

プロジェクト名：細菌の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

細胞外環境シグナル伝達機構の解析

プロジェクト代表者：原 弘志 (理工学研究科・准教授)

1 研究の目的

Rcs リン酸リレーシグナル伝達系は、腸内細菌が宿主体外に排出されて低温・乾燥にさらされた時や固体表面でバイオフィルムを形成する時、細胞外から細胞表層に加わる環境ストレスに応答して活性化し、莢膜多糖合成系など多くの遺伝子の発現を制御する。その活性化に、外膜に局在するリポタンパク質である RcsF が必須である。

本研究は、外膜リポタンパク質 RcsF が、環境情報を感知し、そのシグナルを内膜タンパク質であるリン酸リレー系キナーゼ RcsC・トランスミッター YojN に伝達する機構を解析することを目的としている。

2 研究の進め方と成果

(1) マルトース結合タンパク質 (MBP) に融合してペリプラズム遊離型とした大腸菌 RcsF タンパク質の N・C 両末端からの欠失実験で、後述の N 末端付近 proline-rich region を除く C 末端部分のかなり大きなドメインが内膜タンパク質へのシグナル伝達に働くことが明らかとなった。

(2) この欠失実験で C 末端ドメインの少なくとも 1 つのシステイン残基がシグナル伝達に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。C 末端ドメインには各種細菌の RcsF 間で保存されている 4 つのシステイン残基があり、これらの間のジスルフィド結合が重要かもしれない。

(3) MBP-RcsF 融合タンパク質を発現している大腸菌細胞をスフェロプラスト化して分画すると、MBP-RcsF はペリプラズムに遊離しているだけでなく、内膜に付着してスフェロプラストとともに回収されるものもある。このことが内膜タンパク質 RcsC・YojN との相互作用による可能性を考えたが、RcsC・YojN の欠損でもスフェロプラスト画分に回収される MBP-RcsF の量はほとんど変わらず、RcsF が内膜の他のタンパク質あるいは脂質と相互作用していると考えられる。

(4) RcsF の N 末端付近のプロリン残基を多く含む領域 (proline-rich region, PRR) を欠失すると、MBP-RcsF では Rcs 系活性化機能が著しく増強し、さらに細胞表層ストレスを加えても活性化レベルの増大が見られなくなる一方、本来の外膜リポタンパク質の状態の RcsF では Rcs 系活性化機能が著しく低下し、ストレスを加えても活性化がほとんど見られなかった。外膜リポタンパク質 RcsF についての結果が、欠失によって RcsF アミノ酸鎖長が短くなったために内膜タンパク質との相互作用に距離的な制約が生じたことによるのではないことを、外膜リポタンパク質 RcsF の C 末端付近に RcsF の成熟体部分をタンデムに融合したものを作成し、明らかにした。このタンデム RcsF で PRR を欠失すると、やはり Rcs 系活性化機能の低下が見られた RcsF が細胞外環境に応答して RcsC・YojN へのシグナル伝達レベルを制御するために PRR が中心的な役割を果たしていることを示唆する結果であると考えている。

3 展望

(1) PRR が、RcsF の N 末端部分 (本来の外膜リポタンパク質の状態では外膜にアンカーされている) と RcsC・YojN へシグナルを伝達する C 末端ドメインとの間の構造可変 linker として、細胞

外環境に応答して RcsF 分子全体の構造を変化させることによって、Rcs 系を制御していて、PRR を欠失すると Rcs 系活性化機能が ON あるいは OFF の状態に固定するという仮説を立て、今後その検証を進める。

(2) そのために、RcsF タンパク質の細胞表層ストレスの感知、活性化機能の制御、RcsC・YojN との相互作用によるシグナル伝達に働く各ドメインの領域を確定し、タンパク質全体のドメイン構成を詳細に解析する。さらに、C 末端ドメインのシステイン残基、PRR のプロリン残基、また、PRR にプロリンと同様多く含まれる塩基性残基の機能に注目し、これらの残基の置換変異の効果を検討することから、解析を進める。