

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：31311

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292043

研究課題名(和文) リボソーム蛋白質L10を介した細菌細胞壁結合ポリアミンの合成制御の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the regulation of biosynthesis of polyamine which is covalently bound to the peptidoglycan by the ribosomal protein L10 in bacteria

研究代表者

神尾 好是 (Kamio, Yoshiyuki)

尚絅学院大学・総合人間科学部・名誉教授

研究者番号：00109175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：カダベリン(Cad)結合型細胞壁(PG)を持つ *Selenomonas ruminantium* において、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をもつ。しかし、CadのPGへの共有結合機構、並びに外膜-PG間の結合に関与する外膜蛋白・Mep45の分子・原子機構は未解明である。本研究で我々は次の4項目の成果をあげた。すなわち(1) 本菌 のゲノム解析、(2) Mep45の機能解明、(3) L10を介したCad合成酵素LDC/ODCの分解制御機構の解明、並びに(4) D-Glu残基へのCadの共有結合を触媒する酵素・Ltdの同定反応機構、等である。

研究成果の概要(英文)：In *Selenomonas ruminantium*, cadaverine serves as an essential constituent of the peptidoglycan for the maintenance of envelope integrity through the interaction with SLH domain of Mep45, the outer membrane protein. Cytoplasmic biosynthesis of cadaverine occurs totally in a eukaryotic-like manner. Lysine/ornithine decarboxylase (LDC/ODC), responsible for cadaverine synthesis in this bacterium, displays significant homology to the eukaryotic ODC, and its activity is tightly regulated by antizyme(L10)-mediated proteolysis. Here, we show the following 4 findings, i.e. (i) Determination of the complete genome sequence of *S. ruminantium*, (ii) Molecular mechanism of Mep45 function. We found that Mep45 forms a non-specific diffusion channel in its C-terminal region, (iii) Identification of the ATP-dependent ClpX/P for degradation of LDC/ODC, which is mediated by L-10 and (iv) Identification of an enzyme for cadaverine-adding reaction into the peptidoglycan of this bacterium.

研究分野：微生物生理学

キーワード：ポリアミン合成制御機構、ペプチドグリカン結合型ポリアミン、バクテリアアンチザイム L-10 *Selenomonas ruminantium* 外膜主要たんぱく質 Mep45 リピド中間体：ポリアミン転移酵素 Ltd ClpX P protease

## 1. 研究開始当初の背景

細菌の表層膜は、細胞の最外層として細胞内部と外部環境とを分け隔てる境界構造であり、外環境と細胞質内との間の物質の出入りをコントロールする透過障壁となる。その一方で、細胞の生存に必要な物理的強度を与え、細胞形態の安定化や浸透圧に対する耐性を付与する重要な役割も果たす。グラム陰性細菌の細胞表層構造は、細胞質膜、ペプチドグリカン (PG) 層、外膜の 3 層で形成される。表層膜として正常に機能するためには、3 層それぞれが適切に合成・局在化されるのはもちろんのこと、これらが互いに構造的に接着し表層膜一体として維持・安定化される必要がある。特に外膜 - PG 間接着構造についてはグラム陰性菌のモデル細胞である大腸菌を対象として多数の報告があり、1) 本接着構造には、ムレインリポ蛋白質と、Tol-Pal system と称される蛋白質複合体が寄与すること、これらのいずれかを欠損させると外膜が PG から剥がれ、外環境中の毒性物質 (界面活性剤、色素、抗生物質等) に対して感受性になることが明らかになっている。これらの蛋白質は Proteobacteria と呼ばれる系統分類上におけるグラム陰性細菌の代表的グループにおいて広く保存されていることから、外膜 - PG 間接着構造のモデルとして捉えられてきた。しかし、羊ルーメンに棲息する偏性嫌気性グラム陰性細菌

*Selenomonas ruminantium* の表層膜は上記接着構造とは根本的に異なる外膜 - PG 間接着システムを保持している。本菌にはムレインリポ蛋白質や Tol-Pal system が存在せず、その代わりにポリアミン分子種の一つであるカダベリン

( $\text{NH}_3^+ \cdot (\text{CH}_2)_5 \cdot \text{NH}_3^+$ ) が本菌の PG に共有結合して存在しており、外膜主要蛋白質 Mep45 (Major envelope protein with 45kDa) のペリプラズム側 S-layer homologous (SLH) ドメインとの相互作用を通じて外膜を PG に接着させ、表層膜を安定化する [S. Kojima, KC Ko, Y. Takatsuka, N. Abe, J. Kaneko, Y. Itoh & Y. Kamio, *J. Bacteriol.* 192, 5953-596 (2010)]. ポリアミン分子種は全ての生物種に共通して存在する低分子生理活性物質として、細胞質内において DNA 複製やタンパク質合成等、様々な重要な生体反応に関与することが知られてきたが、本研究は原核生物における細胞壁結合型のポリアミン分子の機能を示した初めての例となった。

*S. ruminantium* において、カダベリンは細胞質内でリジンの脱炭酸により生成されたのち、PG 合成の中間体に lipid intermediate : diamine transferase (Ldt) の触媒により取り込まれて細胞表層へ移行し上記の生理機能を果たす。しかし、本合成系は以下の 2 点において従来の原核生物の合成系とは一線を画する、真核生物型のシステムであることが明らかとなった。

(1) 本菌においてリジンの脱炭酸を触媒する lysine/ornithine decarboxylase (LDC/ODC) のアミノ酸配列は原核生物由来の ODC や LDC と

は相同性を示さず、むしろ真核生物由来の ODC に非常に高い相同性を示す。

(2) 一方、*S. ruminantium* における LDC の研究で、「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 [Y. Yamaguchi, Y. Takatsuka & Y. Kamio, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1431-1434 (2002)]. 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 が AZ として機能していた。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。しかし、これまで本機構の解明はなされていない。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 間の結合に関与するカダベリンの役割の分子・原子機構は未解明であった。

これらの知見を統合して考えると、本菌の表層膜安定化に係るカダベリンの分子機能は、その合成系から表層膜上における機能的特性に至るまで、一般的な原核微生物とは根本的に異なる独特な生理機構の中で発揮されていることが伺える。本菌におけるカダベリン分子の統合的生理機構の理解は PG 結合型カダベリンが発見されてからの長年の研究命題であった。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景下、本研究で我々は、(1) *S. ruminantium* のゲノム解析、(2) ポリアミン結合型 PG の機能解明、(3) L10 を介した LDC / ODC 分解に関するプロテアーゼ遺伝子産物による分解機構の解明、並びに (4) Ldt の生化学的および構造科学的特性の解明を行う。

## 3. 研究方法

### 3-1. *S. ruminantium* subsp. *lactilytica* TAM6421 株のゲノム解析に係る実験方法:

本菌の培養は trypticase-yeast extract-lactate 培地で嫌気培養した。菌体からのゲノム DNA は定法に従って調製し、ソニケーションで物理的に裁断してサイズ分画した。断片長に応じ、S クローン (平均インサート長約 2 kbp)、M クローン (約 4.6 kbp) はプラスミドで、L クローン (約 34 kbp) は cosmid を用いて 3 種類のショットガンライブラリを作成した。それぞれのライブラリにおいて、ベクター配列をもとに調製したプライマーを用いた cycle sequence 反応により、インサートの両端からの draft sequence を得、アッセンブルを行った。配列のアッセンブルの過程では、散在する様々な繰り返し配列をマスク配列として一時的に取り除き、contig 配列を得た。より大きな断片をもったクローンのインサートの内部をシーケンスや contig PCR によって確認しながら環状化した。コンピュータ上で作成した

染色体 DNA の制限酵素地図と、OpGen 社 ( <http://www.opgen.com/> ) に依頼して作成した Optical-map ( 全ゲノム制限酵素マップ ) と比較して確認した。完成した塩基配列を基に、GeneMark S ( <http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/genemarks.cgi> ) および Glimmer V3.02 ( <http://www.cbcb.und.edu/software/glimmer/> ) を用いて orf を予測し、それぞれの推定アミノ酸配列をもとにして EMBL/GenBank/DDBJ データベースに対して BLAST 検索を行った。さらに Interpro Database (15.0) \ Uniprot Database (18.0) を用い、ドメイン情報を得た。予想された ORF のアミノ酸配列の長さが BLAST 検索により得た既知のタンパク質のアミノ酸配列の全長の 70 % 以上であること、その領域において 30 % 以上の相同性を有していた場合、その orf を当該遺伝子のオーソログであると判断した。また、コンピュータ予測による翻訳開始位置は、SD 配列の存在および当該オーソログの N-末端位置の比較によって評価した。orf 産物の機能は BLAST 結果、ドメイン ( Uniprot Database、Interpro Database ) 検索結果、KEGG pathway 割付結果、BRENDA ( EC number DB ) の情報をもとに推定した。なお、データベース上に上記の条件にオーソログが見い出せなかった遺伝子産物名は hypothetical protein とした。一方、tRNA、SRP ( シグナル認識粒子 )、tmRNA、RNaseRNA および rRNA など機能 RNA 領域の解析は tRNAscanSE v1.23 ( [http://lowelab.ucsc.edu/tRNA\\_scan-SE/](http://lowelab.ucsc.edu/tRNA_scan-SE/) )、ARAGORN v1.1.6 ( <http://130.235.46.10/ARAGORN/> ) および Rfamscan.pl を用いて解析した。rRNA 領域は PCR 産物の解析およびサザンブロットング解析の結果と合わせ、コピー数を確定した。代謝経路は KEGG pathway ( <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> ) にそれぞれの遺伝子を割当て、解析した。

### **3-2. PG 結合型カダペリンの Mep45 を介した外膜安定機構の解明に係る実験方法:**

**3-2-1. Mep45 の可溶化並びに精製:** *S. ruminantium* の菌体を破砕後、超遠心で膜画分を回収した。0.5% lauroylsarcosine 処理により Mep45 以外の夾雑蛋白質を可溶化・除去後、2% lithium dodecyl sulfate 処理により Mep45 を可溶化した。その後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて精製した。

**3-2-2. チャネル活性測定:** Kojima and Nikaido ( 下記業績論文番号 2 ) の方法に従い、人工膜小胞に再構成しチャネル活性を測定した。

### **3-3. 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解明に係る実験方法:**

**3-3-1. ATP 依存性プロテアーゼ遺伝子の選抜およびクローニングに係る研究方法:** 上記 3-1 の *S. ruminantium* ゲノム塩基配列から MEROPS data base より推定されたセリンプロテアーゼおよび ATP 要求

性の 2 項目で本遺伝子を検索した。その結果、SR1624, SR1526 および SR1625 の 3 遺伝子候補が特定された。SR1524 は Lon 型プロテアーゼであり、SR1526 および SR1625 はそれぞれ ClpP および ClpX に相当し両者共同でプロテアーゼ活性を持つことが知られている。さらに ClpXP 型は分解される蛋白質に結合するアダプターを要求する。一方、Lon 型はアダプターを要求しない。これらの知見から今回は、ClpXP 型を第一候補遺伝子に挙げた。これら 2 遺伝子を pET15b プラスミドベクターに挿入し、プラスミド psClpP および psClpX を得た。各プラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。

### **3-3-2. 組換え sClpP および sClpX の精製並びに**

**酵素反応に係る実験方法:** *E. coli* BL21 (DE3) / psClpP および *E. coli* BL21 (DE3) / psClpX を IPTG (1 mM)、ペニシリン (100 μg/ml) 存在下、35 °C で 2 時間培養し集菌した。菌体を海砂で破壊した後、20,000 x g で遠心後 sClpP については上清をポリエチレンイミン塩析、DEAE-5PW および TSK ゲル G3000W で SDS 電気泳動的に単一バンドまで精製した。sClpX については、ニッケルカラム、DEAE-5PW および TSK ゲル G3000W で SDS 電気泳動的に単一バンドまで精製し、7 量体として回収された。sClpP 標品はインタクト ClpP の N 末端 2 アミノ酸残基が離脱した 14 量成熟体として回収された。精製 sClpP および sClpX 標品を 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 1 μM LDC/ODC, 500 nM L10, 1 μM sClpP, および 500 nM sClpX を含む 25 mM Tris-HCl buffer (pH7.5) を 37 °C で保温し、分解される LDC/ODC の量を経時的に LDC/ODC 抗体法で測定した。

**3-4. 無細胞系による Ltd の活性測定法:** 上記 *ldt* 候補遺伝子を大腸菌で発現し、得られた組換え大腸菌由来の粗膜画分を <sup>14</sup>[C]-ジアミン、ATP、UDP-GlcNAc、MgCl<sub>2</sub>、UDP-MurNAc-pentapeptid と共に 37 °C で保温した後、ペーパークロマトグラフィーおよびオートラジオグラフィーで解析した。そして、ペプチドグリカン画分に取り込まれた放射能を測定した。

## **4. 研究成果**

### **4 - 1 . *S. ruminantium* subsp. *lactilytica* TAM6421 株のゲノム解析 (業績論文 3):**

本菌は 3,003,680 bp、2,826 orf と 7 対のリボゾーム RNA 遺伝子 (rrn)、69 の tRNA をコードする環状ゲノム、および 9 個のプラスミドを保有していた。GC 含量は染色体では 50.7%、プラスミドでは 42.0 から 50.0% であった。

本菌は外膜を保有する「グラム陰性」の菌であるが、16S rRNA の配列から、グラム陽性の Firmicutes 門分類される。本菌のゲノム解析の結果、本菌が外膜を有することを除けば、様々なグラム陽性型のシステムを有していること、外膜形成に関わる遺伝子クラスターがゲノム全体に配置されていることを明らかにすることが出来た。本

菌が有する7対のrrnのうち、3対の16SrRNA遺伝子中には配列を分断するintervening sequence(IVS)が存在し、これらは成熟リボソーム中では除去されていた。またゲノム中4カ所(34.8, 20.2, 40.6, 7.8 kbp)に溶原化ファージおよびその痕跡、並びに171.3kbpに渡る接合型プラスミドと推定される領域が確認された。

9個のプラスミド中のpSRC1は285,449 bp、266 orfsをコードする巨大プラスミドであり、enolaseやピオチン合成系、トランスポーターなどと想定される遺伝子群をコードしていた。また、pSRC1および2には様々な糖代謝系酵素遺伝子がコードされていた。またpSRC3-5はファージ由来すると推定された。

本菌と同様Negativicutesに属し、ポリアミン結合型の細胞壁を有する*Veillonella parvula* DSM208株の比較ゲノム解析から、本菌のORFのうち40.2%が*V. parvula*でも見られた。特に核酸、脂質、補酵素代謝系では75%のアナログが共通であった。一方で糖代謝やシグナル伝達系に関わる遺伝子群の共通性は25%以下であった。また、外膜を構成するLPSの生合成に関わる遺伝子群は2つの大きなクラスターを形成していた。

本菌の外膜係留機構はproteobacteriaとは異なり、ムレインリポタンパク質やTol-Palシステムに代えて、ポリアミンが共有結合したペプチドグリカンとMep45のペリプラズム側N-末端のSLHドメインとの相互作用がそれを担っている。Mep45遺伝子は2つのLPS生合成系遺伝子クラスターに挟まれた領域に存在したが、Mep45ホモログをコードする6つの遺伝子はゲノム上の様々な領域に存在していた。鞭毛形成に関わる遺伝子群もいくつかのクラスターにわかれて存在していた。本菌は乳酸を炭素源として利用するとき鞭毛を形成し盛んに運動するが、グルコースを炭素源とすると鞭毛を形成しないことから、鞭毛形成はカタボライト抑制により調節されていると考えられる。本菌はcAMP結合タンパク質(CRP)やアデニル酸シクラーゼのホモログを有するが、グラム陽性のカタボライト調製タンパク質CcpAホモログは見い出されなかった。

以上のように、本研究によりグラム陽性、陰性双方のシステムを併せ持つ本菌の生理をゲノムレベルで解析できる基盤が整った。最近、本菌のようにFirmicutes門に属する外膜保有細菌はNegativicutes綱にまとめられ、2015年にはSelenomonadales目、Acidaminococcales目、Veillonellales目に再編された。本研究で明らかになった事実を含め、本菌のゲノム情報はNegativicutes綱に属する一群の細菌の系統発生研究にも応用できる成果が得られた。

なお、一連の配列情報は染色体ゲノムはNC\_017068.1に、9個のプラスミドは大きい順にpSRC 1(285,449 bp); NC\_017078.1、pSRC 2(94,348 bp); NC\_017076.1、pSRC 3(73,380 bp); NC\_017073.1、pSRC 4(72,893 bp);

NC\_017069.1、pSRC 5(35,182 bp); NC\_017074.1、pSRC 6(29,913 bp); NC\_017070.1、pSRC 7(29,781 bp); NC\_017077.1(、pSRC 8(4,693 bp); NC\_017071.1、pSRC 9(2,614 bp); NC\_017072.1に登録した。

#### 4 - 2. *Selenomonas ruminantium* の表層構造・機能の分子特性解析(業績論文番号7):

ルーメン細菌は反芻動物における飼料消化と栄養供給を担うため、宿主栄養生理に極めて重要であるが、その特性の多くは不明であった。我々はこれまでの研究で、*S. ruminantium*の外膜が、ペプチドグリカン結合型カダベリンと本菌の主要外膜蛋白質Mep45との結合作用により維持・安定化されることを明らかにしてきた(図1)。本研究では、機能未知であったMep45のC末端側の膜貫通領域の機能解析を行った。Mep45は一細胞あたり $10^6$ 分子程度存在し、外膜表面積の約8割を占める。従って外膜の透過性はMep45の膜貫通領域の機能と深く関わっていると予想した。Mep45を単離・精製し、人工膜小胞に再構成してチャネル機能を解析した。その結果、Mep45は分子量約600以下の化合物を非特異的に透過させる拡散チャネルを形成していることがわかった(図2)。チャネル孔の透過速度と化合物の分子半径の関係性を表すRenkin方程式を利用し、Mep45チャネル孔径を算出したところ、半径0.58 nmであった。このチャネル活性は、N末端側の細胞壁結合ドメインを欠損させても変化がなかった。これらの結果から、Mep45はN末端側でペプチドグリカンに結合し、C末端側でチャネルを形成することで、外膜安定化因子と外膜チャネルの二つの役割を果たす二機能性蛋白質であることが明らかになった。Mep45のホモログはルーメン内最優勢菌群の一つ*Veillonellaceae*に特徴的に広く分布していることから、ルーメン内の細菌生態にとって何らかの生理的意義があると考えられる。今後は、本菌群の細胞表層の特性と、宿主栄養生理との相互関係の解明が課題となる。

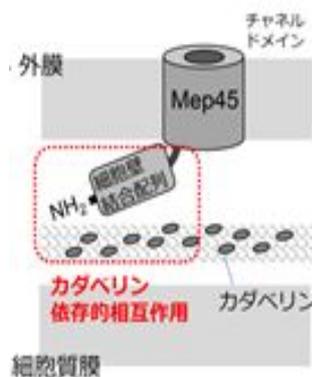


図1. *S. ruminantium* の細胞表層構造の模式図

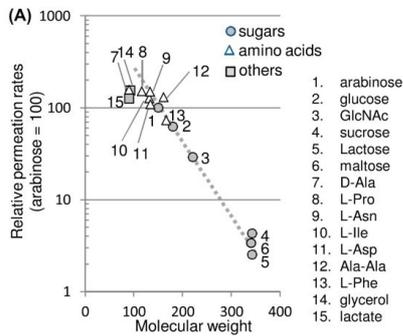


図2 . Mep45 のチャネル活性

透過速度は化合物の分子量に依存する。

#### 4 - 3 . *S. ruminantium* の L10 を介した ATP 依存性プロテアーゼによる LDC/ODC の分解制御機構の解明 (投稿準備中) :

本菌の全ゲノム配列を参考に本菌からClp型プロテアーゼ遺伝子 (*clpP-clpX*) を予測し、大腸菌にクローニングした後、組換え蛋白質 (rClpP 並びに rClpX) を得た。これら組換え対蛋白質を SDS 電気泳動的に単一バンドとして精製後、プロテアーゼ活性を測定した結果、予想通り精製 rClpP 標品が精製 rClpX 標品と共同して、ATP および L10 依存的に LDC/ODC を分解することを明らかにした。

#### 4 - 3 . Ldt の同定とポリアミン転移活性 (投稿準備中) :

先に我々は、*S. ruminantium* の粗膜画分を用いた試験管内 PG 合成実験により、ポリアミンが PG 合成中間体であるリポド中間体のペンタペプチド鎖 (L-Ala-D-Glu-meso-DAP-D-Ala-D-Ala) に転移することを明らかにしている。転移反応の実体は、D-Glu 残基の  $\gamma$ -カルボキシル基とポリアミンのアミノ基とのアミド結合の形成である。この反応は、内膜の細胞質側で生じ、ATP および  $Mg^{2+}$  依存的に起こる。本反応を担う酵素 Lipid intermediate : diamine transferase (Ldt) の同定を試みた。

本菌ゲノム情報を利用し、次の 2 方向からの探索戦略によって候補遺伝子を絞り込んだ。(A) アミド結合の形成を ATP 依存的に触媒する酵素に広く保存される ATP-grasp ドメインを持つ遺伝子を探索した。本菌ゲノムには 10 個の該当遺伝子があり、そのうち 6 遺伝子は既知遺伝子との相同性があり、残り 4 個が機能未知であった。この 4 つの機能未知遺伝子を Ldt 候補とした。(B) ATP 結合配列を持つ遺伝子を探索した。本菌には 224 個の遺伝子が該当した。そのうち、大腸菌の遺伝子と相同性を有する 188 遺伝子を除外した。残り 36 遺伝子の中から、機能未知かつ PG 結合型ポリアミンを有する菌種に保存されている 4 遺伝子を Ldt 候補とした。(A)、(B) の合計 8 個の候補遺伝子を、pET22-b ベクターを利用してそれぞれ大腸菌にて発現させ、PG へのポリアミン転移活性を測定した。その結果、ORF2750 の発現サン

プルからポリアミン転移活性を検出できた (図 3)。

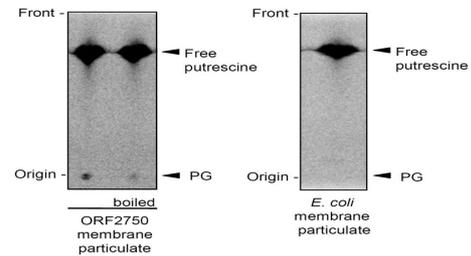


図3 . ORF2750 のポリアミン転移活性の検出

#### 5 . 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者には下線)

##### 〔雑誌論文〕(計 11 件)

- (1) D. Yamashita, T. Sugawara, M. Takeshita, J. Kaneko, Y. Kamio, I. Tanaka, and M. Yao, Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins, *Nature Commun.*, 5, 4898-4909 (2014).
- (2) S. Kojima and H. Nikaido, High salt concentrations increase permeability through OmpC channels of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **289**, 26464-26473 (2014).
- (3) J. Kaneko, S. Yamada-Narita, N. Abe, T. Onodera, E. Kan, S. Kojima, T. Miyazaki, Y. Yamamoto, A. Oguchi, A. Ankai, N. Ichikawa, H. Nakazawa, S. Fukui, M. Takahashi, S. Yamazaki, N. Fujita & Y. Kamio, Complete genome sequence of *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* will accelerate further understanding of the nature of the class Negativicutes, *FEMS Microbiol. Lett.*, 362, 1-6 (2015).
- (4) T. Onodera, E. Futai, E. Kan, N. Abe, T. Uchida, Y. Kamio, and J. Kaneko, Phosphatidylethanolamine plasmalogen enhances the inhibiting effect of phosphatidylethanolamine on  $\gamma$ -secretase activity, *J. Biochem.*, 156, 301-30 (2015).
- (5) G. H. M. Sagor, M. Inoue, D. W. Kim, S. Kojima, M. Niitsu, T. Berberich, and T. Kusano, The polyamine oxidase from lycophyte *Selaginella lepidophylla* (SelIPA05), unlike that of angiosperms, back-converts thermospermine to norspermidine, *FEBS Lett.*, 589, 3071-3078 (2015).
- (6) T. Sugawara, D. Yamashita, K. Kato, Z. Peng, J. Ueda, J. Kaneko, Y. Kamio, Y. Tanaka, and M. Yao, Structural basis for pore-forming mechanism of staphylococcal alpha-hemolysin, *Toxicon*, 226-23 (2015).
- (7) S. Kojima, K. Hayashi, S. Tochigi, T. Kusano, J. Kaneko, and Y. Kamio, Peptidoglycan-associated outer membrane protein Mep45 of

rumen anaerobe *Selenomonas ruminantium* forms a non-specific diffusion pore via its C-terminal transmembrane domain, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 80, 1954-195 (2016). (2016年度BBB論文賞受賞)

- (8) S.Kojima, K.Muramoto, T.Kusano, Outer membrane proteins derived from non-cyanobacterial lineage cover the peptidoglycan of *Cyanophora paradoxa* cyanelles and serve as a cyanelle diffusion channel, *J. Biol. Chem.*, 291, 20198-20209 (2016).
- (9) E.Sugawara, S.Kojima, and H.Nikaido, *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of  $\beta$ -lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC, *J. Bacteriol.*, 198, 3200-3208 (2016).
- (10) H.Kowata, S.Tochigi, T. Kusano, and S. Kojima, Quantitative measurement of the outer membrane permeability in *Escherichia coli lpp* and *tol-pal* mutants defines the significance of Tol-Pal function for maintaining drug resistance, *J. Antibiotics*, 69, 863-870, 2016.
- (11) 児島征司, グラム陰性細菌の多剤耐性  $\beta$ -lactam系抗生物質の外膜透過・排出速度の測定結果を例に理解する, *化学と生物*, 54, 80-82, 2016.

#### 学会口頭発表(計4件)

- (1) S.Kojima, Bifunctional outer membrane protein of ruminal bacteria that acts as a diffusion channel via its C-terminal region and as an anchor binding to the peptidoglycan via its N-terminal region, *Protein & Peptide conference- 2017*, Fukuoka, Japan (March 2017) (招待講演)
- (2) Kojima S., K.Muramoto, and T.Kusano, Proteins originated from a non-cyanobacterial lineage constitute the dominant peptidoglycan-associated outer membrane protein in *C.paradoxa* cyanelle and serve as non-specific diffusion channel, *Bacterial Cell Surfaces*, Gordon Research Conferences, West Dover, USA. (June 2016)
- (3) 林華奈子、金子淳、栃木左枝子、草野友延、神尾好是、児島征司、偏性嫌気性ルーメン細菌 *Selenomonas ruminantium* の主要外膜蛋白質 Mep45 は C 末端側 341 残基で拡散チャネルを形成する, 日本農芸化学会東北支部大会 2016.10.9 山形大学農学部(鶴岡市).
- (4) S. Kojima, Outer membrane permeability and stability of Gram-negative bacteria, in multi-drug resistance and generation of

primitive chloroplast, *13<sup>th</sup> International conference of Flow dynamics* (招待講演), 仙台国際センター, 11<sup>th</sup> Oct. 2016.

#### 【図書】(計1件)

- (1) Y. Kamio, Y.Yamaguchi & J.Kaneko, Bacterial antizyme in "Polyamines: A universal molecular nexus for growth, survival and specialized metabolism, edited by T. Kusano and H.Suzuki, Springer, Tokyo. 2015. 総ページ数 336 ページ

#### 【産業財産権】

出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者:

神尾好是(KAMIO YOSHIYUKI)  
尚絅学院大学・名誉教授  
研究者番号: 0010917

##### (2) 研究分担者:

金子淳(KANEKO JUN)  
東北大学大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 30221188

草野友延(KUSANO TOMONOBU) (2015~2016年度)  
東北大学大学院生命科学研究所・教授  
研究者番号: 40186383

姚 閔(YAO MIN)  
北海道大学大学院先端科学研究院・教授  
研究者番号: 40311518

児島征司(KOJIMA SEIJI) (2016~2017年度)  
東北大学学際化学フロンティア研究所・助教  
研究者番号: 20745111