

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 3月31日現在

機関番号：12401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010年度～2012年度
 課題番号：22570001
 研究課題名（和文）細胞表層ストレスを感知する細菌外膜リポタンパク質による二成分制御系の活性化機構
 研究課題名（英文）Activation mechanism of a bacterial two-component system by an outer membrane lipoprotein sensing cell envelope stresses
 研究代表者
 原 弘志 (HARA HIROSHI)
 埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
 研究者番号：00173071

研究成果の概要（和文）：大腸菌の外膜リポタンパク質 RcsF は Rcs 二成分制御系(リン酸リレーシグナル伝達系)の必須の要素である。RcsF は細胞表層に加わるストレスを感知し、細胞膜にあるヒスチジンキナーゼ RcsC に情報を伝える。RcsF が Rcs 系活性化に際して RcsC のリガンドとして働いていることを示唆する結果を得た。また、RcsF の N 末端側のプロリンと塩基性残基に富む領域が Rcs 系活性化の制御において重要な働きをしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The outer membrane lipoprotein RcsF is an essential component of the Rcs phosphorelay signal transduction system in *Escherichia coli*. It senses stresses imposed on the cell envelope and conveys the information to histidine kinase RcsC in the cytoplasmic membrane. It is suggested that RcsF functions as a ligand for RcsC in activating the system. RcsF has a region rich in proline and basic residues near the N terminus. This region is likely to play an important role in regulation of the function of RcsF in activating the Rcs system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

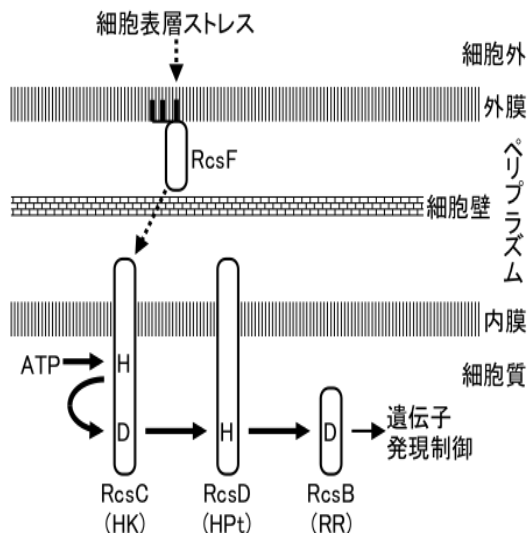
キーワード：外膜リポタンパク質・二成分制御系・細胞表層ストレス

1. 研究開始当初の背景

二成分制御系(リン酸リレーシグナル伝達系)は、細菌・古細菌や一部の真核細胞が環境ストレスを感知して応答する洗練された機構である。環境ストレスは、細胞質膜より外に露出したヒスチジンキナーゼの N 末端側の感知ドメインで感知される。感知ドメインに直接結合するリガンドが明らかになっているのはごく少数の例だけで、多くの二成分制御系では感知の機構はわかっていない。

腸内細菌群の Rcs シグナル伝達系は、細胞

表層を攪乱するストレスに応答し、バイオフィルムの発達や病原性に深く関与している。Rcs 系は図に示すような多段階のリン酸リレー系である。内膜を貫通するヒスチジンキナーゼである RcsC はレシーバードメインも持っている。活性化されると RcsC はキナーゼドメインの His 残基を自己リン酸化し、リン酸基をレシーバードメインの Asp 残基に渡す。その後のリン酸基転移は RcsD(YojN と呼ぶ)のホストランスマッタードメインの His 残基を介して



Rcs二成分制御系(リン酸リレー系)

太い矢印はリン酸基の転移の経路を、H・Dはリン酸化されるヒスチジン・アスパラギン酸残基を示す。

起こる。RcsDも内膜貫通タンパク質で、RcsCの感知ドメインとキナーゼドメイン(ただし保存された His 残基は含まない)とよく似た配列をもつ。リン酸基は最終的にレスポンスレギュレーターRcsBの Asp 残基に渡され、活性化した RcsB が転写因子として働く。大腸菌では Rcs 系は 150 以上の遺伝子の転写を正または負に制御しており、その大部分は細胞表層関連の機能に関与している。

外膜リポタンパク質 RcsF は、当初、過剰発現すると Rcs 系を活性化するものとして同定された。多くの環境ストレスや突然変異によるストレスが Rcs 系を活性化するのに RcsF が必要であることがわかり、RcsF は RcsC にストレス情報を伝える必須の役割をもつ Rcs 系の構成成分であると思なされるようになった。

リポタンパク質は、シグナルペプチド切断部位にリボボックスと呼ばれるコンセンサスは配列をもつ前駆体として合成される。Sec 系によって内膜を通過後、内膜のペリプラズム側でいくつかの段階を経て、成熟体となる。まず、プロリポタンパク質ジアシルグリセロール転移酵素(Lgt)によって、ホスファチジルグリセロールを主要な供与体として、リボボックス中の Cys 残基がジアシルグリセロールで修飾される。この修飾が、プロリポタンパク質シグナルペプチダーゼ (LspA) によるシグナルペプチドの切断に必要である。その後、N 末端となったジアシルグリセリルシステインが、アポリポタンパク質 N-アシル転移酵素(Lnt)によって、N-アシル化を受けて成熟体となる。成熟体リポタンパク質は、2 番目の残基のリポタンパク質ソーティングシグナルにもとづいて、Lol 系によって外膜に運ばれるか、内膜にとどまるかが決まる。2 番目の残基が Asp のとき、内膜停滞

シグナルとして働く。RcsF は 2 番目の残基が Ser で、外膜へと運ばれる。

ホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素を欠き、主要酸性リン脂質であるホスファチジルグリセロールとカルジオリピンをまったくもたない大腸菌 *pgsA* 完全欠損株は、*lpp* 遺伝子にコードされる主要外膜リポタンパク質を同時に欠くと生育可能となるが、42°C で高温感受性を示す。この高温感受性のサプレッサー変異をトランスポゾン挿入変異実験で探索したところ、*rscF*・*rscC*・*rscD*・*rscB* 遺伝子のいずれかが挿入破壊されると高温感受性がサプレッサーされることわかった。*pgsA lpp* 変異株では Rcs 系が恒常的に活性化しており、そのために 42°C で溶菌が引き起こされる。

2. 研究の目的

本研究は、(1)細胞表層ストレスを感知し、RcsC へ情報を伝達するタンパク質としての RcsF の機能を明らかにし、(2)RcsF タンパク質の機能ドメイン構造を解析することを主な目的とした。

3. 研究の方法

標準的な遺伝学的手法・DNA 操作法を用いて、菌株・プラスミドを構築した。Rcs 系活性化レベルは、Rcs 系支配下にある *cps* オペロンと *lacZ* の転写融合(*cpsB'-lacZ*)を用いて、β-ガラクトシダーゼ活性でモニターした。RcsF タンパク質の外膜/内膜局在化を調べるには、蔗糖密度勾配遠心分離を行なった。ペリプラズムとスフェロプラストの分離は細胞のリゾチーム処理後に遠心分離を行なった。RcsF タンパク質の検出は、ウェスタン分析によった。抗 RcsF 抗血清(ウサギ)は、シグナルペプチドを欠き、C 末端に His₆ タグを付加した RcsF を Ni-ニトリロ三酢酸アガロースカラムクロマトグラフィーで精製したものを抗原として作成した。抗 MBP 抗体は市販のものを用いた。

4. 研究成果

(1)*lgt* 遺伝子上流のトランスポゾン挿入による *pgsA* 完全欠損株の高温感受性のサプレッション

以前の研究で、*pgsA lpp* 変異株 S330 を mini-Tn10 *cam* を用いてトランスポゾン挿入変異誘発実験を行ない、高温感受性のサプレッサー変異株を 44 株分離した。そのうち 41 株は PCR 分析により、*rscF*・*rscC*・*rscD* のいずれかにトランスポゾン挿入があることがわかった。残り 3 つのサプレッサー変異株のうち 2 つは *ptsP* 遺伝子の終止コドンの 2 塩基下流に mini-Tn10 *cam* が挿入されていた。その染色体上の位

置 63.9 分にもとづいて、この挿入変異を *zgd::mini-Tn10 cam* と名付けた。もうひとつのサブレッサー変異は、2238 塩基の *ptsP* のコーディング領域の 1321 番目の塩基の位置に挿入があった。3 つのサブレッサー変異すべてで、ミニトランスポゾンの *cam* 遺伝子は、*ptsP* 遺伝子とその終止コドンの 151 塩基下流から始まる *lgt* 遺伝子と同じ向きであった。*ptsP* 遺伝子をもつプラスミドをサブレッサー変異株に導入しても高温耐性の表現型は変わらなかったため、*ptsP* の欠損がサブプレッションの原因ではない。*lgt* 遺伝子をもつプラスミドも同様だったが、親株の S330 に導入すると、42°C で高温耐性を示した。そこで、挿入ミニトランスポゾンの *cam* 遺伝子のプロモーターからの転写による *lgt* 遺伝子の発現上昇がサブプレッションの原因だと考えた。実際、ドットプロットハイブリダイゼーション実験で、*zgd::mini-Tn10 cam* をもつ形質導入体は、親株の S330 よりも *lgt* 転写産物が多いことが示された。

別の実験として、S330 の高温感受性のマルチコピーサブレッサーをクローン化する試みで、pACYC184 をベクターとするプラスミドが 23 クローン単離できた。そのうち 6 つが *lgt* 遺伝子を含む領域をもっていた。以上より、*lgt* 遺伝子の過剰発現が *pgsA* 完全欠損株の高温感受性を矯正することができる結論づけた。

(2) *pgsA* 完全破壊株での Rcs 系活性化の *lgt* 過剰発現による抑制

pgsA 完全欠損株の高温感受性が Rcs 系の活性化によるものなので、*lgt* 過剰発現の Rcs 系への効果を調べた。活性化レベルは、*cpsB'-lacZ* 転写融合を用いて、莢膜多糖合成に働く *cps* オペロンの発現レベルでモニターした。

pgsA lpp cpsB'-lacZ 融合株 CL330 は Rcs 系の活性化のために高い β -ガラクトシダーゼ活性を示す。CL330 株の *zgd::mini-Tn10 cam* 形質導入体は 42°C で生育し、X-Gal を含む LB 寒天培地で淡い青色を呈した。30°C で培養して β -ガラクトシダーゼ活性を測定すると、*pgsA+ lpp cpsB'-lacZ* 融合株 UE29 より高いものの、CL330 株の半分以下の活性を示した。

lgt 遺伝子を IPTG で誘導される *trc* プロモーターの下にクローン化した低コピープラスミド pHR725 を CL330 に導入すると、X-Gal と 0.5 mM IPTG を含む LB 寒天培地で 42°C で生育し、白いコロニーを生じた。IPTG なしでは、42°C での生育は悪く、淡い青色を呈した。0.1 mM IPTG 存在下で 30°C で培養して β -ガラクトシダーゼ活性を測定すると、ベクタープラスミド pHR718 をもつ CL330 株の半分程度の活性を示した。したがって、*lgt* 過剰発現は *pgsA* 完全欠損株におけ

る Rcs 系活性化を抑えることがわかった。

(3) *LspA* 阻害による Rcs 系活性化

lgt 過剰発現が *pgsA* 完全欠損株の Rcs 系活性化を抑えるということは、リポタンパク質成熟がうまくいかないことが Rcs 系活性化の原因であるかもしれない。そこで *pgsA+ lpp cpsB'-lacZ* 融合株 UE29 を *LspA* の特異的阻害剤であるグローボマイシンで処理した。濃度は 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ で、この濃度では生育には殆ど影響がない。グローボマイシン処理によって、僅かではあるが、 β -ガラクトシダーゼ活性が上昇した。*rcsF* 欠損によって上昇しなくなった。このことは、RcsF リポタンパク質のプロセッシングがうまく行かないことが Rcs 系活性化を引き起こしていることを示していると言える。

(4) *pgsA* 完全欠損株における RcsF の内膜蓄積

これまでの結果は、*pgsA* 完全欠損株における Rcs 系活性化がリポタンパク質、ことに RcsF の成熟過程に欠損があるためであることを示唆している。私たちは以前、*pgsA lpp* 変異株で *lpp* 遺伝子を発現させると、Lgt の反応でのジアシルグリセロールの主要な供与体であるホスファチジルグリセロールがないために *lpp* 遺伝子産物の修飾がうまくいかず、その結果、前駆体が内膜に蓄積して、それが溶菌を引き起こすことを示した。しかし、量的にマイナーな RcsF の成熟もまた同様に遅れるとは必ずしも言えない。そこで、RcsF タンパク質の外膜/内膜局在性を蔗糖密度勾配遠心分離した試料をウェスタン解析によって調べた。

pgsA+ である UE29 株では、RcsF は OmpA タンパク質とともに外膜画分に回収された。これに対し、*pgsA* 完全欠損の CL330 株では、かなりの量の RcsF がコハク酸脱水素酵素活性とともに内膜画分に回収された。この結果は、ジアシルグリセロール修飾を直接分析しているわけではないが、ホスファチジルグリセロールの欠損がマイナーなリポタンパク質である RcsF の成熟過程を遅延させたことを示していると考えられる。

(5) リポタンパク質ソーティングシグナルを改変した RcsF の内膜局在化とそれによる *pgsA+* 株での Rcs 系の活性化

成熟リポタンパク質の局在性は成熟体の 2 番目の残基がソーティングシグナルとなって決まる。2 番目の残基が Asp だと内膜停滞シグナルとなり、3 番目の残基も停滞効率に影響する。部位特異的変異導入によって、RcsF の成熟体 2 番目の残基を Asp に改変した。この RcsFS2D を、低コピー数のプラスミド上の *trc* プロモーター

から、染色体上の RcsF と同じレベルで発現させた(20 μ M IPTG)ところ、*pgsA*⁺株で Rcs 系が活性化した。RcsF は3番目の残基として Met をもつ。2番目が Asp で3番目が Met というのは余り強い内膜停滞シグナルとはならず、約 60%だけが停滞するとされている。3番目の残基が Asp・Glu・Gln のとき最も強い停滞シグナルとなり、停滞効率は 100% となる。そこで、RcsFS2D の3番目の残基を Gln に改変した。この RcsFS2DM3Q は RcsFS2D よりも強く Rcs 系を活性化した。これら改変 RcsF による Rcs 系活性化は RcsC がいないと起こらなかった。蔗糖密度勾配遠心分離によって調べると、RcsFS2DM3Q は殆ど全部が内膜タンパク質 EnvZ とともに内膜画分に回収された。

(6)ペリプラズムタンパク質であるマルトース結合タンパク質(MBP)と融合した RcsF 似よる強い Rcs 系活性化

RcsF の成熟体部分をペリプラズムタンパク質である MBP(*malE*遺伝子産物)の C 末端側に融合させた。この MBP-RcsF 融合タンパク質を低コピー数プラスミド上の *trc* プロモーターから発現させた細胞をスフェロプラスト化して遠心分離し、抗 MBP 抗体でウェスタン解析したところ、半分以上が染色体にコードされた MBP とともに上清のペリプラズム画分に回収された。MBP-RcsF は、非常に低い発現レベルでも、強く Rcs 系を活性化した。

(7)局在性を変えた RcsF の細胞表層に関わる突然変異への応答

さまざまな突然変異が RcsF が存在するときのみ Rcs 系を活性化することが知られている。そのうちいくつかを挙げると、(i)ホスファチジルグリセロリン酸合成酵素をコードする *pgsA*, (ii)ペリプラズムの膜由来オリゴ糖の合成にあずかるグルコシル転移酵素をコードする *mdoH*, (iii)細胞表層の integrity の維持にあずかる Tol 系のペリプラズム成分をコードする *tolB*, (iv)リポ多糖の形成にあずかるリン酸転移酵素をコードする *rfaP* などがある。

RcsF が外膜リポタンパク質であることの重要性を明らかにするために、内膜やペリプラズムに局在性を変えた RcsF のこれら変異への応答を調べた。RcsFS2D・RcsFS2DM3Q も MBP-RcsF も、*pgsA*・*mdoH*・*tolB* 変異には応答したが、*rfaP* 変異には応答しなかった。このことは外膜の外側のリポ多糖の構造に影響を与える *rfaP* 変異によるストレスに応答するには、RcsF が外膜リポタンパク質であることが必要であることを示している。

(8)RcsF は Rcs 系活性化に際して RcsC のリガンドとして働く

RcsF タンパク質が内膜に停滞すると、内膜貫通タンパク質である RcsC センサーキナ

ーゼのペリプラズムに突出したセンサードメインにより近づきやすくなって、Rcs 系が活性化すると考えられる。MBP-RcsF も同様に、ペリプラズム内に遊離の状態となって、RcsC のペリプラズムのドメインに接近しやすくなり、強く Rcs 系を活性化するのだろう。つまり、RcsF は Rcs 系活性化に際して、RcsC のリガンドとして働くと考えられる。

(9)*pgsA* 完全欠損株における Rcs 系活性化は RcsF の内膜停滞だけによるのではない

RcsFS2DM3Q はほぼ完全に内膜に停滞するが、それでも *pgsA* 完全欠損変異によるストレスに応答する。MBP-RcsF は Lgt の反応には関係がないが、*pgsA* 完全欠損変異に強く応答する。つまり、RcsF の内膜停滞だけが、*pgsA* 完全欠損株における Rcs 系活性化の原因ではない。RcsF の内膜停滞に加えて、主要酸性リン脂質を欠くことがストレスとなって Rcs 系を活性化すると考えられる。

(10)RcsF の proline-rich region

次に私たちは RcsF の一次構造に注目した。国立遺伝学研究所の GTOP データベース (<http://spock.genes.nig.ac.jp/~genome/gtop.html>)において、(一次翻訳産物の N 末端の Met からかぞえて) 31-48 番目の領域が、low-complexity region と予測されている。この領域が Pro 残基に富んでいることに気づいた。この Pro-rich region (PRR) は塩基性アミノ酸にも富んでいる。さまざまな細菌の RcsF タンパク質のアミノ酸配列を比較したところ、この PRR 周辺的一次構造は他の領域に比べて保存性が低いが、Pro 残基と塩基性残基に富んでいるという特徴は共通して持っていることがわかった。本研究では 32-50 番目(成熟体の N 末端の Cys からかぞえて 17-35 番目)の領域を PRR と定義して解析を進めた。

```

1      10      17      25      35
CSMLSRSPVEPVQSTAPQPKAEPAKPKAQRATEVRI
37
YTNAEELVGKPFPRDLGEVSGDSCQASNQDPPSIPTARKRM
78      118
QINASKMKANAVLLHSCEVTSGTPGCYRQAVCIGSALNITA
119
K

```

RcsF の PRR

PRR を大きいフォントで、Pro 残基を白黒反転で、塩基性残基を下線を付けて示す。

(11)ペリプラズム遊離型 MBP-RcsF 融合タンパク質の PRR 欠失による Rcs 系活性化レベルの上昇

ペリプラズム遊離型の MBP-RcsF は Rcs 系を強く活性化する。この融合タンパク質から、RcsF 部分の N 末端 16 残基を欠失しても、Rcs 系活性化レベルは変わらなかった。N 末端 35 残基を欠失すると、活性化レベルは著しく上昇した。RcsF の Rcs 系活性化に働くドメインは 36 番目の残基から C 末端の 119 番目の Lys 残基の間にあることになる。17 番目から 35 番目の PRR だけを欠失した場合も、35 番目までの欠失と同じ活性化レベルを示した。この実験では、融合タンパク質は低コピープラスミド上の *tac* プロモーターから IPTG なしで発現させている。

MBP-RcsF は *pgsA*・*mdoH*・*tolB* などの変異によるストレスに応答して Rcs 系を活性化する(ただし *rfaP* には応答しない)。MBP-RcsFΔPRR を低コピー数プラスミド上の *tac* プロモーターから IPTG なしで発現させたところ、*rfaP* を含む変異で、変異によるストレスがない状態と同程度の高い Rcs 系活性化レベルを示した。MBP-RcsF の PRR 欠失は Rcs 系を最大限まで活性化して、細胞表面にかかわる変異があっても、もはや応答しないのかもしれない。

(12) 内膜に局在化した RcsF リポタンパク質の PRR 欠失による Rcs 活性化レベルの上昇

RcsFS2D や RcsFS2DM3Q から PRR を欠失すると、それぞれさらに Rcs 系が活性化した。

(13) 野生型の外膜リポタンパク質 RcsF の PRR 欠失では Rcs 系活性化レベルは上昇しない

野生型の外膜リポタンパク質 RcsF は、PRR を欠失しても、Rcs 活性化レベルは上昇しなかった。通常 Rcs 系を活性化させる *mdoH*・*tolB*・*rfaP* の変異にも応答せず、Rcs 系の活性化はみられなかった。*pgsA* 変異では、RcsF は内膜に停滞する。そのため RcsFΔPRR は RcsFS2 や RcsFS2DM3QΔPRR と同様に高い Rcs 系活性化レベルを示した。

(14) タンデムに繰り返した外膜リポタンパク質 RcsF の PRR 欠失による Rcs 活性化レベルの低下

野生型の外膜リポタンパク質 RcsF の PRR 欠失で Rcs 系活性化レベルが上昇しないのは、PRR 欠失によって RcsF の分子のサイズが小さくなったためかもしれないと考えた。RcsF は Rcs 活性化に際して内膜のヒスチジンキナーゼ RcsC のリガンドとして働くと考えられるので、分子サイズが小さくなると RcsC と相互作用できなくなるのかもしれない。このようなサイズの問題を避けるために、タンデムに繰り返した RcsF を作成した。繰り返した RcsF の上流側のものは C 末端の 4 残基を除いた。RcsF の C 末端 4 残基を欠失すると、Rcs 系活性化能が失われることがわかってい

る。下流側のものは N 末端のシグナルペプチドを除いた。

このようにして作成したタンデムに繰り返した RcsF (RcsFΔ4-RcsF) は、Rcs 系を強く活性化した。これは分子のサイズが大きくなって RcsC のペリプラズムドメインに接近しやすくなったためだろう。

上流側の RcsF 部分から PRR を欠失しても (RcsFΔPRRΔ4-RcsF), Rcs 系活性化レベルは変わらなかったが、下流側の RcsF 部分の PRR 欠失 (RcsFΔ4-RcsFΔPRR) では Rcs 系活性化レベルが著しく低下した。上流側と下流側の両方から PRR を欠失した場合も同様に著しい低下がみられた。上流側の RcsF が野生型のリポボックスとリポタンパク質ソーティングシグナルをもっているので、タンデムに繰り返した RcsF も外膜リポタンパク質として挙動すると考えられる。

また、野生型外膜リポタンパク質の RcsF を過剰発現させたところ、PRR 欠失によって Rcs 系活性化レベルの低下がみられた。

PRR の欠失は、外膜リポタンパク質のときと、内膜もペリプラズムに局在性を変えたときとで、Rcs 系活性化レベルに反対の効果と及ぼすことになる。

タンデムに繰り返した RcsF では、下流側の RcsF の PRR 欠失はひとつながりの活性化ドメインのコンフォメーションに影響を及ぼすが、上流側の PRR 欠失は人為的につなげられた下流側 RcsF の活性化ドメインには影響を及ぼさないと考えられる。

(15) PRR 中の Pro 残基の Ala への置換

MBP-RcsF の PRR 中の Pro 残基をひとつずつ Ala に置換すると、33 番目 (PRR 中で一番 C 末端側) の Pro を Ala に変換したときのみ、MBP-RcsFΔPRR の 1/3 程度の Rcs 系活性化を示した。他の Pro の置換ではまったく影響がなかった。

外膜リポタンパク質である RcsF を過剰発現させたところ、Pro の Ala への置換は Rcs 系活性化レベルを低下させた。置換の位置が C 末端に近いほど低下の程度は大きかった。

PRR 中の Pro 残基を全部 Ala に置換したとき、MBP-RcsF ではさらに活性化レベルが上昇することはなかった。外膜リポタンパク質の RcsF の場合は、さらに活性化レベルが低下したが、PRR 欠失ほどには低下しなかった。

Pro の Ala への置換の効果は野生型とペリプラズム遊離型にしたものと違っていたが、PRR の C 末端側に近いほど、RcsF の C 末端領域にある活性化ドメインに強く影響するという点では共通していた。

(16)PRR 中の塩基性残基の Gln または Glu への置換

PRR 中の Pro 残基を全部 Ala に置換しても PRR 欠失と同じレベルの影響が現れなかったため、次に PRR 中の 5 つの塩基性残基 (Arg と Lys) を Gln または Glu に置換することを試みた。MBP-RcsF の PRR の全塩基性残基を Gln に置換すると (KR-Q), Rcs 活性化レベルは 2 倍程度に上昇した。全部を Glu に置換すると (KR-E), 活性化レベルは著しく上昇した。全 Pro 残基の Ala への置換 (P-A) を KR-Q・KR-E と組み合わせると、それぞれさらに上昇した。KR-E と P-A の組合せでは PRR 欠失と同程度の活性化レベルを示した。

外膜リポタンパク質の RcsF を過剰発現させたとき、KR-Q・KR-E・P-A の置換変異はいずれも同程度、Rcs 活性化レベルが低下した。P-A 置換を KR-Q・KR-E 変異と組み合わせても、活性化レベルは変化しなかった。この活性化レベルは PRR 欠失のときより少し高かった。

(17)RcsF のドメイン構造

RcsF は Rcs 系活性化に際して内膜のヒスチジンキナーゼ RcsC のリガンドとして働くと考えられる。MBP-RcsF の RcsF 成熟体部分の N 末端 35 残基を欠失すると、高い Rcs 系活性化レベルを示したため、Rcs 系活性化に働く RcsF の機能ドメインは 36 番目の Ile と C 末端 (119 番目) の Lys の間にあることになる。X 線結晶解析 (Leverrier *et al.*, 2011) や NMR による解析 (Rogov *et al.*, 2011) によれば、33 番目の Pro 残基から C 末端までは β シートを 2 本の α -ヘリックスがはさむようなかっちりした構造をとっている。

PRR が Rcs 系活性化レベルに及ぼす効果は、野生型の外膜リポタンパク質の RcsF と、内膜やペリプラズムに局在性を変えた RcsF とで逆になった。PRR の Pro 残基を Ala に置換したり、塩基性残基を Gln や Glu に置換したり、また、これら置換を組み合わせたりしたときの効果も、野生型の外膜リポタンパク質の RcsF と、内膜やペリプラズムに局在性を変えた RcsF とで異なっていた。その理由がうまく説明がつかないが、PRR が Rcs 系活性化に際して RcsF の機能を制御するのに重要な役割を果たしていると考えられることができる。Pro 残基に富む配列は一般にフレキシブルな領域をつくとされている。実際、X 線結晶解析や NMR 解析でも、33 番目の Pro 残基より N 末端側ははっきりした構造を示さないことがわかっている。この領域の一次配列はさまざまな種の RcsF の間で余り保存されていないが、Pro 残基と塩基性残基に富むという特徴は共通している。

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 9 件)

(1) Aya Itou, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. 2012. Activation of the Cpx phosphorelay signal transduction system in acidic phospholipid-deficient *pgsA* mutant cells of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読有 421(2): 296–300.

(2) Yasuhiro Shiba, Hiroyoshi Miyagawa, Hideki Nagahama, Kenji Matsumoto, Daitetsu Kondo, Satoshi Matsuoka, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. 2012. Exploring the relationship between lipoprotein mislocalization and activation of the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*. *Microbiology* 査読有 158(5): 1238–1248.

他 7 件、すべて査読有

[学会発表] (計 56 件)

(1) 梅川 満, 中村 達郎, 宮川 宏義, 松岡 聡, 原 弘志, 松本 幸次. 外膜リポタンパク質 RcsF の二成分制御系活性制御に働く Proline-Rich Region の機能領域の特定. 日本遺伝学会第 82 回大会. 北海道大学高等教育機能開発総合センター, 札幌, 2010 年 9 月 20–22 日.

他 55 件、国内国際学会発表 11 件

[図書] (計 1 件)

(1) Kouji Matsumoto, Satoshi Matsuoka and Hiroshi Hara. 2012. Membranes and lipids, p. 61–91. *In* Yoshito Sadaie and Kouji Matsumoto (Eds.), *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: The Frontiers of Molecular Microbiology Revisited. Research Signpost, Kerala, India.

[産業財産権] なし

[その他] なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 弘志 (HARA HIROSHI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：00173071

(2)研究分担者

松本 幸次 (MATSUMOTO KOUJI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：00119140

松岡 聡 (MATSUOKA SATOSHI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：90509283

(3)連携研究者 なし