

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590482

研究課題名（和文） グラム陽性病原菌のプロテインキナーゼを介するシグナル伝達系の解明

研究課題名（英文） Study on Function of Eukaryotic Protein Kinase and Phosphatase in Firmicutes

研究代表者

成谷 宏文（NARIYA HIROFUMI）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30452668

研究成果の概要（和文）：

真核型 Protein Ser/Thr Kinase(K)-Protein Ser/Thr phosphatase(P) を介したシグナル伝達系は、多くの細菌に存在し生物普遍のシステムとして、様々な生理現象を制御している。ガス壊疽菌 *Clostridium perfringens* における K のリン酸化基質タンパク質(S) の同定に成功し、同遺伝子の変異株および発現解析から、K-P System による S のリン酸化調節によって、同菌の形態が制御されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Protein Ser/Thr Kinase(K)-Phosphatase(P) plays essential roles in regulation of cellular functions in both prokaryotes and eukaryotes. Although Clostridia have also the K-P systems, they have not been investigated. In this study, we revealed function of the K-P system in *C. perfringens* by analyzing in-frame deletion mutants of the system and the target protein (S) for K identified. Our results indicate that the K-P system regulates morphology of Clostridia via phosphorylation of S.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細菌学、生化学、分子微生物学、応用微生物学

科研費の分科・細目：基礎医学、細菌学（含真菌学）

キーワード：ガス壊疽菌、シグナル伝達、リン酸化、形態形成、プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼ、*Clostridium perfringens*、多様性

1. 研究開始当初の背景

生物の特異的機能は、その生存環境への適応進化の過程で獲得したものであり、その機能発現には、様々な生物反応プロセスが関与している。中でも環境の変化を情報として伝達するプロセスの分子基盤の解明は、生命機構を理解する上で重要な課題である。Protein Kinaseによるシグナル伝達機構には「Ser/Thr/Tyr」のリン酸化と「His/Asp」のリン酸化（二成分制御系）を介する2つの機構がある。

細菌ではこれまで His Kinase による二成分制御系のみ存在すると考えられていたが、1991年に粘液細菌で真核型 Protein Ser/Thr Kinase (K)が発見され、また、ゲノム解析から K および脱リン酸化酵素 Protein Ser/Thr phosphatase (P)が多くの細菌に存在し、様々な機能を制御することが明らかになっている。特に分化能を有する細菌(粘液細菌、シアノバクテリア、放線菌)および病原細菌(結核菌)に多数の K 遺伝子が見いだされているが、その存在意義やシグナル伝達機構にはいぜんとして不明な点が多く、国内外において活発に研究が進められている。

2. 研究の目的

*Clostridium*を含むFirmicutesグラム陽性菌では、PP2C Family P とレセプター型 PknB Family K のオペロン(PK)および、その周辺遺伝子がよく保存されている。*Bacillus*、*Streptococcus*において、いくつか K 基質タンパク質の同定がされているが、種により異なり、また破壊株の表現型に多面的効果がみられ、菌種間、遺伝子破壊法によっても相違がみとめられていた。

そこで我々は、*Clostridium*属のPknBに関する報告がないこと、またガス壊疽菌 *C. perfringens* (13株)には、CPE1738の一つのみがKとして認められ、複数のK遺伝子を持つ細菌よりも解析が容易であることから、その機能解析を行った。また、これまでガス壊疽菌で利用できる遺伝子操作・解析ツールが乏しいことが遺伝子機能解析の障壁となっていたので、多重遺伝子欠損株作製法、遺伝子誘導発現システム、DNA精製や菌体タンパク質等の調整に有用なガス壊疽菌特異的溶菌酵素等の開発を行い、国内外の *Clostridium* 属細菌の研究推進に貢献した。

3. 研究の方法

1) ガス壊疽菌における Galactokinase 遺伝子(*galK*)を用いた In-Frame 遺伝子欠損株作製法の確立

上法では、挿入破壊株で問題となるクラスター/オペロン遺伝子の極性効果、薬剤耐性遺伝子の使用制限と無関係に、多重遺伝子欠損株を作製できる。ガス壊疽菌での同法確立のため、まず Gal 利用能、*galETKM* オペロンの検索、非代謝性 2-DeoxyGal の毒性試験を行った。当研究室保存のガス壊疽菌 13 株は既知のように Gal 利用能を有し、また 2-deoxyGal 培地で致死であった。またゲノムデータベースから、*galTK* オペロン、*galM*、*galE*の存在を確認した。

親株となる *galTK* 欠損株を作製するため、*C. acetobutylicum* の *galK(galK-Ca)*を、そのコドン使用の類似性および遺伝子相同性の低さから、使用した。*galK-Ca* をガス壊疽菌のフェレドキシン/NanI 遺伝子の融合高発現プロモーター下にクローニングし、In-Frame 欠損用プラスミドを構築した。これにガス壊疽菌 *galTK* の In-Frame 欠損遺伝子(大部分の構造遺伝子を抜き取り、読み枠を合わせ結合させた遺伝子)をクローニングし、同法によって In-Frame 欠損株(HN13株;Gal利用能欠損, 2-DeoxyGal非感受性)を作製した。この親株を用いて、我々は、ガス壊疽菌の主要な分泌型病原性因子遺伝子6つの多重欠損株の作製に成功し、また P-K System の欠損株作製を行った。

2) ガス壊疽菌特異的溶菌酵素の発見と応用
菌種特異的に作用するバクテリオファージの細胞壁分解酵素 Endolysin は、感染症治療、食品製造において、抗菌剤、添加剤としてその利用価値は極めて高い。我々はウェルシュ菌ゲノムの網羅的検索から、数種のファージ由来 Endolysin 遺伝子を発掘し、その一つであるムラミダーゼ Psm を大腸菌で大量発現・高度精製(約 10 mg/liter)し検討した結果、ウェルシュ菌特異的に強靱な溶菌活性(1 μg の酵素で約 8 x 10⁸ 個の菌を5分で溶菌させる)を示し、DNA やタンパク質を容易に抽出できるなど、研究ツールとしても有用であることが明らかになった。更に Psm を、K-P System の発現解析に用いた。

3) ガス壊疽菌における遺伝子誘導発現システムの構築

大腸菌-ガス壊疽菌のシャトルベクターに *C. difficile* 由来の Xylose Repressor 遺伝子および Operator 領域を導入した Xylose 誘導発現ベクター(pXCH)を構築し、Chloramphenicol-acetyltransferase (CAT) reporter gene, Phospholipase C (PLC) gene を用いて発現解析を行った結果、pXCH は厳密に制御が可能な ON-OFF 遺伝子発現ベクターであることを明らかにした。これを用いて、K-P System の発現解析を行った。

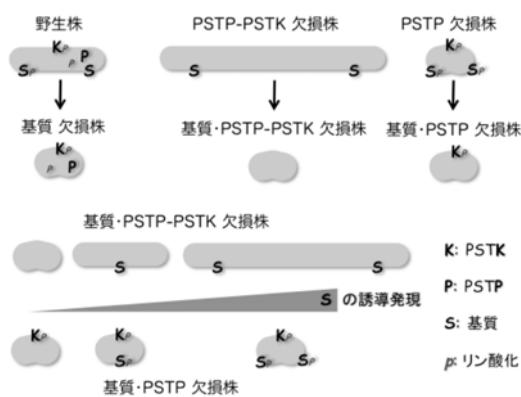
4. 研究成果

1) ガス壊疽菌 K-P System 欠損株作製と K 基質タンパク質の同定

野生株は 3-5 μm の桿菌であるが、PK オペロン欠損株 (ΔPK) は、生育に障害がみられ、形状はへび状の長鎖を呈し、P 欠損株 (K 発現株、 ΔP) では、コンマ状の短桿菌となった。更に、K を PK 欠損株においてプラスミドで誘導発現させると、コンマ状の短桿菌に変化し、逆に P 欠損株で P を誘導発現させると長鎖桿菌に変化した。また、Psm 処理で得られた菌体タンパク質のリン酸化抗体による Western blot 解析により、K のリン酸化基質タンパク質 (S) と考えられる約 60-kDa の Thr-リン酸化バンドを検出した。リン酸化タンパク質を Affinity Column にて分画精製し、トリプシン消化産物の LC-MS/MS 解析を行った結果、S は CPE1057 と同定された。

2) K 基質タンパク質遺伝子の欠損株作製と相補解析

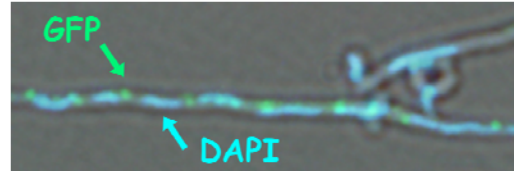
欠損株 (ΔS , $\Delta\text{PK}\Delta\text{S}$, $\Delta\text{P}\Delta\text{S}$) を作製し解析した結果、すべての株で 60-kD リン酸化バンドが検出されず、形状はすべてコンマ型になった。 $\Delta\text{P}\Delta\text{S}$ で S を誘導発現させると、リン酸化バンドの増加が検出された。S のリン酸化部位は、欠損変異遺伝子の発現解析により、N 末端領域に存在することが明らかとなった。また CPE1057 ホモログは、Clostridium 属のみに見いだされた。更に $\Delta\text{PK}\Delta\text{S}$ において、非リン酸化型 S の発現量を制御 (少→多) すると、コンマ→正常→長鎖型へと変化した。しかし、 $\Delta\text{P}\Delta\text{S}$ においては、S がリン酸化されるため、その変化が大幅に軽減され、ほぼコンマ型であった。つまり、PSTK-PSTP による CPE1057 のリン酸化調節を介して、Clostridium 属の菌の形態が制御されるものと考えられる。また、菌の生育環境に応じた形態変化を支配するメカニズムとして注目している。



3) K 基質タンパク質の細胞内局在性

S の細胞内局在性の解析を目的とし、GFP 融合遺伝子を構築し、その発現解析を行った。

基質タンパク質蛍光は、多くの場合、隔壁、両極に認められた。また、リン酸化及び非リン酸化基質タンパク質の局在性は同様である事が示唆された。更に長鎖桿菌での DAPI 蛍光観察の結果、明瞭な隔壁がほとんど認められないが、分配された Nucleoid をはさみ、S の GFP 蛍光が観察された。



S のリン酸化型、非リン酸化型の精製標品を LC/MS/MS 解析にかけ、リン酸化部位の決定を行い、リン酸化部位の候補を見いだした。現在、変異株の作製、解析を行っている。更に、それぞれに相互作用するタンパク質の同定、様々な環境における、ガス壊疽菌の形態と基質のリン酸化レベルの相関を検討している。

K-P System が普遍的に存在するのに対して、S が Clostridium 属のみに見いだされ、他の Firmicutes (グラム陽性菌) での研究で、各々異なるリン酸化基質タンパク質が同定されていることから、適応進化に応じた K-P System による制御の機能的多様性が示唆された。

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 5 件)

- ① Nariya H, Miyata S, Kuwahara T and Okabe A. Development and characterization of a xylose-inducible gene expression system for *Clostridium perfringens*. Applied and Environmental Microbiology 77, 8439-8441 (2011) 査読有
- ② Nariya H, Miyata S, Tamai E, Sekiya H, Maki J and Okabe A. Identification and characterization of a putative endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. Applied Microbiology and Biotechnology 90, 1973-1979 (2011) 査読有
- ③ Nariya H, Miyata S, Suzuki M, Tamai E and Okabe A. Development and application of a method for counterselectable in-frame deletion in *Clostridium perfringens*. Applied and Environmental Microbiology 77, 1375-1382 (2011) 査読有
- ④ Tanaka H, Nariya H, Suzuki M, Houchi H, Tamai E, Miyata S and Okabe A.

High-level production and purification of clostripain expressed in a virulence-attenuated strain of *Clostridium perfringens*. Protein Expression and Purification 76, 83-89 (2011) 査読有

- ⑤ Manabe S, Nariya H, Miyata S, Tanaka H, Minami J, Suzuki M, Taniguchi Y and Okabe A. Purification and characterization of a clostripain-like protease from a recombinant *Clostridium perfringens* culture. Microbiology 156, 561-569 (2010) 査読有

[学会発表] (計 19件)

- ① Hirofumi Nariya, Tomomi Kuwahara. Eukaryotic protein kinase and phosphatase regulate morphology of *Clostridium perfringens*. 第85回日本細菌学会総会, 2012年3月, 長崎
- ② Eiji Tamai, Hiroshi Sekiya, Hiromi Yoshida, Hirofumi Nariya, Shigehiro Kamitori, Tomomi Kuwahara and Jun Maki. Studies of the catalytic center of Psm, an endolysin specific to *Clostridium perfringens*. 第85回日本細菌学会総会, 2012年3月, 長崎
- ③ 関谷 洋志, 玉井 栄治, 成谷 宏文, 牧 純: Study of each domain in Psm, specific endolysin to *Clostridium perfringens*. 日本薬学会第132年会, 2012年3月, 札幌
- ④ 成谷 宏文, 宮田 茂, 鈴木 基生, 岡部 昭延, 桑原 知巳. ウェルシュ菌のプロテインキナーゼの解析 (3). 第64回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2011年10月, 岡山
- ⑤ 玉井 栄治, 吉田 裕美, 田所 隼人, 成谷 宏文, 関谷 洋志, 神鳥 成弘, 岡部 昭延, 牧 純. ウェルシュ菌特異的溶菌酵素Psmの構造と機能解析. 第64回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2011年10月, 岡山
- ⑥ Nariya H, Miyata S and Okabe A. Development and characterization of a xylose-inducible gene expression system for *Clostridium perfringens*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, 2011 September, Sapporo
- ⑦ Tanaka H, Nariya H, Suzuki M, Miyata S, Tamai E, Kosaka S, Fukuoka N, Houchi H and Okabe A. High-level production and purification of clostripain expressed in a virulence-attenuated strain of *Clostridium perfringens*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, 2011 September, Sapporo
- ⑧ Katayama S, Tanaka C, Hashikawa N, Ishibashi K, Nakamura D and Nariya H. Function of the phased A-tracts upstream the promoter of the phospholipase c gene on the gene expression in *Clostridium perfringens*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies Congresses 2011, 2011 September, Sapporo
- ⑨ Miyata S, Nariya H, Tamai E, Moriyama R and Okabe A. Clostridial expression system. 6th International Conference on Gram-Positive Microorganisms, 2011 Jun, Tuscany, Italy
- ⑩ 成谷 宏文, 波多野 直哉, 宮田 茂, 鈴木 基生, 南 純三郎, 岡部 昭延. ウェルシュ菌のプロテインキナーゼの解析 (2). 第63回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2010年10月, 松山
- ⑪ 田中 裕章, 成谷 宏文, 鈴木 基生, 谷口 有紀, 芳地 一, 宮田 茂, 岡部 昭延. ウェルシュ菌の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseの性状解析. 第63回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2010年10月, 松山
- ⑫ 中村 大輔, 成谷 宏文, 片山 誠一. ウェルシュ菌 VirR/S欠失株における phased A-tractsによる α 毒素遺伝子の発現促進. 第63回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2010年10月, 松山
- ⑬ 成谷 宏文, 宮田 茂, 鈴木 基生, 岡部 昭延. Function of Protein kinase in *Clostridium perfringens*. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月, 横浜
- ⑭ 宮田 茂, 成谷 宏文, 鈴木 基生, 南 純三郎, 岡部 昭延. Characterization of *Clostridium perfringens* glycosidases. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月, 横浜
- ⑮ 田中 裕章, 成谷 宏文, 宮田 茂, 岡部 昭延. High-level expression, purification and characterization of clostridial Clostripain. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月, 横浜
- ⑯ 渡邊 真理子, 片山 誠一, 山崎 勤, 成谷 宏文, 櫃本 泰雄. Search for a novel fibronectin-binding protein of *Clostridium perfringens*. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月, 横浜

- 菌学会総会，2010年3月，横浜
- ⑰ 田中 千春，橋川 直也，成谷 宏文，石橋 広太郎，片山 誠一. *Clostridium perfringens*のホスホリパーゼC遺伝子上流に存在するphased A-tractsの役割. 第32回日本分子生物学会年会，2009年12月，横浜
- ⑱ 成谷 宏文，宮田 茂，鈴木 基生，谷口 有紀，岡部 昭延. ウェルシュ菌ファージ由来Endolysinの解析. 第62回日本細菌学会中国四国支部総会，2009年10月，広島
- ⑲ 田中 裕章，成谷 宏文，宮田 茂，鈴木 基生，真鍋 貞夫，岡部 昭延. *Clostridium histolyticum*のクロストリパインの量産と精製について. 第62回日本細菌学会中国四国支部総会，2009年10月，広島

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/%7Emicrobio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成谷 宏文 (NARIYA HIROFUMI)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：30452668

(2) 研究分担者

宮田 茂 (MIYATA SHIGERU)
香川大学・医学部・講師
研究者番号：90314913