

# 膜脂質組成変動によって擬される 細胞表層ストレスへの細菌の応答の解析

## Analysis of Bacterial Responses to Cell Surface Stresses Mimicked by Membrane Lipid Composition Changes

プロジェクト代表者: 原 弘志 (理学部分子生物学科・助教授)  
Hiroshi Hara (Assoc. Prof., Department of Biochemistry  
and Molecular Biology, Faculty of Science)

### 1 研究の背景

私たちは、大腸菌と枯草菌の脂質合成系の分子遺伝学的解析を行ない、脂質合成酵素の大多数の遺伝子について、変異株や破壊株、人為的発現抑制・誘導株を作成し、細胞膜脂質組成を任意に操作できる系を構築して、細菌細胞膜がもつ各種脂質の生理的機能についての考察を進めてきた。本研究プロジェクト開始時までに、大腸菌の主要酸性リン脂質を完全に欠損する変異(*pgsA::kan*変異)による致死性を、主要外膜リポタンパク質(リポタンパク質については後述)の欠損(*lpp*変異)が少なくとも低温では抑圧(サプレッション)することを見出して、そのサプレッションの原因を明らかにし、この欠損変異株で微量ではあるが蓄積するホスファチジン酸などの酸性の前駆体物質が果たす生理的機能について考察するとともに、*pgsA::kan lpp*二重変異株が示す高温感受性のサプレッサー変異を分離・同定して、これらがすべてRcsリン酸リレー制御系の構成成分の遺伝子に生じていたことから解析を進め、主要酸性リン脂質欠損によってRcsリン酸リレー系が活性化していることを明らかにしていた。一方、大腸菌の両性リン脂質合成酵素欠損株(*pssA*欠損変異株)で、やはりリン酸リレー制御系のひとつであるCpxリン酸リレー系が活性化していることが報告されていた。リン酸リレー制御系とは、細菌や植物の細胞が外部環境からのストレスに応答して遺伝子発現を制御する情報伝達機構で、細胞質膜にあるセンサーキナーゼが環境からシグナルを受け取ると自己リン酸化し、細胞質のレスポンスレギュレーターがそのリン酸基の転移を受けて転写制御因子として働く。大腸菌には約30種類のリン酸リレー系がある。

### 2 膜脂質組成変動に対するリン酸リレー系応答の特異性

大腸菌主要酸性/両性リン脂質合成欠損変異株(*pgsA/pssA*完全欠損変異株; 図1)で活性化しているRcs/Cpxリン酸リレー系は、それぞれ特定の細胞表層タンパク質過剰発現によって活性化され、生理的シグナルは不明のまま、細胞表層ストレスに応答するとされてきたが、近年、Rcs系は、宿主体外で低温・乾燥にさらされたときやバイオフィームを形成するとき活性化し、バイオフィームの厚くて入り組んだ構造の発達に必要であり、一方Cpx系は、物体表面との接触によって活性化し、バイオフィーム形成初期の物体表面への接着に必要であると考えられるようになってきている。バイオフィームとは、単細胞生物である細菌が、物体表面に接着し、その上に多数の細胞がさらに接着して、細胞外に産出する多糖類によって入り組んだ微細構造をつくりあげた多細胞集合体である。

主要酸性/両性リン脂質含量の変動によって膜の屈曲性向や充填圧などの物理的性質が変動することから、突然変異導入による膜脂質組成の変動は人為的ではあるものの、細胞表層と外界の相互作用を模倣している可能性がある。主要酸性/両性リン脂質の物理的性質の相違を考慮すると、細胞表層ストレスという点では一見共通していても、異なる環境変化に応答していると思われる。

そこで、まず*pgsA/pssA*欠損変異株のそれぞれでRcs/Cpx系が特異的に活性化しているかを、Rcs/Cpx系制御下にある遺伝子群の*lac*オペロン融合の発現レベルの定量的解析によって検討した。Rcs系の活性化は*pssA*欠損変異株ではまったく観察されず、*pgsA*欠損株に特異的であった。一方Cpx系制御下の遺伝子の転写活性への影響が、*pssA*欠損株だけでなく、*pgsA*欠損株でも観察された。この影響は、Cpx系のリン酸リレーにあずかるタンパク質の欠損変異の導入で失われ、確かにCpx系の活性化によるものである。次項に述べるように、*pgsA*欠損株では、主要酸性リン脂質欠損によるリポタン

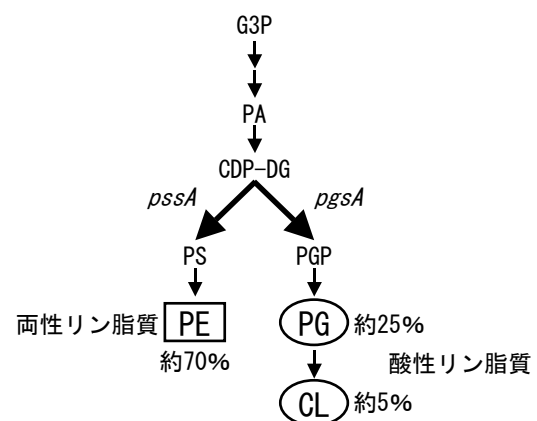


図1 大腸菌のリン脂質組成と合成経路

G3P: グリセロール-3-リン酸, PA: ホスファチジン酸, CDP-DG: CDP-ジアシルグリセロール, PS: ホスファチジルセリン, PE: ホスファチジルエタノールアミン, PGP: ホスファチジルグリセロリン酸, PG: ホスファチジルグリセロール, CL: カルジオリピン。主要両性/酸性リン脂質合成の分岐点の反応の矢印に、各酵素をコードする遺伝子名を添えて示す。

パク質成熟過程遅滞の影響を考慮しなくてはならない。物体表面接着時にCpx系が活性化するのに必要なNlpEも外膜リポタンパク質のひとつだが、NlpEの欠損によっては、*pgsA*欠損株のCpx系活性化は損なわれなかった。また、Rcs系を構成するタンパク質の欠損もCpx系活性化に影響せず、リン酸リレー制御系のストレス感知や情報伝達の研究でしばしば議論の対象になる系間クロストークも関与していなかった。以上の結果から、*pgsA*欠損株では*ppsA*欠損株より広範なストレス応答が起こっていると考えている。

ところで、*pgsA*欠損株・*ppsA*欠損株ではともに運動能が失われている。最近Rcs系が、鞭毛の形成と回転運動に働く一群の遺伝子の発現を制御するマスター遺伝子オペロン*flhDC*を、Cpx系が*flhDC*遺伝子産物の制御下において運動能にあずかる*motABcheAW*オペロンを負に制御していると報告されたことから、運動能欠損がこれらリン酸リレー系の活性化の結果である可能性を考えた。しかし、*pgsA*欠損株にRcs系・Cpx系両方の構成成分の遺伝子の欠損変異を、*ppsA*欠損株にCpx系構成成分の遺伝子の欠損変異を導入しても、運動能は失われたままで、運動能欠損には、さらに他の要因が関与していると結論した。

### 3 膜脂質組成の変動ストレスを感知する機構の検討

外膜リポタンパク質のひとつであるRcsFタンパク質の過剰発現がRcs系を活性化することが知られていた。私たちは*pgsA*欠損株でのRcs系活性化にRcsFが必須であることを示した。細菌のリポタンパク質(図2)とは、シグナルペプチドをもつ前駆体として合成され、内膜透過後、成熟体N末端に相当するシステイン残基のSH基が、主要酸性リン脂質のひとつであるホスファチジルグリセロールを供与体としてジアシルグリセリル基で修飾された後、シグナルペプチド切除とN末端アミノ基のアシル化を受けて成熟体となり、N末端の3つのアシル鎖によって外膜か内膜に結合しているタンパク質である。2段階の修飾反応後、N末端から2番目の残基を主な目印にして外膜に輸送されるものと内膜に留まるものに分別される。大腸菌は約90種類のリポタンパク質をもっている。外膜主要リポタンパク質は、細胞のもつ他のタンパク質に比べて圧倒的に大量に(1細胞あたり数十万分子)存在し、C末端のリジン残基のε-アミノ基が細胞壁ペプチドグリカンの側鎖ペプチドと結合して外膜構造を安定化しているが、増殖に必須ではない。

*pgsA*欠損株では、少量蓄積するホスファチジン酸などもジアシルグリセリル供与体となるが、修飾効率は悪いので、リポタンパク質の成熟過程が滞って前駆体のまま内膜にとどまってしまう可能性がある。実際、*pgsA*欠損株で主要外膜リポタンパク質を大量に発現すると、内膜にとどまった前駆体が、外膜に輸送されたときと同様にC末端とペプチドグリカンの結合反応を受け、本来外膜を細胞壁につなぐべきものが内膜と細胞壁をつないでしまい、これが致死性の原因になっていた。

*rscF*遺伝子に改変を加えてRcsFの内膜/外膜分別シグナルを内膜型にすると、この変異型RcsFは過剰発現しなくても、外界からのストレスがない状態でRcs系(図3)を活性化した。この活性化はRcs系のリン酸リレーにあずかるタンパク質の欠損変異の導入で失われた。したがって、*pgsA*欠損株でもRcsF前駆体の内膜滞留がRcs系活性化を引き起こしている可能性がある。しかし、この変異型RcsFによるRcs系活性化のレベルは*pgsA*欠損株に比べてかなり低く、また、*pgsA*欠損株にこの*rscF*変異を導入すると、付加的なRcs系活性化が見られたので、RcsF前駆体の内膜滞留だけでは主要酸性リン脂質によるRcs系活性化をすべて説明することはできない。*pgsA*欠損株で主要外膜リポタンパク質を大量に発現させた場合でも一部は成熟して外膜に検出されるので、1細胞あたりの分子数が少ないRcsFの外膜移行がどれだけ主要酸性リン脂質欠損の影響を受けるかは検討しなくてはならない。そのようなRcsFの細胞内動態を追跡するために、RcsF成熟体タンパク質部分を精製し、それに対して

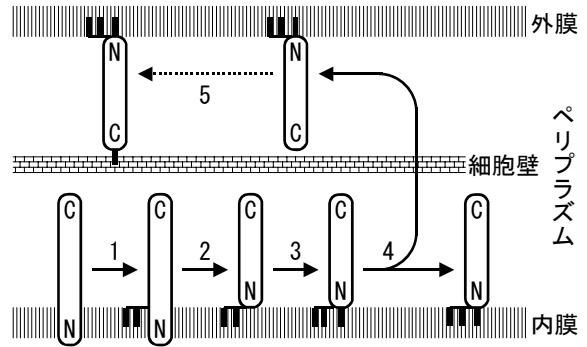


図2 細菌のリポタンパク質の成熟過程

1: ジアシルグリセリル修飾, 2: シグナルペプチド切除, 3: N-アシル修飾, 4: 外膜・内膜への分別, 5: 主要外膜リポタンパク質Lppと細胞壁ペプチドグリカンの結合. N・Cはタンパク質N末端・C末端を示す。

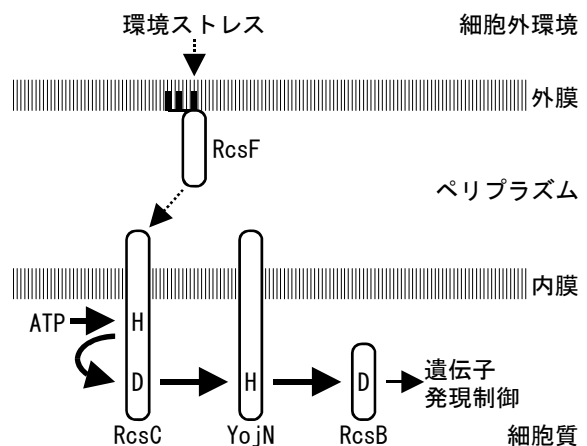


図3 Rcsリン酸リレー制御系

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。RcsBタンパク質はホモ二量体で、またはRcsAタンパク質とのヘテロ二量体となって、転写制御因子として働く。

高い特異性を示す抗血清を作成した。

RcsFタンパク質のC末端残基も主要外膜リポタンパク質と同様リジンである。RcsFがペプチドグリカンと結合するとは考えられていないが、この残基を他のアミノ酸残基に置換してみた。やはり*pgsA*欠損株におけるRcs系活性化には影響がなかった。一方、RcsFのC末端数残基を欠失ただけで、*pgsA*欠損株でRcs系が活性化しなくなったことから、C末端領域の重要性が示された。C末端欠失RcsFが細胞内で分解されずに存在していることは抗RcsF血清を用いた免疫ブロッティングで確認してある。主要酸性リン脂質の欠損や外部環境からのストレスによって外膜のRcsFタンパク質の高次構造に変化が生じて、そのC末端領域が、内膜のRcsC/YojNセンサーキナーゼ複合体と相互作用する可能性を考えて、こんごの研究を進める。

RcsFに関する解析と並行して、多コピープラスミドにクローン化して過剰発現させると*pgsA*欠損株の高温感受性をサプレッスする遺伝子の探索を行なった。そのようなマルチコピーサプレッサーがいくつか得られたが、そのうち、*yrfF*・*ybaP*の2つの遺伝子は、過剰発現するとRcs系の活性化を抑制することがわかった。*yrfF*遺伝子は内膜タンパク質をコードしており、サルモネラ菌のもつ相同遺伝子*igaA*の産物もRcsリン酸リレーを負に調節すると報告されていることから、大腸菌でも同様の働きをすると考えられる。*ybaP*遺伝子は細胞質タンパク質をコードしており、Rcs系をもつ腸内細菌に保存されている。Rcs系抑制効果は必ずしも大きくはないが、新規のRcs系調節因子であると考え、分析を進めている。

#### 4 プログラム細胞死との関連

Ecn addiction moduleの毒性因子EcnB・解毒因子EcnAがともに外膜リポタンパク質であることから、主要酸性リン脂質欠損の影響に注目した。Addiction moduleとは、毒性因子とそれに対する解毒因子が一对になっているもので、染色体上にコードされているものは細菌細胞集団が生き延びるためのプログラム細胞死に関与すると考えられている。毒性因子EcnBを単独で野生株で発現させても定常増殖期に入らないと致死効果は現れないが、*pgsA*欠損株では対数増殖期でも毒性を発揮して溶菌する。リポタンパク質は成熟型が生理的機能をもつものとは一般には信じられているが、EcnBの場合は、前駆体がプログラム細胞死のための機能を持ち、リポタンパク質としての成熟過程がその機能を負に調節している可能性を示唆する結果である。そのような可能性を提案した日本遺伝学会第76回大会での発表は、Best Papers賞を受賞した。

#### 5 高温感受性に関与する遺伝子の探索

*pgsA*欠損株のDNAマイクロアレイ解析で、高温で著しい転写上昇の見られた*osmB*遺伝子について、Rcsリン酸リレー系の制御下にあることを確認し、Rcs系の遺伝子欠損によって高温感受性がサプレッスされた*pgsA*欠損株で*osmB*遺伝子を発現させると再び高温で溶菌するようになるが、*osmB*遺伝子を破壊しても*pgsA*欠損株の高温感受性はサプレッスされないことから、この遺伝子の発現が*pgsA*欠損株でのRcs系活性化による高温感受性に関与しているものの、それが唯一の原因ではないと解釈している。野生株では*osmB*遺伝子の過剰発現は何ら効果を現さないが、*osmB*遺伝子産物も外膜リポタンパク質であり、*pgsA*欠損株での成熟過程や外膜移行の遅滞が影響していると考えられる。なお、OsmBタンパク質のC末端残基もリジンだが、これを欠失させても、主要外膜リポタンパク質のC末端リジン欠失変異と異なり、*pgsA*欠損株における効果は変わらなかった。マイクロアレイ解析で高温での転写上昇が検出された他のいくつかの遺伝子についても同様に遺伝子破壊と過剰発現による解析を進めている。

マイクロアレイ解析では、上述のとおりCpxリン酸リレー系制御下の遺伝子の発現が*pgsA*欠損株で影響を受けていることも確認できたが、Rcs系と異なり、Cpx系の構成成分の欠損によっては高温感受性はサプレッスされなかった。マイクロアレイ解析では、このほかに、熱ショック応答シグマ因子 $\sigma^H$ や細胞外ストレス応答シグマ因子 $\sigma^E$ の制御下にある遺伝子の発現にも影響が見られ、これらシグマ因子の活性が低下していることが示唆された。 $\sigma^E$ はCpx系によって負に制御されているという報告があるが、Cpx系の遺伝子の欠損変異を導入しても、 $\sigma^E$ の制御下の遺伝子の発現レベルは低下したままだったので、Cpx系の活性化のために $\sigma^E$ タンパク質量が減少しているとしても、それだけで*pgsA*欠損変異の影響を説明することはできない。このようなさまざまな遺伝子の発現に対する*pgsA*欠損変異の影響を、リアルタイムPCRによって確認する作業を進めている。

上述の*pgsA*欠損株の高温感受性のマルチコピーサプレッサーの探索で、*rplS*遺伝子が見出された。*rplS*遺伝子はリボソームタンパク質のひとつをコードしていて、増殖に必須の遺伝子である。マイクロアレイ解析でも*rplS*遺伝子の転写レベルの低下が検出されており、この遺伝子の発現抑制が*pgsA*欠損株の高温感受性の一因になっている可能性がある。また、マルチコピーサプレッサーのひとつとして、*rprA*遺伝子も同定された。*rprA*はRcs系活性化によって転写が促進されることが報告されている。細胞表面ストレスに対応するべく*rprA*が発現しても、主要酸性リン脂質欠損株では不十分で、多コピープラスミドからさらに過剰に発現することによってようやく高温感受性がサプレッスされるのかもしれない。*rprA*遺伝子は小さなRNA分子をコードしていて、このRNAは増殖静止期に入ると働くシグマ因子で、細胞質ストレスにも応答するとされている $\sigma^S$ の翻訳を正に制御することが知られているが、 $\sigma^S$ の欠損変異を導入しても*rprA*によるマルチコピーサプレッションは観察されるの

で、 $\sigma^S$ の働きがサプレッションに関与しているわけではない。

以上のように、*pgsA*欠損変異による遺伝子発現制御は、Rcs系活性化によるものもそうでないものも含め多岐にわたっており、そのなかには増殖やストレス応答に重要な機能を果たしているとみられる遺伝子も多い。*osmB*遺伝子の発現が高温感受性の一因とは考えられるものの、それだけでは高温感受性が説明できなかったことから、*pgsA*欠損株の高温感受性は複数の因子によるものと考えて解析を進める必要がある。

## 6 枯草菌の膜脂質組成変動

本研究プロジェクトは、大腸菌の各脂質合成酵素変異による増殖欠損の原因の追究からRcsリン酸リレー系の活性化に着目したことに端を発している。一方、枯草菌は大腸菌よりも多様な脂質をもっていて、ひとつの脂質分子種を欠損しても他の脂質が機能の一部を代替できるためか、明確な増殖欠損を示す脂質合成酵素変異は今のところ*pgsA*欠損変異だけである。*pgsA*欠損は致命的で、そのサプレッサー変異は多数の試行にもかかわらず得られていない。そこで、多コピープラスミドにクローン化すると*pgsA*発現抑制株の致死性をサプレスする遺伝子の単離を試み、*yufM*・*yceC*・*ywnF*・*yqgB*の4つの遺伝子が、弱いながらマルチコピーサプレッサーとして働くことを見出した。*yufM*はYufL-YufMリン酸リレー制御系のレスポンスレギュレーターをコードしており、このリン酸リレー系はリンゴ酸を細胞内への取込みに働くトランスポーターの遺伝子を正に制御していることが知られている。栄養培地での増殖欠損にリンゴ酸の取込みが関係するとは考えにくいので、このリン酸リレー系制御下の未知の遺伝子の関与を考える必要がある。また、*pgsA*欠損がこのリン酸リレー系の活性に影響を及ぼしているかどうか今後検討する。*yceC*は亜テルル酸耐性に働くとしており、何らかの細胞表層ストレスに対応する効果があるのかもしれない。*ywnF*は脂肪酸合成に関与する可能性も指摘されているが、機能ははっきりしていない。*yqgB*も機能未知の膜タンパク質をコードしている。これらマルチコピーサプレッサーの存在下では、*pgsA*発現抑制株は、主要酸性リン脂質とそれに由来するリジルホスファチジルグリセロールの合成が回復しないまま増殖するが、増殖速度は低い。今後、これらマルチコピーサプレッサーによるサプレッションの機構や、*pgsA*完全欠損変異もサプレスできるかどうかを検討し、さらにマルチコピーサプレッサー存在下で増殖している細胞の膜脂質組成の変動に対する応答を追究する。

## 7 論文発表など

原著

- Yasuhiro Shiba, Yasuko Yokoyama, Yoshiko Aono, Takashi Kiuchi, Jin Kusaka, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. 2004. Activation of the Rcs signal transduction system is responsible for the thermosensitive growth defect of an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol and cardiolipin. *Journal of Bacteriology* 186(19): 6526–6535.
- Ayako Nishibori, Jin Kusaka, Hiroshi Hara, Masato Umeda, and Kouji Matsumoto. 2005. Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *Journal of Bacteriology* 187(6): 2163–2174.
- Shingo Fujisaki, Isao Takahashi, Hiroshi Hara, Kensuke Horiuchi, Tokuzo Nishino and Yukinobu Nishimura. 2005. Disruption of the structural gene for farnesyl diphosphate synthase in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry* 137(3): 395–400.

総説

- 原 弘志, 松本 幸次. 2005. 細菌の膜脂質欠損とバイオフィーム形成シグナル応答. *バイオサイエンスとインダストリー* 63(5): 320–323.

抄録

- 日下 仁, 西堀 綾子, 原 弘志, 梅田 眞郷, 松本 幸次. 2004. ホスファチジルエタノールアミンの細菌細胞内局在性の解析. *脂質生化学研究* 46: 132–135.