

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 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22570187

研究課題名（和文）粘液細菌の真核生物様プロテインキナーゼ／ホスファターゼを介した情報伝達機構の解明

研究課題名（英文）Signal transduction in myxobacteria using eukaryotic protein kinases and phosphatases.

研究代表者

木村 義雄 (KIMURA YOSHIO)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：10243750

研究成果の概要（和文）：粘液細菌を用いて、2種の細菌型チロシンキナーゼの機能解析を行った結果、グラム陰性型チロシンキナーゼ BtkB は増殖期に発現し、高温ストレス適応に関与しており、グラム陽性型チロシンキナーゼ BtkA は飢餓誘導における成熟孢子形成期に発現し、成熟孢子形成に必須な酵素であった。両者とも菌体外多糖の生産に関与していた。一方、Ser/Thr/Tyr ホスファターゼ Pph3 は飢餓誘導による孢子形成に関与し、PHP ファミリーに属するホスファターゼ PhpA は、細菌型チロシンキナーゼの自己リン酸化チロシン残基の脱リン酸化反応を行い、菌体外多糖の生産の調節に関与していると推察された。

研究成果の概要（英文）：*Myxococcus xanthus btkB* gene is expressed mainly in the growth phase and early stages of fruiting body development. When cultured in nutrient medium at high temperature (37 ° C), *btkB* mutant showed reduced maximum cell density as compared to the wild type. Also, phosphorylated BtkA is expressed late after starvation induction and early after glycerol induction, and BtkA is required for the formation of mature spores. BtkA and BtkB are involved in the synthesis of exopolysaccharide. On the other hand, Pph3 showed the enzymatic characteristics of PP2C-type serine/threonine protein phosphatases, and is involved in spore formation. PhpA shares homology with PHP family, and dephosphorylates Tyr-phosphorylated BtkA and BtkB. This enzyme is also involved in the production of exopolysaccharide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,500,000	450,000	1,950,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 細胞生物学

キーワード：粘液細菌 Ser/Thr/Tyr プロテインホスファターゼ 細菌型チロシンキナーゼ

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、細菌において真核生物様セリン/スレオニンプロテインキナーゼが見出されていたが、その機能は不明な点が多く、実際には真核生物とは異なり、重要な機能を有さないと考えられていた。しかしながら、細菌のゲノム解析が進むにつれ、解析された細菌の約2/3において真核生物様セリン/スレオニンプロテインキナーゼが見出されたことから、細菌においても本酵素は重要な役割を有していると考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

粘液細菌は、飢餓になると1カ所に集合し、孢子からなる子実体を形成するといった集団行動をとる細菌で、複雑な情報伝達機構を有することが推定されている。実際、本菌のゲノム解析の結果から、粘液細菌には100-250程度のセリン/スレオニンプロテインキナーゼが見出されており、これは他の細菌に比べ、突出して多く、1000遺伝子におけるセリン/スレオニンプロテインキナーゼの割合は、ほ乳動物と同等かそれ以上である。細菌のセリン/スレオニン/チロシンキナーゼ及びホスファターゼの酵素学的諸性質及び細胞内での役割についての報告例は極めて少ないことから、上記の研究の背景も含めて、粘液細菌を用いて、細菌における真核生物様セリン/スレオニンプロテインキナーゼによる情報伝達系の解明を行うことは、意義があると考え、我々は粘液細菌におけるセリン/スレオニン/チロシンキナーゼ及びホスファターゼを介した情報伝達機構の詳細を明らかにすることを本研究の目的とする。また、近年、細菌にのみ存在する細菌型チロシンキナーゼの研究も進んできていることから、本菌における細菌型チロシンキナーゼの機能解析についても研究を行った。

3. 研究の方法

今回、対象とする酵素については、それぞれの遺伝子を大腸菌系発現ベクターであるpColdベクターもしくはpColf-TFベクターに組み込み、大腸菌にて発現後、精製した酵素を用いて種々の酵素学的諸性質を明らかにした。

また、細胞内での機能解析を行うために、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。最初に各遺伝子にカナマイシン分解遺伝子を組み込んだのち、エレクトロポレーション法により、粘液細菌に導入後、相同組換えにより、目的遺伝子の破壊がなされた変異株を獲得後、種々の表現型を野生株と比較することにより、それぞれの酵素が細胞内でどのような役割を有しているか明らかにした。

各酵素の発現時期の特定は、RT-PCR法もしくは、抗体を用いたWestern blotting法により、解析した。

4. 研究成果

(1) セリン/スレオニン/チロシンホスファターゼの機能解析：真核生物のセリン/スレオニン/チロシンホスファターゼと相同性の高いホスファターゼ(Pph3)を選択し、酵素学的諸性質を検討したところ、本酵素はMn依存性でオキサリ酸に阻害を受けないこと、リン酸化スレオニンペプチドを最も良い基質にすること、そのKm値は、ほ乳動物のPP2Cとよく似ていることなど、真核生物のPPMファミリーのそれらとよく似た性質を有していた。

また、*pph3*遺伝子破壊株は、飢餓条件下で未成熟な子実体を形成し、最終的な孢子数は野生株の45%程度であったことから、本酵素は飢餓時の孢子及び子実体形成に関与していることが推定された。

(2) Ser/ThrホスファターゼPph3の酵素学的機能解析：粘液細菌において真核生物のSer/Thrホスファターゼと相同性の高いホスファターゼ(Pph3)を用いて金属塩、基質結合などに関与していると推定されるアミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異酵素を作製し、基質及び金属塩に対するアフィニティー、反応速度などを測定し、酵素学的諸性質を検討した。

その結果、金属塩の結合に重要と考えられるアミノ酸を変異させた酵素において活性はほとんど消失し、また、基質結合に関与しているアミノ酸を置換したところ、基質結合能の減少がみられ、これらのアミノ酸は重要な働きを有していることを確認した。

また、この酵素はC末端領域にcAMP結合部位を有していることから、この領域により、酵素活性の調節がなされているかどうか確認し

た。この酵素のC末端領域を欠損した変異酵素は、比活性の増加が見られたことから、C末端領域はこの酵素の活性を阻害していることが推定された。一方、C末端領域欠損酵素は、野生酵素で活性に必要なメルカプトエタノールを添加しなくても活性がみられたことから、触媒領域にあるS-S結合の形成に何らかの影響を与えていると考え、触媒領域にある2つのS-S結合を形成しない変異酵素を作製した。その結果、メルカプトエタノールを添加しない条件下でも活性が見られ、阻害を受けなかったことから、C末端領域は酵素の阻害として機能しているのではなく、触媒領域のS-S結合に関与していると考えられた。また、cAMPを添加すると活性の増加がみられたので、cAMPが結合することでC末端領域の構造が変化し、触媒領域のS-S結合の形成に影響を与えていると考えられた。

(3) PHPファミリーに属するチロシンホスファターゼの機能解析 最近、枯草菌で報告された細菌特有のチロシンホスファターゼであるPHPファミリーに属するPphAの酵素学的諸性質を明らかにしたところ、本酵素は活性にMn²⁺やCo²⁺を必要とし、リン酸化ペプチド基質の酵素活性より、リン酸化チロシンを特異的に脱リン酸化する酵素であることが明らかになった。この酵素はまた、上記の細菌型チロシンキナーゼの自己リン酸化されたチロシンの脱リン酸化を触媒した。

また、本遺伝子破壊株は、飢餓誘導による分化が野生株より少し早く進むこと、凝集も早く起こること、また、菌体外多糖を多く合成することなどから、細菌型チロシンキナーゼであるBtkA及びBtkBの自己リン酸化チロシンの脱リン酸化などに作用し、本菌の菌体外多糖合成の調節に関与していると推定された。

(4) グラム陽性型チロシンキナーゼの機能解析 研究対象としている*M. xanthus*はグラム陰性型とグラム陽性型のチロシンキナーゼをそれぞれ1つずつ有しており、最初にグラム陽性型チロシンキナーゼBtkA (MXAN_3228)の機能解析を行った。グラム陽性型チロシンキナーゼは、レセプター型タンパク質と細胞質キナーゼがそれぞれ別のタンパク質で構成されているが、他の菌で報告されているようにBtkAはレセプタータンパク質(MXAN_3227)がないと自己リン酸化が起こらなかった。

この酵素は増殖期には見られず、飢餓誘導後、72時間程度で発現した。また、*btkA*遺伝子

破壊株を作製し、その表現型を明らかにしたところ、本変異株は集合体を形成するものの熱処理及び超音波処理に対して耐性な成熟胞子を形成しなかった。成熟胞子を被うコートは数種のタンパク質と多糖から構成されており、タンパク質の組成及び量においては野生株と変異株の間では差は見られなかったが、変異株の多糖合成量において野生株のそれより、30%程度少なかった。このことから、BtkAは胞子のコートを形成する多糖の合成に関与している可能性が示唆された。

(5) グラム陰性型チロシンキナーゼの機能解析

グラム陰性型チロシンキナーゼは、レセプター型タンパク質と細胞質キナーゼが1つのタンパク質で構成されており、レセプターのN末端に存在する活性化領域とキナーゼ領域を含むタンパク質を大腸菌で発現させると、自己リン酸化活性が見られた。本酵素は対数増殖期、定常期、子実体形成期初期に発現が見られた。*btkB*遺伝子破壊株を作製し、その表現型を野生株と比較したところ、高温での生育不良や分化の遅延が見られた。また、変異株の多糖合成量において野生株のそれより、低下がみられたことから、BtkBも菌体外多糖の合成に関与している可能性が示唆された。

(6) cNMP 分解酵素の機能解析

この酵素は今回の課題とする酵素と機能が異なるが、プロテインホスファターゼである Pph3 は cAMP により活性調節が行われること、我々は cNMP 分解酵素の class 3 に属する同酵素 2 種の酵素学的諸性質と機能を既に報告していることから、研究対象とする粘液細菌で報告されていない class 2 の cNMP ホスホジエステラーゼ (PdeE) の酵素学的諸性質を明らかにした。

本酵素は cAMP 及び cGMP を基質としたほか、NTP, NDP, NMP などに対し脱リン酸化活性がみられ、飢餓 24-48 時間後に最も発現が多かった。また、*pdeE* 遺伝子破壊株は、飢餓条件下で子実体及び胞子形成が 1 日程遅れたが、最終的な胞子数は野生株と同程度であった。本酵素は本菌における最初の cGMP 分解酵素の報告例となった。

我々は、細菌においてまだ報告例の少ないプロテインホスファターゼについて、今回、粘液細菌が有する 2 種の酵素を用いて、酵素学的諸性質と機能を明らかにし、細菌におけるプロテインホスファターゼの一端を明らかにすることができた。

また、細菌型チロシンキナーゼは近年、菌

体外多糖の生産に関与することが報告され、菌体外多糖は、莢膜などの細胞表層や菌体外へ産生されるリポ多糖(LPS)や糖タンパク質、また、バイオフィームなどの構成成分で、宿主(動物)細胞への接着(感染)、動物体内での細菌の生活群集の形成、細菌毒素や抗原などにおいて人間の疾病等にも重要な関係を有している。粘液細菌は、グラム陰性型及び陽性型チロシンキナーゼをそれぞれ1つずつ有しているため、それらの酵素を大腸菌で発現、精製した酵素を用いて酵素学的諸性質と変異株の表現型から機能解析を行うことで、本酵素の役割を明らかにした。

現在、粘液細菌が有する真核生物型のプロテインキナーゼに関して研究を進めており、ある程度結果が得られているので、近々、学術論文等で報告したい。

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7件)

- ① Mori, Y., Takegawa, K., and Kimura, Y. Function analysis of conserved amino acid residues in a Mn²⁺-dependent protein phosphatase, Pph3, from *Myxococcus xanthus*. *Journal of Biochemistry* 152:269-274 (2012). doi: 10.1093/jb/mvs067. 査読有り
- ② Kimura, Y., Kato, T., and Mori, Y. Function analysis of a bacterial tyrosine kinase, BtkB, in *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiological Letters* 336:45-51(2012). doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02651.x. 査読有り
- ③ Mori, Y., Maeda, M., Takegawa, K., and Kimura, Y. PphA, a tyrosine phosphatase of *Myxococcus xanthus*, is involved in the production of exopolysaccharide. *Microbiology* 158:2546-2555 (2012). doi: 10.1099/mic.0.059824-0 査読有り
- ④ Kimura, Y., Yoshimi, M., and Takata, G. Enzymatic and mutational analysis of a class II 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase, PdeE, from *Myxococcus xanthus* 193:2053-2057 (2011). doi: 10.1128/JB.01250-10.

査読有り

- ⑤ Kimura, Y., Mori, Y., Ina, Y., and Takegawa, K. Enzymatic and functional analysis of a protein phosphatase, Pph3, from *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology* 193:2657-2661 (2011). doi: 10.1128/JB.01357-10. 査読有り
- ⑥ Kimura, Y., Yamashita, S., Mori, Y., Kitajima, Y., and Takegawa, K. A *Myxococcus xanthus* bacterial tyrosine kinase, BtkA, is required for the formation of mature spores. *Journal of Bacteriology* 193:5853-5857 (2011). doi: 10.1128/JB.05750-11 査読有り
- ⑦ Kimura, Y., Kawasaki, S., Yoshimoto, H., and Takegawa, K. Glycine betaine biosynthesized from glycine provides an osmolyte for cell growth and spore germination during osmotic stress in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology* 192:1467-1470 (2010). doi: 10.1128/JB.01118-09. 査読有り

[学会発表] (計8件)

- ① 木村義雄、掛水葵、松原優子、粘液細菌のSer/Thrプロテインキナーゼ(SpkA)の酵素学的特徴について 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 2010年12月10日、神戸
- ② 川崎真治、土本遼太、木村義雄：粘液細菌の浸透圧調節物質の合成酵素について 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 2010年12月10日、神戸
- ③ 木村義雄、吉見昌晃：粘液細菌 *Myxococcus xanthus* の class II 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PdeE) の酵素学的諸性質と機能解析 第84回日本生化学会大会、2011年9月21日、京都
- ④ 森裕美、伊奈陽平、木村義雄：粘液細菌のプロテインフォスファターゼ Pph3 の

酵素学的諸性質と機能解析 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都

- ⑤ 森裕美、木村義雄：粘液細菌 *Myxococcus xanthus* のマンガン依存性プロテインフォスファターゼ Pph3 における保存アミノ酸残基の解析 日本農芸化学会中四国支部第 32 回講演会 2012 年 1 月 21 日、鳥取
- ⑥ 木村義雄、前田美璃、森裕美：粘液細菌 *Myxococcus xanthus* のチロシンホスファターゼ PphA の酵素学的諸性質 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡
- ⑦ 岡本怜子、木村義雄：粘液細菌 *Myxococcus xanthus* における真核生物様チロシンキナーゼについて 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡
- ⑧ 加藤拓也、木村義雄：粘液細菌 *Myxococcus xanthus* が有する細菌型チロシンキナーゼ BtkB の機能解析 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/kimura/HP2012.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 義雄 (Kimura Yoshio)
香川大学・農学部・教授
研究者番号：10243750

(3) 連携研究者

竹川 薫 (Takegawa Kaoru)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：50197282