

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440176

研究課題名(和文)細菌外膜リポタンパク質が二成分制御系内膜成分へ細胞表層ストレス情報を伝達する機構

研究課題名(英文) A mechanism by which a bacterial outer membrane lipoprotein transmits cell surface stress information to an inner membrane component of a two-component regulatory system

研究代表者

原 弘志 (HARA, Hiroshi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：00173071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：外膜リポタンパク質RcsFは大腸菌のRcs二成分制御系(リン酸リレーシグナル伝達系)の必須の成分である。RcsFをペリプラズムや膜に誤局在させるとRcs系が強く活性化し、RcsFが系の内膜成分と相互作用して働いていることがわかる。これはRcsFが、系の負の制御因子である内膜タンパク質YrfFのペリプラズム領域(YrfF)と相互作用するという報告と合致する。本研究では、内膜ヒスチジンキナーゼRcsCのペリプラズム領域領域(RcsCperi)のペリプラズム遊離実験や二分子蛍光相補(BiFC)実験で、RcsFがYrfFperiだけでなくRcsCperiとも相互作用して系を活性化していることを示した。

研究成果の概要(英文)：An outer membrane lipoprotein RcsF is an essential component of the Rcs phosphorelay signal transduction system of Escherichia coli. Mislocalization of RcsF to the periplasm or to the cytoplasmic membrane leads to high activation of the Rcs system, suggesting that RcsF functions by interacting with the cytoplasmic membrane component(s) of the system. This is consistent with the report that RcsF interacts with the periplasmic domain of the inner membrane protein YrfF (YrfFperi), a negative regulator of the system. We show that RcsF also interacts with the periplasmic domain of the inner membrane histidine kinase RcsC (RcsCperi). When RcsCperi was secreted to the periplasm, it titrated RcsF's activating effect. A bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiment showed interaction of RcsF with RcsCperi as well as with YrfFperi. We conclude that RcsF interacts with the periplasmically exposed region of RcsC as well as with that of YrfF in activating the system.

研究分野：分子生物学

キーワード：大腸菌 外膜リポタンパク質 二成分制御系 細胞表層ストレス タンパク質間相互作用 BiFC ヒスチジンキナーゼ 負の制御因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸内細菌群の Rcs 二成分制御系(リン酸リレーシグナル伝達系)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。外膜リポタンパク質 RcsF は Rcs 系活性化に必須の成分である。

(2) RcsF の成熟体部分を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)と融合させてペリプラズムに遊離させたり、RcsF のリポタンパク質ソーティングシグナルを改変して内膜に滞留させると、Rcs 系が強く活性化する。この結果は、RcsF が Rcs 系の内膜成分(ヒスチジンキナーゼ RcsC・トランスミッター RcsD・負の制御因子 YrfF)のいずれかと直接相互作用することによって Rcs 系活性化に働いていることを示唆する。

(3) 私たちは RcsC のペリプラズム領域(RcsCperi)が RcsF と相互作用すると予測した(引用文献)。一方、Cho らは YrfF のペリプラズム領域(YrfFperi)が RcsF と相互作用することを示した(引用文献)。

(4) 最近、RcsF の N 末端修飾リポドは外膜外葉にアンカーされており、C 末端側は outer membrane proteins (OMPs) の バレル内腔を通過してペリプラズムに露出していることが示された(引用文献)。

2. 研究の目的

(1) Rcs 系活性化に際して RcsC が YrfF と同様 RcsF と相互作用することを示す。

(2) Rcs 系活性化には RcsF の RcsC との相互作用は不可欠だが、YrfF との相互作用は必ずしも不可欠でないことを示す。

(3) Rcs 系活性化に際して RcsF の C 末端側が内膜に近づくようにスライドすることを示す。

3. 研究の方法

(1) 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。

(2) ウェスタン分析による RcsF 検出の一次抗体としては私たちが作成した抗 RcsF 抗血清を、MBP-RcsCperi・MBP-RcsDperi の検出には市販の抗 MBP モノクローナル抗体を、ヘキサヒスチンタグ融合 YrfF の検出には市販の抗ポリヒスチンモノクローナル抗体を用い、FLAG タグ融合 RcsC のウェスタン検出や FLAG タグ挿入 RcsF のドットプロット検出には市販の抗 FLAG モノクローナル抗体を用いた。

(3) 二分子蛍光相補(BiFC)実験には、一般の GFP とは異なりペリプラズムでもフォールディングして蛍光を発する superfolder GFP (sfGFP)を、sfGN(N 末端から 173 番目の残基まで)と sfGC(155 番目の残基から C 末端まで)の 2 断片に分割し、それぞれの N 末端に MBP のシグナル配列(SS)を付加したものの C 末端に注目するタンパク質を融合させたものを、compatible なプラスミドから発現するように構築した。

4. 研究成果

(1) Rcs 系が活性化している *apgH* (以前は *mdoH* と命名されていた) 変異株で MBP-RcsCperi を発現すると、Rcs 系活性化レベルが低下した。細胞分画によって MBP-RcsCperi はペリプラズムに遊離していることが確かめられたので、内膜の RcsC よりも優先的に外膜の RcsF と相互作用して、RcsF の Rcs 系活性化能を titrate したと考えられる。

(2) MBP-RcsCperi は、ペリプラズムに遊離した RcsF の Rcs 活性化能を titrate out した。RcsF は N 末端近くにプロリンと塩基性に富む領域(PRR)をもっており、ペリプラズム遊離型・内膜滞留型で PRR を欠失させると Rcs 系活性化能が著しく上昇する(引用文献)。MBP-RcsCperi はこの高い活性化能も titrate out した。

(3) RcsCDF を欠損した株にペリプラズム遊離型 RcsF Δ PRR と MBP-RcsC を発現させ、細胞を 0.5%ホルムアルデヒドで処理した後、SDS 電気泳動で分離し、抗 RcsF 抗体と抗 MBP 抗体でウェスタン分析した。両抗体で共通して約 200 kDa の架橋複合体が検出された。不完全に架橋されたと思われる約 170, 130, 100 kDa の複合体も検出された。SDS 電気泳動前に試料を 95 °C で処理すると架橋が切れて複合体は検出されなかった。分子量から判断して、約 200 kDa の架橋複合体は 4 分子の RcsF Δ PRR と 2 分子の MBP-RcsC からなると考えられる。約 170, 130, 100 kDa の複合体の RcsF Δ PRR:MBP-RcsC 構成比は 2:2, 4:1, 2:1 だと考えられる。以上の結果は RcsF と RcsCperi とが直接相互作用していることを示している。

(4) MBP-YrfF もペリプラズム遊離型 RcsF の Rcs 系活性化能を titrate out した。この結果は引用文献のとおり、RcsF と YrfFperi が直接相互作用していることを示している。

(5) 二分子蛍光相補(BiFC)実験は、蛍光タンパク質断片と相互作用パートナーとを融合させて、生細胞内で相互作用の局在を可視化する方法である。RcsCDF・YrfF を欠損した株に MBP の SS の働きでペリプラズムに分泌される sfGN-RcsF Δ PRR と sfGC-RcsCperi, sfGN-RcsF Δ PRR と sfGC-YrfFperi を発現させると、

蛍光顕微鏡観察によって、いずれも細胞周縁部に蛍光が観察された。2つの融合タンパク質のうち一方をsfGNあるいはsfGCにすると蛍光は観察されなかった。周縁部に蛍光が観察される細胞をリゾチーム処理すると、スフェロプラストとなった細胞からは蛍光が失われ、桿菌状態を保っている細胞には周縁部に蛍光が観察された。以上の結果はRcsFとRcsCperi・YrfFperiがペリプラズムで直接相互作用していることを示している。

(6) RcsFとの相互作用にはRcsCのペリプラズム領域が働いている。C末端にFLAGタグを融合したRcsCと、そのペリプラズム領域の中央1/3を欠失させたRcsCA160-231-FLAGを構築した。RcsCFを欠損する株で内膜滞留型RcsFとRcsC-FLAGを発現させると高いRcs系活性化が見られたが、RcsCA160-231-FLAGではRcs系は活性化しなかった。抗FLAG抗体を用いたウェスタン分析ではRcsCA160-231-FLAGの分解はほとんど観察されなかった。YrfF欠損は同時にRcsCDBのいずれかを欠損していないとRcs系の過活性化のため致死となる。RcsCF・YrfF欠損株でRcsC-FLAGやRcsCA160-231-FLAGをきわめて低レベルで発現させると、高いRcs系活性化が観察されたので、RcsCA160-231-FLAGがRcs系活性化能を失っているわけではない。この結果は、RcsFとRcsCperiの相互作用がRcs系活性化に必要であることを示している。

(7) RcsFとの相互作用にはYrfFのペリプラズム領域が働いている。C末端にヘキサヒスチジンタグを融合したYrfFとそのペリプラズム領域を欠失させたYrfF Δ peri-His₆を構築した。これらをコードするプラスミドをRcsF欠損株に導入して発現を誘導している状態で、 Δ yrfF::kanをP1ファージ形質導入すると、形質導入体を得られた。抗ポリヒスチジン抗体によるウェスタン分析ではYrfF Δ peri-His₆はほとんど検出できなかったが、YrfF欠損は致死性で、RcsCDBのいずれかの欠損が抑圧変異となるが、RcsFは抑圧変異とはならないので、YrfF Δ peri-His₆は僅かながらも発現してRcs系の過活性化を抑制しているはずである。実際YrfF Δ peri-His₆の発現誘導量を上げるとRcs系の活性が低下した。このYrfF Δ peri-His₆をもつ形質導入体にペリプラズム遊離型RcsFを発現させると、その発現量に応じてRcs系活性化レベルが上昇した。この結果は、RcsFとYrfFperiの相互作用がなくてもRcs系が活性化しうることを示唆している。

(8) RcsDの構造構造はRcsCに似ており、そのペリプラズムペリプラズム領域領域(RcsDperi)はRcsCperiと15.3%の同一性・61.8%の類似性を示す。しかし、MBP-RcsDperiはペリプラズム遊離型RcsF Δ PRRのRcs系活性化能をtitrateしなかった。抗MBP抗体を

用いたウェスタン分析ではMBP-RcsDperiの分解はほとんど観察されなかった。この結果はRcsDperiがRcsCperiとは違ってRcsFと相互作用しないことを示している。

(9) 背景(4)に述べたとおり、RcsFのN末端末端側は細胞表面に露出しており、C末端側はペリプラズムに露出している。引用文献を参考にしてRcsFの表面露出領域に存在する21番目と59番目のアミノ酸・表面に露出していない100番目のアミノ酸の後ろにFLAGタグを挿入したもの(R21FLAG, V59FLAG, K100FLAG)を構築した。細胞懸濁液をそのままPVDF膜にドット状にプロットして抗FLAG抗体で検出すると、R21FLAGとV59FLAGは検出されたが、K100FLAGは検出されなかった。SDS電気泳動泳動のちにウェスタン分析をするといずれも同程度に検出されたので、発現量に違いがあるわけではない。遺伝子欠損によってRcs系が活性化している株(*rfaP*欠損株・*tolB*欠損株)ではV59FLAGの検出量が減少した。浸透圧ストレス(NaClあるいはショ糖による)・低温ストレスによりRcs系が活性化している場合もV59FLAGの検出量が減少した。Rcs系が活性化する条件では、59番目のアミノ酸以降の部分の内側に近づくようにRcsFがスライドしてRcsCやYrfFと相互作用し、Rcs系が活性化すると考えられる。

<引用文献>

Yasuhiro Shiba, Hiroyoshi Miyagawa, Hideki Nagahama, Kenji Matsumoto, Daitetsu Kondo, Satoshi Matsuoka, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. Exploring the relationship between lipoprotein mislocalization and activation of the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 158 巻, 2012, 1238-1248

Seung-Hyun Cho, Joanna Szewczyk, Christina Pesavento, Matylda Zietek, Manuel Banzhaf, Paula Roszczenko, Abir Asmar, Géraldine Laloux, Ann-Kristin Hov, Pauline Leverrier, Charles Van der Henst, Didier Vertommen, Athanasios Typas, and Jean-François Collet. Detecting envelope stress by monitoring β -barrel assembly, *Cell*, 159 巻, 2014, 1652-1664

Anna Konovalova, David H. Perlman, Charles E. Cowles, and Thomas J. Silhavy. Transmembrane domain of surface-exposed outer membrane lipoprotein RcsF is threaded through the lumen of β -barrel proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 巻, 2014, E4350-E4358

Mitsuru Umekawa, Hiroyoshi Miyagawa, Daitetsu Kondo, Satoshi Matsuoka, Kouji

Matsumoto, and Hiroshi Hara. Importance of the proline-rich region for the regulatory function of RcsF, an outer membrane lipoprotein component of the *Escherichia coli* Rcs signal transduction system, *Microbiology*, 159 巻, 2013, 1818-1827

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Takatsugu Sato, Akira Takano, Nanako Hori, Tomoko Izawa, Takayoshi Eda, Kota Sato, Mitsuru Umekawa, Hiroyoshi Miyagawa, Kenji Matsumoto, Ayako Muramatsu-Fujishiro, Kouji Matsumoto, Satoshi Matsuoka, and Hiroshi Hara. Role of the inner membrane histidine kinase RcsC and outer membrane lipoprotein RcsF in the activation of the Rcs phosphorelay signal transduction system in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 査読有, 2017, 印刷中
Takahiro Seki, Kouji Matsumoto, Satoshi Matsuoka, and Hiroshi Hara. Activation without proteolysis of anti- σ factor RsiV of the extracytoplasmic function σ factor σ^V in a glucolipid-deficient mutant of *Bacillus subtilis*, *Advances in Microbiology*, 査読有, 7 巻, 2017, 315-327
DOI: 10.4236/aim.2017.74026
Satoshi Matsuoka, Takahiro Seki, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. Suppression of abnormal morphology and extracytoplasmic function sigma activity in *Bacillus subtilis* *ugtP* mutant cells by expression of heterologous glucolipid synthases from *Acholeplasma laidlawii*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 8 巻 2016, 2325-2333
DOI: 10.1080/09168451.2016.1217147
Jin Kusaka, Satoshi Shuto, Yukiko Imai, Kazuki Ishikawa, Tomo Saito, Kohei Natori, Satoshi Matsuoka, Hiroshi Hara, and Kouji Matsumoto. Septal localization by membrane targeting sequences and a conserved sequence essential for activity at the COOH-terminus of *Bacillus subtilis* cardiolipin synthase, *Research in Microbiology*, 査読有, 167 巻, 2016, 202-214
DOI: 10.1016/j.resmic.2015.11.004
Takahiro Seki, Ryota Mineshima, Michihiro Hashimoto, Kouji Matsumoto, Hiroshi Hara, Satoshi Matsuoka. Repression of the activities of two extracytoplasmic function σ factors, σ^M

and σ^V , of *Bacillus subtilis* by glucolipids in *Escherichia coli* cells, *Genes & Genetic Systems*, 査読有, 90 巻, 2015, 109-114

DOI: 10.1266/ggs.90.109

Hiraku Takada, Sanae Fukushima-Tanaka, Masato Morita, Yasuhiro Kasahara, Satoru Watanabe, Taku Chibazakura, Hiroshi Hara, Kouji Matsumoto and Hirofumi Yoshikawa. An essential enzyme for phospholipid synthesis associates with the *Bacillus subtilis* divisome, *Molecular Microbiology*, 査読有, 91 巻, 2014, 242-255

DOI: 10.1111/mmi.12457

Mitsuru Umekawa, Hiroyoshi Miyagawa, Daitetsu Kondo, Satoshi Matsuoka, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. Importance of the proline-rich region for the regulatory function of RcsF, an outer membrane lipoprotein component of the *Escherichia coli* Rcs signal transduction system, *Microbiology*, 査読有, 159 巻, 2013, 1818-1827

DOI: 10.1099/mic.0.069328-0

Michihiro Hashimoto, Takahiro Seki, Satoshi Matsuoka, Hiroshi Hara, Kei Asai, Yoshito Sadaie and Kouji Matsumoto. Induction of extracytoplasmic function sigma factors in *Bacillus subtilis* cells with defects in lipoteichoic acid synthesis, *Microbiology*, 査読有, 159 巻, 2013, 23-35

DOI: 10.1099/mic.0.063420-0

[学会発表](計73件)

伊沢 朋子,松本 幸次,松岡 聡,原 弘志. 大腸菌 Rcs シグナル伝達系における RcsF の働き, 第 88 回日本遺伝学会遺伝学会大会, 2016 年 9 月 7 日, 日本大学国際関係学部(静岡県三島市)

佐藤 貴皓,高野 晃,松本 幸次,松岡 聡,原 弘志. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)を用いたペリプラズムにおける Rcs 系のタンパク質間相互作用解析, 第 38 回日本分子生物学会年回・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

高野 晃,柴 康弘,宮川 宏義,梅川 満,松本 幸次,松岡 聡,原 弘志.大腸菌 Rcs リン酸リレーシグナル伝達系における RcsF と RcsC ペリプラズム露出領域の相互作用解析,日本遺伝学会第 86 回大会,2014 年 9 月 19 日,長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)

他 70 件, 内国際学会発表 5 件

[図書](なし)

〔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・理工学研究科・准教授
研究者番号：00173071

(2) 研究分担者

松岡 聡 (MATSUOKA, Satoshi)
埼玉大学・理工学研究科・助教
研究者番号：90509283

(3) 連携研究者 (なし)

(4) 研究協力者

松本 幸次 (MATSUMOTO, Kouji)
埼玉大学・理工学研究科・名誉教授