい基質とし、また、PKAの特異的阻害剤であるPKI_{5,24}により活性の阻害がみられた。そのKm値及びKi値は真核微生物のPKAで報告されている数値と同程度で、SpkAはPKA触媒サブユニットとよく似た酵素学的諸性質を有していた。

次いでPKA調節サブユニットのホモログタンパク質である *M. xanthus* CbpBタンパク質を用いて、SpkAとの相互作用を酵素活性の測定、タンパク質のリン酸化反応及びゲルろ

過カラムによる分子量の測定により解析を行った。SpkAとCbpBを混合後、ゲルろ過カラムに通すとSpkAとCbpBが1:1で結合していることがわかった。また、CbpBがSpkAによってリン酸化されているかどうかを調べると、CbpBはcAMP添加及び無添加条件下の両方でリン酸化を受けた。CbpBとSpkAをMgATP存在下及び非存在下で1時間置いた後、酵素活性を測定するとSpkAの活性阻害は見られなかった。一方、MgATP非存在下で混合していた酵素では、CbpBの添加量の増加に伴い2-3倍SpkAの活性が増加した。これらのことから、SpkAとCbpBでは相互作用が見られるものの、酵素活性の調節機構は真核生物のPKAのそれとは異なっていた。

PKA 触媒サブユニットの検索として、本菌からの酵素の精製及び PKI インヒビターを用いたアフィニティークロマトグラフィによる検索を試みたが、いずれも成功しなかった。酵素の精製は、酵素活性に用いた Kemptide 基質が PKA 酵素のみならず、一般的なセリン/スレオニンキナーゼの基質にもなるため、それらの酵素量に応じて精製され、PKA 酵素を特異的に精製することができなかったことに起因する。また、PKA の特異的阻害剤である PKI インヒビターを GST タンパク質に融合させて発現させ、カラムに連結後、*M. xanthus* 酵素抽出物をアプライし、PKA 酵素のスクリーニングを試みたが、この実験により分離されたタンパク質のアミノ酸配列の決定の結果、*M. xanthus* のセリン/スレオニンプロテインキナーゼに相当するものではなく、PKA 触媒サブユニットの検索には至らなかった。

cAMP 情報伝達機構に関する全体像を理解することを目的として、cAMP 分解酵素とホ

モログのある3つの遺伝子(*pdeA, B, C*)破壊株を作製し、浸透圧、温度ストレス条件下等での生育、分化などの表現型ならびに細胞内cAMP濃度を野生株と比較した。その結果、*pdeA, B* 変異株の胞子は浸透圧条件下で野生株より早く発芽がみられた。この結果は既に我々が報告している浸透圧を感知すると考えられるセンサー型cAMP合成酵素の変異株と相反する結果を示した。また、変異株の栄養細胞では高温条件下で生育の低下がみられた。それぞれの変異株では浸透圧条件下で約1.3-2.0倍cAMP濃度が野生株より高い値を示した。

これらの結果より、PdeA と PdeB は浸透圧条件下での胞子発芽時及び高温培養時においてcAMP濃度の調節を行うことで環境変化の適応に関与していることが示唆された。

次いで細菌でのバクテリア型(ClassIII)のcAMP分解酵素に関しては、数例の報告がある程度で、細菌におけるcAMP分解酵素の存在自体が疑問視されていたので、*M. xanthus*が有する先述した2つのcAMP分解酵素(PdeA, PdeB)を大腸菌で発現、精製させた酵素を用いて酵素学的諸性質を明らかにした。両酵素は3',5'-及び2',3'-cAMPを5'-AMPと3'-AMPにそれぞれ分解し、さらにアデノシンまで分解するといった今までにcAMP分解酵素では報告されていない基質特異性を有する酵素であった。また、両酵素はATP, ADPなど幅広い基質を脱リン酸化するホスファターゼ活性も有しており、それらの K_m 値は、報告されている酵素よりもかなり低い値(数-10 μ M)を示し、基質に対して高いアフィニティを有する酵素であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ① Kimura, Y., Okazaki, N., and Takegawa, K. Enzymatic characteristics of two novel *Myxococcus xanthus* enzymes, PdeA and PdeB, displaying 3',5'- and 2',3'-cAMP phosphodiesterase, and phosphatase activities. FEBS Letters 583, 443-448, 2009, 査読有
- ② Kimura, Y., Kakemizu, A. Matsubara, Y., and Takegawa, K. Enzymatic characteristics of a Ser/Thr protein kinase, SpkA, from *Myxococcus xanthus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 107, 10-15, 2009, 査読有
- ③ Ishibashi, K., and Kimura, Y. *Myxococcus xanthus* CbpC and CbpD containing two cAMP-binding domains are involved in temperature tolerance. Technical bulletin of faculty of agriculture, Kagawa University, 61, 2009, 査読無
- ④ Kimura, Y., and Hamanaka, H., Analysis of functional properties of PirA and ScdA in *Myxococcus xanthus*. Technical bulletin of faculty of agriculture, Kagawa University, 59, 79-84, 2007, 査読無
- ⑤ Kimura, Y., Nakatuma, H, Sato, N., and Ohtani, M. Contribution of the cyclic nucleotide phosphodiesterases PdeA and PdeB to adaptation of *Myxococcus xanthus* cells to osmotic or high-temperature stress. Journal of Bacteriology, 188, 823-828, 2006, 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① 木村義雄、粘液細菌におけるレセプター型アデニル酸シクラーゼの機能解析、第82回日本細菌学会、2009年3月13日、名古屋
- ② 木村義雄 粘液細菌 *Myxococcus xanthus*

のヒスチジンキナーゼMokAは浸透圧耐性と分化に必要である 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会2008年12月12日、神戸

③ 田上駿一、木村義雄、*Myxococcus xanthus* sセリン/スレオニンプロテインキナーゼSpkAの酵素学的特徴、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会、2008年12月10日、神戸

④ 木村義雄、財賀大行、浜中裕子、的場秀樹、*Myxococcus xanthus* twin-arginine translocation system is important for growth and development. BMB2007、2007年12月14日、横浜

⑤ Ishibashi, K., Kobayashi, S., Nakato, H., and Kimura, Y.: *Myxococcus xanthus* CbpB, CbpC, and CbpD containing two cAMP-binding domains is involved in temperature and osmotic tolerances, 日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006年12月7日、横浜

⑥ Kimura, Y., Nakatuma, H., Sato, N., and Ohtani, M.: Contribution of cyclic nucleotide phosphodiesterases, PdeA and PdeB, in adaptation of *Myxococcus xanthus* cells to osmotic or high temperature stress. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006). 2006年6月21日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者
木村 義雄 (KIMURA YOSHIO)
香川大学・農学部・教授
研究者番号: 10243750

(2) 連携研究者
竹川 薫 (TAKEGAWA KAORU)

九州大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50197282