

プロジェクト名：細菌の細胞膜脂質リサイクル系の生理機能の解析

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

枯草菌のジアシルグリセロール(DG)キナーゼをコードする *dgkB* 遺伝子は必須遺伝子である。DG はホスファチジン酸(PA)の脱リン酸によって、またリポテイコ酸(LTA)合成の副産物としてつくられる。LTA はグラム陽性菌細胞表層の陰イオン性ポリマーで、糖脂質ジグルコシルジアシルグリセロールを膜アンカーとして、リン脂質ホスファチジルグリセロール(PG)の *sn*-グリセロール-1-リン酸部分を重合して合成される。それに伴ってPGのDG部分が残されることになる。LTAは鎖長の長いポリマーなので、1分子のLTA合成に際して、数十分子のDGが産生される。DGは*dgkB*遺伝子産物(DgkBタンパク質、DGキナーゼ)によってリン酸化されてPAとなり、PGその他のリン脂質の合成経路へとリサイクルされる。

枯草菌のPG合成に働く *pgsA* 遺伝子が必須遺伝子であることから、LTA合成経路に注目しはじめた。*pgsA* 遺伝子をイソプロピルチオガラクトシド(IPTG)で誘導される P_{spac} プロモーター支配下におくと、生育がIPTG依存性となった。黄色ブドウ球菌でLTA合成酵素の遺伝子 *ltaS* が同定され、その欠損が著しい生育不全を引き起すと報告されたので、*pgsA* 発現抑制の致死性はLTA合成欠損によるのかもしれないと考えた。

dgkB 遺伝子が必須である原因も不明であった。LTAはDgkBがかかわるリサイクル系で合成されるので、*dgkB* 欠損はLTA合成欠損を引き起こすために、致死となるのかもしれない。或いは、キナーゼがないとDGが蓄積することが致死の原因かもしれない。

本研究は、*dgkB* 遺伝子・*pgsA* 遺伝子の必須性の原因を探り、細胞膜脂質リサイクル系の生理機能を解析することを目的とした。

2 研究の進め方と成果

枯草菌は *ltaS* のホモログを4つもち、いずれも必須遺伝子とされていないのはその冗長性のゆえとも考えられた。4つのうち *ltaS* と同源性の高い *yf1E* と *yfnI* は、黄色ブドウ球菌 *ltaS* 発現抑制株で発現させると、前者は生育とLTA合成を回復させ、後者は生育は回復させないもののLTA合成が観察されるが、他の2つ *yqgS* と *yvgJ* では生育もLTA合成も回復しない。そこでまず *yf1E* と *yfnI* について、一方の挿入破壊株のDNAによる他方の挿入破壊株の形質転換をさまざまな組合せで試みたところ、LTA合成と無関係の非必須遺伝子の破壊株のDNAによるのと同様の効率で形質転換され、*yf1E yfnI* 二重破壊株ができた。*yqgS yvgJ* 二重破壊の遺伝的背景でも同じ結果が得られ、四重破壊株が構築できた。ただし、*yf1E* 破壊をもつ株は生育速度が少し低かった。黄色ブドウ球菌ではLTAは生育に非常に重要だが、*Bacillus* 属にはLTAをもたない種も知られている。枯草菌 *pgsA* 遺伝子はLTA合成基質PGの供給に必要だが、*pgsA* 欠損はLTAが合成欠損のために致死となるのではないと考えられる。

dgkB 発現抑制株でもLTAが合成できなくなるが、そのためではなく、DGがリン酸化されずに蓄積するために致死となるのだろうと考え、*yf1E*・*yfnI*破壊の一方または両方を P_{spac} -*dgkB*株に導入したところ、予想どおりIPTG非存在下で生育できるようになった。一方の破壊ではLTA合成に伴うDG産生はなくならず減少するだけだと思われるが、それでもIPTG依存性をサプレッした。*yfnI*破壊でもサプレッできたのは、*YfnI*もLTAを合成してDGをつくることを示している。ただし、*yfnI*破壊によるサプレッションの程度は弱く、IPTG非存在下での増殖はIPTG存在下ほどよくはなかった。*YfnI*は*Yf1E*よりマイナーなLTA合成酵素だと考えられる。*yqgS*・*yvgJ*については二重破壊でもはっきりしたサプレッションは観察されなかった。

P_{spac} -*dgkB*株を放射性標識し、脂質を抽出して分析すると、IPTG除去による*dgkB*発現抑制に伴ない、著しいDGの蓄積がみられた。*yf1E*または*yfnI*を破壊すると、*dgkB*発現抑制時のDG蓄積量は少なくなった。ただし、*yfnI*破壊の方が*yf1E*破壊の場合に比べるとDG蓄積量が多かった。この点でも*yfnI*破壊によるサプレッションは弱く、上に述べたとおり、*Yf1E*の方がメジャーなLTA合成酵素として、より

多くの DG を産生していると考えられる。 *yf1E yfnI* 二重破壊を導入すると、DG 量は野生型レベルにまで減少し、*dgkB* 発現を抑制しても、DG 含量は増えなかった。残りの2つの *yqgS*・*yvgJ* は、少なくとも栄養増殖期を対象とした今回の実験条件下では、DG 産生、ひいては LTA 合成にほとんど寄与していないと考えられる。

ugtP 遺伝子にコードされる糖脂質合成酵素は、グルコースを UDP-グルコースから DG に次々と転移する酵素で、DG を消費する。*ugtP* 遺伝子は必須遺伝子ではなく破壊できるが、LTA 合成欠損で DG 産生量が減ることによって致死性がサプレスされている *dgkB* 発現抑制株ではどうだろうか。*ugtP* 遺伝子の欠失を導入すると、*P_{spac}-dgkB yfnI* 株は再び IPTG 依存性となったが、*yf1E* 破壊・*yf1E yfnI* 二重破壊を導入した *P_{spac}-dgkB* 株は IPTG の有無にかかわらず同程度の生育を示した。*yfnI* 破壊ではメジャーな LTA 合成酵素である *yf1E* 遺伝子産物が働いて DG をつくるため、*ugtP* 欠失によって DG 消費が減ると生育を妨げることになると考えられる。

P_{spac}-dgkB 株の解析から、LTA 合成欠損株では *dgkB* 遺伝子の発現が抑制されても生育できることがわかった。しかし、IPTG がなくても *P_{spac}* プロモーターからの基底レベルの発現があるので、*dgkB* 遺伝子を完全に欠損できるかどうかはわからない。そこで、まず、*amyE* 座位に挿入した GFP-DgkB 融合タンパク質の遺伝子が発現している条件で、*dgkB* 遺伝子を pMUTIN 由来プラスミドの挿入によって破壊した。この株の染色体 DNA による形質転換を試みたところ、*dgkB* 破壊は野生株には導入できなかったが、*yf1E yfnI* 二重破壊株にも、一方が破壊された株にも導入できた。したがって、*yf1E*・*yfnI* の一方または両方の破壊によって、LTA 合成に伴う DG 産生が低いレベルに抑えられれば、*dgkB* 遺伝子は必須ではなくなるということがわかった。

LTA 合成基質 PG の供給にはたらく PgsA タンパク質が細胞の分裂隔壁領域に局在することを見いだしているので、LTA 合成酵素も同様の局在をみせると考えた。GFP-Yf1E・GFP-YfnI 融合タンパク質を低レベルで発現させると、予想どおり隔壁領域に蛍光が観察された。LTA 合成反応が主要な DG 供給源と思われるので DG キナーゼの局在も同様かと考えたが、GFP-DgkB 融合タンパク質は分裂隔壁だけでなく細胞膜全体に観察された。なお、アミノ酸配列からは DgkB タンパク質自体は可溶性タンパク質と予測されるが、酸性リン脂質に親和性をもつことが *in vitro* で示されており、それによって細胞膜に結合しているのだろう。

3 まとめと展望

以上の結果から、DG の蓄積は枯草菌の増殖に有害であるが、LTA 合成欠損によって DG 産生レベルが低ければ、DG キナーゼは必須ではない。また、*yf1E* 遺伝子産物の方が *yfnI* 遺伝子産物よりも主要な LTA 合成酵素として働いていると結論した。

グラム陰性菌である大腸菌の DG キナーゼは枯草菌 DgkB とは別のタンパク質ファミリーに属し、その遺伝子 *dgkA* は必須遺伝子ではない。大腸菌では、ペリプラズムのオリゴグルカンである membrane-derived oligosaccharide (MDO) の *sn*-グリセロール-1-リン酸修飾に PG が供与体として使われ、その副産物として DG ができる。MDO 合成量がふえる低浸透圧条件や、修飾反応の受容体アナログであるアルブチン (*p*-ヒドロキシフェニル- β -D-グルコシド) の存在下では、*dgkA* 欠損株は DG が蓄積して生育が阻害されることが知られており、大腸菌でも DG の蓄積は生育に有害である。

DG 含量が高い脂質二重層構造は、通常のリン脂質や糖脂質からなる場合と異なる性質をもつようになることや、DG が膜タンパク質の細胞膜への組み込みに影響することが示されている。DG の蓄積が細菌細胞の生育に有害となる直接の原因を調べるのが今後の課題である。