

令和元年6月12日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18664

研究課題名(和文) 枯草菌における糖脂質の局在とシャペロン機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of glucolipids localization and their chaperone function in *Bacillus subtilis*

研究代表者

松岡 聡 (Matsuoka, Satoshi)

埼玉大学・理工学研究科・講師

研究者番号：90509283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：枯草菌糖脂質欠損株は形態異常を示し、ECFシグマ(M、V、X)が活性化する。異種細菌由来のMGlcDG合成酵素遺伝子導入によって欠損株の形態異常が相補され、ECFシグマの活性化が減少した。MGlcDG、DGlcDG合成酵素遺伝子の同時発現で、X活性が野生型レベルに戻った。これらは、MGlcDGは枯草菌の形態維持やECF制御に必要なこと、またDGlcDGはX制御への関与を示唆する。ECF活性化では通常膜タンパク質であるアンチシグマが分解されるが、糖脂質によるECFシグマの活性化では、アンチシグマの分解は起こらないことから、糖脂質がシャペロン様にアンチシグマに作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、枯草菌糖脂質が膜タンパク質アンチシグマを介したECFシグマの活性化機構において、シャペロンのように働いているなど、新たな知見が得られた。またMGlcDGが枯草菌の細胞形態維持に重要であるなど脂質分子種特異的な機能が明らかとなった。糖脂質および糖脂質を基質として合成されるリポテイコ酸(LTA)は、グラム陽性病原菌の病原性・宿主の抗原認識にも密接に関わっており、本研究から糖脂質の欠損でLTA構造が変化することが明らかとなった。糖脂質の欠損は様々な抗生物質やストレスに感受性になることから、UgtPがグラム陽性病原菌に対する薬剤開発のための新たな標的として有望であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In *Bacillus subtilis*, the *ugtP* mutant, which lacks glyceroglucolipids, shows abnormal morphology and activation of some extracytoplasmic function (ECF) sigma factors (M, V and X) in the log phase. Conversely, the expression of monoglucosyldiacylglycerol (MGlcDG) synthase (*alMGS*) from *Acholeplasma laidlawii* almost completely suppresses the *ugtP* disruptant phenotype. Activation of ECF sigmas in the *ugtP* mutant is decreased by *alMGS* expression. When *alMGS* and *alDGS* (*A. laidlawii* diglucosyldiacylglycerol (DGlcDG) synthase) are simultaneously expressed, X activation is repressed to wild type level. These observations suggest that MGlcDG molecules are required for maintenance of *B. subtilis* cell shape and regulation of ECF sigmas, and that DGlcDG regulates X activity. The activation of ECF sigmas is not accompanied by proteolysis of anti-. Thus, glyceroglucolipids may have the specific role of helping membrane proteins function by acting in the manner of chaperones.

研究分野：微生物分子遺伝学

キーワード：糖脂質 シャペロン ECFシグマ アンチシグマ 枯草菌 細胞形態 膜タンパク質 UgtP

1. 研究開始当初の背景

1997年に枯草菌糖脂質合成酵素をコードする遺伝子が *ugtP* であることが報告されて以降、枯草菌糖脂質に関する研究はほとんど報告されていなかった。2005年 *UgtP* が *FtsZ* と同様に細胞分裂予定域へ局在することが発見され(Nishibori et al., 2005)、その結果に基づき、2007年に Weart らは枯草菌糖脂質合成酵素タンパク質 *UgtP* 細胞分裂タンパク質 *FtsZ* の重合阻害を阻害するという *in vitro* での実験結果を報告し、糖脂質合成酵素 *UgtP* タンパクが細胞分裂を制御するというモデルを提唱した。しかしながら、現在まで *UgtP* によって合成される糖脂質の細胞内局在に関する報告はない。研究代表者は枯草菌の糖脂質欠損株を作製し、その細胞形態が太く歪曲することを見出した。また、研究代表者は糖脂質合成に必要な UDP-グルコース合成系の遺伝子破壊株(糖脂質合成酵素は存在する)を作製し、糖脂質欠損と同様の太く歪曲する形態を見出した(Matsuoka et al., 2011)。更に糖脂質欠損株に進化的に異なるファミリーの糖脂質を生産する酵素遺伝子を導入したところ、細胞形態が野生型と同様に回復した(日本遺伝学会第 83 回大会口頭発表、2011)。これらの結果は Weart らのモデルを支持しない。糖脂質合成酵素 *UgtP* 存在下でも細胞形態が大きく変化することから、むしろ糖脂質そのものが細胞形態の維持に深く関わることを示唆する結果を得ていた(日本遺伝学会第 85 回大会口頭発表、2013)。

2. 研究の目的

枯草菌糖脂質欠損株の形態異常の原因解明を端緒として、多様な生体機能を制御する糖脂質の生物学的機能を分子レベルで明らかにすることを目的とした。特に糖脂質と ECF シグマの関係に着目して研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) ECF シグマは非ストレス条件下では膜タンパク質であるアンチシグマに捕捉され活性が抑制されている。枯草菌糖脂質欠損株ではシグマ M、V、および X が活性化した(Matsuoka et al., 2011)。特にシグマ M は細胞表層維持に関わるレギュロンを制御しており、これら ECF シグマの制御と糖脂質の関連は興味深い。しかしながら、枯草菌細胞内では糖脂質が様々な因子に関わっているため解析を進めるのが困難である。そこで糖脂質を持たない大腸菌内で ECF シグマ活性化における糖脂質の影響を解析した。各 ECF シグマのプロモーターと *lacZ* 遺伝子の転写融合、糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP*、ECF シグマ・アンチシグマオペロンをそれぞれ選択マーカーの異なるプラスミドにクローニングし、糖脂質の有無による ECF シグマ因子の活性への影響をβ-ガラクトシダーゼ活性でモニタした。

(2) 枯草菌では *UgtP* によって3種類の糖脂質が段階的(3段階)に合成される。*ugtP* 破壊によってすべての糖脂質が合成されなくなるため、どの糖脂質分子種が重要なのか解析するのが困難である。そこで、異種細菌由来の糖脂質合成酵素の導入・発現によって糖脂質欠損株の形態異常や ECF シグマの活性化が抑圧されるかを解析した。

(3) 枯草菌糖脂質欠損株ではシグマ M、V、および X が活性化する(Matsuoka et al., 2011)。また枯草菌がリゾチームに曝されると、多段階のプロテアーゼによって *RsiV* が分解され、シグマ V が活性化する。糖脂質欠損におけるシグマ V の活性化について、リゾチーム暴露と同様の経路によるものなのか解析した。

(4) ECF シグマは、糖脂質欠損条件の他、ホスファチジルグリセロール(PG)減少、リポテイコ酸(LTA)欠損条件でも活性化する。LTA は糖脂質と PG から合成されるため、これら減少・欠損条件と ECF シグマ活性化の関係をリアルタイム RT-PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) ECF シグマは、環境ストレスにตอบสนองして、適応に必要な多くの遺伝子の発現を制御している。通常の生育条件下では、ECF シグマは膜タンパク質であるアンチシグマに捉えられており、ストレス条件下で離れて活性を現す。枯草菌の糖脂質を欠く *ugtP* 変異株で活性化したシグマ M、V、X とアンチシグマの遺伝子を大腸菌に導入すると、ECF シグマ因子制御下のプロモーターと *lacZ* のオペロン融合の発現から、ECF シグマ因子の活性が検出できた。また、これら大腸菌に枯草菌の *ugtP* 遺伝子を導入して発現させると、シグマ M、V の活性が抑制された。シグマ X には影響がなかった。糖脂質はアンチシグマ M、V に直接働きかけて、それぞれの ECF シグマ因子を捕捉するようなコンフォメーションをとらせていると考えられる。

(2) 枯草菌の糖脂質は *UgtP* 酵素によって UDP-グルコースからジアシルグリセロールへ次々とグルコースを転移して合成される。*ugtP* 変異株は異常な細胞形態を示すが、UDP-グルコース合成に係る *pgcA* 遺伝子や *gtaB* 遺伝子の破壊によって糖脂質ができなくなっても同様な形態異常を認めことから、糖脂質の欠損が細胞形態異常を引き起こすと考えられた。逆に、*Acholeplasma laidlawii* の aMGs 酵素によってモノグルコシルジアシルグリセロール(MG1cDG)が合成されると、*ugtP* 変異株の細胞形態異常は殆ど完全に相補された。*ugtP* 変異株における ECF シグマ(SigM、

SigV、SigX)の活性化も aIMGS 遺伝子の発現によって下がり、また MgSO₄の添加によって抑えられた。aIMGS と *A. laidlawii* でジグルコシルジアシルグリセロール(DGlcDG)を合成する aIDGS を同時に発現させると、SigX の活性は野生型レベルに抑えられた。これらの観察結果から、枯草菌の細胞形態と ECF 因子を正常に保つのに MGlCDG が必要で、SigX の制御に DGlcDG が働いていると考えられる。

(3)枯草菌 ECF シグマ因子シグマ V は、通常はアンチシグマタンパク質である RsiV に捕捉され、活性が抑制されている。枯草菌がリゾチームに曝されると、多段階のプロテアーゼによって RsiV が分解され、シグマ V が活性化する。枯草菌糖脂質欠損株でもシグマ V 活性が上昇するが、この場合プロテアーゼによる RsiV 分解を伴わないことを明らかにした。また RsiV のドメイン交換実験から、糖脂質欠損によるシグマ V の活性化には RsiV の C 末端領域が重要であることが分かった。

(4)LTA は糖脂質のひとつ DGlcDG に PG 由来のグリセロールリン酸基が多数重合することによって構成される細胞表層成分のひとつである。したがって、糖脂質の欠損や PG の減少が LTA の質的量的変化を起こすかもしれないと考えられたため、糖脂質や LTA の欠損、PG の減少、またはその組み合わせでの ECF シグマの活性を測定した。その結果、糖脂質の欠損によって LTA 構造に変化が起きていることが明らかとなった。また、PG 減少では LTA の変化は認められなかった。LTA 単独欠損と比較して、LTA・糖脂質欠損株では、シグマ M、V、X、Y が更に活性化した。LTA 欠損 PG 減少株では、LTA 単独欠損株と比較して、シグマ M、V、W が更に活性化した。これらの結果は糖脂質欠損や PG 減少により生じると思われる LTA の変化ではなく、糖脂質欠損や PG 減少そのものが ECF の制御に係ることを示唆する。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Seki T, Furumi T, Hashimoto M, Hara H, Matsuoka S. Activation of extracytoplasmic function sigma factors upon removal of glucolipids and reduction of phosphatidylglycerol content in *Bacillus subtilis* cells lacking lipoteichoic acid. *Genes Genet. Syst.* 94, 71-80. (2019) [査読有]

Matsuoka S. Biological functions of glucolipids in *Bacillus subtilis*. (review) *Genes Genet. Syst.* 92, 217-221. (2017) [査読有]

Seki T, Matsumoto K, Matsuoka S, Hara H. Activation without Proteolysis of Anti-Factor RsiV of the Extracytoplasmic Function Factor V in a Glucolipid-Deficient Mutant of *Bacillus subtilis*. *Adv. Microbiol.* 7, 315-327. (2017) [査読有]

Matsuoka S, Seki T, Matsumoto K, Hara H. Suppression of abnormal morphology and extracytoplasmic function sigma activity in *Bacillus subtilis* *ugtP* mutant cells by expression of heterologous glucolipid synthases from *Acholeplasma laidlawii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 2325-2333. (2016) [査読有]

Seki T, Mineshima R, Hashimoto M, Matsumoto K, Hara H, Matsuoka S. Repression of the activities of extracytoplasmic function factors, sigma M and sigma V, of *Bacillus subtilis* by glucolipids in *Escherichia coli* cells. *Genes Genet. Syst.* 90, 109-114. (2015) [査読有]

[学会発表](計29件)

松岡聡、篠原高人、朝井計、戸澤譲. 枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御機構の解析. 日本農芸化学会 2019 年度大会. 2019 年.

濱永里菜、戸澤譲、松岡聡. 枯草菌 X・RsiX のストレス応答機構の解析. 2018 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議. 2018 年.

Matsuoka S, Seki T, Matsumoto K, Hara H. Biological Functions of Glucolipids in *Bacillus subtilis*. 19th International Conference on *Bacilli* & Gram-Positive Bacteria. 2017.

濱永里菜、戸澤譲、松岡聡. 枯草菌 X・枯草菌アンチシグマ因子 RsiX の局在解析. 2017 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議. 2017 年.

松岡聡. 枯草菌の生理機能に関する分子遺伝学的研究(招待講演). 日本遺伝学会第 88 回大会. 2016 年.

関貴洋、松岡聡、松本幸次、原弘志．キメラアンチシグマ因子を用いた糖脂質欠損による枯草菌 V の活性化機構の解析．日本遺伝学会第 88 回大会．2016 年．

松岡聡、松本幸次、朝井計、原弘志．枯草菌細胞形態維持における糖脂質の役割についての解析．21 世紀大腸菌研究会．2016 年．

松岡聡、松本幸次、朝井計、原弘志．枯草菌二成分制御系 WaiKR の制御における糖脂質の影響．日本農芸化学会 2016 年度大会．2016 年．

松岡聡、松本幸次、原弘志．枯草菌 *sigI* の転写制御解析．日本遺伝学会第 87 回大会．2015 年．

関貴洋、峯島良太、橋本理尋、松岡聡、松本幸次、原弘志．枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* 欠損株における ECF シグマ因子の活性化機構の解析．第 57 回日本脂質生化学会．2015 年．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：原 弘志

ローマ字氏名：(HARA, Hiroshi)

研究協力者氏名：松本 幸次

ローマ字氏名：(MATSUMOTO, Kouji)

研究協力者氏名：関 貴洋
ローマ字氏名：(SEKI, Takahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。