

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07716

研究課題名(和文)細菌細胞壁のテイコ酸修飾機構の解明および高温環境適応におけるテイコ酸の重要性

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of teichoic acid decoration and its importance in high temperature adaptation

研究代表者

山本 博規 (Yamamoto, Hiroki)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：20262701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまで明らかにされていなかった枯草菌の細胞壁テイコ酸(WTA)およびリポテイコ酸(LTA)の合成・修飾酵素群について、エピトープタグを融合させることによりそれらの局在性を網羅的に明らかにした。WTA合成・輸送・結合タンパク質は、細胞側壁にパッチ状に局在しており、過去に報告されているGFP融合タンパク質の螺旋状の局在パターンとは異なる事を明らかにした。またLTA合成・修飾タンパク質に関しても、GFP融合タンパク質で報告されているセプトムへの局在性に加えて、側壁にもパッチ状に局在していることを見出した。さらにこれらのタンパク質の共有局在性を調べることで、細胞内での位置関係を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラム陽性細菌は厚い細胞壁をもっており、細胞形態を決める外骨格として機能するとともに、様々な環境変化や化学物質などから細胞を守る機能がある。細胞壁テイコ酸およびリポテイコ酸の両方を欠損すると合成致死になることから、両テイコ酸の重要性がうかがえる。本研究では、細胞表層のWTAやLTA修飾機構を明らかにするとともに、両テイコ酸の生理的役割の解明を試みた。本研究により得られた成果は、未だ不明な点が多い細胞壁のテイコ酸修飾が、細胞表層においてどのように行われているのか明らかにするとともに、新たな殺菌・静菌法の開発にもつながる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have systematically demonstrated that subcellular localization of epitope-tagging proteins involved in the wall- and lipo-teichoic acid biosynthesis pathways in *Bacillus subtilis*. In the case of WTA synthesis, export, and attachment proteins, they were localized in patch-like patterns along the sidewall, being different from helical localization in a previous report regarding the GFP-fused proteins. In addition, LTA synthases and modification enzymes have localized not only at septum but also along the sidewall in the patch-like manner. Moreover, we have performed co-localization analyses for these proteins to observe distinct subcellular localization and to identify the nascent biosynthesis sites of these anionic polymers.

研究分野：応用微生物学

キーワード：枯草菌 細胞壁 細胞壁テイコ酸 リポテイコ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性細菌の細胞壁は、主に2種類のテイコ酸ポリマーで修飾されることにより機能している。細胞壁テイコ酸(WTA)はペプチドグリカン(PG)を、リポテイコ酸(LTA)は細胞膜を修飾している。枯草菌の場合、両テイコ酸の主鎖は、同じグリセロールリン酸(GroP)の陰イオンポリマーで構成され、レアアース等の希少金属イオンを特異的に吸着する性質をもつことが明らかになっている。WTAは細胞内で前駆体が合成され、その欠損株は丸く膨らんだ形態を示すのに対し、LTAは細胞外で合成・修飾され、欠損株は長くねじれたような形態異常を示す。さらに、両テイコ酸の欠損株は合成致死性を示すことから、WTA及びLTAは新規抗生物質のターゲットとしても注目されている。申請者らはこれまでに、WTAのグルコース修飾を蛍光標識レクチン(ConA-TMRあるいはConA-AF488)により検出することで、細胞側壁におけるWTA修飾が細胞膜付近ではパッチ状に行われ、その後WTAにより修飾された繊維状の新規細胞壁ファイバーが、細胞に巻き付くように螺旋状に挿入されて行くことを見出した。

一方、枯草菌において主要なLTA合成酵素であるLtaSには、主にストレス応答に関与する3つのホモログ(YfnI, YqgS, YvgJ)が存在することが知られている。LTAは金属イオンの保持や、セプタム形成の制御に関与していること以外には、その局在性や機能がほとんど明らかにされていないのが現状である。これまでの報告によると、N-末端にGFPを融合させたGFP-LtaSは、主にセプタム部分に局在しており、*ltaS*変異株は細胞分裂に異常をきたすことから、LTAはセプタム部分の細胞膜を修飾することで分裂部位の決定に重要な役割を担っていると考えられていた。しかし*ltaS*を欠損させた細胞では、本来細胞分裂面のみで局在するLytFが細胞側壁にも螺旋状に局在すること、および細胞伸長に関与するLytEの発現量が3倍以上に増大し、側壁への局在量も大幅に増加すること等を見出した。以上の結果から、LTAはWTAと同様に細胞側壁にも局在しており、側壁の伸長に機能するLytEの発現量と局在性を制御している可能性が強く示唆された。また、高温環境下で培養した際の両テイコ酸に関する興味深い知見として、野生株を52℃で培養した場合、37℃で培養した細胞に比べてWTA量が約35%低下し、LTA修飾はほとんど行われていないことを見出した。このため高温条件におけるLTA修飾の著しい減少が、SigI依存性である*lytE*発現量の顕著な増加を引き起こしている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまで得られた結果では、細胞膜付近の新規PG合成部位、新規WTA修飾部位、新規LTA修飾部位のそれぞれが、いずれもパッチ状の局在性を示すことがわかった。これらの知見に基づき、細胞表層成分についてさらに詳細に解析するために次のような事項の解明を目指した。

(1) FLAG-tagやConA-TMR、抗LTA抗体等を用いた共染色を実施し、細胞壁の合成・修飾・分解に関与する様々な構成成分の相対的な位置関係を明らかにする。(2) 高温条件下においてテイコ酸修飾の低下が見られた原因を解明するために、両テイコ酸合成酵素の局在性および局在量に変化が見られるかどうか調べる。(3) WTAよりもLTAの方がMg²⁺イオンの捕集において主要な役割を担っていることから、LTA欠損株における細胞内Mg²⁺イオンの充足度を測定する。これにより、LTA欠損株が43℃までしか生育できない原因の解明を試みる。(4) LytEやCwlOのような細胞伸長に必須である細胞壁溶解酵素について、現時点では明らかにされていない分泌直後の局在性について共染色実験を行い、それぞれの位置関係を明確にする。

これらの新たな知見が得られることは、これまで明らかにされていない高温適応機構におけるテイコ酸の役割の解明のみならず、新たな殺菌・静菌法の開発にもつながる可能性が考えられ

る。そこで本研究では、細胞表層の WTA や LTA 修飾機構を明らかにするとともに、高温条件下における両テイコ酸の修飾機構や生理的役割の解明を目的としている。本研究を進めることで、未だ明らかにされていない細胞表層のテイコ酸修飾に関する新たな生理学的意義の解明につながる可能性が期待できる。

3. 研究の方法

細胞壁の合成・修飾機構を解明するための取り組みとして、まず WTA 合成酵素 (TagA/B/D/F/O) および WTA 輸送タンパク質 (TagG/H) WTA をペプチドグリカンに結合する WTA リガーゼ (TagT/U/V) に FLAG-tag あるいは Myc-tag を融合し、それらの共染色観察を実施する。また同様に、LTA 合成酵素についても共染色実験を実施し、複数存在する LTA 合成酵素の共局在性を明らかにする。また、WTA や LTA を D-alanine (DltD) やグルコース (TagE) *N*-アセチルグルコサミン (CsbB-YfhO) 修飾する酵素についてもそれらの局在性を明らかにする。また、高温条件下において WTA 及び LTA 修飾が低下する原因を明らかにするために、両テイコ酸合成酵素の局在量と局在パターンに変化が見られるかどうか調べる。さらに、LTA 欠損株の生存限界温度が 43 °C まで低下する原因を明らかにするために、LTA 欠損株における細胞内 Mg²⁺イオンの充足度を測定する。細胞内における Mg²⁺イオンの充足度の測定は、リボスイッチにより Mg²⁺イオン依存的に転写制御される P_{mgtE} プロモーターからの転写をモニターすることで実施する。次に、WTA および LTA により発現量と局在性が制御されている LytE および CwlO の分泌直後の局在部位と、WTA および LTA の新規修飾部位が一致するかどうか共染色により解析する。

4. 研究成果

まず、WTA 合成に関与する TagO/A/B/D/F タンパク質に関して、FLAG 融合タンパク質の局在性を観察した結果、全てのタンパク質が細胞側壁にパッチ状に局在していることが明らかとなった。この結果は、過去に GFP 融合タンパク質で報告されているらせん状の局在パターンとは異なっていた。また WTA 前駆体をペプチドグリカンに結合する WTA リガーゼである TagT/U/V や、WTA のグルコース修飾に関与する TagE および D-alanine 修飾に関与する DltD についても、同様のパッチ状の局在パターンを示した。次に、WTA リガーゼである TagT/U/V に 2 種類の epitope-tag (FLAG および c-Myc) を融合させて共局在するかどうか観察した結果、TagT と TagV は約 82% の高頻度で共局在していた。一方、TagT と TagU は約 60%、TagV と TagU は約 58% 程度の共局在性を示した。このことから TagT と TagV は大部分が同じ場所で働いているものの、TagU は若干異なる場所で機能している可能性が示唆された。このことは 3 種類の WTA リガーゼ間でも、役割分担が存在する可能性が示唆された。さらに、細胞壁テイコ酸 (WTA) 輸送体である TagGH タンパク質に FLAG-tag を融合させ、免疫蛍光顕微鏡観察を行った結果、細胞側壁にパッチ状に局在することを明らかにした。また、TagH タンパク質の膜貫通領域および細胞外ドメインを欠損させた場合、37 °C では生育に全く影響を及ぼさないが、50 °C 以上では生育が停止することを見出した。この生育への影響は、膜貫通領域を残して細胞外ドメインのみを欠損させた場合には見られなかった。このことから、TagH の膜貫通領域は高温でのテイコ酸輸送に必須であることが明らかになった。

次に、栄養増殖期に発現している LTA 合成酵素 (LtaS および YfnI) や LTA の *N*-アセチルグ

ルコサミン修飾に関与する酵素 (CsbB および Yfh0) に関しても、それらの局在性を調べた結果、いずれも細胞側壁にパッチ状に局在していた。また、LtaS と YfnI について共局在性を調べた結果、約 60% のタンパク質が共局在していたものの、残りのスポットは単独で局在していたことから、栄養増殖期の LTA 合成酵素に関しても、ある程度の割合で役割分担がある可能性が示唆された。

またテイコ酸欠損株について、それらの高温での生育について調べた結果、野生株が 53 まで生育可能であるのに対し、WTA 欠損株 ($\Delta tag0$) は 50 では生育に遅れが見られ、51 では生育できないことがわかった。一方、LTA 欠損株 ($\Delta ltaS \Delta yfnI \Delta yqgS \Delta yvgJ$) は 43 で既に生育に遅れが見られ、51 では生育できないことが明らかになった。そこで培地中に高濃度 (25 mM) の Mg^{2+} イオンを添加すると、WTA 欠損株では特に生育の回復が見られなかったのに対し、LTA 欠損株は、43 では野生株と同様に生育可能となり、51 においても部分的な生育の回復が見られた。そこで Mg^{2+} 濃度依存的にリボスイッチにより転写が制御されている P_{mgtE} -*lacZ* 株を用いて、LTA 欠損株の細胞内 Mg^{2+} イオンの充足度を調べた結果、細胞内の Mg^{2+} イオン濃度は野生株と比べてほとんど変化が見られなかった。従って、LTA を欠損することにより生じる高温感受性は、細胞内の Mg^{2+} イオンが不足していることに起因している訳ではないことが示唆された。LTA 欠損株の高温耐性能の低下がどのようなメカニズムにより生じているのか、今後さらなる解析が必要である。

さらに細胞増殖において重要な細胞壁溶解酵素 LytE と Cwl0 の分泌直後の局在性について調べた。これまでの研究により、LytE は細胞側壁にらせん状に局在していることが明らかになっているが、Cwl0 の局在性は明らかにされていなかった。Cwl0 は膜タンパク質である FtsEX により活性を制御されているため、Cwl0 の C-末端に 6xFLAG タグを融合させた株を構築し、細胞膜近傍の局在性を観察したが、明確な蛍光は観察されなかった。そこで Cwl0 の N-末端に 6xFLAG タグを融合させたところ、細胞膜近傍で明確なパッチ状の蛍光が観察された。同様に FtsX の局在性についても観察した結果、細胞側壁においてパッチ状に局在していた。さらに Cwl0 の発現を人為的に誘導したところ、誘導 5 分後からパッチ状の蛍光が観察され、その後時間が経過しても局在パターンに変化は見られなかった。一方、LytE は誘導 5 分後にはパッチ状に局在し、その後らせん状の局在パターンへと変化した。このことから分泌直後の Cwl0 と LytE はパッチ状に局在するが、その後の局在パターンは変化することが明らかになった。さらに細胞側壁に分泌直後の両酵素の共局在性を調べた結果、約 62% の共局在性を示していた。このことから分泌直後の両酵素は、大部分は同じ部位ではたらいっているものの、一部異なる部位でも機能している可能性が示唆された。両酵素の局在性を制御する因子については今後更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada, T., Miyashita, M., Kasahara, J., Tanaka, T., Hashimoto, M., Yamamoto, H.	4. 巻 164
2. 論文標題 The transmembrane segment of TagH is required for wall teichoic acid transport under heat stress in <i>Bacillus subtilis</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 935-945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mic.0.000674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashimoto Masayuki, Matsushima Hiroaki, Suparthana I. Putu, Ogasawara Hiroshi, Yamamoto Hiroki, Teng ChingHao, Sekiguchi Junichi	4. 巻 164
2. 論文標題 Digestion of peptidoglycan near the cross-link is necessary for the growth of <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 299 ~ 307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mic.0.000614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚 匠, 山本博規, 森脇 洋
2. 発表標題 枯草菌あるいはその遺伝子操作株をフリーズドライした粉末による金イオンの吸着
3. 学会等名 環境化学討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----