

細菌外膜リポタンパク質と内膜タンパク質の相互作用による環境シグナル伝達機構

Transduction of signals from extracellular environment through interaction of outer membrane lipoproteins with inner membrane proteins in bacteria

プロジェクト代表者：原 弘志 (理工学研究科・准教授)
Hiroshi Hara (Assoc. Prof., Grad. Sch. of Sci. & Eng.)

1 研究の背景

大腸菌の主要酸性リン脂質合成酵素完全欠損株 (*pgsA* 遺伝子挿入破壊変異株) は、主要外膜リポタンパク質 Lpp を同時に欠損していると生育可能だが、高温感受性である。私たちは、*pgsA* 変異株では Rcs リン酸リレーシグナル伝達系が活性化しているために高温感受性となっていること(ただし、*pgsA* 野生型株で Rcs 系が活性化しても高温感受性にならず、主要酸性リン脂質欠損状態でこのシグナル伝達系が異常に活性化していることが高温感受性の原因である)、この活性化にマイナーな外膜リポタンパク質のひとつである RcsF が必須であることを見出した (Shiba *et al.*, 2004, J. Bacteriol. 186: 6526–6535)。Rcs 系は、宿主の腸から体外に排出された場合やバイオフィーム形成時に、外部環境の変動によって細胞表面に加わるストレスにตอบสนองして活性化するとされている。*pgsA* 欠損変異以外の細胞表面構造に関わる突然変異や他の環境刺激による Rcs 系活性化にも RcsF が必須であったことから、RcsF は Rcs シグナル伝達系を構成する必須の成分と見なすに到った。

外膜は外部環境と接している生体膜なので、外膜タンパク質が環境刺激を最初に感知することは理にかなっていると言えるが、比較的分子量の外膜リポタンパク質である RcsF が、内膜にあるセンサーキナーゼにどうやってシグナルを伝達するのか、RcsF は環境刺激をどうやって感知するのか、RcsF を刺激する環境刺激の分子レベルでの正体は何か、などを明らかにしてゆくことを目的として、RcsF の構造と機能の解析を行なった。

2 ペリプラズム遊離型 RcsF による Rcs 系の活性化

pgsA 変異株では、リポタンパク質の成熟過程における修飾反応の主たる基質となるホスファチジルグリセロールをもたないために、Lpp を発現させると前駆体が内膜に停滞する(そのために Lpp 発現によって致死となる; Suzuki *et al.*, 2006, J. Bacteriol. 184: 5148–5425) のと同様に、RcsF も成熟が遅れて前駆体が内膜に停滞する。RcsF のリポタンパク質外膜・内膜ソーティング配列を改変して内膜局在型としたものは、細胞表面ストレスのない条件でも Rcs 系を活性化した。リポタンパク質としての修飾を受けていない RcsF 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) の C 末端に融合させて、ペリプラズム遊離型としたものは、発現レベルを非常に低く抑えても、内膜局在型 RcsF より強い Rcs 系活性を示した。このペリプラズム遊離型 RcsF の C 末端 4 残基を欠失させると、野生型 RcsF リポタンパク質の C 末端 4 残基欠失と同様、Rcs 系活性化能が著しく損なわれ、外膜に局在化する本来の RcsF と同じ機構で Rcs 系を活性化していると思われる。

Rcs 系について多くの研究が進められてきているが、この系の構成タンパク質として内膜より外側で働いているものは RcsF しか知られていない。内膜のペリプラズム側表面に容易に接触できる内膜局在型・ペリプラズム遊離型の RcsF が強い Rcs 系活性化能をもつことは、外膜リポタンパク質である本来の RcsF の場合も、内膜の Rcs 系構成タンパク質であるセンサーキナーゼ RcsC・トランスミッター YojN や両者の複合体のペリプラズム露出領域と直接相互作用することによって、環境刺激を感知したというシグナルを伝達して、Rcs リン酸リレー系を活性化することを示唆している。この直接相互作用には、その欠失によって Rcs 活性化能が損なわれることになる C 末端領域が関与していると考えられる。

3 ペリプラズム遊離型 RcsF による細胞表面ストレス応答

環境刺激に対する応答における RcsF の機能を考えるとき、シグナルを細胞質膜の Rcs 系構成タンパク質に伝達する機能だけでなく、刺激を感知する機能を考える必要がある。ペリプラズム遊離型 MBP 融合 RcsF は細胞表面ストレスがない条件でも強く Rcs 系を活性化するが、*pgsA*・*mdoH*・*tolB* など細胞表面構造に欠損を生じる突然変異によって、より強く活性化した。このことは、MBP 融合 RcsF が刺激感知能を保持しており、N 末端に脂質修飾を受けたリポタンパク質であることは感知機構に必ずしも必要ではないことを示している。また、*pgsA* 変異によっても活性化したことは、この変異株における Rcs 系活性化が、RcsF リポタンパク質の成熟が遅れて前駆体が内膜に停滞することが一因であるにしても、そのためだけではなく、主要酸性リン脂質欠損がやはり細胞表面ストレスとして Rcs 系によって感知・応答されることも示している。

4 RcsF の高プロリン含量領域

RcsF の刺激感知機構に関連して、RcsF 成熟体の N 末端近傍に、プロリンと塩基性アミノ酸に富む特徴ある配列が存在することに注目した。一般にプロリンに富む配列は、タンパク質分子内のドメイン構造の接合部にあって、屈曲性や伸縮性を与えている例が知られている。RcsF のアミノ酸配列は、全長にわたって、腸内細菌の間で非常によく保存されているが、成熟体 N 末端近傍に大腸菌 RcsF とは一次配列の保存性が低い部分をもつ細菌種もある。しかし、一次配列が保存していなくても、多くの場合、プロリンと塩基性アミノ酸に富むという特徴は保存されている。このことは、この特徴ある配列領域が機能上重要である可能性を示唆している。

ペリプラズム遊離型 MBP 融合 RcsF から、RcsF 成熟体 N 末端近傍にある高プロリン含量領域 (proline-rich region, PRR) を欠失させた構造のタンパク質 MBP-RcsFΔPRR は、細胞表面ストレスのない条件で、MBP-RcsF よりもさらに強く Rcs 系を活性化した。しかし、MBP-RcsF と異なり、MBP-RcsFΔPRR は、*pgsA*・*mdoH*・*tolB* などの突然

変異によってさらに強く活性化することはなかった。つまり、PRRの欠失により、RcsFは細胞表層ストレスの有無にかかわらず最大限のRcs系活性化能を示した。PRRは、細胞表層ストレスがない時にはRcsFの機能を抑制しており、細胞表層ストレスを感知すると、その抑制がはずれることによって、Rcs系を活性化するものと考えられる。

5 RcsFが本来は外膜タンパク質であることの意義

リポタンパク質外膜/内膜ソーティング配列を改変して内膜局在型としたRcsFや、MBPと融合させてペリプラズム遊離型としたRcsFは、*pgsA·mdoH·tolB*などの突然変異には応答してRcs系活性化したが、この3種の突然変異と同様にRcs系を活性化を引き起こすことが知られている*rfaP*変異には応答できず、Rcs系の活性化は見られなかった。*rfaP*変異は、外膜リポ多糖の糖鎖への修飾に欠損を生じる。このような外膜より外側に加わるストレスに対して、ペリプラズムや内膜に局在化するRcsFは対応できないと考えられる。Rcs系活性化機構の研究のために、系の活性化を引き起こす刺激として、*pgsA·mdoH·tolB*など細胞表層構造に欠損を生じる突然変異を用いているが、これは実験室条件であって、自然環境中の大腸菌は、細胞の外側の環境からのストレスに応答して、Rcs系を活性化しているはずである。外部環境刺激を感知するためには、RcsFタンパク質が外膜に局在化していることが必要であると考えられる。

6 論文発表など

原著論文

- Yasuhiro Shiba, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. 2006. DjlA negatively regulates the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*. *Genes Genet. Syst.* 81: 51–56.
- Fumitaka Kawai, Hiroshi Hara, Hiromu Takamatsu, Kazuhito Watabe, and Kouji Matsumoto. 2006. Cardiolipin enrichment in spore membranes and its involvement in germination of *Bacillus subtilis* Marburg. *Genes Genet. Syst.* 81: 69–76.
- Hideki Nagahama, Yutaka Sakamoto, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. 2006. RcsA-dependent and -independent growth defects caused by the activated Rcs phosphorelay system in the *Escherichia coli pgsA* null mutant. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 52: 91–98.
- Hideki Nagahama, Taku Oshima, Hirotada Mori, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. 2007. Hyperexpression of the *osmB* gene in an acidic phospholipid-deficient *Escherichia coli* mutant. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53: 143–151.

総説

- Kouji Matsumoto, Jin Kusaka, Ayako Nishibori, and Hiroshi Hara. 2006. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* 61: 1110–1117.

学会発表

- 日本遺伝学会第78回大会. つくば国際会議場, つくば, 2006年9月25–27日
宮川 宏義, 松本 幸次, 原 弘志. 大腸菌 Rcs リン酸リレーシグナル伝達系を制御する外膜リポタンパク質 RcsF の機能解析.
工藤 ゆかり, 周藤 悟志, 日下 仁, 原 弘志, 松本 幸次. リン脂質合成酵素を分裂隔壁に局在させる機能領域の解析.
渡邊 倫史, 岩下 静香, 松本 幸次, 原 弘志. 大腸菌の toxin リポタンパク質 EcnB の成熟段階と毒性発現.
- 第3回21世紀大腸菌研究会–2006–「モデル生物大腸菌の統合的理解をめざして」ウェルサンピア滋賀(滋賀厚生年金休暇センター), 近江八幡, 2006年10月3–4日
宮川 宏義, 松本 幸次, 原 弘志. 大腸菌 Rcs リン酸リレーシグナル伝達系を制御する外膜リポタンパク質 RcsF の機能解析.
内山 純爾, 原 弘志, 松本 幸次. 大腸菌酸性リン脂質欠損による鞭毛マスターオペロン *flhDC* 転写抑制における σ^S の働き.
- 日本分子生物学会2006フォーラム. 名古屋国際会議場, 名古屋, 2006年12月6–8日
内山 純爾, 原 弘志, 松崎 博, 松本 幸次. 大腸菌酸性リン脂質欠損による鞭毛マスターオペロン *flhDC* 転写抑制における σ^S の働き.
松浦 孝枝, 寺山 泰司, 宇佐美 論, 堀越 弘毅, 原 弘志, 松本 幸次. 枯草菌 *ykoN* 遺伝子産物の酵素機能.
周藤 悟志, 工藤 ゆかり, 日下 仁, 原 弘志, 松本 幸次. 枯草菌細胞におけるリン脂質合成酵素の隔壁局在機構の解析.
- 日本農芸化学会大会2007. 東京農業大学, 東京, 2007年3月25–27日
福島 早苗, 池田 由香里, 長谷川 真紀, 岡田 真乙, 周藤 悟志, 原 弘志, 松本 幸次, 吉川 博文. リン脂質合成系と細胞分裂関連タンパク質のインタラクトーム解析.
国立遺伝学研究所研究会—細胞周期制御をめぐる単細胞システム分子生物学—. 国立遺伝学研究所セミナーハウス, 三島, 2007年3月30–31日
原 弘志, 松本 幸次. 大腸菌の主要酸性リン脂質合成欠損変異株の高温感受性と細胞表層ストレス応答シグナル伝達系の活性化.