

# 外膜リポタンパク質による 細菌の環境ストレス感知とシグナル伝達

## Bacterial Stimulus Perception and Signal Transduction in Response to Environmental Stresses through Outer Membrane Lipoproteins

プロジェクト代表者: 原 弘志 (理学部分子生物学科・助教授)  
Hiroshi Hara (Assoc. Prof., Department of Biochemistry  
and Molecular Biology, Faculty of Science)

### 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* 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。最近私たちは、*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応答して活性化するとされている。当初、そのような環境ストレスの効果を *pgsA* 変異による主要酸性リン脂質欠損が *mimic* している、*Rcs* 系が活性化していると考えた。さらにこの活性化に、マイナーな外膜リポタンパク質のひとつであると考えられる *RcsF* が必須であることを示した。同時に、MDO (膜由来オリゴ糖) 欠損や両親媒性薬剤クロールプロマジン処理による *Rcs* 系活性化にも必須であることを示した。過剰生産によって *Rcs* 系を活性化することから、*RcsF* は *Rcs* リン酸リレー系の補助的な制御因子とされてきたが、Hagiwara *et al.* (2003) がグルコースと亜鉛イオン存在下での低温処理による *Rcs* 系活性化に必須であることを示しているのとあわせ、*RcsF* は *Rcs* シグナル伝達系を構成する成分と見なすことができると考えた。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ストレスを最初に感知することは理にかなっていると言えるが、外膜リポタンパク質 *RcsF* が、離れた細胞質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* は環境ストレスをどうやって感知するのか、*RcsF* を刺激する環境ストレスの分子レベルでの正体は何か、などは不明のままになっている。

### 2 *RcsF* タンパク質の外膜局在性と *pgsA* 変異株での内膜停滞

*RcsF* は N 末端付近に典型的なリポボックスと外膜ソーティング配列をもつので、外膜リポタンパク質と推定されてきた。細胞表面画分を蔗糖密度勾配遠心分離によって内膜と外膜に分画して分析することによって、*RcsF* が外膜に局在化するタンパク質であることを確認した。さらに、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 *pgsA* 変異株では、以前 *Lpp* について見出していたと同様に、*RcsF* もその成熟が遅れ、内膜に停滞することを明らかにした。これらのことから、*RcsF* は確かに外膜リポタンパク質であると結論した。

### 3 *RcsF* の *Rcs* リン酸リレー系活性化における必須性

主要酸性リン脂質や MDO の欠損・クロールプロマジン処理による場合だけでなく、外膜リポ多糖の欠損や、外膜タンパク質に内膜からエネルギーを伝えるのに働く *Tol* タンパク質群の欠損によって *Rcs* 系が活性化するときにも、*RcsF* が必須であることを示した。このように *RcsF* は細胞表面に加えられたストレスに応答するために必須の *Rcs* 系構成タンパク質である。

### 4 *RcsF* の内膜停滞による *Rcs* 系の活性化

リン脂質合成について野生型の菌株を、リポタンパク質シグナルペプチダーゼの特異的阻害剤であるグロボマイシンで処理することによって、リポタンパク質の成熟を妨げた場合も、*Rcs* 系が活性化した。この活性化は、*RcsF* を欠損しているで見られなかった。また、*RcsF* の内膜/外膜ソーティング配列を改変して、外膜への局在化を抑えて内膜に残留するようにすると、細胞表面にストレスが加わらなくても *Rcs* 系が活性化し、その活性化レベルは内膜への残留する程度に対応していた。*pgsA* 変異株における *Rcs* 系の活性化は、*RcsF* が内膜に停滞することによると考えられる。ただし、*Lpp* をもつ野生型の菌株でリポタンパク質の成熟が遅れると、内膜に停滞した *Lpp* が致死性を引き起こすので、環境ストレスによってリポタンパク質全般の成熟遅滞が生じて、その結果 *Rcs* 系が活性化するとは考えにくい。

### 5 ペリプラズム遊離型 *RcsF* による *Rcs* 系の活性化

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 末端に融合したタンパク質を発現させたところ、発現レベルを低く抑えても、内膜局在型 *RcsF* を発現させたときよりも著しい *Rcs* 系活性化が見られた。野生型 *RcsF* の C 末端 4 残基を欠失させ

ると Rcs 系活性化能が失われることをすでに見出していたが、MBP に融合したペリプラズム遊離型 RcsF の場合も C 末端 4 残基の欠失で Rcs 系活性化能が失われ、外膜に局在化した RcsF と同じ機構で Rcs 系を活性化していると思われる。

## 6 RcsF による Rcs 系活性化機構

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。RcsF が内膜に停滞したりペリプラズム遊離型となるだけで Rcs 系が活性化することから、外膜リポタンパク質である RcsF が、内膜の Rcs 系構成タンパク質、おそらくセンサーキナーゼ RcsC のペリプラズム露出領域と、直接相互作用すると、Rcs リン酸リレー系が活性化すると結論した。環境ストレスに应答して外膜リポタンパク質 RcsF が何らかの立体構造変化を起こし、内膜にある Rcs 系構成タンパク質と相互作用できるようになることによって、外部環境変化に応じた Rcs 系の活性化が引き起こされると考えられる。なお、RcsF と相互作用する内膜の Rcs 系構成タンパク質としては、RcsC のほかに、RcsC と複合体を形成している可能性が高いと考えているトランスミッター YojN や、両者の複合体のペリプラズム領域をを想定している。

## 7 RcsF と RcsC の相互作用を検出する試み

RcsF が RcsC と直接相互作用するならば、一方を抗体によって免疫沈降させたときに他方も共沈降することが検出される可能性がある。RcsF については特異性の高い抗血清を作成してあるが、RcsC については抗血清を持っていないので、染色体上の *rscC* 遺伝子を改変して、RcsC の C 末端に FLAG エポトープタグを融合したタンパク質を発現させた。この融合タンパク質は正常なセンサーキナーゼ機能を保っていた。残念ながら、野生型 RcsF についても内膜局在型 RcsF についても、RcsC との共免疫沈降を検出することはできなかった。Rcs 系活性化の際の RcsF と RcsC との相互作用は、共免疫沈降が起こるほど安定なものではないのかもしれない。なお、YojN についても、C 末端に HA エポトープタグを融合したタンパク質の発現系を構築したが、この融合タンパク質はトランスミッター機能を失っていたので、共免疫沈降実験を試みることはできなかった。

## 8 RcsF の細胞内局在性の検討

Rcs 系を含め、リン酸転移がトランスミッターを経由する多段階リン酸リレー系では、細胞質膜のセンサーキナーゼが細胞の両端に局在化すると報告があった(吉本ら、日本遺伝学会第 76 回大会[2004])ことから、Rcs 系の必須の構成タンパク質である RcsF も同様の細胞内局在性を示す可能性があると考えた。タンパク質の細胞内局在性の検討には緑色蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質がよく用いられるが、大腸菌細胞では、GFP は内膜より外側に運び出されると正しくフォールディングされず、蛍光を発しない。そこで、ウサギ抗 RcsF 抗体と蛍光標識したマウス抗ウサギ免疫グロブリン抗体を用いて、免疫蛍光顕微鏡法で RcsF の細胞内局在性を調べた。しかし、野生型・内膜局在型の RcsF のどちらでも、また、MDO 欠損によって Rcs 系が活性化していて RcsF と RcsC との相互作用が強くなっていると思われる場合でも、蛍光標識された RcsF は細胞の両端には局在化せず、細胞表面の全面に多数の蛍光点を作って分布していた。ただし、蛍光を検出するためには RcsF の発現量を野生型の状態よりも多くせざるをえなかったため、染色体上の遺伝子から生理的なレベルで発現している場合の局在性は、今後検討しなくてはならない。

## 9 内膜局在型 RcsF のストレス感知能

ほぼ 100% 内膜に残留すると考えられる変異型 RcsF だけを発現して Rcs 系が活性化している場合にも、主要酸性リン脂質・MDO・TolB タンパク質の欠損によって、程度の違いはあるものの、Rcs 系がさらに活性化した。このように内膜やペリプラズムにも影響を与えるような欠損によって、内膜に局在化してしました RcsF も応答できる。しかし、外膜リポ多糖の欠損に対しては、内膜局在型 RcsF は応答できなかった。細胞表面の構造や機能に関わる遺伝的変異によるストレスには内膜局在型 RcsF も応答できる場合があるが、外部環境の変動によるストレスに応答するには、外膜リポ多糖欠損に対するのと同様、RcsF が外膜にあることが必要だろうと考えている。

## 10 RcsF の構造と機能の相関

RcsF の C 末端 4 残基を欠失させると、細胞表面に加わる明白なストレスが無いときに、野生型の発現レベルを上げたり、ペリプラズム遊離型を低レベルで発現させても Rcs 系が活性化しなくなったことから、センサーキナーゼ RcsC へのシグナルの伝達に C 末端領域が必須の役割を果たしていると考えている。RcsF は分子中央にプロリン残基に富む特徴的な配列領域(PRR)を持っている。野生型 RcsF の PRR を欠失させると、少なくとも MDO 欠損による Rcs 系は起こらなくなった。この領域がストレスの感知に重要な働きをしている可能性があるが、単に外膜の RcsF の分子サイズが小さくなったために内膜の RcsC と相互作用できなくなったとも考えられる。ペリプラズム遊離型から PRR を欠失させた場合の効果を検討するなど、今後の解析が必要である。

## 11 Rcs 系を負に制御する内膜タンパク質

DnaJ コシヤペロンのファミリーに属する内膜タンパク質である DjlA を過剰生産すると Rcs 系が活性化することが知られていたが、この活性化には、他の既知の Rcs 系を活性化する細胞表層へのストレスと異なり、RcsF は必要なかった。DjlA の欠損や低レベルの発現上昇の効果を調べ、染色体上の遺伝子から生理的なレベルで発現しているときには、このタンパク質が Rcs 系の活性を負に制御していることを見出した。

*pgsA* 変異株では Rcs 系が活性化しているために高温感受性となっているわけだが、多コピープラスミドにクローン化して過剰発現させるとこの高温感受性をサプレッサーする遺伝子として、*yrfF* を見出し、この遺伝子を過剰発現すると Rcs 系の活性化を抑制することがわかった。*yrfF* 遺伝子は内膜タンパク質をコードしており、サルモネラ菌のもつ相同遺伝子 *igaA* の産物について、Rcs リン酸リレーを負に制御していて、Rcs 系が野生型の場合 *igaA* 欠損は致死であることが報告されている。大腸菌でも *yrfF* は欠失することのできない必須遺伝子とされていたが、Rcs 系構成成分の遺伝子が欠損している株で *yrfF* を欠失することができた。今後、YrfF タンパク質の Rcs 系制御における機能の解析を進める。

## 12 枯草菌の *pgsA* 発現抑制株の解析

大腸菌の *pgsA* 完全欠損株は、主要外膜リポタンパク質 Lpp を同時に欠損していると高温感受性にはなるものの生育可能だが、枯草菌の *pgsA* の発現を抑制すると致死的で、これを生育可能とするようなサプレッサー変異は見つかっていない。私たちは、多コピープラスミドにクローン化すると枯草菌の *pgsA* 発現抑制株の致死性を弱いながらサプレッサーする遺伝子として、*yufM*・*yceC*・*ywnF*・*yqgB* の 4 つの遺伝子を同定した。*yufM* は YufL-YufM リン酸リレー制御系のレスポンスレギュレーターをコードしており、このリン酸リレー系はリンゴ酸を細胞内への取込みに働くトランスポーターの遺伝子を正に制御していることが知られている。栄養培地での増殖欠損にリンゴ酸の取込みが関係するとは考えにくいので、このリン酸リレー系制御下の未知の遺伝子の関与を考える必要がある。*yceC* は亜テルル酸耐性に働くこととされており、何らかの細胞表層ストレスに対応する効果があるのかもしれない。*ywnF* は脂肪酸合成に関与する可能性も指摘されているが、機能ははっきりしていない。*yqgB* も機能未知の膜タンパク質をコードしている。これらマルチコピーサプレッサーの存在下でも、*pgsA* 発現抑制株の主要酸性リン脂質とそれに由来するリジルホスファチジルグリセロールの合成が欠損したままであることを確認した。これらマルチコピーサプレッサーによるサプレッションの機構や、*pgsA* 完全欠損変異もサプレッサーできるかどうかを検討し、さらにマルチコピーサプレッサー存在下で増殖している細胞で、主要酸性リン脂質の欠損に対してどのような応答が生じているか追究していく必要がある。

## 13 論文発表など

### 原著論文

- Ayako Nishibori, Jin Kusaka, Hiroshi Hara, Masato Umeda, and Kouji Matsumoto. 2005. Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *J. Bacteriol.* 187(6): 2163–2174.
- Shingo Fujisaki, Isao Takahashi, Hiroshi Hara, Kensuke Horiuchi, Tokuzo Nishino and Yukinobu Nishimura. 2005. Disruption of the structural gene for farnesyl diphosphate synthase in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 137(3): 395–400.
- Yasuhiro Shiba, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. 2006. DjlA negatively regulates the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*. *Genes Genet. Syst.* 81(1): 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(2): 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(2): 91–98.

### 総説

- 原 弘志, 松本 幸次. 2005. 細菌の膜脂質欠損とバイオフィーム形成シグナル応答. *バイオサイエンスとインダストリー* 63 (5): 320–323.

### 抄録

- 河合 文隆, 原 弘志, 松本 幸次. 2005. 酸性リン脂質カルジオリピンの枯草菌孢子への蓄積と発芽における役割. *脂質生化学研究* 47: 235–238.
- Satomi Hirono, Kaori Tanikawa, Hiroshi Hara, and Kouji Matsumoto. 2005. Analysis of the function of the acidic phospholipid in *Bacillus subtilis* by using multicopy suppressors. *Genes Genet. Syst.* 80(6):

464.

Yasuhiro Shiba, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. 2005. Stimulation of *Escherichia coli* Rcs phosphorelay regulatory system by stagnation of outer membrane lipoprotein RcsF in the inner membrane. *Genes Genet. Syst.* 80(6): 464.

Jin Kusaka, Ayako Nishibori, Hiroshi Hara, Masato Umeda, and Kouji Matsumoto. 2005. Analysis of the factor involved in the localization of the phospholipids in *B. subtilis*. *Genes Genet. Syst.* 80(6): 475.

Fumitaka Kawai, Hiroshi Hara, and Kouji Matsumoto. 2005. Cardiolipin enrichment in *Bacillus subtilis* spore membranes and its involvement in germination. *Genes Genet. Syst.* 80(6): 476.

学会発表

微生物研究会第3回セミナー「細菌の多様性・可能性を探る」埼玉大学キャンパス内大学会館大集会室、さいたま、2005年4月23日

長濱 秀樹, 松本 幸次, 原 弘志. 大腸菌主要酸性リン脂質欠損株の高温感受性マルチコピーサプレッサーの Rcs リン酸リレー制御系への影響.

柴 康弘, 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抑制する膜結合性 DnaJ 様タンパク質 DjIA.

河合 文隆, 原 弘志, 松本 幸次. 酸性リン脂質カルジオリピンの枯草菌胞子への蓄積と発芽における役割.

日下 仁, 西堀 綾子, 原 弘志, 梅田 眞郷, 松本 幸次. 細菌におけるホスファチジルエタノールアミンの細胞内局在性の解析.

第47回日本脂質生化学会. 金沢市観光会館中央公民館, 金沢, 2005年6月2-3日.

河合 文隆, 原 弘志, 松本 幸次. 酸性リン脂質カルジオリピンの枯草菌胞子への蓄積と発芽における役割.

21世紀大腸菌研究会2005「モデル生物大腸菌の統合的理解にむけて」メルパール伊勢志摩, 志摩, 2005年6月23-24日.

柴 康弘, 松本 幸次, 原 弘志. Rcs リン酸リレーシグナル伝達系を抑制する内膜結合性 DnaJ 様タンパク質 DjIA.

IUMS 2005, Joint Meeting of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies. Moscone Convention Center, San Francisco, California, U.S.A., 2005年7月23-28日.

Kouji Matsumoto, Jin Kusaka, Ayako Nishibori, Fumitaka Kawai, Masato Umeda, and Hiroshi Hara. Lipid domains in bacterial membranes.

Hideki Nagahama, Kouji Matsumoto, and Hiroshi Hara. Identification and analysis of the genes involved in temperature sensitivity due to acidic phospholipid deficiency in *E. coli*.

Jin Kusaka, Hiroshi Hara, Masato Umeda, and Kouji Matsumoto. Subcellular localization of phosphatidylethanolamine in bacterial membranes.

Gordon Research Conference on Molecular and Cellular Biology of Lipids 2005. Waterville Valley Resort, Waterville Valley, New Hampshire, U.S.A., 2005年7月24-29日.

Teresa A. Garrett, Hiroshi Hara, Kouji Matsumoto, and Christian R. H. Raetz. Identification by mass spectrometry of an acidic phosphatidylethanolamine derivative in an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol.

日本遺伝学会第77回大会. 国立オリンピック記念青少年総合センター, 東京, 2005年9月27-29日.

広野 聡美, 谷川 香, 原 弘志, 松本 幸次. マルチコピーサプレッサーによる枯草菌酸性リン脂質機能の分子遺伝学的解析.

柴 康弘, 松本 幸次, 原 弘志. 大腸菌外膜リポタンパク質 RcsF の内膜停滞による Rcs リン酸リレー制御系の活性化.

日下 仁, 西堀 綾子, 原 弘志, 梅田 眞郷, 松本 幸次. 枯草菌における脂質合成酵素の局在メカニズムについての解析.

工藤 かおり, 日下 仁, 原 弘志, 梅田 眞郷, 松本 幸次. 枯草菌ホスファチジルグリセリン酸合成酵素を分裂隔壁に局在させる機能領域の解析.

河合 文隆, 原 弘志, 梅田 眞郷, 松本 幸次. 枯草菌胞子におけるカルジオリピンの蓄積と発芽誘導への関与.

日本分子生物学会第28回年会. 福岡ヤフードーム, 福岡, 2005年12月7-10日.

内山 純爾, 松崎 博, 原 弘志, 松本 幸次. 大腸菌酸性リン脂質欠損による *flhDC* 転写抑制を回復する *gadW* の役割.