

細菌が外膜リポタンパク質によって環境シグナルを感知し ゲノム情報発現システムに伝達する機構の解析

プロジェクト代表者：原 弘志（理工学研究科・准教授）

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、しかも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ている(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などに、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して活性化し、ストレスに対処する遺伝子群を発現させるためのゲノム情報発現システムを制御している。*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 が必須であることから、RcsF は Rcs シグナル伝達系を構成する必須の成分と見なすことができる。

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、比較的低分子量の外膜リポタンパク質である RcsF が、細胞質膜(内膜)にあるリン酸リレー系の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。

内膜局在型・ペリプラズム遊離型の 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.*, 2002, *J. Bacteriol.* 184: 5148–5425)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内膜局在型に改変したものは、細胞表面ストレスのない条件でも Rcs 系を活性化する。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 系活性を示す。

外膜/内膜ソーティング配列を内膜局在型に改変した変異 RcsF タンパク質が、予想どおり内膜に局在しているかどうかを、細胞表面成分をショ糖密度勾配遠心で外膜/内膜に分画して検討し、確かに内膜に局在していることを確認した。

また、この融合タンパク質が、予想どおりペリプラズム遊離型となっているかどうかを検討した。MBP-RcsF 融合タンパク質を発現させた細胞に浸透圧ショック処理を施したところ、内部対照として発現させた野生型 MBP と同じくペリプラズム漏出画分に回収された。このことは、ペリプラズムに遊離している融合タンパク質分子があることを示している。

しかしながら、野生型 MBP がほぼ 100%ペリプラズム画分に回収されたのに対し、MBP-RcsF 融合タンパク質は一部が細胞本体の画分に残った。RcsF のアミノ酸配列には一部疎水性アミノ酸含量の高い部分があるので、非特異的に内膜に結合した可能性も考えられた。ところが、残る割合は、融合タンパク質発現量を増やすと減少した。これは、内膜外面に RcsF と結合する因子があつて、その数に限りがあることを示唆していると考えた。内膜に存在するセンサーキナーゼである RcsC を欠損した株で融合タンパク質を発現させると、細胞本体画分に残る割合が減少した。このことは、RcsF が内膜にある RcsC のペリプラズム突出露出領域と直接的または間接的に相互作用していることを示すと考えている。

Rcs 系では、センサーキナーゼ RcsC から細胞質のレスポンスレギュレーター RcsB へのリン酸リレーの過程にトランスミッター YojN が介在している。YojN は内膜タンパク質で、ペリプラズム突出領域を含め RcsC と相同性が高い。RcsC 欠損株でも MBP-RcsF 融合タンパク質が細胞本体画分に残ったが、それは YojN のペリプラズム露出領域とも相互作用するためかもしれない。現在、YojN 欠損株・RcsC YojN 二重欠損株での融合タンパク質の挙動を調べている。

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野生型 RcsF の場合も、内膜の RcsC・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していると考えられる。

外膜局在 RcsF 分子のサイズと Rcs 系活性化 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。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つて、屈曲性や伸縮性を与えている例が知られている。ペリプラズム遊離型 MBP 融合 RcsF からこの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-RcsF Δ PRR は、細胞表層ストレスのない条件で、MBP-RcsF よりもさらに強く Rcs 系を活性化する。MBP-RcsF と異なり、MBP-RcsF Δ PRR 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いことから、細胞表層ストレスがない時には RcsF の機能を PRR が抑制している、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 系を活性化するというモデルが考えられる。

ところが、外膜局在リポタンパク質の状態の RcsF から PRR を欠失させると、野生型 RcsF より強く Rcs 系を活性化するどころか、まったく活性化せず、*mdoH*・*tolB* などの突然変異にも応答しなくなるという上記の PRR の抑制機能モデルと合致しないかのような結果が見られた。これは外膜局在 RcsF の PRR 欠失によって分子サイズが小さくなったためと考え、C 末端 64 残基を欠失した RcsF に RcsF の成熟体部分を融合して、サイズの大きいタンデム繰返し分子を作成して発現させてみたところ、ストレスのない条件でも高い Rcs 活性化を示した。この RcsF Δ 64-RcsF を用いて、外膜に局在している RcsF における PRR 欠失の効果を検討している。

タンデム繰返し型 RcsF として、当初 C 末端を 4 残基だけ欠失した RcsF に (4 残基の根拠は次項参照) RcsF 成熟体部分を融合したもの (RcsF Δ 4-RcsF) を作成した。この分子は不安定で、単独 RcsF 分子に近いサイズの分解産物が生じた。このような分解産物はペリプラズムに遊離している可能性が高いので、外膜局在 RcsF での PRR 欠失の効果を調べる材料としては使えない。RcsF は高度に分子内ジスルフィド結合をつくっていることが知られており、リポタンパク質としての脂質修飾を受ける成熟体 N 末端のシステイン以外のシステイン残基は C 末端 64 残基に含まれている RcsF Δ 4-RcsF が不安定なのは、野生型と異なるジスルフィド結合をつくってしまったためにペリプラズムのプロテアーゼによる分解を受けやすくなっているのかもしれない。RcsF タンパク質のジスルフィド結合形成と機能などとの相関も今後検討していく。

RcsF のシグナル伝達機能における C 末端領域の働き 野生型 RcsF リポタンパク質もペリプラズム遊離型 MBP-RcsF も、C 末端 4 残基を欠失させると Rcs 系活性化が著しく損なわれる。これは、RcsF の C 末端部分が内膜の RcsC・YojN や両者の複合体との相互作用に働いていることを示している。5 残基以上の欠失は RcsF タンパク質の不安定化を招き、シグナル伝達機能への効果を調べることはできない。次に N 末端側からさまざまな長さの欠失を導入することによって、RcsF 分子中のシグナル伝達機能領域を限定することができると考えられるが、上述のようなサイズの問題もあるので、実験材料には MBP-RcsF 融合タンパク質を使うべきである。まず、RcsF の N 末端から活性化機能制御領域と考えられる PRR までを欠失させた融合タンパク質を作成した。この分子が安定であつて分解産物がほとんど検出されないこと、予想どおり Rcs 系を最大限活性化させることを確認した。さらに長い欠失をもつ融合タンパク質を作成して、検討を進めている。

RcsC のペリプラズム露出領域の機能 細胞表層ストレスに応答して RcsF の PRR が構造変化を生じ、C 末端部分が内膜にあるセンサーキナーゼ RcsC やトランスミッター YojN と相互作用してシグナルを伝達すると考えている。RcsC や YojN の側でシグナルを受容するのは当然ペリプラズム露出領域と考えられるので、手始めに 12 残基の無関係なアミノ酸配列を RcsC のペリプラズム領域のほぼ中央部に挿入する変異を導入した。しかし、Rcs 系は細胞表層ストレスに応答してちゃんと活性化した。RcsC のペリプラズム領域が modular な構造をもっているか、あるいは YojN のペリプラズム領域が正常ならば、RcsF からのシグナル伝達を受けられるのかもしれない。上述のとおり RcsC と YojN は相同性の高い内膜タンパク質で、一般にセンサーキナーゼは二量体をつくとされていることから、RcsC と YojN が二量体あるいはそれぞれのホモ二量体の複合体をつくっていると考えている。その場合、RcsC・YojN の一方のペリプラズム領域の構造が乱されても、ストレスに応答できる可能性はある。現在、RcsC のペリプラズム領域に欠失を導入することによって、この領域のシグナル伝達における機能、さらにこの領域内のどの部分が重要かを検討している。同様の実験を YojN についても行う予定である。

論文発表

- Nagahama, H., Oshima, T., Mori, H., Matsumoto, K., and Hara, H. (2007) Hyperexpression of the *osmB* gene in an acidic phospholipid-deficient *Escherichia coli* mutant. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **53**(2): 143–151.
- Matsuura, T., Usami, R., Yoshida, H., Hara, H., and Matsumoto, K. (2008) Characterization of a novel esterase YkoN from *Bacillus subtilis* Marburg. *J. Jpn. Soc. Extremophiles* **6**(1): 32–37.
- Matsuura, T., Terayama, T., Usami, R., Yoshida, H., Hara, H., and Matsumoto, K. (2008) Involvement of YkoN in production of a new phospholipid in *Bacillus subtilis* Marburg. *J. Jpn. Soc. Extremophiles* **6**(1): 38–44.