

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580085

研究課題名（和文） 細菌細胞壁のテイコ酸修飾における細胞骨格蛋白質の機能解明

研究課題名（英文） Elucidation of roles of actin-like cytoskeletons in the teichoic acid modification of the bacterial cell wall

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

研究成果の概要（和文）：レクチンの一種である Concanavalin A の蛍光標識物（ConA-TMR）を用いることにより、枯草菌の細胞壁テイコ酸（WTA）を特異的に検出する方法を確立した。種々のテイコ酸修飾遺伝子変異株を用いて観察を行った結果、ConA-TMR は major WTA のグルコース修飾を効率よく検出し、minor WTA やリボテイコ酸は検出できないことが明らかになった。また、major WTA のグルコース修飾に関与する *tagE* 条件変異株を用いて、細胞側壁における WTA 修飾が螺旋状に行われていることを明らかにした。さらに側壁の WTA 修飾制御には、細胞骨格蛋白質のひとつである MreB が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this research, we analyzed how the wall teichoic acid (WTA) modification is carried out in the Gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*. In order to detect WTA, we used a fluorescent derivative of concanavalin A (ConA-TMR) specifically bound to glucose residue in the major WTA. ConA-TMR staining with a *tagE*-conditional mutant in the major WTA glucosylation pathway indicated that WTA modification is done in a helical pattern along the sidewall. Moreover, we found that MreB, an actin-like cytoskeleton protein, may control the sidewall WTA modification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：テイコ酸, 細胞骨格蛋白質, 枯草菌

1. 研究開始当初の背景

多くのグラム陽性細菌細胞壁はペプチドグリカン(PG)がテイコ酸(WTA)などの陰イオンポリマーにより修飾されていることが

わかっているが、その修飾メカニズムや機能に関してはほとんど解明されていないのが現状である。当研究室ではこれまでに、枯草菌の栄養増殖期において細胞分離に機

能している 3 つの細胞壁溶解酵素 LytF、LytE、及び Cw1S が、細胞の分裂面及び分裂後の極に局在することを明らかにした。これらの蛋白質は N-末端側にそれぞれ 5 回、3 回、及び 4 回繰り返しの LysM motif が存在し、C-末端側には PG のペプチド架橋部分を特異的に切断する DL-endopeptidase 活性を持つドメインが保存されている。さらに *in vitro* での細胞壁結合実験により Glutathione S-Transferase (GST) と LysM ドメインとの融合蛋白質 (GST-2xLysM) は、細胞壁中の PG を特異的に認識・結合し、WTA によりその結合が阻害されることを見出した。さらにテイコ酸合成系の必須遺伝子産物である Tag0 を枯渇させた初期の細胞では、LytF は分裂面及び分裂後の極だけでなく細胞側面にも螺旋状に局在することが明らかになった。その後さらに Tag0 を枯渇させると、菌体は丸く膨らみ、LytF は細胞壁全体にほぼ均一に局在し、最終的には破裂して溶菌に至った。さらに、細胞骨格蛋白質である MreB を枯渇させた細胞側面においても、LytF の螺旋状パターンが観察された。このことは細胞側面における WTA 修飾が、MreB 依存的かつ螺旋状に行われている可能性を強く示唆していた。

2. 研究の目的

細菌細胞壁における PG は細菌にとって必須のコンポーネントであり、原核生物特異的な構造であることから、その生合成機構は新規抗菌物質のスクリーニングにおいて非常に興味深いターゲットとなる可能性が考えられる。これまでのポストゲノム機能解析により、枯草菌の PG 生合成に関与する遺伝子群は、そのほとんどが必須遺伝子であることが明らかになっている。また、合成された PG を修飾している WTA の生合成に関与する遺伝子群も生存に必須であることが明らかにされた。近年このような背景から、細菌細胞壁の合成・修飾・分解機構に関する研究が精力的に行われるようになってきた。当研究室では PG 特異的に結合する細胞分離酵素 LytF の局在メカニズムを調べる過程で、細胞側壁の WTA 修飾が MreB 依存的に螺旋状に行われている可能性を見出した。しかしながらこの結果は WTA を直接検出したものではなく、LytF が PG 特異的に結合する性質を利用することにより WTA 修飾されていない PG 領域を検出した結果であった。そこで本研究では、グルコースを特異的に認識するレクチンである Concanavalin A を用いて、WTA に含まれるグルコースを直接検出することにより細胞壁の WTA 修飾機構を明らかにすることを試みた。また、細胞側壁における WTA 修飾がどのよう

なメカニズムにより行われているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず Concanavalin A が細胞表層のテイコ酸に含まれるグルコース残基を認識するかどうか検討した。蛍光標識されたレクチンである Concanavalin A (ConA-TMR) を用いて、枯草菌野生株に対する観察手法の確立を試みた。

次に WTA およびリポテイコ酸 (LTA) のグルコース修飾に関与する各種変異株を作製し、同様に ConA-TMR 染色を行うことにより、どのテイコ酸のグルコース修飾を検出しているのか、その認識特異性を明らかにした。

また WTA のグルコース修飾に関与している *tagE* 遺伝子に関して IPTG 制御可能な条件変異株を作製し、細胞壁の WTA 修飾がどのようなパターンで行われているのかを調べた。

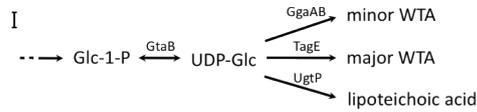
さらに細胞骨格蛋白質をコードしている *mreB* の条件変異株を作製し、MreB を枯渇させた場合の WTA 修飾機構に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) ConA-TMR を用いた WTA 観察法の確立

まずグルコースを特異的に認識する蛍光標識レクチンである Concanavalin A (ConA-TMR) を用いて、WTA のグルコース修飾を検出する手法の確立を試みた。野生株を染色した結果、細胞間で若干染色度合いにばらつきがあったものの、細胞全体がほぼ均一に染色されていた (図 1-II B)。枯草菌は細胞壁テイコ酸として major および minor WTA の 2 種類を持っている。そこで次に ConA-TMR がどちらの WTA を特異的に認識しているのかについて調べた。図 1-II D に示すように、minor WTA の合成遺伝子である *ggaAB* 欠損株を染色したところ、野生株に比べて細胞間でのばらつきがほとんど見られず、均一かつ明瞭な蛍光が観察された。これらの結果は、ConA-TMR が minor WTA にほとんど結合できず、major WTA のグルコース修飾を検出する妨げになっている可能性を示唆していた。このような ConA-TMR の結合性の違いは、major および minor WTA の化学構造の違いに由来するのではないかと考えられた。すなわち major WTA では poly (glycerol phosphate) の主鎖にグルコースが側鎖として結合しているのに対し、minor WTA ではグルコースが主鎖である poly(3-*O*-β-D-glucopyranosyl N-acetylgalactosamine 1-phosphate) の中に含まれている。そのため ConA-TMR は major WTA のグルコースには結合できるものの、minor WTA のグルコースにはほとんど結合できないのではないかと推測された。また枯草菌の LTA もまたグルコース修飾を受けている

と考えられているが、*gtaB* 欠損株および *tagE* 欠損株の両者において全く蛍光が観察されなかったことから、ConA-TMR 染色は LTA のグルコース修飾も検出していない可能性が考えられた (図 1-II F, H)。これらの結果から、以降の実験では *ggaAB* 欠損株をバックグラウンドとして用いることとした。



II

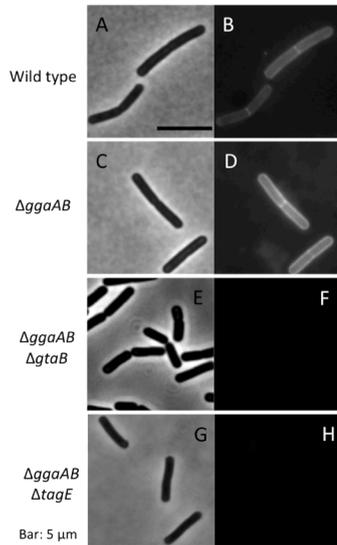


図1 ConA-TMRを用いたWTA染色法の確立

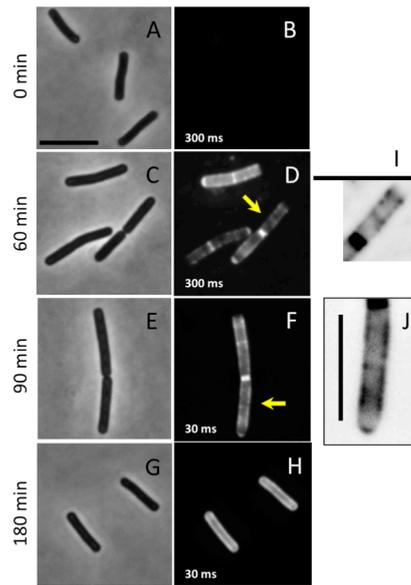
I. テイコ酸のグルコース修飾経路

II. テイコ酸のグルコース修飾変異株に対するConA-TMR染色結果
位相差イメージ (A, C, E, G)、ConA-TMR染色イメージ (B, D, F, H)

(2) 細胞壁の WTA 修飾パターンの観察

次に細胞壁の WTA 修飾がどのように行われているのかを観察するために、*tagE* を IPTG 制御可能なプロモーターの下流においた条件変異株を構築した。TagE 誘導条件における ConA-TMR 染色パターンを観察した結果、誘導後 60 分頃から新たな分裂面および極に蛍光が見られ、細胞側面には螺旋状の染色パターンが観察された (図 2-I D, I)。さらに 90 分後の細胞側壁には螺旋状の強い蛍光が観察され (図 2-I F, J)、180 分後には細胞全体がほぼ均一に染色されていた (図 2-I H)。一方 TagE 枯渇条件では、枯渇後 60 分の細胞側壁においてドット状の ConA-TMR 染色パターンが観察された (図 2-II N, S)。さらに 90 分後では、微弱な蛍光が観察され (図 2-II P)、その後 180 分経過した細胞では蛍光が全く観察されなくなった (図 2-II R)。またデータは示していないが、同様な観察結果が *gtaB* 条件変異株を用いた実験でも得られたことから、側壁のテイコ酸修飾は均一に行われているのではなく、螺旋状に行われていることが明らかになった。

I



II

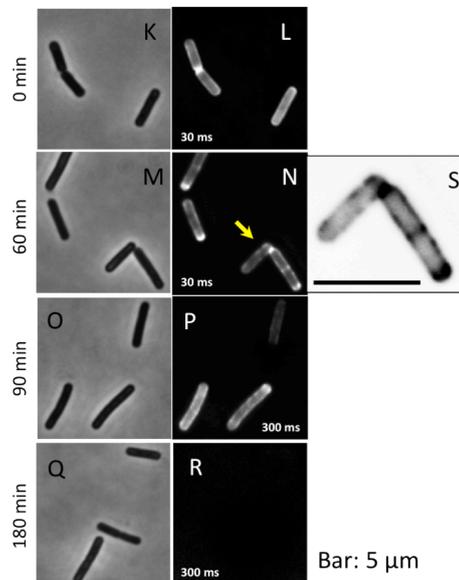


図2 *tagE*条件変異株を用いたWTA修飾パターンの観察
 P_{spac} -*tagE* $\Delta ggaAB$ 株を用いて、IPTG誘導後 (パネルI) および枯渇後 (パネルII) の細胞を、それぞれConA-TMRを用いて染色した。
位相差イメージ (A, C, E, G, K, M, O, Q)、ConA-TMR染色イメージ (B, D, F, H, L, N, P, R)、および矢印の細胞を拡大し、明暗を反転させたイメージ (I', J, S)
撮影時の露光時間はConA-TMR染色イメージ中に示した。

(3) WTA 修飾機構と細胞骨格蛋白質との関連性

当研究室ではこれまでに細胞分離酵素の局在性を明らかにする過程で、細胞側壁の WTA 修飾が MreB 依存的に螺旋状に行われている可能性を見出した。枯草菌が持つ MreB ホモログは全部で 3 種類 (MreB, Mbl, MreBH) あり、それらは同一の螺旋状ケーブルを形成

していることが明らかになっている。これらの MreB ホモログのうち、Mbl は側壁の PG 合成を制御しており、MreBH は細胞が伸長する際に側壁の PG を限定的に分解する細胞壁溶解酵素 LytE の局在部位を制御していることが報告されている。そこで WTA 修飾部位の制御における細胞骨格蛋白質の関与について明らかにすることを試みた。この目的のために *mreB* 条件変異株を構築し、MreB を枯渇させた場合の ConA-TMR 染色パターンを調べた。その結果、MreB 枯渇後 210 分の細胞側壁において、ドット状の ConA-TMR 染色パターンが観察された (図 3 E, F)。このパターンは TagE を枯渇させた細胞側壁において観察されたパターン (図 2-II N, S) と非常に似ていたことから、MreB を枯渇させると細胞側壁で行われている螺旋状の WTA 修飾パターンに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

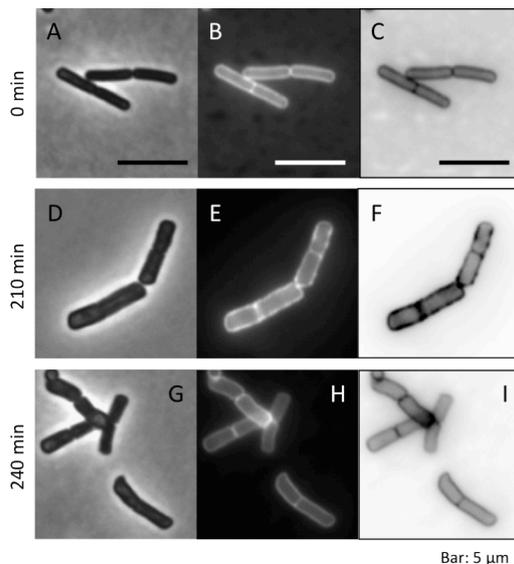


図3 MreB条件変異株におけるConA-TMR染色パターン
*P_{xyf}-mreB ΔmreB*株を用いて、誘導物質であるキシロースを枯渇させた細胞をConA-TMRで染色した。位相差イメージ (A, D, G)、ConA-TMR染色イメージ (B, E, H)、およびConA-TMR染色の明暗反転イメージ (C, F, I)

さらに *mreB* 欠損株の致死性および細胞形態の異常は、培地中に高濃度の Mg^{2+} イオンを添加することにより抑制されることが報告されている。また当研究室でも *mreB* 欠損細胞の側壁に現れた LytF の螺旋状局在パターンが、高濃度の Mg^{2+} イオンを添加した細胞では見られなくなることを報告した。そこで *mreB* 欠損株を構築し、高濃度の Mg^{2+} イオンを添加もしくは枯渇させた場合の細胞側壁における WTA 修飾パターンを調べた。その結果、高濃度の Mg^{2+} イオンを添加した場合は、野生株と同様に正常な WTA 修飾が行われていた (図 4 B, C)。一方、 Mg^{2+} イオン枯渇後 180 分の細胞では側壁の WTA 修飾に異常が観察され

た (図 4 E, F)。このことから *mreB* 欠損により側壁において観察された WTA 修飾の異常は、培地中への高濃度の Mg^{2+} イオン添加により抑制されることが明らかになった。

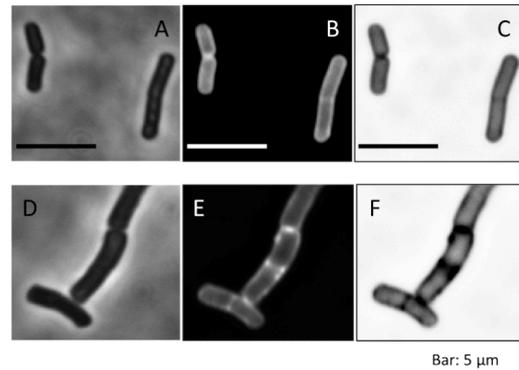


図4 $\Delta mreB$ 欠損株の Mg^{2+} 枯渇条件下におけるConA-TMR染色パターン
 Mg^{2+} 添加 (A-C) および無添加 (D-F) 条件下で、それぞれ 180分間培養した $\Delta mreB$ 細胞をConA-TMRで染色した。位相差イメージ (A, D)、ConA-TMR染色イメージ (B, E)、およびConA-TMR染色の明暗反転イメージ (C, F)

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 4 件)

- ①橋本昌征, 山本博規, 関口順一, 枯草菌における細胞の分離, 繊維と工業, 65 巻, 282-286, 2009, 査読無
- ②Yamamoto, H., Miyake, Y., Hisaoka, M., Kurosawa, S. and Sekiguchi, J. The major and minor wall teichoic acids prevent the sidewall localization of vegetative DL-endopeptidase LytF in *Bacillus subtilis*, *Molecular Microbiology*, 70, 297-310, 2008, 査読有
- ③Yamamoto, H., Hashimoto, M., Higashitsuji, Y., Harada, H., Hariyama, N., Takahashi, L., Iwashita, T., Ooiwa, S. and Sekiguchi, J. Post-translational control of vegetative cell separation enzymes through a direct interaction with specific inhibitor IseA in *Bacillus subtilis*, *Molecular Microbiology*, 70, 168-182, 2008, 査読有
- ④Fukushima, T., Kitajima, T., Yamaguchi, H., Ouyang, Q., Furuhashi, K., Yamamoto, H., Shida, T. and Sekiguchi, J. Identification and characterization of new cell wall hydrolase, CwlT: a two-domain hydrolase of N-acetylmuramidase and D,L-endopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 11117-11125, 2008, 査読有

〔学会発表〕（計5件）

- ① 矢澤一也，山根久彌，山本博規，枯草菌 LytF の局在に及ぼすリポテイコ酸の影響，日本農芸化学会，2010. 3. 29，東京
- ② 三宅由希子，黒澤真一郎，久岡美晴，山本博規，関口順一，枯草菌の細胞壁溶解酵素の局在性とテイコ酸による影響，日本農芸化学会，2008. 3. 27，名古屋
- ③ 針山望，東辻雄平，原田宏之，高橋梨佐，橋本昌征，山本博規，関口順一，枯草菌細胞分離阻害蛋白質の機能解析，日本農芸化学会，2008. 3. 27，名古屋
- ④ 岩下智昭，原田宏之，東辻雄平，山本博規，関口順一，枯草菌細胞壁溶解酵素に結合する YoeB タンパク質の発見と解析，日本ゲノム微生物学会，2007. 3. 2，千葉（かずさ）
- ⑤ 岩下智昭，原田宏之，東辻雄平，山本博規，関口順一，枯草菌の細胞分離を阻害する YoeB の機能解析，日本農芸化学会，2007. 3. 25，東京

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

(3) 連携研究者

石川 周 (ISHIKAWA SHU)
奈良先端大学院大学・情報科学研究科・助教
研究者番号：30359872