

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：12401  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2012～2015  
 課題番号：24570003  
 研究課題名(和文)細菌膜脂質ドメイン構造の全体像とその細胞機能の解明  
  
 研究課題名(英文)Structure and function of bacterial lipid domains  
  
 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  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細菌膜脂質ドメイン構造の全体像とその細胞機能の解明を目的とし、以下の2つの材料から研究を実施した。脂質合成酵素が分裂隔壁細胞膜に局在する機構の解明において、カルジオリピン合成酵素のC末端にある両親媒性ヘリックスが、酸性リン脂質が豊富な隔壁細胞膜に結合する機能を持つMTSであることを蛍光顕微鏡観察とWestern解析により示した。枯草菌の細胞分裂位置を制御するMinDについては、minJ欠損細胞でもC末端MTSにより隔壁に局在することを示した。局在はMinJに依存するとして従来モデルは、カルジオリピン等の酸性リン脂質が豊富な隔壁細胞膜に結合するMTSの機能から修正を要する。

研究成果の概要(英文)：To clarify the structure and function of bacterial lipid domains, we have adopted following two approaches. i) To elucidate the mechanism of formation of cardiolipin domain in *Bacillus subtilis* cells, the function of C-terminal  $\alpha$ -helices of cardiolipin synthase is examined for septal membrane localization by fluorescence microscopy and Western blotting using GFP-CIsA fusion proteins. The enzyme is shown to be septally localized by means of its C-terminal  $\alpha$ -helices, indicating that the C-terminal  $\alpha$ -helices of the enzyme have a function of membrane targeting. ii) *B. subtilis* MinD is examined for septal localization in minJ mutant cells and is shown to be septally localized by means of the membrane targeting sequence at its C-terminus. This indicates that a correction in the current model of the sequential interaction for MinD binding to septal membranes is required.

研究分野：生物学分野 基礎生物学

 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 膜結合配列

## 1. 研究開始当初の背景

Singer and Nicolson の流動モザイクモデル (1972) により、細胞の膜を構成する脂質分子は、膜中では均一に分布しているものとされてきた。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)を成して特定部位に集まることがあるとされている (Simons and Ikonen, 1997)。このような脂質ドメイン構造もしくは極性が、小さな細胞をもつ細菌にも存在することは、大腸菌、*Caulobacter* の走化性レセプター MCP や Che タンパク質、細胞分裂位置を決定する MinD 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例からも、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 *et al.*, 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、夫々の脂質はどのような生理的な役割を担うのかという基本問題に、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 (CL) に特異的に結合する蛍光試薬 *N*-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により初めて示された (Mileykovskaya and Dowhan, 2000)。研究代表者松本は、枯草菌を材料とし、CL が分裂隔壁と両極の細胞膜および孢子形成過程の膜と前孢子膜に局在することを発見した (Kawai *et al.*, 2004)。更に、もう1つの主要リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) も分裂隔壁に局在することを、PE に結合するペプチドの利用により見出し、これに加え、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ている (Nishibori *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2006)。脂質合成酵素の分裂隔壁細胞膜への局在は、これまで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とその機能を解明するための手掛かりとなる筈である。この発見が本研究計画の立案基盤となっている。これまでに CL 合成酵素 ClsA の C 末端に分裂隔壁細胞膜に局在させる両親媒性  $\alpha$  ヘリックス領域 [membrane targeting sequence (MTS)] を見出しており、また糖脂質合成酵素 UgtP は細胞分裂タンパク質 FtsZ のリング構造に類似した局在を示し、細胞分裂と密接な関係があること、欠損変異は細胞形態に異常をもたらすことを見出している (Matsuoka *et al.*, 2011)。これらの成果に加えて、枯草菌 MinD の C 末端には両親媒性  $\alpha$  ヘリックス領域が連続して2つあることを見出しており、これが MinD の細胞内の挙動に関与していると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、以下の2つの課題を解決することを目的とした。

(1) 脂質合成酵素と分裂位置制御タンパク質 MinD が、枯草菌では分裂隔壁細胞膜に局在する。カルジオリピン合成酵素 ClsA がどのようにして隔壁の細胞膜に局在するか、また MinD と脂質ドメインの局在が、どのような機能をもつかを、酵素タンパク質内の機能領域解析から解明する。これにより細菌脂質ドメインの生成とその機能を解明する。

(2) CL と PE は枯草菌細胞膜において均一に分布せず、分裂隔壁と両極にドメインをつくる。そこで、これまで未検討であった主要糖脂質に特異的なプローブを開発し、糖脂質の局在とその機能を解析する。

### 3. 研究の方法

脂質合成酵素 C1sA と MinD が細胞の分裂隔壁の細胞膜に局在する機構の解明：

(1) 種々の欠失変異を持つ GFP-C1sA 融合体を構築し、蛍光顕微鏡により観察、Western 解析による膜面分への分布、また CL 合成能を TLC により分析し、C1sA 内の隔壁膜局在と酵素活性に必須の機能領域を解析した。

(2) MinD 内の C 末端にある MTS を中心に欠失変異株を構築し、分裂隔壁の細胞膜に局在する機能領域を解析、また *divIVA*, *minJ*, *minCD* および脂質の欠損変異細胞における GFP-MinD の局在を解析した。

### 4. 研究成果

(1) CL 合成酵素 C1sA (482 aa) には N 末端に 2 つの膜貫通領域、中央には活性中心とされる 2 つの保存配列 HKD があり、C 末端には膜に結合する領域 (MTS) として知られる両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが 2 つ見出される (図 1a, b)。これらヘリックスの片面には疎水性アミノ酸が多く、反対面には塩基性アミノ酸を始めとする極性アミノ酸が配置され両親媒性を示す (図 1c)。この領域の分裂隔壁膜への局在における役割を検討するため、種々の欠失変異を持つ GFP-C1sA 融合体を構築し、蛍光顕微鏡により観察した。N 末端側からの欠失は隔壁局在には影響なく (図 2a)、C 末端側からの欠失 (図 2b) および各 MTS 単独の GFP 融合の観察により 2 つのヘリックスは共に隔壁局在に寄与する MTS であることが判明した。C 末端の 2 つの MTS は、細胞の膜面分を調製して Western で分析することにより実際に膜結合に寄与していることが示された (図 3)。このことは、N 末端の膜貫通領域 (TM) を切除し、TM の膜面分への寄与を取り除くことで明らかになった (図 3b)。C1sA は結局 2 つの異なる方法で膜に結合することとなる。この成果を

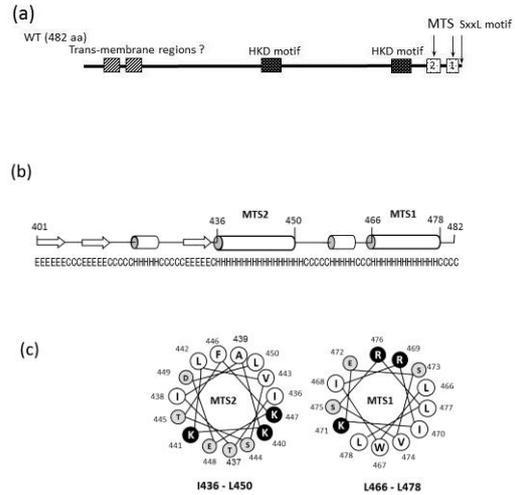


図 1. CL 合成酵素 (482 aa) の全構造 (a), C 末端 MTS1, 2 構造 (b) と  $\alpha$  ヘリックスの両親媒性 (c).

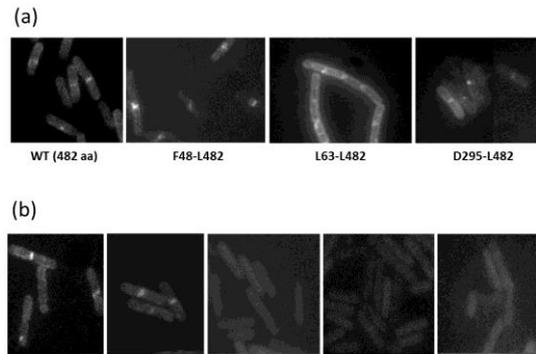


図 2. 各種欠失 GFP-C1sA 変異株の隔壁局在観察構築した欠失株のうち N 末側からの欠失株 (a) と C 末側からの MTS 欠失株 (b) の一部を示す。

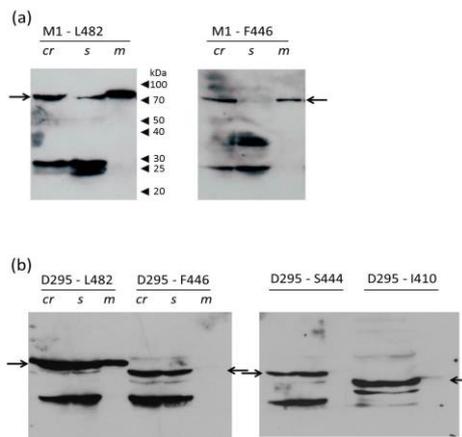
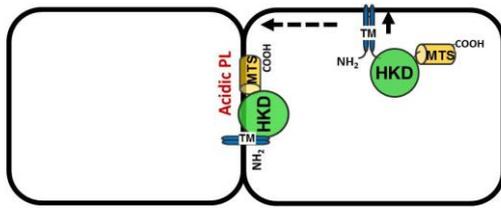


図 3. C1sA の N 末端膜貫通域及び C 末端 MTS 構造が膜局在に関与することを示す Western 解析 cr, 粗細胞抽出画分; s, 上清画分; m, 膜面分。矢印は各欠失 GFP-C1sA タンパク質を示す。

Kusaka *et al.* の論文として Res in Microbiol 誌に公表した。

#### Diffusion and capture on the septal membrane



Lateral diffusion of a protein on eukaryote membranes is ca.  $0.3 \mu\text{m}^2/\text{sec}$  Jacobson *et al.* (1987) cited in Rudner *et al.* (2002)

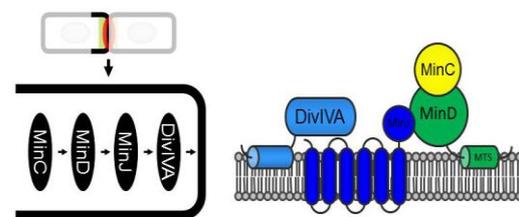
図4. ClsAの隔壁膜局在を説明する隔壁膜酸性リン脂質による diffusion and capture モデル。翻訳後 ClsA は N 末端膜貫通領域 (TM) により近傍の側壁細胞膜に結合するが、側壁細胞膜上を diffusion して隔壁膜に移行し、C 末端の MTS により酸性リン脂質が豊富な隔壁細胞膜に capture される。

細菌細胞内のリボゾームと RNA ポリメラーゼは極や分裂隔壁付近には少ない (Bakshi *et al.*, 2012) ことから、翻訳直後の ClsA は N 末端の膜貫通 (TM) 領域により、まず近傍の側壁細胞膜に結合する。この ClsA が側壁細胞膜上を自由に diffusion し、分裂隔壁の細胞膜に多くある CL、ホスファチジン酸 (PA) ならびにホスファチジルグリセロール (PG) などの酸性のリン脂質が豊富なドメインに MTS を介して結合し、capture されることにより隔壁細胞膜に安定して局在することができる (図 4)。この隔壁の細胞質膜上で、豊富な酸性リン脂質である PG を材料 (= 基質) にして CL が合成され、CL ドメインが隔壁の細胞膜上に形成されることとなる。このモデルを Norris, Mileykovskaya, Matsumoto による総説論文 (Biochem & Anal Biochem 誌 2015) のなかで提案した。

ClsA の酵素活性の中心は酵素中央にある 2 つの HKD モチーフにより構成される。HKD モチーフはホスホリパーゼや大腸菌の PE 合成の鍵となるステップを触媒する酵素 PssA 等に広く見られるが、その機能の詳細は不明である。

ClsA の酵素活性を検討した結果、C 末端側の欠失操作が MTS に至る前に最末端の 1 アミノ酸欠失で活性を失わせることを見出した。C 末端への GFP 付加も酵素活性を失わせた。多くの ClsA ホモログの C 末端は SxxL としてよく保存されており、また大腸菌 PssA の C 末端 (RIDRLISRIL) にも枯草菌 ClsA の C 末端 (SVSRLLSPIL) と同一アミノ酸が多く保存され、これら酵素の最 C 末端が酵素機能に密接に関与していることが示唆された。

(2) 枯草菌において細胞分裂位置を制御する Min システムには MinJ が見いだされており、MinD は細胞極の屈曲を認識してそこに結合する DivIVA により MinJ を介して細胞極に結合すると報告された (Patrick and Kearns, 2008; Bramkamp *et al.*, 2008) (図 5)。しかし、MinC・D の作用部位は極ではなく新生隔壁膜部位であることが詳細な time lapse 解析から明らかになり、MinC・D の極への局在は高発現の誘導によって得られた artefact によると理解されるべきであった (Gregory *et al.*, 2008)。加えて、研究代表者松本らは MinD の C 末端に ClsA と同様の 2 つの両親媒性  $\alpha$  ヘリックスを見出しており、これが膜結合性機能をもつことから枯草菌 MinD の役割を見直すこととした。*minJ::pMUTIN* 破壊をもつ染色体の *amyE* 領域に *P<sub>xyt</sub>-gfp-minD* を導入した株を LB 培地 (0.05% xylose) で mid-log 相まで培養し、誘導された GFP 蛍光を観察すると、MinD の局在は



Patrick and Kearns (2008) および Bramkamp *et al.*, (2008) より改変

図5 枯草菌 Min システムにおける MinJ の役割

*minJ::pMUTINT3 amyE::Pxyl-gfp-minD*

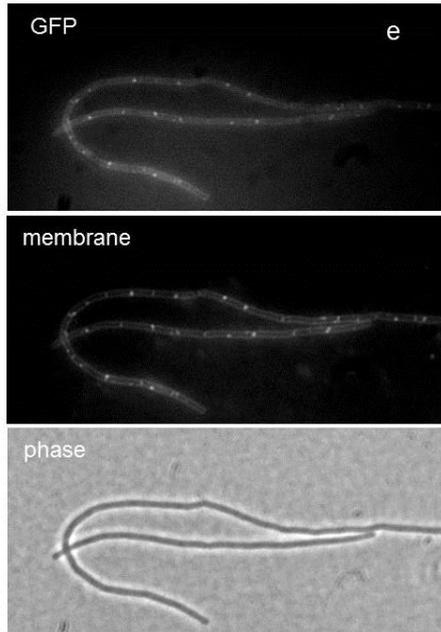


図6. *MinJ*欠損細胞における GFP-MinD の新生隔壁細胞膜局在 *minJ::pMUTINT3* 株を LB 培地 (0.05% xylose) で mid-log まで培養し落射蛍光により GFP-MinD を観察。membrane は FM4-64 による細胞膜の蛍光像、phase は位相差像を示す。

FM4-64 染色で示される新生隔壁領域の細胞膜の部位によく一致していた。即ち、*minJ* を完全に欠損した細胞で MinD は直接新生細胞膜に結合していた。0.02% xylose の低発現でも同様の結果が得られた。また、*minJ* 完全欠失変異を持つ由来の異なる菌株や *divIVA* 欠損細胞でも MinD は同様に直接新生細胞膜に結合した。

更に、MinD の C 末端にある 2 つの両親媒性  $\alpha$  ヘリックスがともに MTS 機能を持つかを GFP-MTS 融合を用いて検討した。この  $\alpha$  ヘリックスは、それぞれ単独で隔壁細胞膜に局在する MTS であることを確認し、塩基性アミノ酸が必要であることを変異 MTS タンパク質の解析から明らかにした。また MTS は単独で、DivIVA, MinJ に依存せずに隔壁細胞膜に局在できた。これらの結果は図 5 左の DivIVA←MinJ←MinD で提案される一方的相互作用による新生隔壁細胞膜への MinD の結合

モデルは、隔壁に局在する CL, PA, PG 等の酸性リン脂質(ドメイン)が MTS を介して MinD を直接細胞膜に結合させる作用が関与することを考慮に加えて MinD の作用と機能を大幅に見直し、修正することが必要であることを示している。

新規糖脂質プローブの開発と細胞表層の脂質分布を明らかにする課題は、糖脂質合成酵素 UgtP が FtsZ と直接相互作用する細胞分裂タンパク質 EzrA および SpoIIE と相互作用し、UgtP 変異細胞では SpoIIE 非対称隔壁膜の形成が遅延することを初年度に見出したことから、UgtP と SpoIIE の相互作用の解析に課題の重点をシフトした。また一方、膜の糖脂質は ECF  $\sigma$  因子( $\sigma^M$  および  $\sigma^V$ ) のアンチ  $\sigma$  タンパク質の働きを安定化する役割をもつことを、本来糖脂質をもたない大腸菌内で再構成する実験を行い明らかにした。糖脂質の細胞膜における新たな機能を発見したものであり、本研究の大きな成果である。

## 5. 主な発表論文等

### ① 雑誌論文(総計 14 件)

- (1) Kusaka J, Shuto S, Imai Y, Ishikawa K, Saito T, Natori K, Matsuoka S, Hara H, Matsumoto K. (2016) Septal localization by membrane targeting sequences and a conserved sequence essential for activity at the COOH-terminus of *Bacillus subtilis* cardiolipin synthase. Res in Microbiol 査読有 167: 202-214. DOI. org/10.1016/j.resmic.2015.11.004
- (2) Norris V, Mileykovskaya E, Matsumoto K. (2015) Extending the transertion hypothesis. Biochem Anal Biochem 査読有 4: 4. DOI. org/10.4172/2161-1009.1000234
- (3) Matsumoto K, Hara H, Fishov I, Mileykovskaya E, Norris V. (2015) The membrane: transertion as an organizing principle in membrane heterogeneity. Frontiers in Microbiol 査読有 6: 572. DOI. org/10.3389/fmicb.2015.00572
- (4) Seki T, Mineshima R, Matsumoto K, Hara H, Matsuoka S. (2015) Repression of the activities of extracytoplasmic function  $\sigma$  factors,  $\sigma^M$  and  $\sigma^V$ , of *Bacillus subtilis* by glucolipids in

*Escherichia coli* cells. Genes Genet Syst 査読有 90: 109-114

- (5) Takada H, Fukushima-Tanaka S, Hara H, Matsumoto K, Yoshikawa H. *et al.* (2014) An essential enzyme for phospholipid synthesis associates with the *Bacillus subtilis* divisome. Mol Microbiol 査読有 91: 242-255. DOI: 10.1111/mmi.12457
- (6) Umekawa M, Miyagawa H, Kondo D, Matsuoka S, Matsumoto K, Hara H. (2013) Importance of the proline-rich region for the regulatory function of RcsF, an outer membrane lipoprotein component of the *Escherichia coli* Rcs signal transduction system. Microbiology 査読有 159: 1818-1827
- (7) Hashimoto M, Seki T, Matsuoka S, Hara H, Asai K, Sadaie Y, Matsumoto K. (2013) Induction of extracytoplasmic function sigma factors in *Bacillus subtilis* cells with defects in lipoteichoic acid synthesis. Microbiology 査読有 159: 23-35. DOI 10.1099/mic.0.063420-0
- (8) Matsumoto K, Matsuoka S, Hara H. (2012) Membranes and lipids. In : Sadaie Y, Matsumoto K, editors. *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: the Frontiers of molecular microbiology revisited. Kerala, India: Research Signpost; 査読無 p. 61-91.
- (9) Sadaie Y, Matsumoto K. (2012) A personal history of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: In : Sadaie Y, Matsumoto K, editors. *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: the Frontiers of molecular microbiology revisited. Kerala, India: Research Signpost; 査読無 p. 1-8.
- (10) Itou A, Matsumoto K, Hara H. (2012) Activation of the Cpx phosphorelay signal transduction system in acidic phospholipid-deficient *pgsA* mutant cells of *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun 査読有 421: 296-300. DOI 10.1016/j.bbrc.2012.04.003.

この他 Proceedings 論文「脂質生化学研究 (JCBL)」査読無 4 件

## ② 学会発表

- (1) Furukawa Y, Ishikawa K, Matsushima, W, Karasawa N, Wada E, Matsuoka S, Hara H, Matsumoto K. Analysis of the role of two amphipathic  $\alpha$ -helices at the COOH-terminus of *Bacillus subtilis* MinD. FEMS 2013 (5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists), July

21-25, 2013, Congress Center Leipzig, Leipzig, Germany.

その他 計 67 件 (日本遺伝学会大会、日本分子生物学会年会、日本脂質生化学会、日本農芸化学会大会、日本ゲノム微生物学会年会、遺伝学研究所研究会、微生物研究会等の学会、研究会において発表)

## ③ 図書 (計 2 件)

- (1) 松本幸次 (2014) 『原核生物の膜と脂質』 p.63-84 梅田真郷 編 「生体膜の分子機構」 総ページ数 251 頁 化学同人 京都
- (2) Sadaie Y, Matsumoto K, (2012) Editors. *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: the Frontiers of Molecular Microbiology Revisited. Kerala, India: Research Signpost. p.1-362.

## 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: 0 0 1 1 9 1 4 0

### (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: 0 0 1 7 3 0 7 1

松岡 聡 (MATSUOKA, Satoshi)  
(埼玉大学・理工学研究科・助教)  
研究者番号: 9 0 5 0 9 2 8 3

### (4) 研究協力者

定家 義人 (SADAIE, Yoshito)  
橋本 理尋 (HASHIMOTO, Michihiro)  
日下 仁 (KUSAKA, Jin)  
周藤 悟志 (SHUTO, Satoshi)  
石川 一輝 (ISHIKAWA, Kazuki)  
今井 裕紀子 (IMAI, Yukiko)  
谷口 綾 (TANIGUCHI, Aya)  
伊藤 安矢 (ITOU, Aya)  
宮川 宏義 (MIYAGAWA, Hiroyoshi)  
梅川 満 (UMEKAWA, Mitsuru)  
近藤 大哲 (KONDO, Daitetsu)  
瀬谷 学人 (SEYA, Manato)  
峯島 良太 (MINESHIMA, Ryota)  
宮松 沙織 (MIYAMATSU, Saori)  
松島 若菜 (MATSUSHIMA, Wakana)  
関 貴洋 (SEKI, Takahiro)  
西野 有紀 (NISHINO, Yuki)  
古川 祐吾 (FURUKAWA, Yugo)  
齋藤 知 (SAITO, Tomo)  
名取 恒平 (NATORI, Kohei)