

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380047

研究課題名(和文)細菌細胞の形を支配する新規表層蛋白質の解析

研究課題名(英文)Analysis of novel cell surface proteins affecting cell shape of bacteria

研究代表者

関口 順一 (SEKIGUCHI JUNICHI)

信州大学・大学院総合工学系研究科・教授

研究者番号：80111053

研究成果の概要(和文): 細胞の形に関わる枯草菌遺伝子産物 (IseA, YggA) を解析した。IseA は DL-endopeptidase 群の活性を阻害する蛋白質であり, その高発現は細胞の繊維状化をもたらした。yggA 遺伝子を含む多重変異株の増殖の解析より, yggA 遺伝子が *lytE* *lytF* *cwlS* などの細胞分離酵素と何らかの関連があることが示唆された。さらに合成致死として知られている CwlO, *LytE* の溶解酵素のうち *LytE* の役割について詳細に解析した。また枯草菌 CwlK, CwlT 細胞壁溶解酵素の酵素化学的性質を明らかにした。

研究成果の概要(英文): *Bacillus subtilis* gene products (IseA and YggA) associated with cell shape were investigated extensively. IseA is a proteinaceous inhibitor against the DL-endopeptidase family and its overexpression led to typical cell filamentation. It is likely that YggA had some relation with cell wall lytic DL-endopeptidases (*LytE*, *LytF* and *CwlS*). The role of *LytE*, which is one of the synthetic lethal proteins, is investigated in detail. Moreover, enzymatic properties of *B. subtilis* CwlK and CwlT are reported.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：ゲノム・応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能, 表層蛋白質, 細胞形態, 細胞壁溶解酵素, インヒビター

## 1. 研究開始当初の背景

細菌細胞の中でも桿菌といわれる細菌では, その細胞形態は球菌とくらべて独自の制御システムを持っている。最近の研究では, アクチンホモログとして見つけられた必須遺伝子産物 MreB, やはりアクチンホモログとして枯草菌で見つけられた Mbl, MreBH, なかでも Mbl 欠損株は細胞増殖が低下する表現型を示し, 世界中で活発に研究がなされて

きている。この研究課題である細胞の形を作る因子の研究は, 細胞増殖・分裂・細胞壁の合成に直接関係する重要な領域であるとともに, 微生物分野で最も注目されている分野の1つである。

## 2. 研究の目的

(1) 細胞の形を作る因子の研究として, 細胞の形に影響することが解った機能未知遺伝

子とその産物について、機能を分子生物学的に解明し、細胞の形を作るメカニズムを明らかにする。

(2) 形をつくる因子と関係の深い細菌細胞壁溶解酵素を検討し、生化学的解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 枯草菌からの遺伝子のクローニング法は枯草菌の染色体を鋳型に目的遺伝子のプライマーを用いてPCR増幅し、その後DNA増幅断片を各種制限酵素で切断した後pUC系プラスミド、pHY300PLKなどに連結し、大腸菌、枯草菌を形質転換した。

(2) 酵素の局在は酵素の末端にFLAG配列を賦与した標識蛋白質を作製し、1次抗体は抗FLAG抗体、2次抗体はFITC-conjugatedな抗体を用いて行った。観察はデコンボリューション装置付蛍光顕微鏡を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 枯草菌及びその類縁菌が生産するIseA(YoeB)はタンパク質系の細胞壁溶解酵素阻害剤であり、*in vivo*でもIseAの高発現が細胞の繊維状化をもたらすことを見つけた。枯草菌においては多数の細胞壁溶解酵素が存在し、酵素の基質特異性も様々であるが、特に栄養細胞増殖期にはグルコサミニダーゼ、ムラミダーゼ、アミダーゼ、LD-エンドペプチダーゼ、DL-エンドペプチダーゼ、DD-エンドペプチダーゼが生産される。*in vitro*では複数の細胞壁溶解酵素のなかでも、さらにDL-endopeptidaseのなかでも、LytEが主にこの阻害タンパク質の標的となっていた。一方必須2成分制御系YycGFの下流にあるLytE、Cwl0は同時の変異で合成致死を示すが、少なくともLytEの触媒ドメインを同じDL-endopeptidase活性を示すLytF、CwlSの触媒ドメインに置換できることが解った。一方LytF、CwlSではLytEと同じ細胞壁結合性ドメインLysMではあるが、その繰返しはLytF、CwlSではそれぞれ5回、4回存在するのに対し、LytEでは3回であり、この違いがLytF、CwlSが分裂部位と細胞の局に存在するのに対し、LytEでは細胞側面へ局在する原因であることが推定された。Cwl0はプロテアーゼに感受性の蛋白質であるが、分泌性プロテアーゼ変異株を使うことにより、LytE同様細胞側面に局在することを初めて明らかにした。IseAのゲルろ過による精製途中、2つの異なる分子量を示すピークが認められた。分子量から推測するとモノマーとダイマーであり、それぞれがかなり安定に存在していた。このことはIseAの構造変化が阻害活性に影響する可能性があると考えられ、DL-endopeptidase活性への阻害実験を計画している。また高次構造決定の為、結晶化も引き続き行い、現在科学研究費基盤(A)に引き継

がれて実施している。

(2) 枯草菌細胞表面タンパク質YqgAは細胞表面タンパク質のプロテオーム解析から見いだされ、細胞表面に多量に存在する機能未知タンパク質である(Proteomics, 2002; 2: 591-602)。YqgAの機能解析を目的とし、細胞内局在を観察したところ、YqgA-3xFLAGは対数増殖期のごく限られた時期(OD600nm=0.5付近)に細胞分裂面に局在し、それ以外の時期では局在が観察されなかった。このタイミングは対数増殖期が終わり移行期に入りかけるタイミングだと考えられる。なお、ウェスタンブロットの結果から、YqgAタンパク質は培養中終始細胞表面に大量に存在していた。また、この局在はFtsZまたはPbp2Bの枯渇株や、細胞分離酵素であるLytE、LytF、CwlSの3重欠損株では観察されなかった。これらのことから、YqgAは細胞隔壁が細胞分離酵素(DL-endopeptidase)によって切断され、細胞が分離する直前に局在するものと考えられる。そこで次に、*yqgA*と*lytE*、*lytF*との遺伝学的な関係を解析した。*yqgA*(null)株と*yqgA*(truncate: C末42アミノ酸を削除)株は、野生株と比べて特に違いは見いだされなかった。また、*lytE lytF*株、*lytE lytF yqgA*(null)株においても野生株との違いは観察されなかったが、*lytE lytF yqgA*(truncate)は主に培養誘導期および対数増殖期において増殖の遅延が観察された。さらに、この時期の細胞を顕微鏡観察したところ、*lytE lytF yqgA*(truncate)株では螺旋状にねじれた細胞が部分的に観察された。これまでの結果から、*yqgA*は*lytE lytF cwlS*などの細胞分離酵素と何らかの関連があることが強く示唆された。

(3) 枯草菌細胞壁溶解酵素ホモログであるCwlKは、ペプチドグリカン溶解酵素であるLD-endopeptidase、DD-endopeptidaseと高い塩基配列の類似性を示した。そこで*cwlK-lacZ*融合株を作り*cwlK*遺伝子の発現を観察したところ、栄養増殖期に発現する遺伝子であり、ウェスタンブロット解析から細胞膜上に局在していた。CwlK蛋白質の基質特異性を調べたところ、DD-endopeptidaseではなくLD-endopeptidaseであることが解った。この報告はPLY500ファミリー蛋白質を解析した最初の報告である。

一方枯草菌*cwlT*(*yddH*)はトランスポゾン様領域に存在する遺伝子で、最近この領域はICEBs1とよばれる挿入接合因子であることが解った。CwlT蛋白質中にはN-末端にsoluble lytic transglycosylase domain、C-末端にNlpC/P60ドメインが存在し、2つのドメインともペプチドグリカンの分解に関与する可能性が考えられた。そこでN-末端、C-末端、両ドメインを同時にクローン化し、

それらの酵素活性を調べたところ、N-末端ドメインは soluble lytic transglycosylase ではなく、muramidase であることが解った。一方 C-末端ドメインは DL-endopeptidase であることを、酵素分解物のアミノ末端にフルオロジニトロベンゼンを用いて修飾し、塩酸で加水分解後 HPLC にて分画し、質量分析計で物質同定することにより明らかにした。両ドメインを同時にクローン化した蛋白質は、細胞壁の分解力が非常に高いことが解った。本研究により新しいタイプの muramidase が明らかになったことは、特筆に値すると思っ

ている。  
以上の研究成果の一部は、微生物や生化学分野の国際誌 4 報に報告しており、本課題の解明に大きく寄与できたものと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

橋本昌征, 山本博規, 関口順一: 枯草菌における細胞の分離。繊維と工業 **65(8)**:282-286 (2009) (査読無)

Yamamoto, H., Y. Miyake, M. Hisaoka, S. Kurosawa, and J. Sekiguchi: The major and minor wall teichoic acids prevent the sidewall localization of vegetative D,L-endopeptidase LytF in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **70(2)**:297-310 (2008) (査読有)

Fukushima, T., T. Kitajima, H. Yamaguchi, Q. Ouyang, K. Furuhashi, H. Yamamoto, T. Shida, and J. Sekiguchi: Identification and characterization of new cell wall hydrolase, CwlT: a two-domain hydrolase of N-acetylmuramidase and D,L-endopeptidase. J. Biol. Chem., **283(17)**:11117-11125 (2008) (査読有)

Yamamoto, H., M. Hashimoto, Y. Higashitsuji, H. Harada, N. Hariyama, L. Takahashi, T. Iwashita, S. Ooiwa and J. Sekiguchi: Post-translational control of vegetative cell separation enzymes through a direct interaction with specific inhibitor IseA in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **70(1)**:168-182 (2008) (査読有)

Fukushima, T., Y. Yao, T. Kitajima, H. Yamamoto, and J. Sekiguchi. Characterization of a new L,D-endopeptidase gene product CwlK (previous YcdD) hydrolyzing peptidoglycan in *Bacillus subtilis*. Mol. Genet. Genomics, **278**:371-383 (2007) (査

読有)

[学会発表](計 5 件)

I Putu Sudiarta, T. Fukushima, J. Sekiguchi. *Bacillus subtilis* CwLP in the SP-beta prophage comprises two novel cell wall hydrolase domains, BioMicroWorld 2009, 2009 年 12 月 2 日, リスボン大学 (リスボン)

関口順一, 福島達也, 橋本昌征, 山本博規. ゲノムで紐解く細胞壁結合蛋白質群の機能, 日本遺伝学会第 8 1 回大会, 2009 年 9 月 16 日, 信州大学 (松本市)  
K. Kobayashi, T. Kodama, T. Fukushima, K. Ara, K. Ozaki, J. Sekiguchi. PdaC (YjeA) deacetylates the acetyl groups of N-acetylglucosamine in the chitin oligomers and N-acetylmuramic acid in peptidoglycan -Biochemical approach for identification of PdaC in *Bacillus subtilis*- 5th Internatl. Conf. on Gram-Positive Microorganisms, 2009 年 6 月 15 日, Catamaran ホテル (サンディエゴ)

J. Sekiguchi. Peptidoglycan degradation and modification enzymes are important in basic and applied research on microbiology. iBio-2008, May 18-21, 2008, Hangzhou, Session 6, Part 1.

Sekiguchi, J., T. Iwashita, and H. Yamamoto. Proteinaceous inhibitor affecting activity of cell separation enzymes in *Bacillus subtilis*. 4th Conference on Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms, June 24-28, 2007, Tirrenia

[図書](計 1 件)

荒 勝俊, 尾崎克也, 掛下大視, 中村幸治, 山根國男, 児玉武子, 関口順一, 門屋享介, 森本拓也, 小笠原直毅. 枯草菌のミニマムゲノムファクトリー. 微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線 (清水晶他編) p.32-48 (総ページ 201 頁), シーエムシー出版, 東京 (2007)

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

名称: p 6 0 エンドペプチダーゼ阻害剤  
発明者: 荒 勝俊, 阪本 知生, 山本 博規,  
針山 望, 関口 順一

権利者: 花王、信州大学

種類: 特許

番号: 特願 2 0 0 8 - 7 8 8 2 8、特開 2 0 0 9 - 2 2 7 6 4 8

出願年月日: 平成 2 0 年 3 月 2 5 日

国内外の別：【NI0800005】日本

名称：溶菌酵素阻害剤、溶菌抑制剤及び  
ポリ - ガンマ - グルタミン酸の分解抑制剤  
及びポリ - ガンマ - グルタミン酸の製造方  
法

発明者：荒 勝俊、関口 順一、山本 博規、  
原田 宏之

権利者：花王、信州大学

種類：特許

番号：特願 2 0 0 7 - 2 6 8 5 2 3、特開 2  
0 0 8 - 1 1 8 9 8 5 【NI0700043】

出願年月日：平成 1 9 年 1 0 月 1 6 日

国内外の別：日本

外国【NI07-43PCT】PCT/JP2007/07051

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

関口 順一 (SEKIGUCHI JUNICHI)

信州大学・大学院総合工学系研究科・教授  
研究者番号：80111053

### (2)研究分担者

山本 博規 (YAMAMOTO HIROKI)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号：20262701

橋本 昌征 (HASHIMOTO MASAYUKI)

信州大学・ファイバーナノテク国際若手研  
究者育成拠点・助教

研究者番号：80402139

福島 達也 (FUKUSHIMA TATSUYA)

信州大学・ヒト環境科学研究支援センタ  
ー・助教

研究者番号：20529200

### (3)連携研究者

なし