

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 2 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21570002

研究課題名（和文） 細菌膜脂質ドメインの構造とその形成機構

研究課題名（英文） Structure and formation of bacterial lipid domains

研究代表者

松本 幸次（MATSUMOTO KOUJI）

埼玉大学大学院 理工学研究科 教授

研究者番号：00119140

研究成果の概要（和文）：本研究は細菌膜脂質ドメインの構造とその形成機構の解明を目的とし、以下の2つの課題を実施した。(1) 膜脂質カルジオリピンとホスファチジルエタノールアミンは枯草菌細胞膜に均一に分布せず、分裂隔壁と両極にドメインをつくり局在する。細胞表層における膜脂質分布の全体像を解明するため、これまで未検討であった他の脂質に対するプローブの開発を進めた。(2) 枯草菌細胞の分裂隔壁細胞膜に脂質合成酵素と細胞分裂タンパク質 MinD がどのような仕組みで分裂隔壁の膜に局在するのか、MinD COOH 末端の局在に係わる領域を解析し、脂質ドメイン形成の原理解明を進めた。

研究成果の概要（英文）：Cardiolipin and phosphatidylethanolamine are localized in the septal and polar membranes, not distributed homogeneously, in *Bacillus subtilis* cells. In order to clarify the structure and mechanism of formation of bacterial lipid domains, we have adopted following two approaches. (i) To examine the distribution of other membrane lipids, we have screened a library of oligopeptides with random amino acid sequence to develop new probes for specific detection of the other lipids. (ii) To study the mechanism of lipid domain formation, the means to localize septally of lipid synthases and MinD, which regulates the position of cell division, is examined with special focus on the region at its COOH-terminus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000円	750,000円	3,250,000円
2010年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
2011年度	500,000円	150,000円	650,000円
総計	3,800,000円	1,140,000円	4,940,000円

研究分野：生物学分野 基礎生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態（5701）

キーワード：脂質ドメイン、カルジオリピン、ホスファチジルエタノールアミン、枯草菌、カルジオリピン合成酵素、MinD

1. 研究開始当初の背景

Singer and Nicolson の流動モザイクモデル (Science, 1972) により、細胞の膜を構成する脂質分子は、それがもつ分子の構造に係わりなく、膜中では均一に分布しているものと信じられてきた。しかしながら、真核細胞にはラフトなどの特定の脂質がドメイン(領域)を成して特定の部位に集まることがあると推定されている (Simons and Ikonen, Nature, 1997)。このような脂質ドメイン構造もしくは膜の極性が、小さな細胞をもつ細菌にも存在することは、大腸菌、Caulobacter crescentus の走化性レセプターMCPや Cheタンパク質、細胞分裂位置の決定を支配するMinCD の細胞極への局在や、枯草菌の孢子形成過程での非対称隔壁の形成などの多くの例からも推定され、特定の脂質がつくるドメインが細胞のもつ生理機能にとって重要な役割を担っていると考えられている (Shapiro, McAdams, and Losick, Science, 2002)。このような考えは、何故細胞膜には多くの種類の脂質があり、それぞれの脂質はどのような生理的な役割を担うのかという、これまで不明であった基本的な問題に対して、ひとつの解答を提供する可能性がある。しかし、特定の脂質のみを認識して結合する特異的なプローブがこれまで得られなかったため、研究の明確な進展はみられなかった。

特定の脂質が細胞の特定の膜領域にあつまる構造(ドメイン)の存在は、カルジオリピンに特異的に結合する蛍光試薬 N-ノニルアクリジンオレンジの蛍光が、大腸菌の細胞分裂隔壁と両極に局在することから、Mileykovskaya と Dowhan により初めて示された (J. Bacteriol., 2000)。

本申請者は、枯草菌を材料とし、カルジオリピン(CL)が分裂隔壁と両極の細胞膜に、および孢子形成過程の engulfment 膜と前孢子

膜に、明瞭な局在を示すことを発見した (Kawai et al., J. Bacteriol., 2004)。また更に、もうひとつの主要なリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン(PE)も分裂隔壁に局在していることを、同リン脂質に特異的に結合するペプチドRoの利用により見出し、これに加えて、多くの脂質合成酵素が分裂隔壁の細胞膜に局在することを見出した (Nishibori et al., J. Bacteriol., 2005; Matsumoto et al., Molec Microbiol., 2006)。脂質合成酵素の分裂隔壁細胞膜への局在は、これまでに報告されたことが無く、ドメイン構造を形成する脂質が分裂隔壁の細胞膜に局在する仕組みを解明するための大きな手掛かりとなるはずである。これらの発見が本研究計画の立案基盤となっている。

2. 研究の目的

本研究は(1)(2)の2つの課題をもうけ計画を推進した。

課題(1) CL等のリン脂質が細胞膜に均一な分布をせず、分裂隔壁にドメイン構造をつくり局在することを見出したが、これまでプローブが得られていないため未検討であった、ホスファチジルグリセロール(PG)、リジルホスファチジルグリセロール、糖脂質ジグルコシルジアシルグリセロール(DGDG)などの他の主要な脂質に特異的に結合するペプチド性の脂質プローブをファージディスプレイ法によりライブラリーから選択し、これらを新たにプローブとして開発する。この新規プローブにより、それら脂質の細胞表層での分布を明らかにし、これまで得られていたドメインと比較解析し、細菌の細胞膜全体にわたって、各脂質分子種がどのように分布するのか、また脂質のドメイン構造がどのように分布するのか、その全体像を理解する。

課題 (2) リン脂質合成酵素が、如何にして分裂隔壁の細胞膜に集まるのかを解析し、これにより膜の脂質の分布とリン脂質ドメイン構造が形成される原理を解明する。このため、まず CL 合成酵素と MinD のタンパク質内の局在に必要な領域を明らかにする。また隔壁の膜に集中する細胞分裂タンパク質のうちの、どの因子が脂質合成酵素を隔壁の細胞膜に局在させる役割を持つのか、更に、それがどのようなタンパク質間の相互作用によるのかを解析し、脂質ドメイン構造が形成・維持される原理を解明する。

本研究は、これまで適切なプローブが無かったため、明らかにできなかった脂質の細胞表層での分布を解析することから細胞の膜脂質ドメインの全体像を明らかにし、更に脂質合成酵素を細胞分裂隔壁の膜に局在させる仕組みの理解から、特定の脂質が分裂隔壁の膜に局在する仕組みを解明しようとする点が特色である。細胞表層における脂質分子種の分布と脂質ドメインの全体像、更にそれが形成・維持される機構とその機能を理解することを目指す研究は他にない。

3. 研究の方法

DGDG をターゲットとした M13 ファージディスプレイライブラリーのスクリーニングには、UgtP を発現させ、DGDG 合成能をもつ大腸菌細胞から抽出し、かきとり精製により精製標品を調製した。また、かきとり精製に必須な TLC 展開においては、二次元展開では分離している DGDG と CL の Rf 値が、一次元展開では近接しているため、CL と PG をもたない大腸菌 S330 株に UgtP を発現させ、TLC 展開を一次元展開のみで済むようにして調製した。得られた 2.5 ml の DGDG かきとり精製標品は、TLC によって、DGDG 濃度は 13 nM と概算された。リン発色により、リン脂質が含まれてい

ないことを確認し、スクリーニングに使用した。CL、PG 及びその他の脂質は市販の合成品を用いた。脂質に対する特異性は ELISA により検定した。脂質標品をあらかじめ 1 well あたり 1 nmol ずつ固定したマイクロタイタープレートを用いて、HRP/anti-M13 で M13 ファージを検出し、候補ファージクローンがもつ脂質特異的結合性を評価した。

4. 研究成果

課題 (1) 脂質に対する新規プローブの開発は、標的脂質分子に特異的に結合するオリゴペプチドを M13 ファージディスプレイのライブラリーから選択した。糖脂質 (GL)、PG 及び CL に特異的に結合するペプチドをコードするクローンを、選り分け操作 biopanning によってライブラリーからスクリーニングした。これらの内には、特定の脂質を欠損する変異株から得られた脂質画分に結合しないものや、精製された特定脂質(とりわけ CL) に高い特異性を示すものが多く得られたことから、これらのクローンの配列決定と特異性検定に集中して研究を実施した。標的脂質分子に特異的に結合するオリゴペプチドを M13 ファージディスプレイのライブラリーから選択した。糖脂質 DGDG、PG もしくは CL に結合するペプチドをコードするクローンをスクリーニングし、配列を決定し、特異性検定を ELISA 法に集中して実施した。環状 7 アミノ酸残基のオリゴペプチドで、特定脂質にたいし高い特異性を示す候補をクローン得た。

DGDG 特異的結合性プローブ

DGDG を固定したマイクロタイタープレートを用いて、biopanning スクリーニングを行い、いくつかの候補クローンが得られた。そこで、枯草菌野生型株にさらに UgtP を発現

させた株 (+UgtP 株) と、枯草菌の UgtP 欠損株 (Δ GL) から抽出した 2 種類の脂質を用いて ELISA を行った。+UgtP 株と糖脂質欠損株から抽出した脂質を固定したマイクロタイタープレートを用いて、ファージクローンの結合性を ELISA で、3 連で測定した (図 1)。下記のグラフの値は、ファージクローンのそれぞれの脂質における吸光度の値から、ライブラリーの挿入部分を持たない deletion 株のそれぞれの脂質における吸光度の値をブランクとして引いた数値を平均化したものである。ファージは 1 well につき 1×10^{10} pfu ずつインプットした。+UgtP 株と糖脂質欠損株 (Δ GL) の脂質に対する結合比 (+UgtP/ Δ GL) と測定値の高さから、クローン D5 (DQKSPDA) と E16 (KVRISGL) 等を有力な候補であるとした。

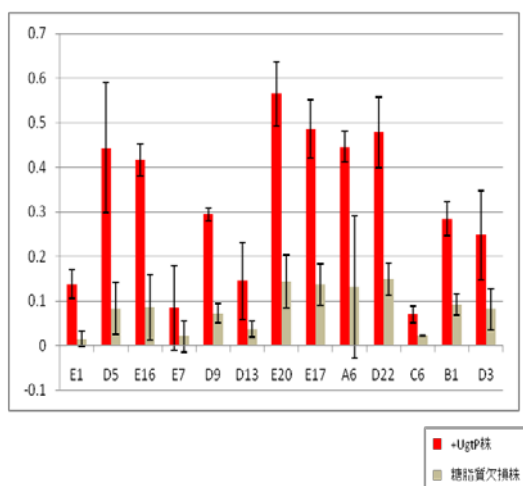


図 1 DGDG に対する特異性の ELISA 検定

CL 特異的結合性プローブ

CL を固定したマイクロタイタープレートを用いたスクリーニングから、31 の候補クローンファージが得られ、更に ELISA によって CL 特異的な結合性を確認した。ELISA には、枯草菌野生型株と CL を欠損した SDB206 株か

ら抽出した脂質標品、ならびに CL と PG のそれぞれの合成標品を固定したマイクロタイタープレートを用い、CL の候補ファージクローンのそれぞれの脂質に対する結合性を検定した。ファージクローンのそれぞれの脂質における吸光度の値から、ライブラリーの挿入部分を持たない M13 ファージの deletion 株のそれぞれの脂質における吸光度の値をブランクとして引いた数値を平均化し、評価した。

現在、これら CL 結合および糖脂質 DGDG 結合クローンの GFP 融合体を構築し、*in vivo* での特異性及び局在検定を試みている。これまでのところ、予備的データではあるが、DGDG に対して興味深い特性を示すクローンを得ている。

課題 (2) では、枯草菌において細胞分裂位置を制御するタンパク質 MinD の COOH 末端に、これまで枯草菌・大腸菌 MinD において知られていた両親媒性 α ヘリックスに加えて、新たな両親媒性 α ヘリックス CTD α 1 (C-terminal domain α 1) を見出した (図 2)。なお、これまで知られていた末端のものを CTD α 2 とした。MinD のこの新たな両親媒性 α ヘリックスの役割の解析を、これまで行なってきたカルジオリピン合成酵素の COOH 末端にある 2 つの両親媒性 α ヘリックスの役割の解析に加えることとした。

GFP 融合を用いた解析により、この新規な両親媒性 α ヘリックスは、単独で隔壁に局在 (localization) すること (図 3)、この領域が α ヘリックスをとること、また塩基性のアミノ酸が、局在に必要であることを変異タンパク質-GFP 融合体の解析から明らかにした。即ち、 α ヘリックスを破壊するアミノ酸であるプロリンをアミノ酸置換により導入すること、塩基性のアミノ酸を酸性のアミノ酸に

変換することにより、局在は観察されなくなった。更に、CTD $\alpha 1/\alpha 2$ は、これまで枯草菌細胞において MinD の局在に關与することが示されている DivIVA, MinJ には、その局在は依存しないことを明らかにした。

この新規な両親媒性ヘリックス CTD $\alpha 1$ が、 α ヘリックスをとること、塩基性のアミノ酸が、局在に必要であることを、*in vitro* で酸性リン脂質との相互作用をより詳細に解析することを目的に、lipid overlay 法、相分離、またリポソームを用いた新たな解析法の開発に取り組んでいる。

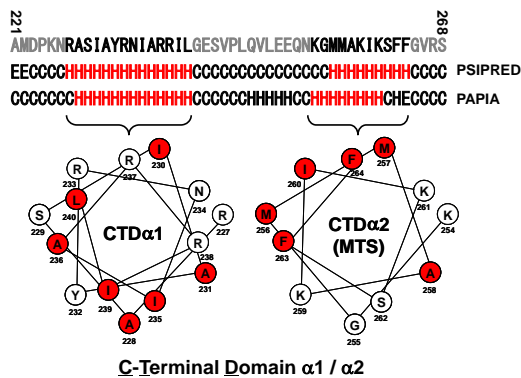


図 2 MinD タンパク質 COOH 末端の α CTD

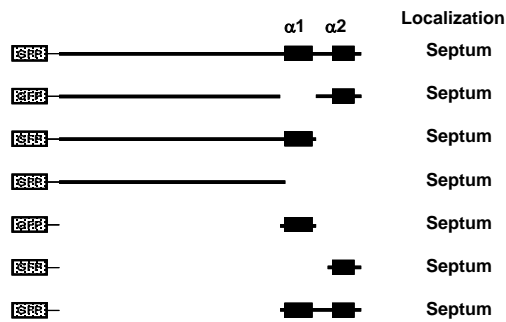


図 3 GFP- α CTD の枯草菌細胞隔壁局在

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者に下線)

① 雑誌論文(計 11 件)

(1) Shiba Y, Miyagawa H, Nagahama H, Matsuo K, Kondo D, Matsuoka S, Matsumoto K and Hara H (2012) Exploring the relationship between lipoprotein mislocalisation and activation of the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*. Microbiology 査読有 158: 1238-1248

(2) Koyama Y, Kaneko Y, Matsuoka S, Matsu moto K, Hara H and Ohta N (2012) Expression and localization of two SecA homologs in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. Biosci Biotech Biochem 査読有 76: 417-422

(3) Matsuoka S, Hashimoto M, Kamiya Y, Miya- zawa T, Ishikawa K, Hara H and Matsumoto K (2011) The *Bacillus subtilis* essential gene *dgkB* is dispensable in mutants with defective lipoteichoic acid synthesis. Genes Genet Syst 査読有 86: 365-376

(4) Matsuoka S, Chiba M, Tanimura Y, Hashi- moto M, Hara H and Matsumoto K (2011) Abnormal morphology of *Bacillus subtilis* *ugtP* mutant cells lacking glucolipids. Genes Genet Syst 査読有 86: 295-304

(5) Koyama Y, Takimoto K, Kojima A, Asai K, Matsuoka S, Mitsui T, Matsumoto K, Hara H and Ohta N (2011) Characterization of the nuclear- and plastid- encoded *secA*- homologous genes in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. Biosci Biotech Biochem 査読有 75: 2073-2078

(6) Morita T, Yamada T, Yamada S, Matsumoto K and Ohta, K. (2011) Fission yeast ATF/CREB family protein Atf21 plays important roles in production of normal spores. Genes to Cells 査読有 16: 217-230

- (7) Uchiyama J, Sasaki Y, Nagahama H, Itou A, Matsuoka S, Matsumoto K and Hara H (2010) Accumulation of σ^S due to enhanced synthesis and decreased degradation in acidic phospholipid deficient *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 査読有 307: 120-127
- (8) Uchiyama J, Nobue Y, Zhao H, Matsuzaki H, Nagahama H, Matsuoka S, Matsumoto K and Hara H (2010) Involvement of σ^S accumulation in repression of the *flhDC* operon in acidic phospholipid deficient mutants of *Escherichia coli*. Microbiology 査読有 156: 1650-1660
- (9) 原 義令、松岡 聡、原 弘志、山下 純、松本幸次 (2010) “細菌のホスファチジン酸合成に関与するアシルトランスフェラーゼの多様性 アシルリン酸をアシルドナーとする新規アシルトランスフェラーゼの発見から” 化学と生物 査読無 48: 301-304 (総説)
- (10) Hashimoto M, Takahashi H, Hara Y, Hara H, Asai K, Sadaie Y and Matsumoto K (2009) Induction of extracytoplasmic function sigma factors in *Bacillus subtilis* cells with membranes of reduced phosphatidylglycerol content. Genes Genet Syst 査読有 84: 191-198
- (11) Kugou K, Fukuda T, Yamada S, Ito M, Sasanuma H, Mori S, Katou Y, Itoh T, Matsumoto K, Shibata T, Shirahige K and Ohta K (2009) Rec8 guides canonical Spo11 distribution along yeast meiotic chromosomes. Molec Biol of the Cell 査読有 20: 3064-3076

この他に Proceedings 論文 6 件 (省略)

② 学会発表 (計 59 件)

学会での口頭発表には、以下の招待講演 1 件

と国際学会発表 8 件が含まれる。

招待講演 松本 幸次 (2011) 「細菌の膜と脂質の機能」 第 10 回 微生物研究会 千葉大学松戸キャンパス 2011 年 11 月 12 日

③ 図書 (計 0 件)

④ 産業財産権

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 幸次 (MATSUMOTO KOUJI) (埼玉大学・理工学研究科・教授) 研究者番号: 00119140

(2) 研究分担者

原 弘志 (HARA HIROSHI) (埼玉大学・理工学研究科・准教授) 研究者番号: 00173071

松岡 聡 (MATSUOKA SATOSHI) (埼玉大学・理工学研究科・助教) 研究者番号: 90509283

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 (埼玉大学大学院理工学研究科博士後期・前期課程学生、理学部分子生物学科 4 年生)

内山純爾、橋本理尋、原 義令、近藤大哲、谷村 遊、石川一輝、今井裕紀子、梅川 満、奥津裕文、神谷雄介、佐々木 優、谷口 綾、千葉美奈子、初 金苗、小島一誠、田中智章、中村達郎、日當竜一、宮崎 希、宮澤 岳、及川達巳、佐野奈緒子、瀬谷学人、松永直子、峯島良太、宮松沙織、横尾茉由子、松島若菜、小穴秋弓、唐沢伸明、木村絵里、関 貴洋、西野有紀、野中ちひろ、古川祐吾