

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 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22248008

研究課題名（和文） 細菌細胞表層制御による細胞増殖，形態，機能維持メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanisms of cell growth, morphology, and maintenance by bacterial cell surface regulation

研究代表者

関口 順一（SEKIGUCHI JUNICHI）

信州大学・繊維学部・特任教授

研究者番号：80111053

研究成果の概要（和文）：枯草菌細胞壁溶解酵素遺伝子 *cw10*, *lytE* のタンパク質を調べ、共に細胞側面に局在し、DL-エンドペプチダーゼ(DLE)活性の保持が増殖に必須であった。DLE 活性を阻害する IseA の NMR 解析より、ユニークな弓鋸型構造を明らかにした。シグマ因子制御系 SigI-RsgI と二成分制御系 WalK-WalR による細胞表層の恒常性の転写制御ネットワークを検討し、増殖期では後者が、定常期などでは前者が関わっていた。細胞壁テイコ酸の修飾メカニズムも解析するとともに、新規表層タンパク質の性質を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Analysis of two cell wall hydrolase genes (*cw10* and *lytE*) in *Bacillus subtilis* indicated that these two gene products were localized at the lateral side of cells and their autolytic DL-endopeptidase activity was required for cell growth. The activity is inhibited by IseA, and NMR analysis indicated IseA is a unique protein with a “hacksaw” structure. To maintain the cell surface, the sigma-directed regulation (SigI and anti-sigma RsgI) and the two-component system, WalK-WalR, were required at the stationary and vegetative growth phases, respectively. Peptidoglycan modification by wall teichoic acids was also investigated and the enzymatic properties of novel surface proteins were reported.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2011年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2012年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
年度			
年度			
総計	35,600,000	10,680,000	46,280,000

研究分野：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

1. 研究開始当初の背景

細菌細胞のなかでもグラム陽性の桿菌である枯草菌は、球菌と比べて独自の制御機構を持ち、さらにグラム陰性菌と比べても、ペプ

チドグリカンが厚く、負電荷のポリマーにより広く修飾されている。負電荷ポリマーの一部は増殖に必須であり、さらに細胞壁溶解酵素の2種が合成致死変異を示すことが解っ

てきている。さらに細胞壁溶解酵素は制御が出来なければ自殺酵素として働くことになり、その活性を阻害するタンパク質も報告された。そこで細胞表層タンパク質とその遺伝子群を総合的に解析することが、増殖、形態、機能維持の機構解明に極めて重要であると考えられた。

2. 研究の目的

細菌細胞壁溶解酵素と細胞壁非ペプチドグリカン成分（テイコ酸、テイコウロン酸）が細菌の細胞増殖、細胞形態形成に果たす役割を、以下の6点から解明する。

(1) 合成致死を示す細胞壁溶解酵素 *LytE*, *CwlO* の触媒活性及び局在ドメインが、合成致死と細胞形態に関与する機構

(2) 枯草菌細胞壁成分である非ペプチドグリカン成分の機能解析

(3) テイコ酸欠損の致死及び形態異常がテイコウロン酸高生産で機能相補される機構

(4) 表層変異に対する2成分制御系の遺伝子発現への影響

(5) 必須2成分制御系の下流にある細胞壁溶解酵素阻害剤 *IseA* の立体構造決定と *IseA* 構造制御による *LytE*, *CwlO*, *LytF* 活性阻害機構の解明

(6) 新規表層タンパク質の酵素化学的性質の検討

これらの研究により細菌の基本的機能に対する細胞表層の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 合成致死を示す細胞壁溶解酵素 *LytE* の細胞壁結合ドメインと数種の DL-エンドペプチダーゼドメインとのキメラ断片の構築は PCR で行った。他の基質特異性を示す酵素触媒活性ドメインとの融合も同様に行った。

(2) 壁テイコ酸 (WTA) のグルコース修飾を特異的に染色可能な蛍光レクチン (ConA-TMR)、およびグルコース修飾を触媒する *TagE* の条件変異株を用いて、枯草菌の WTA 修飾がどのように行われているのか観察した。また3種類の *MreB* ホモログ変異株において、WTA 修飾に変化が見られるかどうか調べた。

(3) テイコ酸合成課程においてグリセロールリン酸のポリマー化に関わる *tagF* を欠損させ、代わりに *thrC* locus で *tagF* を *xylA* プロモーターと融合させることでキシロース存在下で発現誘導可能な枯草菌を作製し、次にテイコ酸合成オペロン (*tuaA-H*) の上流に *Pspac* プロモーターを導入することで、*TagF* 枯渇 *tuaA-H* 誘導条件下の細胞形態の観察、遺伝子発現解析を行った。

(4) *SigI* の過剰発現系を用いたマイクロアレイ解析により、レギュロン候補遺伝子をピックアップした。B ガラクトシダーゼや GFP 等

のレポーターを用いた転写解析や、ノザンプロット、RT-PCR、プライマー伸長法等の mRNA レベルの転写解析により、*SigI* のレギュロン遺伝子を絞り込んだ。*SigI* 破壊株やレギュロン遺伝子の破壊株の表現型の変化を観察した。

(5) 理化学研究所 NMR 施設を利用して、核磁気共鳴(NMR)法を用いた *IseA* の立体構造解析を行った。また、相互作用解析や阻害実験、立体構造に基づくコンピューターシミュレーションなどを組み合わせて、*IseA* の阻害メカニズムの解析を行った。

(6) 新規タンパク質の調整の為、*cwlP*, *cwlQ*, *pdaC* (*yjeA*) 遺伝子をゲノム DNA から PCR 増幅し、pQE プラスミドに挿入後、大腸菌を形質転換した。形質転換株からタンパク質を抽出後、His-タグカラムで精製した。

4. 研究成果

(1) *LytE* の細胞壁結合ドメインと数種の DL-エンドペプチダーゼドメインとのキメラは、活性ドメインが DL-エンドペプチダーゼドメインであるならば *LytF*, *CwlS* のものでも *LytE* とほぼ同じ機能を示した。一方活性ドメインを他の基質特異性を示すものに変更した場合、DD-エンドペプチダーゼのみ同じ機能を示した。

(2) *TagE* の発現制御株を用い、新規にグルコース修飾された WTA の観察を行なった。グルコース修飾開始後 90 分の細胞では、細胞側壁にケーブル状の蛍光が観察された。一方、リゾチーム処理により外側の細胞壁を分解した細胞では、グルコース修飾開始後 12 分ごろからスポット状の蛍光が観察された。これらの結果より、WTA の細胞壁への修飾はスポット状に行なわれ、WTA 修飾されたケーブル状の新しい細胞壁が既存の細胞壁間に挿入される事がわかった。次に、*MreB* ホモログを枯渇させた際の WTA 修飾への影響を調べるため、WTA のリン酸量を調査した。その結果、*MreB* を枯渇させた細胞壁でのみ、リン酸量が減少していることが明らかになった。

(3) テイクロン酸が、増殖において必須のテイコ酸を代替できるかを検討するため、① *Bacillus subtilis* 168 株の *tagF* の必須性の再検証を行い、② キシロース、IPTG の量で *tagF*, *tuaA-H* の発現量を調節可能な枯草菌株の構築を試みた。まず、*tagE* 下流の *tagF* に *Pspac* プロモーターの導入を試みたところ、IPTG 存在下でのみ形質転換体を得られ、それら株の IPTG 非添加時の増殖が著しく減退したことから *tagF* が増殖に必須であることが再確認された。次に *tuaA* 上流に *Pspac* プロモーターを導入後、*thrC* locus で *xyl* プロモーターと *tagF* を融合させたが、細胞形態および生育に影響は見られなかった。現在、

tagE 下流の *tagF* locus にクロラムフェニコール耐性遺伝子を導入することを試みている。今後、*tagF* および *tuaA-H* を厳密に調節可能な枯草菌株の構築を行い、当初の研究目的の達成を目指している。

(4) WalKR は低 G+C グラム陽性細菌に広く保存され、増殖に必須な 2 成分制御系である。*cwIO*, *lytE* をコードする遺伝子は、共にこの WalK-WalR により、正に転写制御される。*cwIO* や *lytE* 遺伝子の転写にも SigI が関与すること、SigI と CwIO も、LytE と CwIO の同時欠失と同様に、合成致死となることを明らかにした。このように SigI-RsgI シグマ因子制御系と WalK-WalR 二成分制御系には機能の重複があることを示唆した。さらに *lytE* や *cwIO* 以外の SigI のレギュロンとして細胞分裂面の細胞壁合成に関与する遺伝子 (*ftsE*)、DNA の前駆体となる葉酸合成遺伝子群 (*pabB* オペロン) や酸化 DNA 修復遺伝子 (*mutT*) を同定した。一方 *sigI* 変異株は、LB 液体培養で定常期の後期に顕著に濁度が減少した。定常期の細胞も酸化などの外部ストレスにさらされ、細胞表層や DNA にダメージを受けており、SigI-RsgI シグマ因子制御系がこれに応じて細胞を修復するが、*sigI* 欠損株ではこの修復ができず、ダメージを受けた細胞が溶菌したと考えられる。すなわち、WalK-WalR が増殖をモニターしているのに対し、SigI は定常期などの非増殖期の細胞の状態をモニターする表層維持機構であると考えられる。

(5) IseA の立体構造は、これまでに全く報告例がない、非常にユニークで新奇な“弓のこ型”構造であることを解明した。特に、弓のこの刃に対応する細いひも状のループ部分が非常に特徴的な構造であることを発見した。また、IseA と酵素の相互作用解析や、IseA のループ部分の変異体を作製し、酵素活性の阻害を調べる実験を行い、IseA のループ部分が酵素活性を阻害するために非常に重要であることを明らかにした。さらに、IseA と酵素の表面形状や電荷分布などの特徴を詳細に考察して、コンピューターシミュレーションを行うことにより、IseA のループ部分が酵素の活性部位の谷間にはまり込み、広範囲に相互作用するタイプの新たな酵素阻害メカニズムモデルを提唱した。

(6) CwIP は SP-beta プロファージ領域に存在する細胞壁溶解酵素で、ムラミダーゼ活性と DD-エンドペプチダーゼ活性を示した。一方 CwIQ は 1 つのドメインがムラミダーゼ活性と溶解トランスグリコシダーゼ活性を示す 2 機能酵素であった。PdaC(YjeA) はペプチドグリカン脱アセチル化する酵素で、この遺伝子の変異株はリゾチームに対し感受性となった。

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 8 件)

- ① 関口順一 (2013) 細菌細胞壁溶解・修飾酵素群の総合的研究. 生物工学会誌 **91(2)**:50-72 (査読無)
http://www.sbj.or.jp/sbj/sbj_vol91_no02.htm
- ② Hashimoto, M., T. Seki, S. Matsuoka, H. Hara, K. Asai, Y. Sadaie, and K. Matsumoto (2013) Induction of extracytoplasmic function sigma factors in *Bacillus subtilis* cells with defects in lipoteichoic acid synthesis. *Microbiology* **159(1)**:23-35 (査読有)
DOI:10.1099/mic.0.063420-0
- ③ Hashimoto, M., S. Ooiwa, and J. Sekiguchi (2012) The synthetic lethality of the *lytE* *cwIO* genotype in *Bacillus subtilis* is caused by lack of DL-endopeptidase activity at the lateral cell wall. *J. Bacteriol.* **194(4)**:796-803 (査読有)
DOI:10.1128/JB.05569-11
- ④ Kobayashi, K., I.P. Sudiarta, T. Kodama, T. Fukushima, K. Ara, K. Ozaki, and J. Sekiguchi (2012) Identification and characterization of a novel polysaccharide deacetylase C (PdaC) from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **287(13)**:9765-9776 (査読有)
DOI:10.1074/jbc.M111.329490
- ⑤ Arai, R., S. Fukui, N. Kobayashi, and J. Sekiguchi (2012) Solution structure of IseA, an inhibitor protein of DL-endopeptidases from *Bacillus subtilis*, reveals a novel fold with a characteristic inhibitory loop. *J. Biol. Chem.*, **287(53)**:44736-44748 (査読有)
DOI:10.1074/jbc.M112.414763
- ⑥ Mitsui N., H. Murasawa, and J. Sekiguchi (2011) Disruption of the cell wall lytic enzyme CwIO affects the amount and molecular size of poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (*natto*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* **57(1)**:35-43 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.2323/jgam.57.35>
- ⑦ Sudiarta, I Putu, T. Fukushima, and J. Sekiguchi (2010) *Bacillus subtilis* CwIQ (previous YjbJ) is a bifunctional enzyme exhibiting muramidase and soluble-lytic transglycosylase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**:606-612 (査読有)
DOI:10.1016/j.bbrc.2010.07.001
- ⑧ Sudiarta I Putu, T. Fukushima, and J. Sekiguchi (2010) *Bacillus subtilis* CwIP of the SP-beta prophage has two novel hydrolase domains, muramidase and

cross-linkage digesting D,D-endopeptidase. J. Biol. Chem. **285(53)**:41232-41243 (査読有)
DOI:10.1074/jbc.M110.156273

[学会発表] (計 20 件)

- ① 朝井 計、市島 睦生、関口 順一. 枯草菌 SigI による定常期における細胞維持機構の解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 25 日, 東北大学 (仙台市)
- ② 蕨野裕哉, 田中達仁, 久米田慶裕, 関口 順一, 山本博規. 枯草菌における細胞壁テイコ酸修飾メカニズムの解明. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 2013 年 3 月 9 日, 長浜バイオ大学 (長浜市)
- ③ 新井亮一, 福井貞晴, 小林直也, 関口 順一. 枯草菌細胞壁溶解酵素阻害タンパク質 IseA の立体構造解析: 特徴的な阻害ループを持つ弓鋸型新奇構造の解明, 第 64 回日本生物工学会大会, 2012 年 10 月 25 日, 神戸国際会議場 (神戸市)
- ④ 朝井 計, 三輪 明穂, 松本 貴嗣, 吉川 博文. 細菌のシグマ因子の多様性の意義解明への遺伝学的アプローチ, 日本遺伝学会第 84 回大会, 2012 年 9 月 26 日, 九州大学 (福岡市)
- ⑤ 福井貞晴, 新井亮一, 小林直也, 関口 順一. 枯草菌細胞壁溶解酵素阻害タンパク質 IseA の立体構造解析: 特徴的な阻害ループを持つ弓鋸型新奇構造の解明, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012 年 9 月 22 日, 名古屋大学 (名古屋市)
- ⑥ Kodama, T., K. Endo, K. Ara, K. Ozaki, and J. Sekiguchi. Zymography of extracellular proteases in *Bacillus subtilis*. 4th Internatl. Conf. on Biosci. and Biotechnol., p.29, Sept. 20-21, 2012, Udayana University, Bali, Indonesia
- ⑦ 新井亮一, 福井貞晴, 小林直也, 関口 順一. 枯草菌細胞壁溶解酵素阻害タンパク質 IseA の立体構造解析: 特徴的な阻害ループを持つ弓鋸型新奇構造の解明, 平成 24 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議, 2012 年 8 月 31 日, 焼津グランドホテル (焼津市)
- ⑧ Sekiguchi, J. and R. Arai. Function and three dimensional structure of an autolysin inhibitor IseA from *Bacillus subtilis*, asm2012, American Society for Microbiology, P1823, June 16-19, 2012, San Francisco, USA
- ⑨ K. Asai, M Ichishima, Y Nakaburo, J Sekiguchi. Alternative sigma factor, SigI, regulates the cell wall metabolism in concert with WalRK two-component regulatory system in *Bacillus subtilis*. Asian and Oceanian Conference on Transcription XII, 2012 年 6 月 7 日, Seogwipo KAL hotel (済州島、韓国)
- ⑩ 朝井 計, 市島睦生, 中風呂裕樹, 関口 順一. 枯草菌のシグマ因子 SigI による細胞壁溶解酵素遺伝子群の転写調節機構, 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学 (京都市)
- ⑪ 新井亮一, 北浦想之, 福井貞晴, 佐藤高彰, 関口 順一. 枯草菌の細胞壁溶解酵素阻害タンパク質 IseA の機能構造解析, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011 年 9 月 27 日, 東京農工大学 (東京都)
- ⑫ 朝井 計, 市島睦生, 中風呂裕樹, 関口 順一. 細胞壁の恒常性を維持する枯草菌の転写制御ネットワーク, 日本遺伝学会第 83 回大会, 2011 年 9 月 20 日, 京都大学 (京都市)
- ⑬ Sekiguchi, J., T. Kodama, K. Manabe, Y. Kageyama, K. Ara, K. Ozaki, and T. Fukushima. Cell surface modification and engineering in *Bacillus subtilis*. XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS 2011), AM10-4, Sept. 6-10, 2011, Sapporo, Japan
- ⑭ Hashimoto, M., S. Ooiwa, and J. Sekiguchi. Function of D,L-endopeptidases LytE and CwlO for cell elongation in *Bacillus subtilis*. 6th Internatl. Conf. on Gram-positive Microorganisms, P64, June 19-23, 2011, Montecatini Terme, Tuscany, Italy
- ⑮ Sekiguchi, J. Novel small protein relating to spore germination in *Bacillus*. 1st European Conference of Microbiology and Immunology (eucmi2011), p.114, May 12-14, 2011, Budapest, Hungary
- ⑯ 朝井 計, 奥崎 正人, 井上広海. 枯草菌の細胞表層維持の転写制御ネットワーク, 日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 月 27 日, 東京大学 (東京都)
- ⑰ 北浦想之, 新井亮一, 関口 順一. 枯草菌の細胞壁溶解酵素を阻害する IseA タンパク質の機能構造解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日, 京都女子大学 (京都市)
- ⑱ Sekiguchi, J. Cell wall degradation and modification enzymes of gram-positive bacteria: History, importance and future aspects. 2nd Internatl. Conf. on Bioscience and Biotechnology, pp.1, Sept. 23-24, 2010, Bali, Indonesia
- ⑲ Sekiguchi, J., I P. Sudiarta, and T. Fukushima. Cell wall degradation enzymes in *Bacillus subtilis*. 11th Internatl. Symp. on the Genetics of Industrial Microorganisms, pp. 65, June 28-July 1, 2010, Melbourne, Australia
- ⑳ Sudiarta I P., T. Fukushima, and J. Sekiguchi.

Bifunctional hydrolytic activities of YjbJ domain of *Bacillus subtilis*. 11th Internatl. Symp. on the Genetics of Industrial Microorganisms, pp.93, June 28-July 1, 2010, Melbourne, Australia

〔図書〕（計3件）

- ① Sekiguchi, J., and H. Yamamoto, (2013) Murein Peptidase LytF. In: Neil D. Rawlings and Guy S. Salvesen, editors, Handbook of Proteolytic Enzymes. Oxford: Academic Press, pp. 2479-2482. ISBN:978-0-12-382219-2
- ② Sekiguchi, J., and H. Yamamoto (2013) Cell wall structure of *E. coli* and *B. subtilis*. In: Y. Sadaie and K. Matsumoto, editors, The Frontiers of Molecular Microbiology Revisited, Kerala: Research Signpost, pp. 115-148. ISBN:978-81-308-0492-7
- ③ 関口順一, 眞鍋憲二, 児玉武子. (2012) 細胞表層工学を用いた分泌蛋白質生産性の向上, 微生物を活用した新世代の有用物質生産技術 (穴澤秀治監修) p.107-114, シーエムシー出版, 東京 ISBN:978-4-7813-0658-2

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：組換え微生物
発明者：眞鍋憲二、児玉武子、荒 勝俊、関口順一
権利者：花王(株)、信州大学
種類：特許
番号：特願 2010-110207
出願年月日：2010年5月12日
国内外の別：国内

名称：組換え微生物
発明者：眞鍋憲二、児玉武子、関口順一
権利者：花王(株)、信州大学
種類：特許
番号：特願 2010-110208
出願年月日：2010年5月12日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/news/2012/12/50284.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

関口 順一 (SEKIGUCHI JUNICHI)

信州大学・繊維学部・特任教授
研究者番号：80111053

(2)研究分担者

新井 亮一 (ARAI RYOICHI)
信州大学・繊維学部・助教
研究者番号：50344023

小笠原 寛 (OGASAWARA HIROSHI)
信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・助教
研究者番号：30535232

山本 博規 (YAMAMOTO HIROKI)
信州大学・繊維学部・准教授
研究者番号：20262701

朝井 計 (ASAI KEI)
埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：70283934

橋本 昌征 (HASHIMOTO MASAYUKI)
首都大学東京・理工学研究科・研究員
研究者番号：80402139