

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007 ~ 2009  
 課題番号：19580099  
 研究課題名 (和文) 大腸菌のリポタンパク質をペプチドグリカンに共有結合させるペリプラズム酵素の解析  
 研究課題名 (英文) Analyses on periplasmic enzymes that covalently bind lipoproteins to peptidoglycan in *Escherichia coli*  
 研究代表者  
 松山 伸一 (MATSUYAMA SHINICHI )  
 立教大学・理学部・教授  
 研究者番号：50183108

研究成果の概要 (和文)：大腸菌のペリプラズムタンパク質 YbiS、およびそのパラログである ErfK と YcfS が、主要外膜リポタンパク質 Lpp とペプチドグリカンを結合させるトランスペプチダーゼ (TPase) であることを生化学的、遺伝学的に同定した。YbiS は酸性と中性条件で機能する TPase、YcfS はアルカリ条件で働く TPase であることを明らかにし、環境変化に適応するためにこれらの TPase が協同的に働いていることを強く示唆した。

研究成果の概要 (英文)：YbiS and its paralogs, ErfK and YcfS, that are periplasmic proteins of *Escherichia coli* were biochemically and genetically identified as transpeptidases (TPase) to bind covalently lipoproteins to peptidoglycan. The result that YbiS and YcfS function acid-neutral and alkali conditions, respectively, strongly suggest that these TPase cooperatively work to adapt to the environmental change.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：生化学・微生物学

キーワード：大腸菌、外膜、リポタンパク質、トランスペプチダーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

大腸菌の細胞表層には N 末端が脂質で修飾されたリポタンパク質が約 100 種存在しており、表在性膜タンパク質として形態形成、物質透過、情報伝達などの機能を担っている。Lpp は細胞表層の構造維持に重要なリポタンパク質であり、細胞あたり  $5 \times 10^5$  分子も存在している。1969 年、ドイツの Braun ら

によって Lpp が発見され (Eur. J. Biochem. 1969)、その C 末端リジン残基の  $\epsilon$  アミノ基がペプチドグリカンのジアミノピメリン酸とペプチド結合で共有結合していることが明らかになった。以来、この反応をつかさどる酵素は多くの研究者の興味を引き精神的に研究されてきたが、同定にはいたらなかった。37 年もの長い間見いだされなかった理

由は、このトランスペプチダーゼ (TPase) 活性を解析できる系が確立されなかったことにつづる。

申請者はタンパク質膜透過やリポタンパク質局在化の再構成実験系を確立した経験と実績を活かして、Lpp をペプチドグリカンに共有結合させる *in vitro* 反応系を構築してペリプラズム画分から TPase 活性を精製することに成功した。N 末端アミノ酸配列を決定し、この TPase が分子量 31 k の YbiS タンパク質であることを明らかにした。さらに、第 2 のとらんとすとして ErfK タンパク質も同定し、Braun による Lpp の発見以来 37 年目にして Lpp-ペプチドグリカン TPase 研究の道が開かれた。

## 2. 研究の目的

(1) TPase の酵素化学的な諸性質の解明  
Lpp とペプチドグリカンを共有結合させるすべての TPase を同定し、それらの酵素化学的なさまざまな特性を明らかにする。

(2) 細胞における機能と生理的役割の解明  
大腸菌をはじめ多くのグラム陰性細菌が複数の YbiS/ErfK ホモログをもっている。複数の TPase の機能的な差異や生理的意義を環境変化に対する特性や TPase 遺伝子の発現調節などの解析から明らかにする。

(3) 化学療法剤の新しい標的としての可能性の検討  
すべての TPase 遺伝子を欠損した大腸菌が致死性を示すのであれば、TPase は新しい化学療法剤開発の有望な標的となりうる。その可能性を検討し開発研究の基礎を築く。

### (4) 立体構造の解明

分子機構をより深く理解しさらに発展させるためには TPase の立体構造の知見が必要である。リガーゼを結晶化し、X線結晶構造解析を行い、立体構造を決定するために高度に生成された標品を調製する。

## 3. 研究の方法

(1) YbiS/ErfK のパラログ YcfS、YnhG の解析

YbiS と ErfK は一次構造の上で 65% の identity を有している。これらのタンパク質とホモロジーの高い大腸菌タンパク質を検索した結果、YbiS との identity が それぞれ 51% と 46% の YcfS と YnhG を見いだした。YcfS と YnhG にも Lpp-ペプチドグリカン TPase 活性があるかどうかを調べる。

### (2) 酵素化学的解析

① Lpp とペプチドグリカンの共有結合は D-アラニンの遊離をとまなうペプチド転移反応によって形成されると推測されている。YbiS、ErfK などの反応がペプチド転移反応なのかどうかを確かめる。

② TPase 反応における pH、温度、塩濃度な

どの影響を調べる。

③ Lpp 変異体を構築して TPase の基質認識に重要な領域と配列を決定する。

④ Lpp は三量体タンパク質であるが、TPase の基質は三量体なのか単量体なのかを調べる。

### (3) TPase 遺伝子変異株の解析

*ybiS*、*erfK*、*ycfS*、および *ynhG* の変異株を構築して、複数の TPase の中で *in vivo* で実際に機能しているものはどれかを解析する。また、変異株の生育や細胞表層の構造的、機能的変化を調べる。

(4) 複数の TPase を備えている生理的意義の解明  
細胞表層は環境変化の影響を直接受ける。大腸菌は、環境の変化に応じて複数の TPase を使い分けている可能性が考えられる。そこで、pH、温度、塩濃度、酸化ストレスなどの影響を酵素レベルと上記変異株を用いた細胞レベルで比較検討して、各々の TPase の環境変化に対する特性を調べる。また、環境変化に応答した TPase 遺伝子の発現を解析する。

(5) ペプチドグリカンと共有結合する新規タンパク質の検索  
ペプチドグリカンと共有結合する大腸菌タンパク質は Lpp 以外に報告がない。ペプチドグリカンと共有結合する他のタンパク質があるか検索し、そのタンパク質の機能にとってペプチドグリカンとの共有結合が果たす役割について検討する。

(6) Lpp-ペプチドグリカン TPase は新しい化学療法剤開発の有望な標的となりうる。その可能性を検討するために、すべての TPase 遺伝子を欠損した多重変異株を構築し、致死性を示すかどうかを検討する。また、その際の細胞表層の構造的、機能的変化を解析する。

(7) TPase の X線結晶構造解析から三次構造を決定し、原子レベルで酵素特性や細胞機能を理解する。また、活性中心付近の構造をもとに結合する物質を推定し、化学療法剤の探索の基礎を築く。

## 4. 研究成果

(1) 大腸菌主要外膜リポタンパク質 Lpp は細胞表層の構造維持に重要な役割を果たしており、その C 末端リジン残基の ε アミノ基がペプチドグリカンのジアミノピメリン酸とペプチド結合で共有結合しているが、この反応をつかさどる酵素は多くの研究者の努力にもかかわらず、長い間不明であった。本研究では Lpp をペプチドグリカンに共有結合させる *in vitro* 解析系を構築して、ペリプラズムに局在する YbiS タンパク質が Lpp-ペプチドグリカン TPase であることを見いだした。また、*ybiS* 欠失変異株ではペプチドグリカン結合型 Lpp の量が著しく減少することを見いだし、YbiS が *in vivo* でも Lpp-PG TPase

として機能していることを示した。

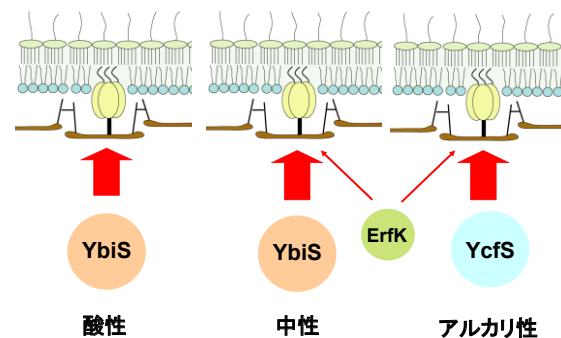
大腸菌には、YbiS のパラログとして ErfK と YcfS が存在する。これらのパラログについて、精製標品を用いた *in vitro* 解析、および欠失変異株による *in vivo* 解析を行った。ErfK には強い Lpp-PG TPase が見いだされたが、その変異株では表現型の変化が認められなかった。また、ErfK は YbiS と同様にアルカリ条件下でその活性が低下した。一方、YcfS は *in vitro* と *in vivo* のいずれの場合にもアルカリ条件下でのみ Lpp-PG TPase 活性を示した。これらの結果より、YbiS が主要な Lpp-PG TPase であること、ErfK は潜在的な Lpp-PG TPase であること、および、YcfS はアルカリ条件下で働く Lpp-PG TPase であることが明らかになった。大腸菌が 3 種の Lpp-PG TPase を備えていることは、環境変化に適応するためにこれらが協同的に働くことが必要であることを示唆している。

(2) 大腸菌の細胞表層の構造維持に重要な役割をはたしている主要外膜タンパク質 Lpp は、そのカルボキシル末端でペプチドグリカンと共有結合している。この共有結合の有無が Lpp の機能にどのような影響を与えているのかを調べるために、Lpp のカルボキシル末端に種々の変異を導入した変異株を構築して、1 mM EDTA - 1 % SDS 存在下での生存率を調べた。ペプチドグリカンと共有結合できない変異をもった Lpp を発現している菌株は EDTA - SDS 処理で完全に死滅したが、Lpp がペプチドグリカンと共有結合できる菌株は EDTA-SDS 処理でも死滅せずに生存していた。この結果は、Lpp が外膜に発現しているだけでは細胞表層の維持には寄与できず、共有結合していることが Lpp の機能に必須であることが明らかになった。

大腸菌は Lpp とペプチドグリカンの共有結合を触媒する TPase を 3 種もっているが、それぞれの役割は不明であった。精製標品を用いた生化学的な機能解析の結果、YbiS は酸性と中性、ErfK は中性、YcfS はアルカリ性の条件下で働く TPase であることを示した。pH 環境の変化が酵素活性だけではなく TPase 遺伝子の発現にも影響しているのかどうかを調べるために、種々の pH で発現させた大腸菌の TPase 3 種の存在量を調べた。その結果、YbiS は酸性と中性条件下で発現していたが、アルカリ条件下ではほとんど発現していなかった。一方、YcfS はアルカリ性条件下でのみ発現していた。これらの結果は、活性と発現が合理的に制御されていることを示唆している。なお、ErfK はいずれの pH でも発現していなかった。

(3) 主要外膜リポタンパク質 Lpp は、ペプチドグリカンと共有結合して細胞表層の構造維持に寄与している。その共有結合反応を触媒しているのが YbiS であり、さらにその

パラログとして YcfS と ErfK が存在することを見いだしてきた。これら 3 種の TPase の役割を環境変化への応答の観点から明らかにするために、3 種の TPase の遺伝子発現が、それぞれ培地の pH 変化にどのように応答するのかを *lacZ* との融合遺伝子を構築して調べた。*ybiS-lacZ* を保持する MC4100 ( $\Delta lacZ$ ) 株は酸性、中性、アルカリ性のいずれの培地でも強い  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性を示したことから、YbiS は pH 変化に対して構成的に発現する TPase であると思われた。また、YcfS はアルカリ条件下で特異的に発現する TPase であることを明らかにし、生化学的解析で得られた *in vivo* の結果と一致した。ErfK は operon fusion では十分な転写活性が示されたが、protein fusion ではほとんど活性が見いだされなかったことから、その発現は翻訳レベルで厳に制御されており、pH によらずあまり発現していない TPase であることが示唆された。これらの結果と当研究室の生化学的な知見から、YbiS は酸性・中性条件下で、YcfS はアルカリ条件下で、ErfK はバックアップとして、それぞれ機能する TPase であると考えられ、大腸菌の細胞表層における環境変化への応答機構のひとつを明らかにすることができた (図)。今回構築した operon fusion と protein fusion は 3 種の TPase の遺伝子発現が pH 以外のどのような環境刺激に応答しているのかを容易に調べるためのプローブとして有用である。なお、立体構造解析は YbiS の高度精製標品の調製の段階まで進展しているため、今後の課題としたい。



## 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 3 件)

① Yasuda M., Iguchi-Yokoyama A., Matsuyama S., Tokuda H., and Narita S., Membrane Topology and Functional Importance of the Periplasmic Region of ABC Transporter LolCDE. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 73, 2009, 2310-2316

②Tokuda, H., Matsuyama, S., and Tanaka-Masuda, K., Structure, function and transport of lipoproteins in *Escherichia coli*. In The Periplasm, M. Ehrmann (ed), ASM press, 査読有, 2007, 67-79

③Ito, H., Ura, A., Oyamada, Y., Yoshida, H., Yamagishi, J., Narita, S., Matsuyama, S., and Tokuda, H., A new screening method to identify inhibitors of Lol (localization of lipoproteins) system, a novel antibacterial target. *Microbiol. Immunol.* 査読有, 51, 2007, 263-270

〔学会発表〕(計4件)

①福本 玲、(松山伸一) 大腸菌 Lpp-ペプチドグリカントランスペプチダーゼ3遺伝子の pH 変化に応答した発現、日本農芸化学会、2009年3月27日、東京

②田中大揮、(松山伸一) 大腸菌主要外膜リポタンパク質 L p p をペプチドグリカンに共有結合させるトランスペプチダーゼ、日本分子生物学会、2007年12月14日、神奈川

③宮 隆允、(松山伸一) 大腸菌の L p p -ペプチドグリカントランスペプチダーゼの生化学的解析、日本分子生物学会、2007年12月14日、神奈川

④田中大揮、(松山伸一) 大腸菌主要外膜リポタンパク質 Lpp をペプチドグリカンに共有結合させるトランスペプチダーゼ、第4回21世紀大腸菌研究会、2007年7月17日、静岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松山 伸一 (MATSUYAMA SHINICHI )  
立教大学・理学部・教授  
研究者番号：50183108

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし