

# プロジェクト名： PRR(proline-rich region)をもつ細菌細胞表層タンパク質による 環境ストレスの感知と伝達

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

腸内細菌のRcsリン酸リレーシグナル伝達系は、宿主体外に排出されて低温・乾燥にさらされたときや固体表面でバイオフィルムを形成するときに、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。

平成20年度総合研究機構プロジェクト研究で、RcsFのN末端付近のプロリン残基と塩基性残基を多数含む領域（PRR）が環境ストレスを感知するドメインとして、C末端側のかなり大きなドメインがリン酸リレー系を構成する内膜（細胞膜）のキナーゼRcsCやトランスミッターYojNにシグナルを伝達するドメインとして働くことを示す結果を得た。

今年度（平成21年度）、本研究では、外膜リポタンパク質RcsFが細胞表層でストレスを感知し、そのシグナルを内膜コンポーネントRcsC・YojNに伝達する機構を、RcsFのドメイン構造、特にストレス感知ドメインと考えられるPRRを含むN末端領域とシグナル伝達ドメインとして働くC末端領域の構造と機能の相関に注目して解析した。

## 2 研究の進め方と成果

大腸菌のRcsFを材料とし、本来の外膜局在リポタンパク質に加え、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）にRcsF成熟体部分119残基を融合してペリプラズム遊離型としたもの、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に局在するリポタンパク質としたもの、外膜RcsFのC末端付近にRcsF成熟体部分をタンデムに融合したものをを用いて解析を進めている。これら3種の改変RcsFはいずれも、細胞表層ストレスがない条件でもRcs系を活性化し、内膜コンポーネントと相互作用しやすくなっているものと考えられる。成熟体部分の17～35番目残基からなるPRRを欠失させると、ペリプラズム遊離型・内膜型ではRcs系活性能が上昇する一方、外膜型・タンデム型では過剰に発現してもRcs系をほとんど活性化できなくなる。

(1)細胞表層ストレスを加える条件で調べたところ、ペリプラズム遊離型・内膜型では、ストレスに応答してRcs系をさらに強く活性化するという事はなくなっており、タンデム型ではストレス応答能が低下し、外膜型では活性化できないままでストレスに応答できなくなっていた。PRRがRcsFがストレスを感知してRcs系活性化レベルを制御するのに重要な働きをしていることを示している。

(2)RcsFはRcs系をもつ多くの腸内細菌種に保存され、C末端側は高いアミノ酸配列相同性を示す。N末端側の一次配列の相同性は分子系統学的に遠縁の種では低いが、プロリン残基と塩基性残基を多数含むというPRRの特徴は強く保存されている。一部の種では大腸菌で現在PRRとして注目している範囲よりN末端ぎりぎりまでこの特徴がみられ、大腸菌でもN末端のごく近くにまでプロリン残基と塩基性残基が散見されることから、大腸菌でも従来よりN末端側に広い範囲にPRRとしての機能領域があるのかもしれないと考えた。しかし、現在PRRと考えている部分よりもN末端側の16残基をすべて欠失させても、PRR欠失と同様の効果は現れなかった。現在考えているPRRだけでストレス感知ドメインとしての機能は十分果たせるものと考えられる。

(3)大腸菌RcsFのPRRは相同性のある配列が2回反復していることを見出すことができることに気づいた。そこで、PRR内のN末端側半領域・C末端側半領域を別々に欠失させたところ、外膜型では、いずれの半領域欠失でも全領域欠失と同様にRcs系をほとんど活性化できなくなった。ペリプラズム遊離型では、C末端側半領域欠失によって、全領域欠失と同様に、もはや細胞表層ストレスに応答しないほどにまでフルにRcs活性化能が上昇したが、N末端半領域欠失によっては、外膜型でみられたのと同様に、Rcs活性化能が大きく低下した

が、ストレス応答能はある程度残っていた。従来観察してきたPRRの機能はおもにC末端側半領域によるものと思われる。また、PRR内のN/C末端側それぞれの半領域には機能的分化があり、PRRは少なくとも2つの機能的サブドメイン構造があると考えている。

(4) N・C両末端からの欠失実験でシグナル伝達ドメインとして働くことが示されたRcsF成熟型部分の40～114番目の残基の領域にはシステイン残基が4つあり、分子系統学的に遠縁の種でも完全に保存されている。システイン残基をセリンに置換する変異を導入して、RcsFタンパク質の安定性・Rcs活性化能・ジスルフィド結合還元に伴う電気泳動度変化への影響を調べたところ、4つのうち1番目と3番目、2番目と4番目がジスルフィド結合を形成し、前二者がRcsFタンパク質の立体構造に、後二者がRcs活性化能に重要であることを示唆する結果を得た。

(5) タンパク質架橋剤によるRcsFと内膜コンポーネントとの相互作用を検出を試みたが、RcsFが二・三量体をつくっている可能性を示す結果が得られたが、内膜コンポーネントとの相互作用は検出できず、相互作用は一過性のものと考えられた。

(6) 大腸菌細胞をスフェロプラスト化して分画すると、ペリプラズム遊離型には、一部、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。これが内膜コンポーネントとの相互作用によるのではないことは平成20年度に示したが、そのデータを詳細に検討したところ、Rcs系活性化能の高いものではスフェロプラスト画分への回収量が減る傾向があることに気づいた。上記のPRR内N末端側半領域・C末端側半領域欠失で調べると、やはりRcs活性化能とスフェロプラスト画分への回収量は負の相関があった。膜との親和性に影響を及ぼすようなRcsFタンパク質のコンフォメーション変化とRcs活性化との関連を示唆するものとして注目している。

### 3 展望

RcsFのストレス感知ドメインとシグナル伝達ドメインについて、それぞれの範囲がほぼ確定し、その構造と機能の相関についていくつかの局面からの知見が得られた。平成21年度の成果にもとづいて、今後まず下記の課題に取り組むことから始める。細菌の細胞膜の外側に局在するタンパク質が、環境ストレス感知と、細胞膜コンポーネントを介しての遺伝発現制御機構へのシグナル伝達に働く機構を、タンパク質ドメインの構造から分子レベルで理解することをめざしている。さらに将来的には、慢性的細菌感染などの原因となるバイオフィーム形成の分子機構の解明と、それにもとづくバイオフィーム形成抑制の方策の開発につながる可能性が期待される。

(1) PRRの特徴であるプロリン残基をアラニンにひとつひとつ置換し、さらにそれらの置換変異を組み合わせさせてRcs系活性化能への効果を検討し、環境ストレス感知におけるプロリン残基の働きを解析する。PRRのもうひとつの特徴である塩基性残基に酸性アミノ酸への置換も同様に試みる。いずれもPRR内のN/C末端半領域に機能的分化があることに留意して解析を進める。

(2) シグナル伝達ドメイン内のシステイン残基のセリン残基置換の実験はペリプラズム遊離型で行なった。RcsF成熟体部分の1番目のシステイン残基のSH基は、本来の外膜リポタンパク質型ではリポド修飾を受けているが、MBPと融合したペリプラズム型ではフリーなので、C末端ドメインのジスルフィド結合に干渉するおそれがある。この1番目のシステイン残基のセリン置換変異はストレス感知とシグナル伝達に影響を与えないことを確認したので、さっそく、この置換変異を出発材料にしてシグナル伝達ドメイン内システイン残基の置換を行なって、本研究での結果の妥当性を確認する必要がある。

(3) MBP融合タンパク質はMBPとマルトデキストランとの親和性を利用して精製することができる。ペリプラズム遊離型RcsFを精製し、プロテアーゼ処理後質量分析によるジスルフィド結合の位置の化学的確認を試みる。

(4) 膜との親和性とRcs活性化レベルとの相関を、上記のプロリン・塩基性残基の置換変異について、また、環境ストレスによる活性化時について検討する。膜との親和性の変化がコンフォメーション変化によるものかどうかを、限定分解のうけかたに差が生じるかどうかということから検討する。

これまで総合研究機構プロジェクト研究経費の支援を受けて進めてきた研究成果を基盤として、平成22年度から3年間の外部資金を獲得し、さらに研究を進展させることができることとなった。総合研究機構プロジェクト研究経費による支援に深く感謝する。