

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02886

研究課題名(和文) 長鎖ポリアミン生合成系の全容解明とシリカ形成における機能解析

研究課題名(英文) Biosynthetic pathway of long-chain polyamines and their role in silica formation

研究代表者

池田 丈 (Ikeda, Takeshi)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授

研究者番号：10505754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：一部の生物が形成するシリカの内部には、多数のアミノ基を有する長鎖ポリアミンが存在することが報告されている。長鎖ポリアミンの生合成経路は未だ不明であり、長鎖ポリアミンの機能を解析する上で大きな障壁となっていた。我々は、シリカを形成する細菌において長鎖ポリアミンの合成に必要な遺伝子群を発見した。本研究では、各遺伝子がコードするタンパク質の機能解析を行い、長鎖ポリアミン合成酵素を同定することに成功した。また、組換え大腸菌の細胞内で合成された長鎖ポリアミンを精製する手法を開発した。精製した長鎖ポリアミンが試験管内においてシリカ形成を促進することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果によって、シリカ形成生物における長鎖ポリアミン合成酵素を初めて同定し、長鎖ポリアミン生合成経路を解明することに成功した。本菌のシリカ形成における長鎖ポリアミンの機能は未だ不明な点が多いが、遺伝子破壊株や変異体を用いた機能解析が可能となったことで、今後一層研究が進展することが期待される。生物による洗練された鉱物形成メカニズムを明らかにすることで、ナノテクノロジー分野への応用につながる

研究成果の概要(英文)：Biosilicifying organisms form inorganic silica intracellularly. Long-chain polyamines (LCPAs) have been isolated from biosilica of phylogenetically distant biosilicifying organisms and are thought to be involved in biological silica formation. However, the biosynthetic pathway of LCPAs has not been clarified yet, which makes it difficult to investigate their physiological functions. We previously found the genes that are essential for LCPA production in a mesophilic biosilicifying bacterium. In this study, we investigated the functions of the proteins encoded by these genes and found that one of them serves as the LCPA-synthesizing enzyme. We also developed a method to produce and isolate LCPAs from recombinant Escherichia coli cells. In vitro experiments showed that the purified LCPAs promotes silica formation from silicic acid.

研究分野：生物工学

キーワード：細菌 ケイ素 ポリアミン

1. 研究開始当初の背景

(1) 珪藻・海綿における LCPA の発見

珪藻や海綿といった一部の生物は、細胞内で無機鉱物であるシリカ(SiO₂)を形成する能力を有する。特に珪藻が形成するシリカ被殻は、現在の微細加工技術では再現することが困難なほどの精密なナノ・マイクロパターン構造を有する。珪藻のシリカの内部には、多数のアミノ基を有する長鎖ポリアミン(long-chain polyamine; LCPA)が存在することが2000年に初めて報告され(文献1)、次いで海綿のシリカの内部からもLCPAが発見された(文献2)。系統的に大きく異なるシリカ形成生物にLCPAが共通して存在し、その他の生物において報告例がないことから、LCPAはシリカ形成において重要な役割を果たしていると予想される。In vitroでの機能解析の結果から、LCPAは精密なシリカの構造形成に関与していると予想されている(文献3)。

一方で、LCPAの発見以来約20年に渡って、その生合成経路は不明のままであった。この間、数多くの研究(例えば文献4, 5)が実施されたにもかかわらず、LCPA合成酵素は未だ同定されていなかった。生物による洗練された鉱物形成メカニズムを明らかにし、ナノテクノロジー分野へと応用するためには、シリカ形成におけるLCPAの役割を解析することが重要だと考えられる。しかし、LCPA生合成経路が解明されていないため、遺伝子破壊株や変異体を用いた機能解析ができず、LCPAの機能を解析する上で大きな障壁となっていた。

(2) シリカ形成細菌における LCPA の発見

我々は、普遍的に存在する土壌細菌である *Bacillus cereus* やその近縁種が細胞内でシリカを形成する能力を有し、シリカの層で孢子(芽胞)表面をカプセル状に覆っていることを発見した(文献5, 6)。また、珪藻や海綿の場合と同様に、本菌のシリカ層の内部にもLCPAが存在することを発見した。

本菌のシリカ層より得られたLCPAの構造と、代表的なポリアミンであるプトレシン・スペルミジン・スペルミンの生合成経路を図1に示す。アルギニンからプトレシンが合成され、それに続くアミノプロピル基の転移反応によってスペルミジン、スペルミンへと伸長していく。前述の通り、LCPAの生合成経路は未解明だが、このアミノプロピル基転移反応が繰り返されることで合成されていると予想される(図1の予測合成経路)。異なる鎖長のLCPAが多数検出されていることから、LCPA合成酵素は長さの異なる複数のポリアミンを基質としてアミノプロピル基転移反応を触媒することで、LCPAを伸長していると考えられた。なお、ポリアミンの伸長反応におけるアミノプロピル基供与体は、S-アデノシルメチオニン(SAM)の脱炭酸によって生じるdecarboxylated SAM(dcSAM)である(図1)。この反応はSAM脱炭酸酵素によって触媒される。

既知のポリアミン合成酵素との相同性を指標に、LCPA合成への関与が疑われる遺伝子を探索した。発見された複数の候補遺伝子について遺伝子破壊株を作製し、LCPA合成能の検証を行ったところ、LCPAの合成に必要なオペロンを同定することに成功した。

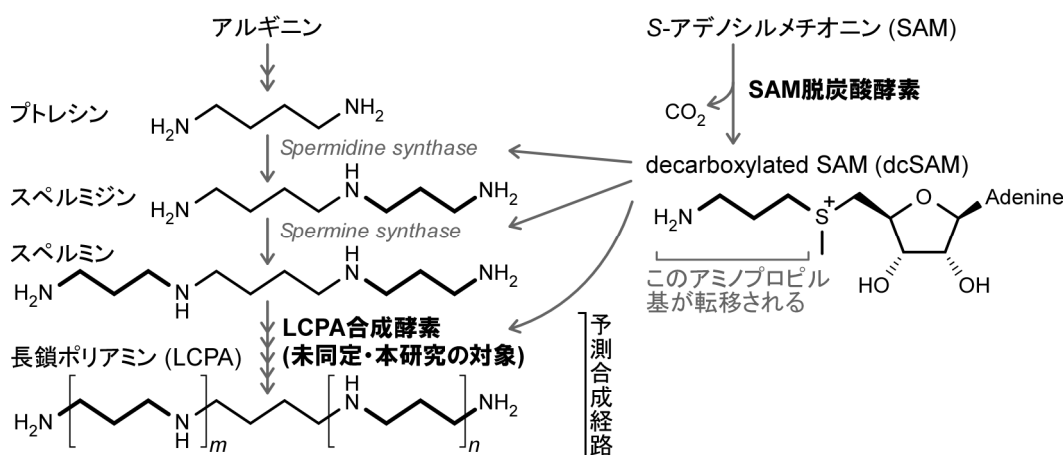


図1 LCPAの予測合成経路

2. 研究の目的

本研究では、発見したオペロン中の遺伝子によってコードされるタンパク質の機能を詳細に解析することで、LCPA合成酵素を同定し、LCPA生合成系の全容を解明することを主な目的とした。また、その過程で得られる知見を活用して、シリカ形成におけるLCPAの機能を解明し、生物による精密な鉱物形成メカニズムの本質に迫ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 組換えタンパク質の発現と機能解析

組換えタンパク質の発現のために、発見したオペロン中の各遺伝子をそれぞれタンパク質発現用プラスミドに挿入した。また、複数の遺伝子をオペロンごと挿入したプラスミドも作製した。作製したプラスミドを導入した大腸菌を培養し、複数の条件で目的タンパク質の発現を誘導した。遠心分離によって回収した菌体を超音波処理にて破碎し、菌体抽出液を調製した。菌体抽出液に含まれるポリアミンを HPLC により鎖長ごとに分離して検出することで、大腸菌細胞内で発現した組換えタンパク質によって LCPA が合成されたかを検証した。

また、個別に発現した組換えタンパク質をそれぞれ精製し、*in vitro* で酵素反応を触媒するか検証した。

(2) タンパク質の局在解析

目的とするタンパク質の全長もしくはその一部を融合した緑色蛍光タンパク質(GFP)を、*B. cereus* 内で発現するためのプラスミドを作製した。得られたプラスミドをエレクトロポレーションによって *B. cereus* 野生株に導入した。得られた形質転換体を貧栄養培地で 72 時間培養し、孢子形成を誘導した。経時的に培養液をサンプリングし、蛍光顕微鏡を用いて菌体を観察した。

(3) 遺伝子破壊株が形成するシリカの単離と観察

LCPA を合成できない遺伝子破壊株を、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のケイ酸を含む貧栄養培地で 72 時間培養し、孢子形成を誘導した。得られた孢子を強酸中で加熱することで有機物を分解し、酸に不要な画分を超遠心分離によって回収した。得られた沈殿を純水で繰り返し洗浄した後、電子顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 組換えタンパク質の発現と機能解析

発見したオペロン中の遺伝子を大腸菌にて発現し、細胞内で生産されたポリアミンを解析した。それぞれの遺伝子を単独で発現した場合は LCPA の存在が認められなかったのに対し、オペロン中の二つの遺伝子を共発現した場合は顕著な量の LCPA が検出された。この結果より、両者の遺伝子産物が協奏的に働くことが LCPA 合成に重要であることが示唆された。

それぞれの組換えタンパク質を精製し、酵素活性を調査したところ、うち一方が単独で LCPA 合成酵素としての活性を発揮することを確認した。もう一方のタンパク質は SAM 脱炭酸酵素として機能すると考えられた。大腸菌内で前者だけを発現しても LCPA の合成が認められなかったのは、宿主由来の SAM 脱炭酸酵素による dcSAM の供給量が LCPA を合成するのに充分でなかったためだと考えられた。

(2) タンパク質の局在解析

LCPA 合成活性を有するタンパク質の細胞内における分布を解析したところ、孢子表面に局在することが判明した。なお、本タンパク質の N 末端側にはグルタミン残基とリジン残基が多く含まれる特徴的な領域が存在する。欠変異体を用いた解析の結果、本領域が孢子表面への局在に必要であることが明らかとなった。本タンパク質は、シリカ層が形成される孢子表面に N 末端領域を介して局在し、そこで LCPA を合成することでシリカ形成に関与していると考えられた。

(3) LCPA 精製法の開発

項目 1 の成果によって、LCPA を大腸菌細胞内で合成することが可能となった。LCPA の機能を詳細に解析するためには、組換え大腸菌の菌体抽出液に含まれる LCPA を精製する必要がある。シリカ形成生物において LCPA はシリカと相互作用した状態で存在していることから、*in vitro* においてもシリカに吸着すると予想し、シリカ粒子を担体とした LCPA 精製法を以下のように開発した。

組換え大腸菌の菌体抽出液にトリクロロ酢酸を添加してタンパク質を変性させた後、遠心分離によって変性タンパク質を除去した。上清を中和した後、シリカ粒子を添加して混合することで LCPA をシリカ表面に吸着させた。シリカ粒子に吸着した LCPA を解離させるための条件を検討したところ、酸処理によって溶出できることを発見した。本手法によって LCPA を高純度に精製できることを確認した。得られた画分を透析して酸を除去し、以降の実験に用いた。

(4) LCPA のシリカ重合活性の評価

前項で開発した手法によって精製した LCPA を HPLC に供して鎖長ごとに分離し、異なる鎖長の LCPA が含まれる複数の画分として回収した。それぞれの画分のアミノ基濃度が等しくなるよう調整した後、各画分のシリカ重合活性を測定した。アミノ基あたりのシリカ重合活性を短鎖のポリアミンと比較したところ、LCPA の方が顕著に高い活性を示すことが判明した。

(5) 遺伝子破壊株が形成するシリカの単離と観察

生体内でのシリカ形成における LCPA の機能の解明に向けて、LCPA を合成できない遺伝子破壊株の孢子よりシリカを単離し、走査型ならびに透過型の電子顕微鏡による観察を行った。野生株が形成するシリカと比較したが、顕著な違いは認められなかった。また、培養の際に遺伝子破壊株によって取り込まれたケイ酸の量も野生株と同等であったことから、シリカの形成速度にも差がないことが示唆された。野生株と遺伝子破壊株の形成するシリカについて現状では明確な違いが認められなかったものの、シリカ内部に存在する LCPA が失われたことでシリカの物性が変化している可能性が考えられる。

<引用文献>

- N. Kröger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf, M. Sumper, Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2000, 14133-14138
- S. Matsunaga, R. Sakai, M. Jimbo, H. Kamiya, Long-chain polyamines (LCPAs) from marine sponge: Possible implication in spicule formation, ChemBioChem 8, 2007, 1729-1735
- M. Sumper, N. Kröger, Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins, J. Mater. Chem. 14, 2004, 2059-2065
- P. Romer, A. Faltermeier, V. Mertins, T. Gedrange, R. Mai, P. Proff, Investigations about N-aminopropyl transferases probably involved in biomineralization, J. Physiol. Pharmacol. 59 (Suppl. 5), 2008, 27-37
- A.J. Michael, Molecular machines encoded by bacterially-derived multi-domain gene fusions that potentially synthesize, *N*-methylate and transfer long chain polyamines in diatoms, FEBS Lett. 585, 2011, 2627-2634
- R. Hirota, Y. Hata, T. Ikeda, T. Ishida, A. Kuroda, The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores, J. Bacteriol., 192, 2010, 111-116
- K. Motomura, T. Ikeda, S. Matsuyama, M.A.A. Abdelhamid, T. Tanaka, T. Ishida, R. Hirota, A. Kuroda, The C-terminal zwitterionic sequence of CotB1 is essential for biosilicification of the *Bacillus cereus* spore coat, J. Bacteriol., 198, 2016, 276-282

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshi Ikeda	4. 巻 85
2. 論文標題 Bacterial biosilicification: a new insight into the global silicon cycle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1324-1331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takeshi Ikeda, Yukihide Nakasugi, Kohjiro Yamamoto, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
2. 発表標題 The biosynthetic pathway of long-chain polyamines in the biosilicifying bacterium <i>Bacillus cereus</i>
3. 学会等名 Biomim XVI (16th International Symposium on Biomineralization) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中杉 行秀, 舟橋 久景, 廣田 隆一, 黒田 章夫, 池田 丈
2. 発表標題 組換え大腸菌を用いた長鎖ポリアミンの生産とシリカ重合活性の評価
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 丈, 中杉 行秀, 廣田 隆一, 黒田 章夫
2. 発表標題 Bacillus属細菌による芽胞表面へのシリカ層形成
3. 学会等名 第16回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 文, 廣田隆一, 黒田章夫
2. 発表標題 Bacillus cereusが芽胞表層に形成するシリカ層の内部から発見された長鎖ポリアミンの解析：合成酵素の発見とその局在解析
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2020 (第5回講演会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 文
2. 発表標題 固体材料表面と生体分子の相互作用の解析とバイオ融合マテリアル開発への応用
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会(例会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 文
2. 発表標題 固体材料表面と生体分子の相互作用の解析とバイオ融合マテリアル開発への応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Ikeda, Kohjiro Yamamoto, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda
2. 発表標題 Discovery of long-chain polyamines and their biosynthetic enzyme in the biosilicifying bacterium Bacillus cereus
3. 学会等名 BIOMIN XV (15th International Symposium on Biomineralization) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 文, 山本 光太郎, 廣田 隆一, 黒田 章夫
2. 発表標題 Bacillus cereusが形成するシリカ層の内部に存在する長鎖ポリアミンの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 文, 山本 光太郎, 廣田 隆一, 黒田 章夫
2. 発表標題 中温性グラム陽性細菌Bacillus cereusが孢子表面に形成するシリカ層より発見された長鎖ポリアミンの生合成系の解析
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第11回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関