
機関番号：31302

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380054

研究課題名 (和文) リボソーム蛋白質 L10 がアンチザイムとして作動する新規ポリアミン合成制御機構

研究課題名 (英文) New regulation mechanism of polyamine biosynthesis mediated by ribosomal protein, L10 as an antizyme

研究代表者 神尾 好是 (KAMIO YOSHIYUKI)

東北学院大学・環境防災工学研究所・客員教授

研究者番号：00109175

研究成果の概要 (和文)：次の3事実を明らかにした。

(1) カダベリン合成酵素LDCがリボソーム構成タンパク質L-10によりその合成が制御されていること、さらに*S. ruminantium* L-10にのみ存在し、他の細菌のL10では欠損している二つの領域、A領域 (K¹⁰¹NKLD¹⁰⁵) および B領域 (G¹⁶⁰VIRNAVYVLD¹⁷⁰) 両領域がLDCに対して結合活性を持ち本LDC-L10複合体がATP依存性プロテアーゼにより分解される。

(2) *S. ruminantium*の染色体DNAよりLDC-L10複合体を特異的に分解するATP依存性プロテアーゼの3つの候補遺伝子のクローニングに成功した。

(3) *Selenomonas ruminantium* のペプチドグリカン (PG) に共有結合して存在するカダベリンが本菌の外膜の主要タンパク質Mep45のN-末端領域に存在するSLHドメインがペリプラズム空間で本PG結合型カダベリンと特異的に結合して、外膜を安定化させている。

研究成果の概要 (英文)：

Selenomonas ruminantium, which is a strictly anaerobic, Gram-negative bacterium has neither free nor bound forms of lipoprotein which plays an important role of the maintenance of the structural integrity of the cell surface in general Gram-negative bacteria. Instead, it has cadaverine, which links covalently to the peptidoglycan as a pivotal constituent for the cell division. In *S. ruminantium* cadaverine is synthesized constitutively from L-lysine by lysine decarboxylase (LDC) and transferred to the peptidoglycan as an essential constituent for normal cell growth. Furthermore, *S. ruminantium* LDC has two unique characteristics; (1) it has decarboxylase activity towards both L-lysine and L-ornithine. (2) biochemical feature is similar to that of eukaryotic ornithine. Here, we found the following evidences, i.e.

- (1) *S. ruminantium* LDC was dramatically degraded at the early stationary phase by ATP-dependent serine protease(s). This degradation proteolysis was required a degradation factor, which was named as P22. P22 was induced by the accumulation of putrescine in *S. ruminantium* cells, and it bound tightly to LDC with a K_D of 8.5×10^{-11} M. P22 seems to have similar biochemical and biophysical characteristics to those of an antizyme (AZ), which have been reported only in mammalian cells. P22 was identified as a ribosomal protein L10 of *S. ruminantium*. The binding of L10 to LDC for forming LDC-L10 complex may cause a conformational change(s) of LDC subunit, which allow it to be attacked by ATP-dependent serine protease(s), and the LDC would be broken down to small peptides. We also identified the two regions, A region (K¹⁰¹NKLD¹⁰⁵) and B region (G¹⁶⁰VIRNAVYVLD¹⁷⁰) in L-10 molecule essential for its binding to LDC.
- (2) We identified the ATP-dependent serine protease(s), which is involved in the degradation of *S. ruminantium* LDC. There were three genes for ATP-dependent protease chromosomal in *S. ruminantium* and we focused on one of them, which belongs to ClpXP protease(s) since they require an adapter protein. ClpXP protease consists of the ClpX ATPase and the ClpP peptidase. In *S. ruminantium*, L10 may work as an adapter protein and carry the LDC to ClpXP protease. We

cloned ClpP gene from *S. ruminantium* into pET15b and expressed it in *E. coli* BL21 (DE3) and purified.

- (3) Cadaverine covalently linked to the peptidoglycan is required for the interaction between the peptidoglycan and the S-layer homologous (SLH) domain of the major outer membrane protein, Mep45. Here, using a series of diamines with a general structure of $\text{NH}_3^+ (\text{CH}_2)_n \text{NH}_3^+$, $n = 3-6$, we found that cadaverine ($n = 5$) specifically serves as the most efficient constituent of the peptidoglycan to acquire the high resistance of the cell to the external damage agents, and is required for the effective interaction between the SLH domain of Mep45 and the peptidoglycan facilitating the correct anchoring of the outer membrane to the peptidoglycan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・微生物機能学

キーワード：(1) アンチザイム (2) リボソーム蛋白質 L-10 (3) L10 遺伝子 (4) ポリアミン合成制御機構 (5) ペプチドグリカン結合型ポリアミン (6) *Selenomonas ruminantium*

1. 研究開始当初の背景:

カダベリン、プトレシン、スペルミジン、及びスペルミンに代表されるポリアミンは、すべての生体内に存在する脂肪族アミンである。生体内でポリアミンは、遊離の形で存在して酸性生体成分とイオンの相互作用し、核酸や蛋白質の合成促進、酵素活性の調節などの生理作用を発揮することが報告されてきた。ところが1981年以降、研究代表者らにより、(1) 反芻動物第一胃内に生息する嫌気性菌、*Selenomonas ruminantium* の細胞壁 PG の D-Glu 残基に共有結合して存在するカダベリン、(2) 本共有結合を触媒するリポド中間体：ポリアミン転移酵素、(3) カダベリンの欠損時に起きる PG からの外膜の剥離、及びそれに誘発される細胞死、等が発見され生体高分子に共有結合して存在するポリアミンの新規生理機能の発見として注目を集めた。さらに、*S. ruminantium* は、一般の G(-) 菌に存在して表層構造の安定に必須なムレイニンリポ蛋白質を欠き、さらに遺伝子においては *tol-pal* gene cluster を欠くことから、本菌における PG 結合型カダベリンが関与する新規な表層膜安定機構の解明が期待された。そして2010年、PG 結合型カダベリンが、本菌の外膜主要蛋白質 Mep45 のペリプラズムに露出した 46-アミノ酸残基

から成る SLH ドメインを介した外膜-PG 間の強固なアンカーとなり、表層構造の安定に必須物質として存在することが証明された。一方、*S. ruminantium* における LDC の研究で、「原核生物では存在しない」とされていたアンチザイム (AZ) を介した真核生物型ポリアミン分解制御機構が発見された。しかも本菌において、真核生物で報告された AZ とは分子の実体が異なり、リボソーム 50S サブユニット L10 (発見当初は P22 と命名された) が AZ として機能していた。*S. ruminantium* の L10 の構成アミノ酸配列には、既知の原核生物の L10 には存在しない 2 領域 (A, B 領域) が存在し、両領域とも AZ 活性に必須であった。その後、真核生物型オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) を有する超高温性真正 G(-) 細菌 *Aquifex aeolicus* 及び *Thermotoga maritima* にも *S. ruminantium* L10 の存在が見出された。これまで、マウスにおいて過剰のポリアミン蓄積時で見られるポリアミン誘導性の調節蛋白質 AZ を介した ODC 分解制御機構が解明されているが、下等生物では高等生物に見られるような負のフィードバック機構は存在しないと考えられてきた。しかるに、我々の発見した L10 を介したポリアミン分解制御機構は原核生物で見つかった初の負の制御機構であった。以上のように、ポリアミ

ン結合型細胞壁をもつ細菌で、リボソーム構成蛋白質 L10 が分解制御因子として機能する新たな真核生物型ポリアミン分解制御機構の発見は国内外で初めてである。また、本機構はリボソーム蛋白質の新機能解明のための絶好の材料である。また、PGのD-Glu残基へのカダベリンの共有結合の分子機構、並びに外膜 SLH ドメインを介した外膜-PG 間の強固な結合に關与するカダベリンの役割の分子機構は未解明である。従って、本研究で我々は、(1) *S. ruminantium* の LDC をモデルとして、L10 を介した ATP 依存性プロテアーゼによる蛋白質分解機構の全貌を、分子および原子レベルで解明すると共に、(2) PG 結合型カダベリンの外膜安定機構、を分子並びに原子レベルで解明することに至った。

2. 研究の目的

(1) リボソーム蛋白質 L10 が AZ として作動する ATP 依存性セリンプロテアーゼによる LDC 分解制御機構解明：以下の2点に焦点をあわせ、LDC 分解制御機構を究明する。

- ① L-10 の特性並びに大量発現系の構築
- ② ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子のクローニング、組み換え酵素の特性ならびに大量調製

(2) ペプチドグリカン (PG) 結合カダベリンの外膜安定性機構の解明：外膜主要蛋白質 Mep45 の SLH ドメイン-PG 間の結合に係るカダベリンの重要性の証明

3. 研究の方法

(1) L10 の特性解明並びに水可溶性 L-10 の大量発現系の構築：L10 の LDC への結合アミノ酸残基を同定する。既に LDC における L10 結合部位が決定され、さらに結合常数が 8×10^{-11} と決定された。L10 は大腸菌を含む一般の真正細菌のリボソーム構成蛋白質 RplJ (RplJ) とアミノ酸配列で 80% 以上の相同性を有しているが、大腸菌の RplJ には LDC 分解促進活性が見られなかった。既に L10 にのみ存在し、他の細菌の RplJ では欠損している二つの領域、A 領域 (K¹⁰¹NKLD¹⁰⁵) および B 領域 (G¹⁶⁰VIRNAVYVLD¹⁷⁰) の両領域が L10 の機能に必須であるかを変異蛋白質を作成し、これらが LDC に対して結合活性および分解促進活性を持つか否かを検証し、両領域の L10 機能の必須性を確認する。

水可溶性 L-10 の大量発現系は *E. coli* BL21 (pCold L-10) を駆使して行う。

(2) ATP 依存性プロテアーゼの特性の解明、並びに遺伝子のクローニング：

既に LDC 分解に關与するプロテアーゼ活性の無細胞測定系を確立し、本プロテアーゼが細胞質内に存在し、ATP 依存性であることを明らかにした。マウス ODC は 26S プロテアソームと呼ばれる巨大なプロテアーゼ複合体により分解されるが、このような分子は現在までに細菌では見出されていない。従って、本プロテアーゼの特性を明らかにする。

ATP 依存性プロテアーゼのクローニングは次の手法で行う。既に申請者等の提案により、NITE により *S. ruminantium* の全ゲノム配列決定されたので、これを参考に本菌から本プロテアーゼ遺伝子を予測しクローニングを行う。現在、SR1_chromosome_1826 (ClpP) が候補遺伝子として絞られた。SR1_chromosome_1826 (ClpP) は ATP-binding subunit に相当する ClpX と hetero-dimer を形成する、ATP 依存的な Clp protease である。ClpX は SR1_chromosome_1625, SR1_chromosome_0349 に相当し、本菌ゲノム上に ClpX に相当する ORF が 2 つ存在することが明らかになったので、これら候補遺伝子を大腸菌にクローニングした後、リコンビナント蛋白質を得た後、既に確立した本プロテアーゼ活性測定系で確認する。

大量のリコンビナント酵素の大量発現系は L-10 同様に *E. coli* 系を駆使して行う。本酵素標品は結晶構造解析用に使用する。

(3) 外膜主要蛋白質 Mep45 の SLH ドメイン-PG 間の結合に係るカダベリンの重要性の証明：*S. ruminantium* を difluoromethyl ornithine (LDC 阻害剤) + プトレシン (C4-ジアミン) もしくはジアミノヘキサン (C6) 存在下で生育させると、本菌の PG 結合カダベリン (C5) はそれぞれ完全に C4 もしくは C6 に変換される。興味あることに、菌の 37°C での生育並びに形態は正常に見えたが、SDS (80 μg/ml) あるいは novobiocin (2 μg/ml) 存在下では、野生株 (C5) のみが生育可能であった。また 43°C での生育についても野生株のみが生育可能であった。従って、本項目では、C4, C5, C6 結合 PG を精製し、無細胞系でこれら 3 分子種の PG と Mep45 の SLH ドメインとの親和性を温度等の条件を考慮して Biacore で測定する。一方、生菌においては crystal violet 等、種々の色素の表層膜透過性について比較検討し、PG 結合カダベリンの存在特異性の重要性を証明する。

4. 研究成果：

(1) ATP 依存性セリンプロテアーゼ候補遺伝子の取得：

これまで、*S. ruminantium* から本プロテアーゼの精製を試みてきたが、LDC 酵素蛋白質の分解を指標とする活性測定方法の煩雑さに加えて、精製過程において非常に失活しやすい本プロテアーゼの性質から、成功していなかった。そこで今回は、東北大学大学院農学研究科および NITE (独立行政法人製品評価技術基盤機構) との共同研究によって、2009 年に決定された *S. ruminantium* の全ゲノム配列 (投稿準備中) を参考にしたアプローチにより、本プロテアーゼの候補となる ATP 依存性セリンプロテアーゼ遺伝子を取得することとした。

S. ruminantium のゲノム上に予測されていた 3,734 の open reading frames (2009 年 11 月時点) の中から、まずペプチダーゼ候補遺伝子 123 件を抽出し、これらについてペプチダーゼのデータベースである MEROPS⁵⁾ を参照した結果、セリンプロテアーゼ候補遺伝子が 13 件抽出された。さらに ATP 依存性と推測されるプロテアーゼ遺伝子を絞り込んだ結果、SR1_chromosome_0011 (ATP-dependent protease, 1,989 bp, 662 アミノ酸残基をコード)、SR1_chromosome_1624 (ATP-dependent protease La, 2,304 bp, 767 アミノ酸残基をコード)、および SR1_chromosome_1626 [ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (*clpP*), 612 bp, 203 アミノ酸残基をコード] の 3 遺伝子が候補として浮かび上がった。この中でも特に、SR1_chromosome_1626 遺伝子に着目した。本遺伝子産物と推定される ClpP 型プロテアーゼは、真核生物 ODC の分解に関わる巨大プロテアーゼ複合体である 26S プロテアソームの原型ともされ、リング上の 7 量体あるいはそれが 2 つ積み重なった 14 量体を形成し、蛋白質分解活性の発現には AAA⁺ super family に属する ATP 結合サブユニット (リング上の 6 量体を形成し、ATPase 活性を有する) との巨大複合体を形成する必要がある。また、基質となる蛋白質に存在するプロテアーゼ複合体により認識されるシグナル配列、または認識を仲介するアダプター蛋白質が必要であることも知られており、*S. ruminantium* LDC 分解機構における L10 がアダプターとして機能している可能性も考えられた。他の 2 つの候補遺伝子産物と相同性の高いプロテアーゼにおいては、このようなアダプター因子は必要ないとされている。

以上のことより、まず SR1_chromosome_1626 遺伝子産物である ClpP 型プロテアーゼによる *S. ruminantium* LDC の L10 依存的な分解を検証するため、

本遺伝子をクローニングすることとした。また、AAA⁺ family に属する ATP 結合サブユニット相当遺伝子 (*clpP*) として、本菌ゲノム上には SR1_chromosome_1625 (1,266 bp, 421 アミノ酸残基) および SR1_chromosome_0349 (1,278 bp, 425 アミノ酸残基) の 2 つが存在したが、前者が SR1_chromosome_1626 (*clpP*) の下流に位置してクラスターをとっていたため、同時にクローン化を行った。

(2) 候補プロテアーゼの大量発現系の構築と組換え蛋白質の精製:

S. ruminantium の培養菌体から調製した熱抽出物を鋳型とし、PCR により得た SR1_chromosome_1626 (*clpP*) および _1625 (*clpP*) を含む約 1.9 kbp の増幅断片を、プラスミド pET15b にクローン化して両遺伝子の発現用プラスミド pXP7 を構築した。pXP7 からは、T7 プロモーターの制御下に *clpP* および *clpX* をタンデムに発現させられると予想した。pXP7 を大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し発現を誘導した結果、可溶性画分に SR1_chromosome_1626 遺伝子産物 (*S. ruminantium* ClpP、以後 sClpP と記す) と推定される約 24 kDa の蛋白質が大量に得られた。しかし、クラスター下流の SR_chromosome_1625 (*clpP*) 遺伝子産物については明確な発現を確認できなかったことから、別途、単独での発現系を構築中である。

大量発現を確認できた sClpP の精製を、当初、組換え蛋白質の N 末端に付加した His-Tag を利用して Co²⁺ カラムを用いて試みたが、どうしてもカラムに吸着させることができなかった。後にも述べるが、組換え sClpP の N 末端配列が、高次構造をとった sClpP 7 量体の内部に入り込んでいることなどが原因と推測された。そこで、ポリエチレンジアミンを用いた塩析、DEAE-5PW 陰イオン交換クロマトグラフィー、およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行い、100 ml の培養菌体 (265 mg 湿菌重) から SDS-PAGE で単一バンドとなる精製標品 1.6 mg を得た。

(3) 精製プロテアーゼ標品のペプチダーゼ活性測定、および N 末端アミノ酸配列の解析

ゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出結果より、精製標品中の sClpP は 14 量体と 7 量体が 8:2 の比率で存在していると推測された。一般に、ClpP 型プロテアーゼの 14 量体は、ATP 結合サブユニットとの複合体を形成していない状態では、短いペプチドを分解できることが知られている。基質として

N-succinyl-Lue-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Suc-Lue-Tyr-AMC) を用い、ペプチダーゼ活性により遊離する AMC の蛍光強度を測定することでペプチダーゼ活性を評価した⁶⁾。その結果、sClpP 精製標品が本活性を有することが確認でき、比活性は 0.685 pmol/h· μ g of protein と求められた (図 2-B)。これは、大腸菌 ClpP のペプチダーゼ活性 (1,667 pmol/h· μ g of protein)⁶⁾と比較すると、約 1/2,430 という低い値であった。他の既知の ClpP 型プロテアーゼとの違いについては諸性質を検討し、本プロテアーゼの特性を明らかにする必要がある。

また、抗 His-Tag 抗体による免疫染色において、菌体破碎直後は検出できた組替え sClpP が、精製標品では染色されないという現象が見られたことから (データ省略)、精製標品の N 末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、付加した His-Tag を含むベクター由来の 20 アミノ酸残基、およびそれに続く sClpP 由来の 2 アミノ酸残基までが消化されていた。精製過程において自己分解が起きている可能性が示唆されたが、His-Tag が検出される状態でも Co^{2+} カラムに吸着しなかったことや、ClpP 型プロテアーゼの活性中心が 7 量体リング構造の内部にあることなどを含め、自己分解については今後の詳細な検討が必要である。

(4) 外膜主要蛋白質 Mep45 の SLH ドメイン-PG 間の結合に係るカダベリンの重要性の証明: DL- α -difluoromethylornithine (DFMO) を用いて本菌の LDC を阻害しつつ、構造の異なる他のポリアミン種 ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2$, $m=3-6$) を培地に添加して PG に取り込ませた。各種 PG それぞれに対して Mep45 の SLH domain との結合解析を行ったところ、Cad ($m=5$) 結合型 PG に特異的に強く結合した。また、Cad 以外のポリアミン ($m=3, 4, 6$) 結合型 PG を保持する細胞では、外膜の PG からの剥離、および細胞の薬剤耐性の低下が見出された。よって本菌の外膜-PG 間接着構造は PG と SLH domain 間の結合の強弱に依存すると推察され、その中で Cad は両者の相互作用の促進機能を担うと考えられた。

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 6 件)

- (1) Cadaverine covalently linked to the peptidoglycan serves as the correct constituent for the anchoring

mechanism between the outer membrane and peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*, S. Kojima, J. Kaneko, N. Abe, Y. Takatsuka, and Y. Kamio, *J. Bacteriol.*, 193, 2347-2350 (2011). 査読有

- (2) Cadaverine covalently linked to the peptidoglycan is required for the interaction between the peptidoglycan and periplasm-exposed SLH domain of major outer membrane protein Mep45 in *Selenomonas ruminantium*. S. Kojima, K-C. Ko, Y. Takatsuka, N. Abe, J. Kaneko, Y. Itoh, and Y. Kamio, *J. Bacteriol.*, 192, 5953-5961 (2010). 査読有
- (3) Structural basis for translation factor recruitment to the eukaryotic/archaeal ribosomes, T. Naganuma, N. Nomura, M. Yao, M. Mochizuki, T. Uchiumi and I. Tanaka, *J. Biol. Chem.* 285, 4747-4756 (2010). 査読有
- (4) The membrane lipoprotein LppX of *Paenibacillus* sp. W-61 serves as a molecular chaperon for xylanase of the glycoside hydrolase family 11 during secretion across the cytoplasmic membrane. M. Fukuda, S. Watanabe, J. Kaneko, Y. Itoh, and Y. Kamio, *J. Bacteriol.*, 191, 1641-1649 (2009). 査読有
- (5) Occurrence of agmatine pathway for putrescine synthesis in *Selenomonas ruminantium*. S. Liao, P. Poonpoairoj, K. Ko, Y. Takatsuka, Y. Yamaguchi, J. Kaneko, and Y. Kamio, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 444-455 (2008). 査読有
- (6) Two segments in bacterial antizyme P22 are essential for binding and enhance degradation of lysine/ornithine decarboxylase in *Selenomonas ruminantium*. Y. Yamaguchi, Y. Takatsuka and Y. Kamio, *J. Bacteriol.* 190:442-446 (2008). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 児島征司、他 4 名、*Selenomonas ruminantium*におけるペプチドグリカン (PG) 結合型カダベリンを介した外膜-PG 間接着機構の解析、日本農芸化学会、2011年3月26日、京都女子大学
- (2) 沼子仁志、他 5 名、リボソーム蛋白質L-10がアンチザイムとして作動するポリアミン合成制御機構の解明: ATP依存性プロテアーゼノ探索、日本農芸化学会、2011

年3月26日

- (3) 児島征司 他4名、*Selenomonas ruminantium*におけるペプチドグリカン(PG)結合型カダベリンを介した外膜-PG間接着機構の解析、日本ポリアミン学会第2回年会、帝京大学宇都宮キャンパス、2011年1月27日~28日
- (4) 児島誠司(3名)、*Selenomonas ruminantium*細胞表層におけるポリアミン分子種の機能解析、日本農芸化学会、2009年3月27日、マリンメッセ福岡(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神尾好是 (KAMIO YOSHIYUKI)
東北学院大学・環境防災工学研究所・客員教授
研究者番号：00109175

(2) 研究分担者

田中勲 (TANAKA ISAO)
北海道大学・大学院先端生命科学研究科・教授
研究者番号：70093052

高塚由美子 (TAKATSKA YUMIKO)
山形大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：70570810
(H20：研究分担者)