

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580107

研究課題名(和文)細菌細胞表面タンパク質のターゲティング機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of localization mechanism of the cell surface proteins in bacteria

研究代表者

山本 博規 (YAMAMOTO, Hiroki)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号：20262701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌が桿状形態を維持して増殖するためには、細胞壁溶解酵素の活性が必要である。本研究では、これらの酵素の機能を制御する因子の解明を試みた。まず、LytEのシグナルペプチド(SPLytE)を用いてLytFを発現する株(SPLytE-LytF)では、分泌されたLytFは本来のセプトムと極だけでなく細胞側壁にも局在していた。また、lytEとcw10の合成致死性についても、部分的ではあるものの相補できるようになっていた。以上の結果から、シグナルペプチドが細胞壁溶解酵素の局在性と機能を支配している可能性が示唆された。さらに詳細に調べた結果、SPLytEの疎水性領域の前半部分が重要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：DL-endopeptidases are cell wall hydrolases required for shape maintenance and growth in *Bacillus subtilis*. LytF at septum mainly functions in cell separation. On the other hand, LytE at septum and along sidewall is required for cell elongation in addition to cell separation. In this study, we examined to elucidate what is a key factor required for localization and function of these enzymes. When LytF was expressed with a signal peptide of LytE (SPLytE), it has been localizable not only septum and pole s but also along the sidewall. Moreover, SPLytE-LytF could partially suppress a synthetic lethal phenotype of the double mutation in lytE and cw10. These results strongly suggest that signal peptide governs localization and function of the cell wall hydrolases. Further analyses indicated that the first half region in the hydrophobic part of SPLytE might play an important role for the function of LytE.

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：細胞表面タンパク質 細胞分離酵素 細胞壁代謝 枯草菌

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに、枯草菌の栄養増殖期に機能している細胞表面タンパク質の局在性と生理学的役割について解析を進めてきた。その結果、細胞分離に機能している3つの細胞壁溶解酵素 LytE、LytF 及び CwlS の局在性を明らかにした。これら3つの酵素では、それぞれのドメイン構造が非常に良く保存されており、N-末端にペプチドグリカン (PG) 特異的に結合する LysM motif を、C-末端に細胞壁を溶解する DL-endopeptidase ドメインを持っている (図1)。

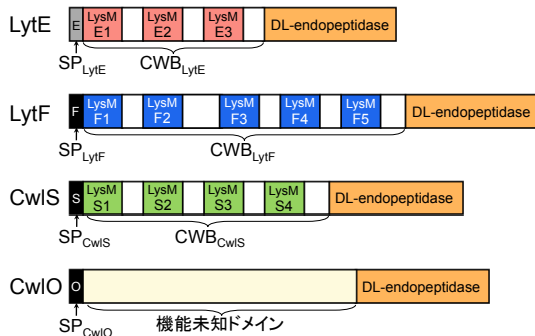


図1 枯草菌 DL-endopeptidase のドメイン構造

SP:シグナルペプチド、CWB:細胞壁結合ドメイン、LysM: LysM モチーフ

ところがそれらの局在性には違いが見られ、5回および4回の LysM を持つ LytF および CwlS は分裂面のみに局在し、LysM が3回の LytE は分裂面に加えて細胞側壁にも螺旋状に局在する。そこで LytF についてさらに詳細に調べた結果、N-末端に存在する5つの LysM motif からなる細胞壁結合ドメイン (CWB<sub>LytF</sub>) が PG 特異的に結合することにより局在し、その結合は WTA により阻害されることを明らかにした。

細胞増殖時における細胞伸長には、側壁の新たな細胞壁合成部位における PG の限定的な分解が必須であると考えられている。この限定分解には LytE および CwlO が働いていると考えられており、両者の変異株は合成致死性を示すことが報告された。このことは LytE の担っている機能を、同じ DL-endopeptidase ホモログである LytF や CwlS でも相補できないことを示唆している。これまでに LytE の細胞側壁への局在は、C-末端に存在する DL-endopeptidase ドメインが MreBH と特異的に相互作用することにより制御されていると考えられていた。しかしながら申請者らは、MreBH を欠損させた場合でも、LytE は細胞側壁に螺旋状に局在可能であることを見出した。そこで LytE および LytF の局在性の違いがどのような原因により生じているのか明らかにするために、両酵素の細胞壁結合 (CWB) ドメインのみを発現させ、それらの局在性を調べた。その結果、CWB<sub>LytE</sub> は分裂面および側壁に螺旋状に局在し、CWB<sub>LytF</sub> は分裂面のみに局在したことから、これらのドメイ

ン内にそれぞれの局在性を区別する因子が含まれていることがわかった。またこの結果は、MreBH との相互作用が報告されている LytE の C-末端を欠損させた場合でも、側壁に螺旋状に局在可能であることを示していた。

### 2. 研究の目的

枯草菌の DL-endopeptidase である LytE および CwlO は、両者を欠損させた場合、合成致死性を示すことから、栄養増殖期において非常に重要な役割を演じていると考えられている。両酵素を枯渇させた場合、細胞の伸長が抑制され、増殖できなくなることがわかっている。また、図1に示したように細胞壁溶解酵素である LytE、LytF および CwlS は、ドメイン構造が非常に類似している。しかしながら、LytF や CwlS の発現を人為的に誘導した場合でも、 $\Delta$ LytE  $\Delta$ cwlO の合成致死性を相補できないことを見出した。そこで本研究では、細胞壁溶解酵素の分泌シグナル配列 (SP) が、それらの局在部位へのターゲティングおよび機能制御に重要であることを明らかにすることを試みた。

### 3. 研究の方法

まず SP<sub>LytE</sub> が、細胞壁溶解酵素の局在性と機能に及ぼす影響を明らかにするために、LytE のホモログである LytF を SP<sub>LytE</sub> により発現させた場合、その分泌性および局在性に及ぼす影響を調べるとともに、 $\Delta$ LytE  $\Delta$ cwlO の合成致死性を回避できるかどうか調べた。同様に SP<sub>LytF</sub> を用いて発現させた LytE が側壁に螺旋状に局在するかどうか、ならびに前述の合成致死性を回避できるかについて調査した。また、それぞれの転写・翻訳レベルを一致させるために、IPTG 誘導可能な P<sub>spac</sub> プロモーターにより転写量を調節し、SD 配列および開始コドンは LytE のものに統一した。さらに詳細に両 SP の機能を調べるために、前半および後半部分を入れ替えたキメラ SP (SP<sub>EF</sub> および SP<sub>FE</sub>) や、3つの領域 (+チャージ、疎水性領域、シグナルペプチド認識部位) を入れ替えたキメラ SP (SP<sub>EFF</sub>、SP<sub>FEF</sub> および SP<sub>FFE</sub>) を作成し、側壁の限定分解における SP の役割を調べた。

### 4. 研究成果

まず、両酵素のシグナルペプチド (SP) を入れ替えた SP<sub>LytE</sub>-LytF および SP<sub>LytF</sub>-LytE を IPTG 誘導により発現可能な株を構築し、それらの分泌・局在性および  $\Delta$ LytE  $\Delta$ cwlO 合成致死相補性について調べた。SP<sub>LytE</sub>-LytF を発現させた場合、融合タンパク質は本来の LytF と同様に細胞外に分泌され、細胞表面画分に安定して検出された (図2)。また細胞表面における局在性を調べた結果、分泌された LytF は本来のセプタムと極だけでなく細胞側壁にも局在できるように変化していた (図3)。さらに、 $\Delta$ LytE  $\Delta$ cwlO 合成致死性を相補でき

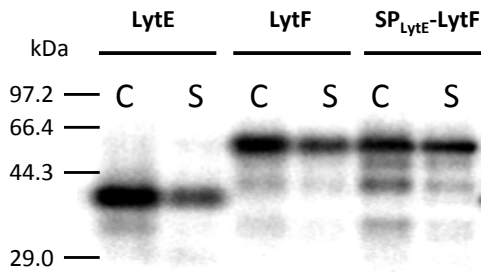


図2 SP<sub>LytE</sub>を用いて発現させたLytFのウエスタンブロットによる分泌性確認

レーンCは細胞表面画分、レーンSは培養上清画分。それぞれのタンパク質にはC-末端にFLAG-tagを融合させ、抗FLAG抗体により検出した。

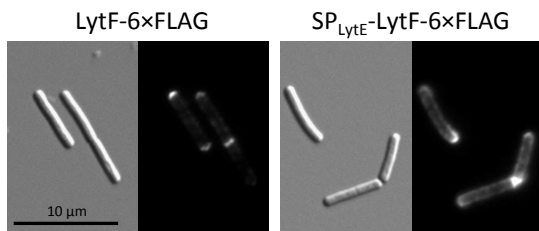


図3 SP<sub>LytE</sub>を用いて発現させた場合のLytF局在パターン観察結果

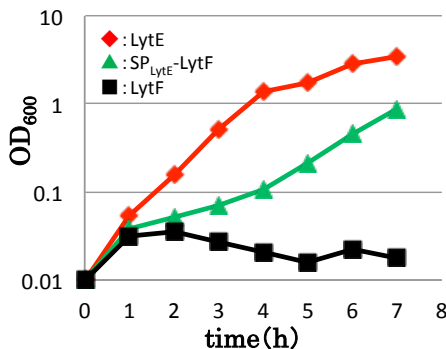


図4 SP<sub>LytE</sub>を用いて発現させたLytFによる $\Delta lytE \Delta cw10$ 合成致死性の相補試験

るかについて調べた結果、部分的ではあるものの相補可能であることが明らかになった(図4)。

一方、SP<sub>LytF</sub>を用いてLytEを発現させた場合についても、細胞表面および培地中に分泌されることを確認した(図5)。これまでの報告により、LytEのC-末端に存在するDL-エンドペプチダーゼドメインが、アクチン様タンパク質であるMreBHと相互作用し、その局在性が部分的に制御されていると考えられている。そこでSP<sub>LytF</sub>-LytEを発現させる場合は、MreBHの影響を排除するために $\Delta mreBH$ 欠損株における機能性を調査した。その結果、本来のSP<sub>LytE</sub>-LytEに比べて側壁への局在量が減少し(図6)、合成致死の相補性も低下している

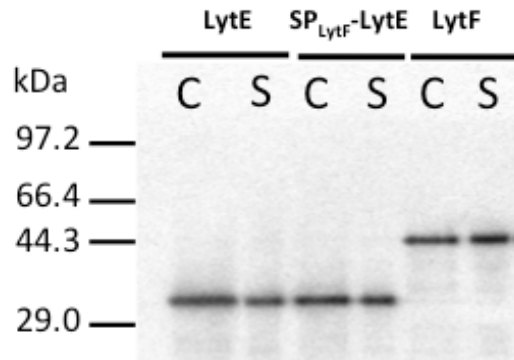


図5 SP<sub>LytF</sub>を用いて発現させたLytEのウエスタンブロットによる分泌性確認

レーンCは細胞表面画分、レーンSは培養上清画分。それぞれのタンパク質にはC-末端にFLAG-tagを融合させ、抗FLAG抗体により検出した。

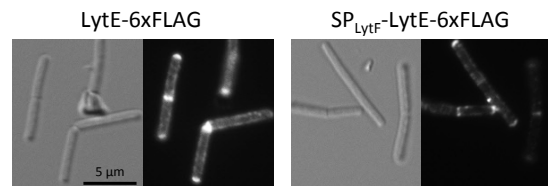


図6 SP<sub>LytF</sub>を用いて発現させた場合のLytE局在パターン観察結果

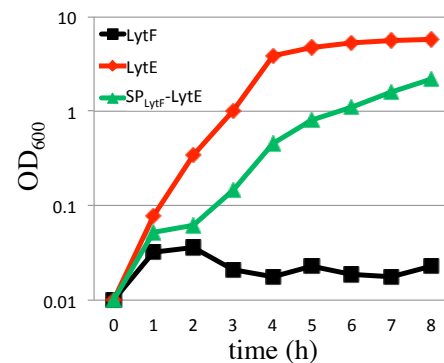


図7 SP<sub>LytF</sub>を用いて発現させたLytEによる $\Delta lytE \Delta cw10$ 合成致死性の相補試験

ことがわかった(図7)。以上の結果は、両酵素のSP中に、それぞれの酵素の局在性と機能を支配する因子が含まれている可能性を示唆していた。

そこで、さらに詳細にSP<sub>LytE</sub>およびSP<sub>LytF</sub>の機能を調べるために、両SPの前半及び後半部分を入れ替えたキメラSP(SP<sub>EF</sub>およびSP<sub>FE</sub>)-LytFや、SPの3つの領域(+チャージ、疎水性領域、シグナルペプチダーゼ(SPase)認識部位)を入れ替えたキメラSP(SP<sub>EFF</sub>、SP<sub>PEF</sub>およびSP<sub>PFE</sub>)-LytFを作成した(図8)。これらのキメラSPを用いて発現させたLytFが、本来のLytEが担っている細胞側壁の限定分解活性を、どの程度相補できるのか調べた。



図8 各種キメラ SP のアミノ酸配列  
 SP<sub>LytE</sub> の配列は赤色で、SP<sub>LytF</sub> の配列は青色で示した。  
 SPase 切断部位は↓で示した。

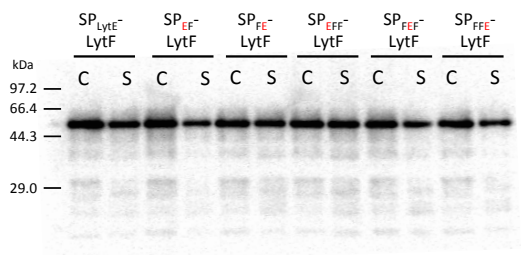


図9 各種キメラ SP を用いて発現させた LytF のウエスタンブロットによる分泌性確認  
 レーン C は細胞表面画分、レーン S は培養上清画分。それぞれのタンパク質には C-末端に FLAG-tag を融合させ、抗 FLAG 抗体により検出した。

まず、それぞれのキメラ SP を用いて発現させた LytF が、どの程度細胞表面あるいは培地中に分泌されているのかウエスタンブロットで調べた。その結果、いずれのキメラ SP を用いた場合でも、コントロールである SP<sub>LytE</sub>-LytF の場合とほぼ同じ量の LytF が細胞表面および培地中に分泌されていた(図9)。

次に機能面での影響を調べるために、 $\Delta$ lytE 欠損株において cw10 を枯渇させた状態で、それぞれのキメラ SP を用いて発現させた LytF が、 $\Delta$ lytE  $\Delta$ cw10 合成致死性をどの程度相補できるか調査した。その結果、前後を入れ替えた SP では、SP<sub>EF</sub>の方は SP<sub>LytE</sub> とほぼ同様の相補性を示したのに対し、SP<sub>FE</sub>の方は機能が低下していた(図10(a))。このことは SP<sub>LytE</sub> の前半部分が機能面において重要であることを示唆していた。さらに3つの領域を入れ替えた SP により発現させた場合、+チャージ領域のみを入れ替えた SP<sub>EFF</sub> では、ほとんど機能しないことがわかった。

これに対して、SPase 認識部位を入れ替えた SP<sub>FEE</sub> では、顕著な機能の低下が見られたものの相補可能であることがわかった。さらに疎水性領域を入れ替えた SP<sub>FEF</sub> では、SP<sub>LytE</sub> とほぼ同様の機能性を示した(図10(b))。以上の結果から総合的に判断すると、SP<sub>LytE</sub> の疎水

性領域の前半部分が、側壁の限定分解を行う上で非常に重要である可能性が示唆された。

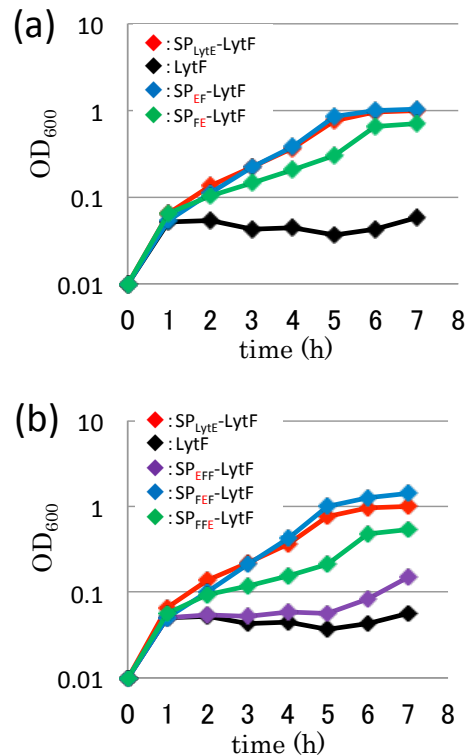


図10 各種キメラ SP を用いて発現させた LytF による  $\Delta$ lytE  $\Delta$ cw10 合成致死性の相補試験

- (a) SP<sub>LytE</sub> および SP<sub>LytF</sub> の前後を入れ替えたキメラ SP を用いて LytF を発現させた場合の生育曲線  
 (b) SP<sub>LytE</sub> および SP<sub>LytF</sub> の3領域を入れ替えたキメラ SP を用いて LytF を発現させた場合の生育曲線

### 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 2 件)

- Moriwaki, H., R. Koide, R. Yoshikawa, Y. Warabino and H. Yamamoto. (2013) Adsorption of rare earth ions onto the cell walls of wild type and lipoteichoic acid-defective strains of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 97 (8): 3721-3728. 査読有
- Moriwaki, H. and H. Yamamoto. (2013) Interactions of microorganisms with rare earth ions and their utilization for separation and environmental technology. *Appl. Microbiol. Biotech.* 97 (1): 1-8. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- 桐山優香、田中達仁、吉川律子、蕨野裕哉、山本博規 (2014年3月8日) 枯草菌 DL-endopeptidase の局在性におけるテイ

- コ酸の影響. 第8回日本ゲノム微生物学会  
年会, 東京, 要旨集 p95.
2. 蕨野裕哉、田中達仁、久米田慶裕、関口順  
一、山本博規 (2013年3月9日) 枯草菌に  
おける細胞壁テイコ酸修飾メカニズムの  
解明. 第7回日本ゲノム微生物学会, 滋賀  
(長浜), 年会要旨集 p90.
  3. 山根久彌、矢澤一也、吉川律子、蕨野裕哉、  
山本博規 (2012年3月12日) 枯草菌 LytF  
の局在性におけるリポテイコ酸および膜  
脂質組成変化の影響. 第6回日本ゲノム微  
生物学会, 東京, 年会要旨集 p83.

[図書] (計 2件)

1. Sekiguchi, J., and H. Yamamoto.  
(2012) Murein Peptidase LytF. In:  
Neil D. Rawlings and Guy S. Salvesen,  
editors, Handbook of Proteolytic  
Enzymes, 3<sup>rd</sup> Edition. Oxford: Academic  
Press, pp. 2479-2482.
2. Sekiguchi, J., and H. Yamamoto.  
(2012) Cell wall structure of *E. coli*  
and *B. subtilis*. In: Y. Sadaie and K.  
Matsumoto, editors, The Frontiers of  
Molecular Microbiology Revisited,  
Kerala: Research Signpost, pp.  
115-148.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 博規 (YAMAMOTO, Hiroki)  
信州大学・繊維学部・准教授  
研究者番号: 20262701

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

石川 周 (ISHIKAWA, Shu)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・助教  
研究者番号: 30359872