

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07741

研究課題名(和文) ラクトコッカス属乳酸菌の線毛先端タンパク質の構造と細胞相互作用の解析

研究課題名(英文) Structure and function of pilus tip proteins of *Lactococcus lactis*

研究代表者

鈴木 チセ (SUZUKI, Chise)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80343820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫賦活活性を持つ乳酸球菌 *Lactococcus lactis* G50株の細胞表面タンパク質 YwfG の X線結晶構造を明らかにし、YwfG は糖の結合に寄与するレクチン構造をもち、マンノース残基、特に $\alpha 1,2$ マンノビオースと強く結合することを明らかにした。酵母の表面はマンノース残基で覆われているため、酵母との相互作用を調べた結果、YwfG が酵母の凝集を起こすこと、G50株は酵母と凝集するが、ywfG破壊株では凝集しないことを示し、YwfG が酵母との相互作用に寄与することを明らかにした。これらの成果は、乳酸球菌の YwfG とマンノースとの結合を介した新たな構造的・機能的知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原菌の細胞表面タンパク質については知見が蓄積されているが、乳酸球菌 *Lactococcus lactis* の細胞表面タンパク質についてはゲノム情報にとどまっている。本研究では抗G50抗体と反応するタンパク質として YwfG を単離し、結晶構造解析からその機能を推定し、実際にマンノース残基との相互作用、さらには酵母菌体との相互作用を明らかにした。YwfG は構造上黄色ブドウ球菌の SraP と類似しているが、結合する糖鎖が異なることが示唆され、病原菌では動物性宿主の、*L. lactis* では植物基質や酵母など、異なる宿主特異性の要因になっていることが考えられる。

研究成果の概要(英文)： *Lactococcus lactis* G50 (G50) is a plant-derived strain and potential candidate probiotics. We determined the crystal structure of cell surface protein YwfG of G50 that reacts with anti-G50 antibody. Our study revealed that YwfG exhibits a lectin structure with specific binding affinity to mannose residues, particularly $\alpha 1,2$ -mannobiosyls. Furthermore, we investigated the interaction between YwfG and yeast, which is coated with mannan proteins. Our results demonstrated that YwfG induces yeast aggregation and that the G50 strain forms aggregates with yeast, whereas the ywfG-disrupted strain does not, highlighting the role of YwfG in yeast interaction. These findings provide novel insights into the structural and functional aspects of YwfG-mediated mannose binding in its ecological niche.

研究分野：応用微生物学

キーワード： *Lactococcus lactis* cell surface protein interaction mannobiose

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの細菌は細胞表面にタンパク質が重合した繊維状の線毛 (Pili) をもち、宿主への接着や侵入に用いられる。グラム陽性菌の線毛はグラム陰性菌の線毛とは異なり、数百コピーのピリン (線毛タンパク質) が直鎖状に結合した構造体で、ソルターゼによって重合する。先端部と細胞壁に結合するタンパク質は別のタンパク質が配置される。*Lactococcus lactis* の線毛に関しては、pil オペロンを過剰発現することにより、その存在が確認された(Oxaran et al. PLoS One, 2012; 7(12):e50989)。また植物由来の *L. lactis* において、高い上皮細胞への付着性とピリンの発現が確認された(Meyrand et al. Mol Cell Proteomics, 2013;12, 3935)。報告者らは *L. lactis* のゲノム配列解析から線毛クラスターの違いに着目した。報告者らは、*L. lactis* 菌株のマクロファージ様細胞におけるサイトカイン誘導能や NO 誘導能や、細胞外多糖の糖組成の違いなど菌株特異性について報告してきたが、その要因となる分子は特定できていなかった。細胞表層分子の候補を探す中で、線毛タンパク質を含むソルターゼで細胞壁に結合する LPXTG モチーフをもつタンパク質に着目した。

2. 研究の目的

本研究では免疫賦活活性が高く、プロバイオティクスの候補株である *L. lactis* G50 株を用い、*L. lactis* の線毛タンパク質と、宿主細胞との相互作用における免疫賦活作用の関係を明らかにすることを目的とした。特に線毛先端に配置する YhgD タンパク質の構造との関係を株間比較及び遺伝子改変によって動物細胞との相互作用を明らかにすることを試みた。一方で G50 菌体を抗原として作出した抗体に反応するタンパク質はエピトープとして認識される反応性をもつことが予想され、それらの細胞表層タンパク質と宿主との解析も本課題で取り組むこととした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

乳酸菌は農研機構畜産研究部門で保有している *L. lactis* G50, S63, O29, H46, H54 を用いた。また G50 の *ywfG* 遺伝子破壊株として作出した *L. lactis* 5A, 12A を用いた(後述)。酵母は *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A, マンナンタンパク質を放出する *gpi10* 変異株 *S. cerevisiae* AB9 (MATa/ α *gpi10/gpi10*), α 1,2-マンノース欠損株と *gpi10* の二重変異株 *S. cerevisiae* AB-2(MATa/ α *gpi10/gpi10 mnn2/mnn2*, isogenic to AB9)を用いた。

(2) ゲノム解析

L. lactis 6 株のゲノムデータ(MiSeq)について Galaxy を用いて比較解析した。また Pacbio で得られた G50 株のゲノム配列データを用いて LPXTG モチーフをもつ細胞表層タンパク質の検索を行った。

(3) 細胞表層タンパク質の調製

細胞表層／細胞壁タンパク質は Meyrand et al (Mol Cell Proteomics. 2013;12(12):3935) の方法に基づき、ガラスビーズ破碎して得られた細胞壁画分をリゾチームとムタノリシンで酵素処理し、得られた上清をウェスタンブロットに供した。

(4) 抗 G50 抗体と反応するタンパク質の解析

細胞表層タンパク質画分を用いて、抗 G50 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングで可視化されたバンドに対応する CBB 染色のバンドを切り出し、MALDI TOFMS (4800 Plus TOF/TOF analyzer, SCIEX) および MASCOT サーチ (ver. 2.4.0.; Matrix

Science, London, UK) を用いてタンパク質の同定を行った。

(5) YwfG の組換え変異体の作製

ゲノム情報から得られた *ywfG* の配列からプライマーを作り、PCR により YwfG 変異体 (28–270, 28–336, 28–511, and 860–1034, 数字はアミノ酸残基) をコードする DNA 配列を得た。pET28b に組み込んで大腸菌 BL21(DE3) で発現し、His-tag を利用して精製し組換えタンパク質 YwfG_{28–270}, YwfG_{28–336}, YwfG_{28–511}, MubR4 (860–1034 残基) を得た。

(6) 等温滴定型カロリメトリー (ITC)

ITC は MicroCal iTC200 system (Malvern Panalytical, Almelo, Netherlands) を用いて行なった。YwfG 組換え変異体は 100 μ M、単糖は 10 mM、マンノビオースは 2 mM、酵母マンナン (Sigma) は 10 mg/L の濃度を用いた。マンナンタンパク質は *S. cerevisiae* AB9 および AB-2 を SD 培地で 6 日間培養し、培養上清を限外濾過 (分子量 10,000 カット) で濃縮し、エタノール沈殿を 2 回繰り返したものを OD₂₈₀=1 になるように調製して用いた。

(7) 結晶構造解析

YwfG_{28–511} を結晶化し、回折データを高エネルギー加速器研究機構にて取得した。D-マンノースおよび α -1,2-マンノビオースの糖鎖複合体の結晶はそれぞれの 10% 糖溶液に結晶を回折実験の前に浸漬することで得られた。YwfG_{28–511} のリガンドフリー構造は、SraP (PDB code 4m01) のレクチンドメイン (残基 258–492) を検索モデルとして、分子置換法により決定した。糖鎖複合体構造は、リガンドを含まない構造を出発モデルとして構築した。

(8) *L. lactis* G50 の *ywfG* 破壊株の作製

ywfG 遺伝子の破壊は温度感受性複製開始点をもつ pG+host プラスミドを用いた対立遺伝子交換法により行なった。*ywfG* の前後 1kb の領域を PCR で増幅して連結し、この領域を含むプラスミドを G50 に形質転換、pG+host の複製ができない 37°C で培養することによりクロモソームへの組み込みを促し、得られた組換え株をエリスロマイシン非存在下で培養し、プラスミドの切り出しを誘導した。得られた *ywfG* 破壊株は PCR および YwfG の発現がないことをウェスタンブロットで確認した。

(9) 酵母細胞と YwfG 変異体および *L. lactis* 細胞との相互作用

OD_{0.6} に調製した X2180-1A 50 μ L と YwfG 変異体 (1 μ M) 10 μ L と PBS または D-マンノース (0.5 mM)、 α -D-マンノシド (0.5 mM)、各種マンノビオース (1 mM) 40 μ L を混合して 1–2 時間後の凝集を観察した。同様に G50 および *ywfG* 破壊株を添加した時の凝集を観察した。

4. 研究成果

(1) *L. lactis* における線毛先端タンパク質 YhgD の存在

L. lactis 6 株のゲノムデータ (MiSeq) について Galaxy を用いて解析した結果、*L. lactis* subsp. *lactis* C59 と DRC2 は Q14 タイプの線毛遺伝子をもつが、4 株は線毛遺伝子をもたないことが推定された。畜産研究部門保有の *L. lactis* 39 株について PCR で *yhgD*-*yhgE* 領域の有無を調べた結果、20 株で *yhgD*-*yhgE* 領域が増幅された。*yhgD* の配列を用いて系統解析を行った結果 G50 を含む 3 株が同じクラスターに属し、残り 17 株は異なるクラスターに分かれた。

当初予定していた YhgD の解析は、*L. lactis* において *yhgD* 遺伝子の発現が顕著ではなかったこと、YhgD の組換えタンパク質を作り抗体作製を行ったが、期待される抗体が得られなかったことなど、解析が困難であったため、本課題では線毛タンパク質ではない細胞表層タンパク質 YwfG について以下に述べる解析を進めた。最終年度、alphafold で作製した分子モデルをもとに YhgD の予測されるレクチンドメイン部分の組換えタンパク質の構造が分子置換法により明ら

かになった。YhgD については今後検討していく。

(2) 抗 G50 抗体が認識する細胞表層タンパク質

G50 生菌を抗原として作出した抗体を用いて G50 の細胞表層タンパク質のウェスタンブロットを行った。抗体と強く反応する 120 kDa のバンドについて MALDI TOFMS 及び Mascot サーチを用いて解析した結果、細胞壁タンパク質(以下 YwfG)と同定された。線毛タンパク質 YhgD は抗 G50 抗体では検出されなかった。YwfG は 1107 アミノ酸 からなり、N 末端側に L-型レクチンドメイン、ムチン結合タンパク質ドメイン、続いて粘膜結合タンパク質リピートが 4 つ連なる構造、C 末端側に細胞壁アンカードメインである LPXTG モチーフを有していた。抗体作製時にエピトープになったことから、宿主と何らかの相互作用が期待される。

(3) YwfG₂₈₋₅₁₁ の結晶構造解析

大腸菌の発現系を用いて YwfG の N 末端側の L 型レクチンドメインからムチン結合ドメインのうち 1 つを含む 28-511 残基のタンパク質 YwfG₂₈₋₅₁₁ を発現し結晶化を行い、解析を行なった結果、2.6Å の分解能でほぼ構造予測通りの結晶構造が得られた(図 1)。また、YwfG₂₈₋₅₁₁ 結晶にマンノースおよび α -1,2-マンノピオースをソーキングした糖結合型 YwfG₂₈₋₅₁₁ の構造解析を行い、YwfG に対するマンノース結合様式を解明した。

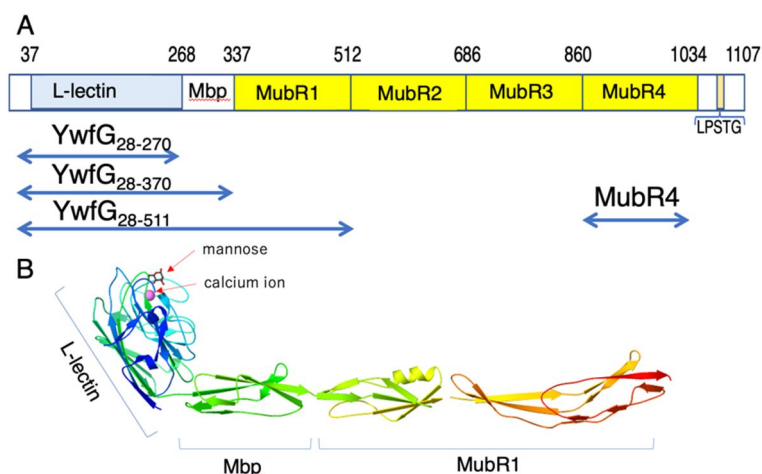


図 1. ywfG 遺伝子の構造と作製した YwfG 変異体の領域 (A) と YwfG₂₈₋₅₁₁ の結晶構造 (B)

(4) YwfG 変異体と糖の相互作用解析

YwfG₂₈₋₅₁₁ を用いて、ヒト型糖鎖を網羅した糖鎖アレイ解析に供してレクチンとして結合する糖鎖の解析を行ったが、結合活性は認められなかった。そこで、4 つの YwfG 変異体 YwfG₂₈₋₂₇₀, YwfG₂₈₋₃₃₆, YwfG₂₈₋₅₁₁, MubR4 について等温滴定型カロリメトリー(ITC)を用いて単糖の結合実験を行なった。YwfG₂₈₋₂₇₀ に対する単糖の結合能を ITC で解析した結果、D-マンノースに対してのみ結合能が確認された。一方、他の変異体 YwfG₂₈₋₃₃₆, YwfG₂₈₋₅₁₁, MubR4 は糖との結合能を示さなかった。次に α -1,2-、 α -1,3-、 α -1,4-、 α -1,6-マンノピオースとの相互作用解析を ITC により実施した。YwfG₂₈₋₂₇₀ に対して 4 種のマンノピオースはいずれも結合を確認したが α -1,2-マンノピオースに対する結合能がもっとも高かった(解離定数 $K_D = 34 \mu M$) (図 2)。興味深いことに、マンノピオースとの結合は YwfG₂₈₋₂₇₀ のみで測定され、YwfG₂₈₋₃₃₆, YwfG₂₈₋₅₁₁ は全く結合性を示さなかった。マンナンタンパク質放出性をもつ *S. cerevisiae* AB9 および α -1,2-マンノース転移酵素欠損株である *mnn2* 変異株 AB9-2 から得られたマンナンタンパク質を用い、ITC 解析を行なった。AB9 株由来のマンナンタンパク質と YwfG₂₈₋₂₇₀ との ITC 解析において結合エネルギーが観測された。一方、*mnn2* 変異 AB9-2 株由来のマンナンタンパク質(α -1,2-結合のマンノースが少ない)では AB9 株由来と比べて YwfG₂₈₋₂₇₀ との結合性が低い傾向が見られ、マンノピオースの結

果と矛盾しない結果が得られた。

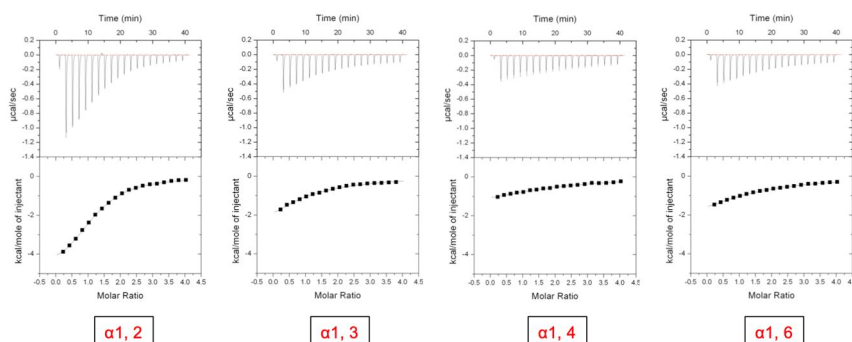


図2. YwfG₂₈₋₂₇₀ と各種マンノビオースとの ITC 解析。YwfG₂₈₋₂₇₀ に対する4種のマンノビオースの ITC 解析の結果、いずれも結合が確認されたがα-1,2-マンノビオースが最も高い結合能を示した。

(5) 酵母との相互作用解析

酵母の細胞表面はマンノース糖鎖が付加されたマンナンタンパク質で覆われている。そこで、酵母と YwfG 変異体との結合を凝集反応により観察した。 *S. cerevisiae* X2180-1A を PBS に懸濁し、各 YwfG 変異体とマンノースを混合した。その結果、YwfG₂₈₋₂₇₀、YwfG₂₈₋₃₃₆、YwfG₂₈₋₅₁₁ では凝集が見られたが、MubR4 では凝集しなかった。興味深いことに YwfG₂₈₋₂₇₀ による X2180-1A の凝集はマンノース添加によっても阻害されなかったが YwfG₂₈₋₃₃₆ および YwfG₂₈₋₅₁₁ による凝集はマンノース添加により阻害された。同様に YwfG₂₈₋₂₇₀ による凝集はマンノビオース添加によって阻害されなかったが、YwfG₂₈₋₃₃₆ と YwfG₂₈₋₅₁₁ による凝集は、α-1,2-マンノビオースの存在下で明確に阻害され、α-1,3-, α-1,4-, α-1,6-マンノビオース存在下で弱く抑制された (図3、A)。酵母に G50 を添加すると弱い凝集反応が観察されたが、*ywfG* 破壊株では凝集しなかった (図3、B) ことから、YwfG が酵母の凝集に寄与していることが示された。

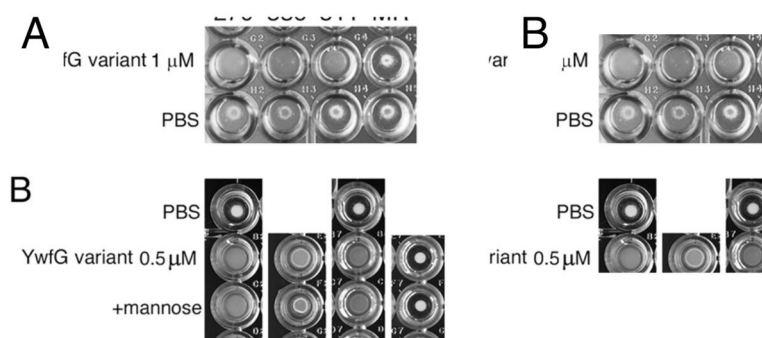


図3. 酵母と YwfG 変異体の凝集反応とマンノビオースによる阻害 (A) および酵母と G50 および *ywfG* 破壊株の凝集反応(B)

粘液結合タンパク質に分類される YwfG は、黄色ブドウ球菌の SraP レクチンと相同であるが、SraP レクチンとは異なり、マンノース残基との結合を示した。これらの結果は、*L. lactis* とその生育環境、例えば植物基質や酵母との相互作用について新たな構造的・機能的な知見をもたらし、病原性細菌の細菌-宿主相互作用とは異なることを示した。

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 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuchiya Wataru, Fujimoto Zui, Inagaki Noritoshi, Nakagawa Hiroyuki, Tanaka Miwa, Kimoto-Nira Hiromi, Yamazaki Toshimasa, Suzuki Chise	4. 巻 18
2. 論文標題 Cell-surface protein YwfG of <i>Lactococcus lactis</i> binds to α -1,2-linked mannose	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0273955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0273955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

1. 著者名 Nakano Kazuma, Minami Maiko, Shinzato Misuzu, Shimoji Makiko, Ashimine Noriko, Shiroma Akino, Ohki Shun, Nakanishi Tetsuhiro, Tamotsu Hinako, Teruya Kuniko, Satou Kazuhito, Moriya Naoko, Kimoto-Nira Hiromi, Kobayashi Miho, Hagi Tatsuro, Nomura Masaru, Suzuki Chise, Hirano Takashi	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> G50 with Immunostimulating Activity, Isolated from Napier Grass	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00069-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/genomeA.00069-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 —

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 鈴木チセ
2. 発表標題 Cell Surface Proteins as Strain Specificity Determinant of Lactococcal Strains
3. 学会等名 The 12th Asian conference lactic acid bacteria （第12回アジア乳酸菌学会）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 チセ、土屋 渉、藤本 瑞、稲垣 言要、山崎 俊正、田中美和
2. 発表標題 α 1,2結合マンノースに親和性をもつ <i>Lactococcus lactis</i> の細胞表層タンパク質 YwfG
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 チセ、土屋 渉、藤本 瑞、稲垣 言要、山崎 俊正
2. 発表標題 乳酸菌 <i>Lactococcus lactis</i> の細胞壁タンパク質YwfGの構造とマンノース結合性
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木チセ、中川博之、山崎俊正、守谷直子、木元広実
2. 発表標題 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> G50株の細胞壁タンパク質YwfG
3. 学会等名 2018年度日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chise Suzuki, Hiroyuki Nakagawa, Toshimasa Yamazaki, Naoko Moriya, Hiromi Kimoto-Nira
2. 発表標題 Analysis of cell wall proteins as potential determinants of immunostimulatory activity of <i>Lactococcus lactis</i>
3. 学会等名 12th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and health (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chise Suzuki, Kazuma Nakano, Naoko Moriya, Maiko Minami, Misuzu Shinzato, Makiko Shimoji, Noriko Ashimine, Akino Shiroma, Shun Ohki, Tetsuhiro Nakanishi, Hinako Tamotsu, Kuniko Teruya, Kazuhito Satou, Hiromi Kimoto-Nira, Miho Kobayashi, Tatsuro Hagi, Masaru Nomura, Takashi Hirano
2. 発表標題 COMPLETE GENOME SEQUENCE OF <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> G50 AND PILIN LOCUS STRUCTURE
3. 学会等名 FEMS 2017 Congress(The 7th Congress of European Microbiologist) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木チセ、中川博之、山崎俊正、守谷直子、木元広実
2. 発表標題 Lactococcus lactis subsp. lactis G50株の細胞表層タンパク質の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------