

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450117

研究課題名(和文) 根粒菌外膜タンパク質ToICの生理的機能の解明

研究課題名(英文) Studies on the physiological functions of ToIC, an outer membrane channel protein, in *Ensifer meliloti*

研究代表者

江田 志磨 (Eda, Shima)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：50420005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルファルファ根粒菌tolC変異株は、浸透圧感受性、運動性の低下、菌体外多糖産生能の低下など多面的な形質変化を示す。網羅的遺伝子発現解析により、tolC変異が外膜リポ多糖合成に関わる遺伝子や細胞膜ストレス応答に関わる遺伝子の発現に影響を与えていることが明らかになった。さらに、tolC変異株の多面的変異形質が抑制された擬似復帰変異株の解析により、リポ多糖合成遺伝子の発現上昇による膜恒常性の変化が、ストレス応答遺伝子など他の多くの遺伝子の発現変化を引き起こしている可能性が高いという重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：An *Ensifer meliloti* strain carrying a null tolC mutation shows pleiotropic phenotypes such as high sensitivity to osmotic/salt stress, decreased motility, and reduced exopolysaccharide production. Transcriptomic profiling analysis revealed that the tolC mutation affects expression of a large number of genes, including those encoding enzymes required for lipopolysaccharide synthesis and those involved in signal transduction of stress responses. By the analysis of pseudo-revertants of the tolC mutant, it was suggested that the disrupted lipid homeostasis in the tolC mutant cell envelope results in subsequent activation of several stress-response signal transduction pathways.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：根粒菌 外膜タンパク質 トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陽性細菌の細胞表層が細胞質膜とペプチドグリカン層からなる細胞壁を持つものに対して、グラム陰性細菌の表層は細胞質膜と細胞壁に加えてもうひとつの膜(外膜)を持つ。外膜は細胞質膜とは異なり非対称な脂質二重層膜であり、内側がリン脂質、外側がリポ多糖で構成されている。この特徴的な構成により、外膜は抗生物質や界面活性剤など異物に対する透過障壁として機能している。他方、外膜の存在は細胞内外の物質輸送の障壁ともなりうる。そのため物質のやりとりが効率的に行えるよう、外膜にはチャンネルタンパク質が存在している。

チャンネルタンパク質 TolC は、他のチャンネルタンパク質と異なりペリプラズム(細胞質膜と外膜の間の空間)に大きく突き出たドメインを持っている。このドメインで細胞質膜の輸送タンパク質およびペリプラズムのアダプタータンパク質と結合し、輸送複合体を形成する。大腸菌においてこの輸送複合体は、抗生物質の排出や菌体外毒素の分泌を行うことが知られている。抗生物質の排出と毒素の分泌は、病原性と関連が深いため、TolC は動物病原細菌に特異的なタンパク質であると思われる。ところが全ゲノム解析の進展により TolC はグラム陰性細菌に広く保存されていることが分かった。これにより現在では、抗生物質や毒素の輸送は TolC の機能の一部であり、TolC はグラム陰性細菌全般において何らかの重要な機能を担っていると考えられている。

申請者は、アルファルファ根粒菌(*Ensifer meliloti*)の根粒形成に関わる遺伝子の探索を行い、*tolC* 遺伝子が根粒形成に必須であることを見出した。宿主のアルファルファに *tolC* 変異株を接種すると、アルファルファは正常な根粒を形成できず窒素欠乏の症状を示した。培養条件下では、*tolC* 変異株は抗生物質や植物由来の抗菌性物質に感受性を示すだけでなく、高浸透圧感受性、活性酸素種感受性、運動性の低下、菌体外多糖産生能の低下など多面的な表現型の変化を示した。TolC と働く細胞質膜トランスポーターの遺伝子破壊により同様の表現型となるか調べたところ、細胞質膜トランスポーター変異株は抗菌物質感受性を示したが、その他の表現型は示さなかった。したがって、これまで知られている TolC の機能からは、共生不全と多面的な表現型の変化が起こる理由は説明できなかつた。他方、*tolC* 変異株は、細胞膜の健全性の低下の指標である界面活性剤感受性、カチオン性抗菌ペプチド感受性を示した。さらに *tolC* 変異株は、野生株よりも高濃度の二価カチオン( $\text{Ca}^{2+}$  または  $\text{Mg}^{2+}$ 、外膜の安定化作用が知られている)を生育に要求することが分かった。これらの結果から、アルファルファ根粒菌の TolC は抗生物質やタンパク質の輸送に加え、膜機能維持に必要な何らかの生理的機能を有すると考えられた。また、この未知の機能を明ら

かにできれば、共生不全となるメカニズムも分かると考えられた。

## 2. 研究の目的

グラム陰性細菌における TolC の生理的機能およびアルファルファ根粒菌 *tolC* 変異株が共生不全となるメカニズムの解明を目指し、具体的には、*tolC* 変異株の各表現型と関連する遺伝子(遺伝子群)の同定および野生株と *tolC* 変異株の細胞膜構成要素の違いを明らかにする。

## 3. 研究の方法

アルファルファ根粒菌野生株と *tolC* 変異株の遺伝子発現の違いを明らかにするため、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。解析に用いた RNA は、TY 培地(複合培地)で対数増殖まで培養した菌体より調製した(欧州の研究グループは、リン源を制限した最小培地を用いてアルファルファ根粒菌 *tolC* 変異株の解析を行っている。*tolC* 変異株の表現型変化はリン制限のようなストレス条件下に限らず、本菌の培養に一般に用いられている複合培地でも観察されるため、本研究では TY 培地を用いた)。機能未知の遺伝子およびそこにコードされているタンパク質の働きを探るうえで、疑似復帰変異株の取得と解析は有効な手段の一つである。本研究では、*tolC* 変異株にアルキル化薬剤処理またはトランスポゾン挿入で変異を誘発し、浸透圧感受性などが回復した復帰変異株を取得し、それらの変異部位と遺伝子発現を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子発現解析

アルファルファ根粒菌野生株と *tolC* 変異株の遺伝子発現プロファイルの違いをマイクロアレイにより調べた。シグナル強度の正規化を MEBI 法、二群間の比較を IBMT 法で行ったところ、771 遺伝子において発現量に違いが見られた( $p$  値 $<0.01$ )。正規化に RMA 法、群間比較に SAM 法を用いた場合には、324 遺伝子に発現量の違いが見られた。違いが見られた主な遺伝子について以下に述べる。

*tolC* 変異により発現が上昇した遺伝子

#### i) *ropB1*

*ropB1* 遺伝子は約 22 kDa の外膜タンパク質をコードしている。アルファルファ根粒菌の RopB1 タンパク質には膜安定性を維持する働きがあり、これが欠損すると界面活性剤感受性や低 pH ストレス感受性となることが知られている。*ropB1* の発現上昇は、*tolC* 変異による膜安定性低下に対する応答であると考えられた。*ropB1* の発現は、ExoRS/ChvI 二成分シグナル伝達系による正の調節を受けることが知られている。ExoRS/ChvI 制御下にある他の遺伝子(SMb21440 および *exo* クラスター)の発現も上昇していたことから、*tolC* 変異株では ExoRS/ChvI 系が活性化されていると考えられた。

ii) *ridA*

*ridA* 遺伝子は、様々な細胞障害を引き起すアミノアクリル酸を分解する酵素をコードしている。*tolC* 変異株では、細胞内のアミノアクリル酸濃度が高くなるような代謝異常が起きていると考えられた。実際に、ピリドキサルリン酸依存性酵素（アミノアクリル酸を生じる反応を触媒）をコードする複数の遺伝子において発現量の上昇が見られた。

iii) TolC 依存性トランスポーター遺伝子

TolC を外膜チャネルとするトランスポーター、*smeAB*、SMb20345-20346 および SMC03167-03168 の3つのオペロンの発現が上昇していた。これらのオペロンの発現は、トランスポーターの基質となる物質の存在により誘導されることが知られている。*tolC* 変異により輸送が機能せず、細胞内に基質物質が蓄積していると考えられた。

iv) *groESL1* および *groESL2*

ストレス応答に関わるシャペロニンをコードする。アルファルファ根粒菌は5つのシャペロニン（*groESL1-groESL5*）を有しており、このうち *groESL5* の発現はストレス応答シグマ因子である RpoH1 により誘導されることが知られているが、残りのシャペロニンの誘導についてはまだよく分かっていない。*tolC* 変異株では、RpoH1 とは別の因子が関与するストレス応答経路が活性化されていると考えられた。

v) *cpxAR*（二成分シグナル伝達系遺伝子）

CpxAR 二成分シグナル伝達系は、シグマ因子 RpoE と並び、グラム陰性細菌の膜ストレス応答における主要な調節因子である。大腸菌において Cpx 系は、膜ストレスから細胞を守るよう働いているが、この系が過剰に活性化すると反対に細胞膜が弱くなることが分かっている。この原因の一つはペリプラズムタンパク質 YnfD の過剰産生にある。また、大腸菌では Cpx が活性化すると運動性が低下することも知られている。アルファルファ根粒菌では Cpx 系のターゲット遺伝子はまだよく分かっていないが、大腸菌などと同様に膜ストレス応答に関わると予想されている。*tolC* 変異により膜ストレスが生じたため Cpx 系が活性化されていると考えられた。

vi) *lpsCDE* および *lpxDAB*

リポ多糖合成に関わる遺伝子群の発現が上昇していた。大腸菌では、細胞膜脂質の恒常性が崩れて外膜の外葉にパルミチン酸（通常の外膜外葉にはほとんど存在しない）が増えたりリポ多糖の合成が活性化されることが分かっている。リポ多糖合成が過剰になった細胞は定常期に死滅しやすく、この死滅は特に二価カチオンが少ない条件で顕著である。*tolC* 変異株は、野生株よりも高濃度の二価カチオンを生育に要求する。*tolC* 変異株においてもリポ多糖の過剰合成が起きている可能性が考えられた。

*tolC* 変異により発現が低下した遺伝子

i) 鞭毛遺伝子群

主染色体上の 711 kb から 752 kb の領域に存在する鞭毛遺伝子クラスター（*fli, flh, mot, flg, fla* など存在）のほとんどの遺伝子において発現が低下していた。*tolC* 変異株の運動性の低下は、鞭毛遺伝子の発現が低下したことによると考えられた。鞭毛遺伝子クラスターの発現は、浸透圧、塩、低 pH などのストレスにより低下することが分かっている。*tolC* 変異で生じるストレスに対する応答はこれらのストレスに対する応答と重複していると考えられた。鞭毛遺伝子クラスターの発現は、調節因子 Rem により活性化される。Rem 発現は VisNR により活性化され、さらにその VisNR の発現は ExoRS/ChvI 系により抑制されている。上記 *ropB1* の項で述べたように *tolC* 変異株では ExoRS/ChvI 系が活性化されていると考えられた。したがって、この活性化により VisNR および Rem の発現が抑制されたことが鞭毛遺伝子クラスターの発現低下の原因であると考えられた。

ii) 走化性遺伝子

鞭毛遺伝子クラスター内にあるケモレセプター遺伝子 *mcpE* および二成分シグナル伝達系遺伝子 *cheAWRBYD* の発現が低下していた。さらにそれぞれ単独で存在するケモレセプター遺伝子 *mcpU, mcpV, mcpW, mcpX* の発現も低下していた。これら4つの遺伝子は染色体上に散在しているが、鞭毛遺伝子クラスターと同じく ExoRS/ChvI 系、VisNR、Rem による発現調節を受けることが分かっている。このことから、*tolC* 変異株では ExoRS/ChvI 系の活性化が起きていると考えられた。

(2) *tolC* 変異と鉄欠乏ストレスとの関連の解析

近年、Cpx 系(前段 v の項)が膜ストレス応答だけでなく鉄欠乏ストレスでも活性化されることが分かってきた。さらにごく最近、大腸菌の *tolC* 変異株を鉄含量の低い培地で培養すると、鉄キレート分子(TolCにより分泌される)がペリプラズムに蓄積し、細胞形態および細胞膜が異常になると報告された。そこで、アルファルファ根粒菌 *tolC* 変異株の細胞膜異常と鉄欠乏ストレスとの関連を調べた。鉄の濃度を変えて野生株と *tolC* 変異株を培養し、菌体内に存在する鉄キレート分子の量を比較したが、両株の間に大きな違いは認められなかった。さらに、*tolC* 変異株を鉄過剰条件で培養しても細胞膜異常は回復しなかった。したがって、アルファルファ根粒菌 *tolC* 変異株の細胞膜異常は鉄欠乏ストレスによるものではないことが明らかになった。

(3) 疑似復帰変異株の取得と解析

*tolC* 変異株にトランスポゾン挿入またはアルキル化剤処理で変異を誘発した後、選択培地(変異誘発前の *tolC* 変異株が生育できない濃度の塩や界面活性剤を含む)で生育した株を復帰変異株として選んだ。

トランスポゾン挿入変異で得た復帰変異株

浸透圧耐性による選択では、弱く耐性が回復した株が多く得られた。これらの変異株は他の表現型の回復は示さなかった。これらの株のトランスポゾン挿入変異をあらためて *tolC* 変異株に導入したが、耐性の回復は再現されなかった。他方、カチオン性抗菌ペプチドであるポリミキシン B への耐性または二価カチオン制限培地での生育により選択した場合には、それぞれの表現型が個別に回復した株だけでなく両方が同時に回復した株も得られた。回復の程度は、野生株と *tolC* 変異株の中間以下ものがほとんどだった。トランスポゾン挿入変異の再導入で回復が再現されたものが 2 株あったので、トランスポゾン挿入部位を調べた。これら 2 株の挿入部位は異なっていた。どちらも遺伝子間領域に挿入されており、その下流には機能未知の外膜タンパク質の遺伝子があることが分かった。大腸菌のリポ多糖過剰合成変異株では、外膜タンパク質 Lpp の欠損により細胞死が緩和される。当該復帰変異株においても大腸菌と類似の現象が起きている可能性が考えられた。

変異誘発剤処理で得た復帰変異株

トランスポゾン挿入による変異誘発と同様に、得られた復帰変異株の多くはそれぞれの表現型が単独で弱く回復した株であった。しかし変異誘発剤処理では、浸透圧耐性、ポリミキシン B 耐性、二価カチオン制限培地での生育などが同時に中程度まで回復した株が複数得られた。そこでこれらの復帰変異株について、上述 (1) の発現解析で変動が見られた遺伝子とその周辺領域を中心に塩基配列を調べた。当該復帰変異株は、リポ多糖合成遺伝子 *lpsCDE* の上流にある *lsrB* 遺伝子に変異を持っていた。LsrB タンパク質は *lpsCDE* の発現を正に調節していることが分かっている。そこで *lpsCDE* の発現量を調べたところ、野生株と同程度であった。したがって、*tolC* 変異により上昇していた *lpsCDE* の発現が、活性化因子 LsrB の変異により野生株レベルに戻ったものと考えられた。当該復帰変異株の *cpxAR* 遺伝子およびその周辺領域に変異は見つからなかったが、*cpxAR* の発現が野生株に近いレベルになっていた。また当該復帰変異株では、運動性もわずかではあるが回復していた。鞭毛遺伝子群、走化性遺伝子および周辺領域には変異がなかったが、これらの遺伝子の発現量は上昇していた。以上の結果から、リポ多糖合成遺伝子の発現と *tolC* 変異株の多面的な表現型変化に関連があるという重要な知見を得ることができた。

#### (4) 総括

本研究を通じて、アルファルファ根粒菌 *tolC* 変異株が示す多面的な表現型変化について、関連する多くの遺伝子を明らかにすることができた。そのなかでも特に、リポ多糖合成とストレス応答遺伝子の発現変化が鍵となる可能性が高いという重要な知見を得ることができた。*tolC* 変異株では、リポ多糖合成の

恒常性の崩れから膜ストレスが生じ、Cpx 系などストレス応答経路が活性化していると予想される。*TolC* タンパク質の機能とリポ多糖合成との具体的な関係の解明が今後の課題である。鍵遺伝子の同定と仮説の提唱ができたことから、本研究の当初の目的はほぼ達成できたと考えている。本研究で得られた成果は、今後学術雑誌等に発表していく予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

江田 志磨 (EDA SHIMA)  
立命館大学・生命科学部・助教  
研究者番号：50420005

##### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：