

平成 22年 4月 30日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ~ 2010

課題番号：19380047

研究課題名(和文) 細菌細胞の形を支配する新規表層蛋白質の解析

研究課題名(英文)

Analysis of novel cell surface proteins affecting cell shape of bacteria

研究代表者

関口 順一 (SEKIGUCHI JUNICHI)

信州大学・総合工学系研究科・教授

研究者番号：80110053

研究代表者の専門分野：ゲノム・応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能, 表層蛋白質, 細胞形態, 細胞壁溶解酵素, インヒビター, 枯草菌

## 1. 研究計画の概要

細胞の形を作る因子の研究は、細胞増殖・分裂、細胞壁の合成、分解にも直接関係する重要な領域である。そこで細胞の形に影響することが解った機能未知遺伝子とその産物の機能を、分子生物学的に解明し、細胞の形を作るメカニズムを明らかにする。

## 2. 研究の進捗状況

枯草菌及びその類縁菌が生産する IseA (YoeB) はタンパク質系の細胞壁溶解酵素阻害剤であり、*in vivo* でも IseA の高発現が細胞の繊維状化をもたらすことを見つけた。枯草菌においては多数の細胞壁溶解酵素が存在し、酵素の基質特異性も様々であるが、特に栄養細胞増殖期にはグルコサミニダーゼ、ムラミダーゼ、アミダーゼ、LD-エンドペプチダーゼ、DL-エンドペプチダーゼ、DD-エンドペプチダーゼが生産される。*in vitro* では複数の細胞壁溶解酵素のなかでも、さらに DL-endopeptidase のなかでも、LytE が主にこの阻害タンパク質の標的となっていた。一方必須 2 成分制御系 YycGF の下流にある LytE、Cwl10 は同時の変異で合成致死を示すが、少なくとも LytE の触媒ドメインを同じ DL-endopeptidase 活性を示す LytF、Cwl1S の触媒ドメインに置換できることが解った。一方 LytF、Cwl1S では LytE と同じ細胞壁結合性ドメイン LysM ではあるが、その繰り返しは LytF、Cwl1S ではそれぞれ 5 回、4 回存在するのに対し、LytE では 3 回であり、この違いが LytF、Cwl1S が分裂部位と細胞の局に存在するのに対し、LytE では細胞側面へ局在する原因

であることが推定された。Cwl10 はプロテアーゼに感受性の蛋白質であるが、分泌性プロテアーゼ変異株を使うことにより、LytE 同様細胞側面に局在することを初めて明らかにした。IseA のゲルろ過による精製途中、2 つの異なる分子量を示すピークが認められた。分子量から推測するとモノマーとダイマーであり、それぞれがかなり安定に存在していた。このことは IseA の構造変化が阻害活性に影響する可能性が有ると考えられ、DL-endopeptidase 活性への阻害実験を計画している。また高次構造決定の為、結晶化も引き続き実施している。

## 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由) IseA 阻害タンパク質の機能解析は順調に進展している。それ以外に細胞壁の分解が細胞の増殖に必須であることを分子生物学的に明らかにするとともに、2 つの細胞壁溶解酵素の細胞壁ペプチドグリカン側面への結合が重要であることを始めて明らかにできたため。

## 4. 今後の研究の推進方策

合成致死を示す 2 つの細胞壁溶解酵素の触媒酵素ドメインをさらに全く基質特異性の異なる細胞壁溶解酵素ドメインに変えることが可能かを見当する。さらに引き続き IseA の立体構造解析のアプローチを進める。

## 5. 代表的な研究成果

(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4件)

- ① 橋本昌征, 山本博規, 関口順一: 枯草菌における細胞の分離. 繊維と工業 **65(8)**:282-286 (2009) (査読無)
- ② Fukushima, T., T. Kitajima, H. Yamaguchi, Q. Ouyang, K. Furuhashi, H. Yamamoto, T. Shida, and J. Sekiguchi: Identification and characterization of new cell wall hydrolase, CwlT: a two-domain hydrolase of *N*-acetylmuramidase and D,L-endopeptidase. *J. Biol. Chem.*, **283(17)**:11117-11125 (2008) (査読有)
- ③ Yamamoto, H., M. Hashimoto, Y. Higashitsuji, H. Harada, N. Hariyama, L. Takahashi, T. Iwashita, S. Ooiwa and J. Sekiguchi: Post-translational control of vegetative cell separation enzymes through a direct interaction with specific inhibitor IseA in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **70(1)**:168-182 (2008) (査読有)
- ④ Yamamoto, H., Y. Miyake, M. Hisaoka, S. Kurosawa, and J. Sekiguchi: The major and minor wall teichoic acids prevent the sidewall localization of vegetative D,L-endopeptidase LytF in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **70(2)**:297-310 (2008) (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① I Putu Sudiarta, T. Fukushima, J. Sekiguchi. *Bacillus subtilis* CwlP in the SP-beta prophage comprises two novel cell wall hydrolase domains, BioMicroWorld 2009, 2009年12月2日, リスボン大学 (リスボン)
- ② 関口順一, 福島達也, 橋本昌征, 山本博規. ゲノムで紐解く細胞壁結合蛋白質群の機能, 日本遺伝学会第81回大会, 2009年9月16日, 信州大学 (松本市)

- ③ K. Kobayashi, T. Kodama, T. Fukushima, K. Ara, K. Ozaki, J. Sekiguchi. PdaC (YjeA) deacetylates the acetyl groups of *N*-acetylglucosamine in the chitin oligomers and *N*-acetylmuramic acid in peptidoglycan—Biochemical approach for identification of PdaC in *Bacillus subtilis*— 5<sup>th</sup> Internatl. Conf. on Gram-Positive Microorganisms, 2009年6月15日, Catamaranホテル (サンディエゴ)

[産業財産権]

- 出願状況 (計2件)
  - ① 名称: p60エンドペプチダーゼ阻害剤  
発明者: 荒 勝俊、阪本 知生、山本 博規、  
針山 望、関口 順一  
権利者: 花王、信州大学  
種類: 特許  
番号: 特願2008-78828、特開2009-227648  
出願年月日: 平成20年3月25日  
国内外の別: 【NI0800005】 日本のみ
  - ② 名称: 溶菌酵素阻害剤、溶菌抑制剤及びポリガンマーグルタミン酸の分解抑制剤及びポリガンマーグルタミン酸の製造方法  
発明者: 荒 勝俊、関口 順一、山本 博規、  
原田 宏之  
権利者: 花王、信州大学  
種類: 特許  
番号: 特願2007-268523、特開2008-118985 【NI0700043】  
出願年月日: 平成19年10月16日  
国内外の別: 日本、  
外国 【NI07-43PCT】 PCT/JP2007/07051