

機関番号：11301
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21880011
 研究課題名（和文）
 人工膜小胞への再構成系を用いたスペルミジン排出輸送体の基質輸送メカニズムの解析
 研究課題名（英文）
 Study of substrate transport mechanism of spermidine exporter by means of proteoliposome
 研究代表者
 七谷 圭 (NANATANI KEI)
 東北大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：00547333

研究成果の概要（和文）：

原核生物の浸透圧ストレス適応とポリアミンの関わりを理解することを目的とし、単分子 FRET の技術を用いて、ポリアミン輸送体と同じファミリーに属する ABC トランスポーターの一分子観察を行い、基質輸送メカニズムの解明に挑んだ。また、ラン藻におけるポリアミン合成と塩ストレス適応の相関解明に向け、アルギニン脱炭酸酵素(ADC1, ADC2)の破壊株を造成し、ADC1, ADC2 がバイオフィーム形成による塩ストレス適応に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to understand the relationship of intracellular polyamine and osmotic stress adaptation in bacterial cells. We investigated the polyamine transport mechanism of the ABC transporter by using the single molecule FRET technology. In addition, we reveal the contribution of polyamine synthetic enzymes (ADC1 and ADC2) to biofilm formation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under salt stress condition by means of *adc1* and *adc2* gene knockout mutants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ポリアミン、トランスポーター、単分子 FRET、リポソーム、塩ストレス適応

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは正に帯電した低分子の脂肪族炭化水素の総称で、ほぼすべての生物に存在しており、細胞分裂や DNA の複製、タンパク質の合成促進などの細胞内の過程や、各種ストレス適応などにおいて重要な役割を果たしている。哺乳動物では、脳梗塞や腎不全といった重篤な生活習慣病と、ポリアミン

の代謝産物であるポリアミンオキシダーゼやポリアミンの代謝産物であるマクロレインの絶対量に強い相関関係があることが明らかになってきており、これらの疾患の早期発見のためにバイオマーカーとしての利用が期待されている。このように医学面で大きな注目を集めるポリアミンであるが、植物や微生物に関しても、ポリアミンの細胞内濃度

が各種ストレスに応答して変動することからポリアミンが環境ストレス適応に関与していることが示唆されている。

ポリアミンは、このように生物の存在に必須である一方、過剰に存在すると生育を阻害するため、細胞内のポリアミン濃度は厳密に調節されており、その調節機構を理解することは重要である。

2. 研究の目的

本課題研究では、様々な環境に適応して生存する微生物（大腸菌、ラン藻）の浸透圧ストレス適応とポリアミンの関わりについて、明らかにすることを目的とした。

生体内におけるポリアミンの含量は、①合成、②分解、③取り込み、④排出によって厳密に制御されている。本研究では、①合成（研究内容3）、③取り込み（研究内容2）、④排出（研究内容1）に着目し、微生物のストレス適応におけるポリアミンの役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) Mdt 系のポリアミン輸送機能の解析

ポリアミンの排出（④）に関しては、大腸菌のポリアミン排出トランスポーター（MdtI, MdtJ）の存在が報告されたのみで（Higashi K. et al, (2008) J. Bacteriol., 190: 872-878）、詳細な機能解析は行われていない。そこで、本研究では、大腸菌からポリアミン排出輸送体（MdtJ, MdtI）をコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主とした膜蛋白質発現用プラスミド pTrc99A による発現系の構築を行った。さらに、界面活性剤を用いた精製系の構築を行い、人工膜小胞（プロテオリポソーム）再構成系を用いて、Mdt 系（MdtI, MdtJ）の詳細な機能の解析を試みた。

(2) 一分子 FRET を用いた膜輸送体の輸送体の動的構造変化の解析

大腸菌においてポリアミンの取り込み（③）は PotABCD の 4 種類のタンパク質（PotA, ATPase; PotB と PotC, 膜タンパク質; PotD, 基質結合タンパク質）により構成される ABC トランスポーターによって行われることが明らかにされた（Kashiwagi K, (1993) J. Biol. Chem.）。輸送体は、基質輸送時にダイナミックな構造変化を伴うと推定されている。そこで、ポリアミン輸送体の動的な構造変化をリアルタイムで観察するため、リポソーム上の輸送体一分子内で起こる FRET の計測技術を開発を行った。本手法は、膜輸送体を精製し、膜輸送体に蛍光ラベルを導入する。次に、輸送体をリポソームに再構成し、単分子蛍光観察装置を用いて単分子の蛍光発色団からの蛍光強度の変化を観察する手法である（図1）。

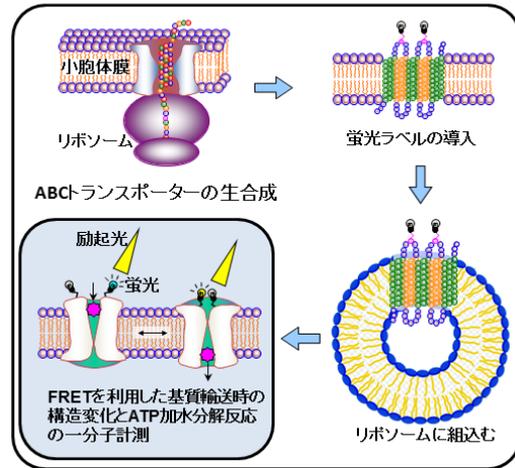


図1 一分子 FRET による構造変化解析概要

(3) 細胞内ポリアミン濃度と塩ストレス耐性の相関解析

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 は、シアノバクテリアの中でもっとも早くにゲノム解析が終了し、光合成生物のモデル生物とされている。また、比較的变化の大きい環境に適応し、生育することが可能である。これまでの研究から、*Synechocystis* sp. PCC6803 は、高塩濃度培地においてバイオフィームを形成するが、ソルビトールによる浸透圧ストレスでは形成しないことを見出した。*Synechocystis* sp. PCC6803 は、塩ストレス特異的にバイオフィームを形成することで外部環境と菌体を隔離し、自身を保護していると示唆された。ラン藻におけるポリアミン合成経路の解明に向け、アルギニン脱炭酸酵素（ADC1, ADC2）の破壊株を作製し、高浸透圧培地における生育を観察した。さらに、細胞内ポリアミン量やバイオフィーム形成量の定量を行った。

4. 研究成果

(1) Mdt 系のポリアミン輸送機能の解析

大腸菌を宿主として、MsbA を細胞膜に発現させ、菌体を破碎後、超遠心により膜画分を取得した。界面活性剤 DDM を用いて可溶化、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて、部分精製した。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィー（Superdex 200 column）に供し、完全精製タンパク質を取得した。精製蛋白質をリポソームに再構成し、詳細な輸送キネティクス解析を進めている。

(2) 一分子 FRET を用いた膜輸送体の輸送体の動的構造変化の解析

ポリアミン排出輸送体の基質輸送メカニズム解明に向け、輸送体一分子内で起こる FRET の計測技術を用いて、ポリアミン輸送体と同じファミリーに属する ABC トランスポーター MsbA の一分子観察を行った。

① 分子構造から一分子 FRET に適したラベル導入部位を検討し、可溶化精製したタンパク質を蛍光試薬 (Alexa532) でラベルし、蛍光強度の変化を検討した。(図 2)

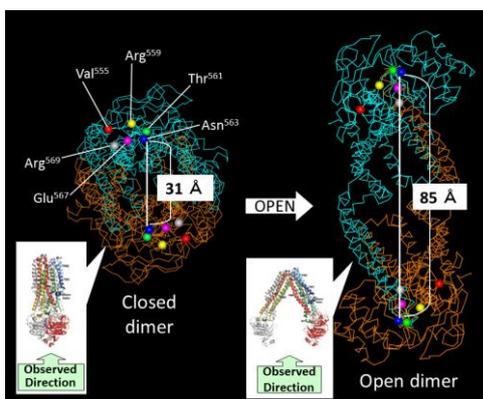


図 2 蛍光ラベル導入カ所の検討

② 発現・精製法の確立

大腸菌を宿主として、MsbA を細胞膜に発現させ、菌体を破碎後、超遠心により膜画分を取得した。界面活性剤 DDM を用いて可溶化、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて、部分精製した。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200 column) に供し、完全精製タンパク質を取得した。

③ 蛍光ラベル方法の確立

MsbA の結晶構造から蛍光導入箇所を検討し、12 種類の single cysteine 変異体の作製を行った。Ni-NTA で部分精製した single cysteine 変異体を 2 種類の異なる蛍光色素 (Alexa532, Alexa647) でラベルし、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200 column) に供し、フリーの蛍光色素を取り除いた。さらに、自作した高感度蛍光分光計を用いて ATP 加水分解による蛍光強度の変化を観察した。

④ リポソームの観察

蛍光物質 Alexa532 を封入したリポソームを一分子蛍光観察装置の流路に流し、リポソームがフローセル内の流路を流れる様子を観察し、リポソームを輝点として観察した。

⑤ 二色蛍光同時観察装置の開発

ダイクロイックミラーを用いて蛍光を CH1 (550 - 600 nm) と CH2 (600 nm-) に分解し、CCD カメラ上の異なる位置にイメージングできるように改良を加えた。これによって、二色の蛍光を同時に観察することが可能となった。

⑥ 一分子 FRET の観察に適した変異体の探索
任意のアミノ酸残基を Cys 残基に置換した 6 つの Single Cysteine 変異体を作製した。導入した Cys 残基を Alexa532 maleimide で修飾し、ATP 有・無の条件下で自作の高感度蛍光分光光度計を用いて蛍光強度の変化を観察した。3 つの変異体において ATP 存在下で優位な蛍光強度の増強が観察された。

⑦ 一分子蛍光観察装置による解析

⑥ で取得した変異体を一分子蛍光観察装置に流し、ATP 有・無において、一分子蛍光強度の時系列データを取得した。一分子蛍光強度分布から、ATP の添加により 50-100 a. u. 程度の強光側へのピークのシフトが観察された。また、LES (Local equilibrium state) 解析から、複数の構造状態が存在することが示唆された。

⑧ ABC トランスポーターの ATP 加水分解メカニズム解析

ABC トランスポーターの ATP 加水分解反応と構造変化の相関を明らかにするため、ATP, ADP, ATP・S (加水分解されない ATP アナログ), ADP/Vi の添加による蛍光強度の変化を観察した (図 3)。

ATP 添加により蛍光強度は増強されたが、ATP・S, ADP/Vi 添加では蛍光強度に変化がなかった。また、ADP 添加では ATP 添加時と比較して 50% 程度の蛍光強度の増強が観察された。以上の結果ら、MsbA はアナログとの結合だけでは構造変化を起こさず、ATP の加水分解によって初めて構造変化を起こすことが示唆された。また、ADP と結合した別のコンフォメーションが存在することが示唆された。

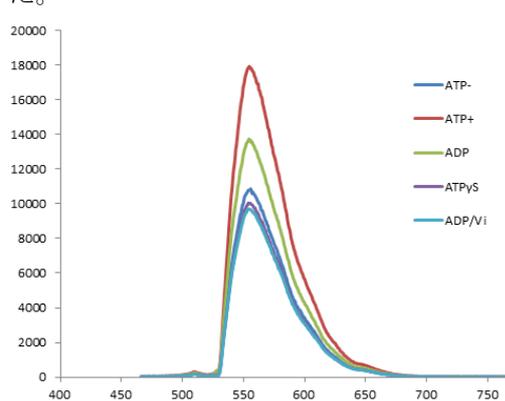


図 3 ATP アナログ結合による ABC トランスポーターに導入した蛍光の強度変化

(3) 細胞内ポリアミン濃度と塩ストレス耐性の相関解析

ラン藻におけるポリアミンと塩ストレス適応相関を明らかにするため、アルギニン脱炭酸酵素 (ADC1, ADC2) の破壊株を作製し、高浸透圧培地における生育を観察した。

① *adc1*, *adc2* 単独破壊株のポリアミン量の定量

Synechocystis 野生株 (WT), *adc1*, *adc2* 単独破壊株 (Δ *adc1*, Δ *adc2*), 二重破壊株 (Δ *adc1*/ Δ *adc2*) を基本培地 (BG11), 250mM, 500mM の NaCl を添加した BG11 で 7 日間培養し、培養液中および細胞中のポリアミン量 (SPD, PSM, PUT) を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。*Synechocystis* 菌体内ポリアミン量は、

WT> Δ adc1>> Δ adc2>> Δ adc1/ Δ adc2 の順に減少していた。また、すべての株で塩ストレスにより細胞内スペルミジン含量が減少していた(図4)。

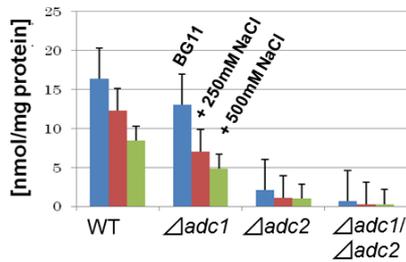


図4 Synechocystis 野生株 (WT), *adc1*, *adc2* 単独破壊株 (Δ *adc1*, Δ *adc2*), 二重破壊株 (Δ *adc1*/ Δ *adc2*) の菌体内のスペルミジン (ポリアミン) 含量

② *adc1*, *adc2* 破壊株のバイオフィーム形成

共焦点顕微鏡観察により、全ての株において NaCl の添加によりバイオフィーム形成量が増加することを確認した。また、*adc* 破壊株は野生株と比べてストレスの無い条件下でもバイオフィーム形成量が増加していた(図5)。これらの結果から、*Synechocystis* の菌体内スペルミジン含量とバイオフィーム形成量には負の相関があり、塩ストレスにより菌体内スペルミジン含量が減少すると、バイオフィーム形成量が誘導されると推定された。このことは、細胞内スペルミジン含量の減少した *adc* 破壊株では、塩ストレスの無い条件下でもバイオフィーム形成が観察されることとも一致した。

アルギニン脱炭酸酵素 (ADC1, ADC2) の破壊株は、塩ストレスの無い条件下でも細胞外多糖を生産したことから、細胞内ポリアミンの細胞外多糖生産制御への関与が示唆された。

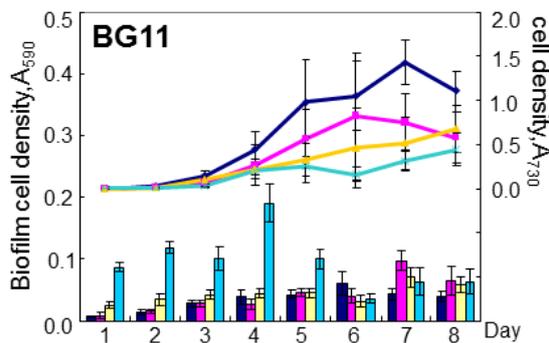


図5 Synechocystis 野生株 (WT), *adc1*, *adc2* 単独破壊株 (Δ *adc1*, Δ *adc2*), 二重破壊株 (Δ *adc1*/ Δ *adc2*) のバイオフィーム形成量

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 七谷圭, 阿部敬悦, 醤油乳酸菌におけるアスパラギン酸脱炭酸とエネルギー生成, 財団法人 日本醸造協会誌, 査読無, 106 巻, 2011, 190-201
- ② 七谷圭, 学会見聞録 2010 農芸化学学会大会 微生物 I, バイオサイエンスとインダストリー, 査読無, 68, 2010, 259
- ③ Kei Nanatani, Peter C. Maloney, and Keietsu Abe, Structural and Functional Importance of Transmembrane Domain 3 (TM3) in the Aspartate:Alanine Antiporter AspT: Topology and Function of the Residues of TM3 and Oligomerization of AspT, Journal of Bacteriology, 査読有, 191, 2009, 2122-2132

[学会発表] (計11件)

- ① 七谷圭, 高野洋佑, 鈴木石根, 四十九俊彰, 赤井政郎, 魚住信之, シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の浸透圧ストレス適応に関する膜輸送システム, 日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会, 2011 年 3 月 25-28 日, 京都市
- ② 濱田一茂, 佐伯千香, 武田幸太, 鈴木石根, 五十嵐一衛, 古川壮一, 森永康, 赤井政郎, 七谷圭, 魚住信之, シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 におけるバイオフィーム形成による塩ストレス耐性獲得機構の解明, 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月 20 日-22 日, 仙台市
- ③ 佐伯千香, 七谷圭, 武田幸太, 四十九俊彰, 五十嵐一衛, 魚住信之, ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 の浸透圧ストレスによるバイオフィーム形成誘導機構の解明, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 2010 年 12 月 9 日, 神戸市
- ④ 七谷圭, 佐伯千香, 武田幸太, 四十九俊彰, 五十嵐一衛, 魚住信之, ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 のポリアミン合成関連酵素の浸透圧耐性への寄与, 第 62 回日本生物工学会大会, 2010 年 10 月 29 日, 宮崎市
- ⑤ 七谷圭, 高野洋佑, 鈴木石根, 四十九俊彰, 魚住信之, 高・低浸透圧ストレス適応に寄与するラン藻 *Synechocystis* PCC6803 の Kdp・Msc 膜輸送系の解析, 日本農芸化学会東北支部・北海道支部合同大会 (東北支部第 145 回大会), 2010 年 9 月 28 日, 仙台市
- ⑥ 木村拓哉, 笹原綾子, 七谷圭, 阿部敬悦, 醤油乳酸菌 *Tetragenococcus*

halophilus 由来の Aspartate:Alanine 交換輸送体、AspT の基質特異性解析、日本乳酸菌学会 2010 年度大会、2010 年 7 月 26~27 日、仙台

- ⑦ 木村拓哉、笹原綾子、七谷圭、阿部敬悦、Aspartate : Alanine 交換輸送体、AspT の基質特異性解析、第五回トランスポーター研究会年会、2010 年 7 月 10~11 日、東京医科大学
- ⑧ 高野洋佑、林琢磨、鈴木石根、四十九俊彰、七谷圭、魚住信之、ラン藻の K トランスポーター Kdp の発現制御機構、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京
- ⑨ 七谷圭、四十九俊彰、魚住信之、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 機械受容チャネルの低浸透圧適応への関与の検討、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京
- ⑩ 笹原綾子、七谷圭、阿部敬悦、醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来のアスパラギン酸・アラニン輸送体 AspT の基質輸送特性、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸市
- ⑪ 笹原綾子、七谷圭、阿部敬悦、醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来の aspartate:alanine 輸送体、AspT の基質特異性解析、第 4 回トランスポーター研究会年会、2009 年 5 月 23 日、東京

[図書] (計 2 件)

- ① Nanatani K., Abe K., Horizon Scientific Press, Lactic Acid Bacteria: Current Progress in Advanced Research, 2011, 67-87
- ② 七谷圭、阿部敬悦、京都大学学術出版会、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、2010、155-167

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

七谷 圭 (NANATANI KEI)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：00547333

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：