

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07366

研究課題名(和文) プロテアーゼ巨大分子複合体とウイルス様膜小胞による細菌の新規細胞機能の確立と応用

研究課題名(英文) Establishment of novel bacterial functions with macromolecular complexes of proteases and virus-like membrane vesicles and their application

研究代表者

渡部 邦彦 (Watanabe, Kunihiko)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90184001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：トリ羽毛の分解を行う好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328株が産生するケラチン分解性プロテアーゼと細部表層から放出される膜小胞について研究を行った。まずトリ羽毛分解を担うプロテアーゼを、ゲノム解析と質量分析から同定した。プロテアーゼの変性剤耐性と熱安定性が膜小胞により向上することを確認した。膜小胞の簡便な検出のため、蛍光色素DiIによる方法を開発した。degP遺伝子破壊株において、膜小胞産生能が高まることを突き止めた。膜小胞の表面提示のため、S-layerタンパク質に絞ったが、この遺伝子破壊株を得ることができず他の検索から複数の足場となる3候補遺伝子を選択した。

研究成果の概要(英文)：Macromolecular complexes of keratinolytic proteases and membrane vesicles produced by *Meiothermus ruber* H328 were employed for the study. A protease responsible for keratin hydrolysis of chicken feathers was identified by combining the proteome analysis with different preparations of strain H328 with the whole genome analysis. The protease was confirmed to hold strong resistance toward various denaturants including SDS and organic solvents. This resistance presumably occurred due to thermophilic properties and membrane vesicles. A simple method including filtration and ultracentrifugation for the culture supernatant was developed by use of a fluorescent dye, DiI. A degP-homologue candidate was selected and its knockout mutant was constructed. Production of membrane vesicles was enhanced at an elevated temperature 60 °C. To develop the system to display a protein on the surface of membrane vesicles, three candidates were screened by use of a software searching membrane proteins.

研究分野：応用微生物学

キーワード：膜小胞 プロテアーゼ 巨大分子複合体 表面提示

1. 研究開始当初の背景

有馬温泉源から単離・同定した好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は、強力なケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体を分泌し、産業廃棄物である強固なトリ羽毛を容易に分解する。本申請者は、これまで自然界に潜む微生物機能を用いて産業廃棄物である難分解性動物タンパク質を分解・再生利用に導く研究を展開してきた。この研究過程でスクリーニングされた微生物が持つ特徴的なプロテアーゼに焦点を絞り、難分解性動物タンパク質の分解に関する機能解明を行って来た。その研究の中で、H328 株で産生されるこの巨大分子複合体が (i) 分子質量 1 億 Da を持つこと、(ii) 驚異的な変性剤耐性と熱安定性 (SDS 30% (w/v)、有機溶媒 40% 共存下、60 °C 24 h 以上) を持つこと、(iii) 細胞表層から放出されるウイルスに類似した脂質二重層構造の「膜小胞」(membrane vesicle) に含まれることを発見している。この特異なプロテアーゼ巨大分子複合体と「膜小胞」は、国内・国外でも研究例がほとんどなく、構造や機能メカニズム、生合成機構等も未知のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、H328 株が分泌する特異な性状を示すプロテアーゼ巨大分子複合体の分子基盤と、この細胞表層から放出する「膜小胞」の構造と生合成機構の実体解明、および両者の関係解明を行い、タンパク質巨大分子複合体形成・分泌と膜小胞放出という、細菌が持つ新しい細胞機能の確立を行うことを目的とした。

この研究を通じ、プロテアーゼ巨大分子複合体化が同時に併せ持つ変性剤耐性獲得機構を、細胞生物学および生化学的な視点から明示することを目指した。さらに、本研究で確立した細胞機能を、応用微生物学的見地から、細菌が放出する「膜小胞」を革新的な天然型タンパク質輸送キャリアーとして他の酵素タンパク質の分泌・反応へ利用すること、および酵素タンパク質の巨大分子複合体構造による高度安定化に応用し、新しい細胞機能の応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) H328 株が分泌する特異な性状を示すプロテアーゼ巨大分子複合体の分子基盤と、この細胞表層から放出する「膜小胞」の構造と生合成機構の実体解明: まずプロテアーゼ本体の中心となる分子を、精製過程(限外ろ過濃縮、ゲルろ過、ショ糖密度勾配超遠心分離 etc)を経たサンプルに対するプロテオーム解析と別途行った H328 株の全ゲノム解析による遺伝子との照合により実施した。ついで、同定したプロテアーゼ本体に対する抗体を別途作製し、この抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析を実施した。

(2) プロテアーゼ巨大分子複合体化が同時に

併せ持つ変性剤耐性獲得機構: プロテアーゼ本体を含む精製過程のサンプルを用いて、SDS、メタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン、クロロフォルムに対して、0-40% (w/v) または (v/v) で、60 °C、30 min 処理を行い、残存する活性を調べた。

(3) 膜小胞の簡便な測定法の確立: 膜小胞は、通常の光学顕微鏡では検出できないため、膜小胞の簡便な分離と蛍光色素による簡便な測定が求められていた。そのため本研究においても、簡便な調製法と蛍光色素による検出を試みた。

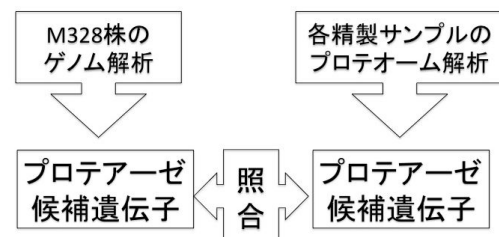
(4) 膜小胞放出量の増加の検討: ストレスタンパク質 DegP を、ゲノム解析データから特定し、この遺伝子破壊株を野生型 H328 株から作製し、培養後の膜小胞産生能を(3)で求めた蛍光色素を用いて行った。

(5) 新しい細胞機能の応用: 細菌が放出する「膜小胞」を革新的な天然型タンパク質輸送キャリアーとして他の酵素タンパク質の分泌・反応へ応用: 上述のプロテオーム解析から得られた候補タンパク質として S-layer タンパク質を選び、この遺伝子破壊株の作成と、別途この遺伝子と他の遺伝子の融合を試みた。なお他の遺伝子として、プロテアーゼ本体から明らかになり、抗体も別途作製した付属タンパク質 Protein A を用いた。

4. 研究成果

(1) H328 株が分泌する特異な性状を示すプロテアーゼ巨大分子複合体の分子基盤と、この細胞表層から放出する「膜小胞」の構造と生合成機構の実体解明:

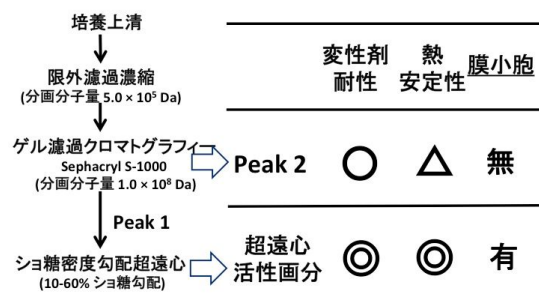
下記のスキムに従ってプロテアーゼ本体の同定を進めた。一方、培養上清のプロテア



ーゼ活性を阻害する主たる阻害剤は、セリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF であったため、セリンプロテアーゼに絞って同定を行った。その結果、限外ろ過濃縮、ゲルろ過、ショ糖密度勾配超遠心分離のいずれの画分でも検出されたセリンプロテアーゼは、唯一 MrH₈₄₄ 遺伝子(2,094 bp, 697 a.a.)としてゲノムに存在していることが判り、このプロテアーゼ(以後 Protein B)が巨大分子複合体の中心であることを突き止めた。また同時に、この遺伝子の 5' 上流側に、機能未知の MrH₈₄₃ 遺伝子産物が、プロテオーム解析でいずれの画分でも検出されており、遺伝子上だけでなく mRNA の発現解析においてもオペロンとして存在していることが明らかになり、Protein A が Protein B のシャペロン機能を有することが示唆された。

(2) プロテアーゼ巨大分子複合体化が同時に併せ持つ変性剤耐性獲得機構:

様々な精製過程(限外ろ過濃縮、ゲルろ過、シヨ糖密度勾配超遠心分離)のサンプルで、SDS、メタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン、クロロフォルムに対して、0-40%(w/v)または(v/v)で、60°C、30 min 処理を行っても、膜小胞が存在する画分は、プロテアーゼの安定な変性剤耐性と熱安定性を示すことが判った。このことから、以下のよ



うな表にまとめた。すなわち、本来 H328 株は、好熱性細菌であるため変性剤耐性の強い、熱安定性の高いプロテアーゼを産生するが、これが膜小胞にあるプロテアーゼは、さらにこれらが増強されることを明らかにした。膜小胞は、細菌外膜構造と類似した構造を持っており、これらの成分によりプロテアーゼ活性の耐性強化や熱安定性増強に貢献したものと推察される。この知見は、他の酵素タンパク質にも応用可能であり、今後膜小胞への酵素タンパク質のターゲットが可能になれば、より有効な安定化の方策として期待できる。

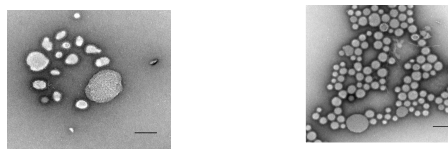
(3) 膜小胞の簡便な測定法の確立: これまでの煩雑な操作(培養上清の限外ろ過、ゲルろ過、シヨ糖密度勾配超遠心分離)を経ず、培養上清に、ろ過(0.45 μm)による除菌を実施し、その後超遠心分離の後、2つの蛍光色素で調査した。蛍光色素としては、FM4-64 (Synapt Red C2)と DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)を用いて試験し、DiI が、最終的に 5 μM 濃度で 37°C、1 時間の操作で、より有効に膜小胞の増加を検出できることを示した。特に DiI は、疎水性環境に対して効果のあることから、操作上はサンプル管内側への吸着などに問題があるが、膜小胞が膜成分を多く含むことに呼応して蛍光が増加することが確認されており、今後変更の可能性はあるものの、当面の方法として用いることにした。

(4) 膜小胞放出量の増加の検討:

(3)の結果を基に、ストレスタンパク質 DegP に焦点を絞って膜小胞産生能増強を調べた。この理由は、大腸菌の *degP* 遺伝子破壊が、膜小胞産生能の増加につながるとの報告が蛍光試薬による定量を基になされている事実に基づく。まず *degP* 遺伝子を、H328 株全ゲノム情報からソフトウェア BLAST を用いて大腸菌 *degP* 遺伝子との相溶性検索を

行い、3つの候補遺伝子を選択した。相溶性に加え、シグナル配列、局在性予測などをもとに1つの候補遺伝子(*mrh_0331*)に絞り込んだ。H328 株でこの遺伝子を相組換え法により破壊し、*degP* 破壊株を得た。H328 株野生株が 65 °C までの温度で生育に異常がないのに対し、55 °C まで正常な挙動を示す一方、60 °C 以上では生育が抑えられることが判った。引き続き、蛍光色素による膜小胞の検出法をこれら 2 株の培養上清に適用した。その結果、55 °C 培養時には見られなかった蛍光強度の大きな増加(6 倍まで)が、60 °C 培養時だけ見られた。さらに、蛍光が増加した 55 °C 及び 60 °C 培養時のサンプルを、透過型電子顕微鏡解析(TEM)に供し、60 °C の蛍光色素により観察されたのと同程度の膜小胞の産生増大が観察された。このことは、*degP* 遺伝子欠損が、熱誘導により膜小胞の産生を促進したことが示唆され、世界で初めて膜小胞の増加を、蛍光試薬による検出だけでなく TEM でも証明することができた。

degP 遺伝子破壊株の膜小胞産生増強
55°C 培養時 60°C 培養時



(5) 新しい細胞機能の応用: 細菌が放出する「膜小胞」を革新的な天然型タンパク質輸送キャリアーとして他の酵素タンパク質の分泌・反応へ応用:

膜小胞産生において、量的増加を(4)で実施し成功させたため、引き続き質的改変を行わせるため、膜小胞表面へのターゲットタンパク質の提示を試みることにした。そのためには、まず膜小胞の足場となるタンパク質の決定が必要になる。(1)のところで、異なる精製過程(限外ろ過濃縮、ゲルろ過、シヨ糖密度勾配超遠心分離 etc)のサンプルに対するプロテオーム解析で、必ず検出されたタンパク質が S-layer タンパク質であったため、まずこのタンパク質に焦点を絞り、実験を行った。膜小胞表面に提示するタンパク質として、(1)の解析でプロテアーゼ本体の付属タンパク質の可能性が示唆された Protein A を選んだ。この理由は、(1)の解析で膜小胞の表面での局在性が明らかな上に、局在性の追究の際に用いた Protein A 抗体が利用可能であるためである。

S-layer タンパク質は、933 個のアミノ酸からなる分子量 98 kDa の分子として、ゲノム中で MrH_2961 として存在する。この遺伝子を、PCR により取得し、N 末端から全長、623 アミノ酸、307 アミノ酸、そして 84 アミノ酸の長さで Protein A と融合遺伝子を、プラスミド pUC119 上で作成した。一方、S-layer タンパク質への融合による Protein A の表面提示を示すためには、H328 株において S-layer

タンパク質の遺伝子破壊を実施する必要があり、この遺伝子破壊株を構築した。ところが、これまで可能であった相同組換えによる遺伝子破壊の方法ではいずれも遺伝子破壊株を取得することができなかった。これは、プロテオーム解析でも全ての画分で検出されてきたように、H328 株にとって必須なタンパク質として機能している可能性が高いことによると推測された。

そこで、S-layer タンパク質以外で外膜の足場になるタンパク質を、web 上で TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) のソフトウェアで H328 株全ゲノム情報を入れて検索し、さらに PSORTb ソフトウェアによる局在性も確認しながら、3つの遺伝子候補 (MrH_466 -galactosidase, MrH_1507 outer membrane efflux protein, MrH_2213 basic membrane lipoprotein) を得て、S-layer タンパク質の場合と同様の検討を加えようと展開しているところである。

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 7件)

Tsujimoto, Y., Saito, R., Sahara, T., Kimura, N., Tsuruoka, N., Shigeri, Y., Watanabe, K. “Draft genome sequence of *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157T, a thermophilic and phospholipase-producing bacterium isolated from acidulocompost.” *Genome Announc.* 査読有, 5, e00089-17 (2017)

渡部 邦彦 「細菌が放出する膜小胞 (membrane vesicle) の機能と生合成機構そして応用に向けた研究動向」化学と生物、査読有, 54, 720-725 (2016)

Tsujimoto, Y., Saito, R., Furuya, H., Ishihara, D., Sahara, T., Kimura, N., Nishino, T., Tsuruoka, N., Shigeri, Y., Watanabe, K. “*Caenibacillus caldisaponilyticus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming and phospholipid-degrading bacterium isolated from acidulocompost.” *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 査読有, 66, 2684-2690 (2016)

Watanabe, K. “Bacterial membrane vesicles (MVs): Novel tools as nature- and nano-carriers for immunogenic antigen, enzyme support, and drug delivery.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 査読有, 100, 9837-9843 (2016)

Tsujimoto, Y., Shimizu, Y., Otake, K., Nakamura, T., Okada, R., Miyazaki, T., Watanabe, K. “Multidrug resistance transporters Snq2p and Pdr5p mediate caffeine efflux in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 79, 1103-1110 (2015)

渡部 邦彦 「細菌が出芽する？いえいえ、放出されるのは膜小胞」日本生物工学会誌、査読無, 93, 412 (2015)

Shigeri, Y., Yasuda, A., Hagihara, Y., Nishi, K., Watanabe, K., Imura, T., Inagaki, H.,

Haramoto, Y., Itou, Y., Asashima, M. “Identification of novel peptides from amphibian (*Xenopus tropicalis*) skin by direct tissue MALDI-MS analysis.” *FEBS J.* 査読有, 282, 102-113 (2015)

[学会発表](計 6件)

武田梨花、西海斗、渡部邦彦 「*Meiothermus ruber* H328 株由来 protein disulfide oxidoreductase (PDO) 発現量増強株の羽毛分解への影響」日本農芸化学会 2018 年大会、2018.

田中秀典、齋藤遼、古谷洋人、辻本善之、鶴岡直樹、茂里康、渡部邦彦 「リン脂質の改変を目指した *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157T 株由来新規ホスホリパーゼ A1 の性質決定」日本農芸化学会 2018 年大会、2018.

藤本 拓也、北村 智彬、泊 直宏、山本 佳宏、鶴岡 直樹、茂里 康、渡部 邦彦 「*Burkholderia* 属細菌 Para-1 株由来アセチルコリンエステラーゼの Cys 残基変異による影響の解析-有機リン系農薬検出系への応用を目指して-」日本農芸化学会 2018 年大会、2018.

武田梨花、西 海斗、清水 歩、渡部邦彦 「*Meiothermus ruber* H328 株由来 protein disulfide oxidoreductase (PDO) の発現量増加による羽毛分解の促進について」日本農芸化学会関西支部例会、2017.

渡部邦彦、大西愛航、清水 歩、西 海斗、川崎一則 「好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株の *degP* 遺伝子破壊株を用いた膜小胞産生に関する研究」日本農芸化学会 2017 年大会、2017.

清水 歩、西 海斗、俣野明日香、森川拓磨、増村威宏、佐生 愛、川崎一則、茂里 康、渡部邦彦 「膜小胞を産生する *Meiothermus ruber* H328 株によるトリ羽毛分解に関する研究 ~ケラチン分解性プロテアーゼ遺伝子破壊株の作成とトリ羽毛分解の検討~」日本農芸化学会 2016 年大会、2016.

[図書](計 0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 邦彦 (WATANABE, Kunihiko)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90184001

(2) 研究分担者

川崎 一則 (KAWASAKI, Kazunori)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
生命工学領域・主任研究員
研究者番号：40356837

増村 威宏 (MASUMURA, Takehiro)
京都府立大学・大学院生命環境科学研究
科・教授
研究者番号：50254321

(3) 連携研究者

なし ()

(4) 研究協力者

なし ()