

## 関口順一・山本博規

目的別テーマ：バイオフィバー生合成機構の解明

研究テーマ

15-2-14：細胞壁合成・修飾・分解機構の研究

### ABSTRACT

Modification of peptidoglycan is important in various bacteria. Especially, *Bacillus subtilis* produces spore under the starvation conditions. We investigated the modification of spore peptidoglycan called cortex with the use of the polysaccharide deacetylase gene (*pdaA*) of *B. subtilis*. *PdaA*-deficient spore did not lead to germination and this mutant completely lacked muramic- $\delta$ -lactam which is essential to germination. In-vitro experiments indicated that *PdaA* did not catalyze deacetylation reaction when the native polysaccharide was used as a substrate, but catalyzed deacetylation when the amidase-digested polysaccharide was used as a substrate. These results indicate *PdaA* plays a key role in cortex biosynthesis.

Biosynthesis, modification and degradation of cell wall in bacteria are stringently controlled during vegetative growth. Here we characterized three vegetative cell wall hydrolases, *CwlO*, *YcdD*, and *CwlS*. First, we found that a novel *yvcE* (*cwlO*) gene encodes a vegetative cell wall hydrolase classified into the DL-endopeptidase family. The C-terminal truncated protein, C-*CwlO*-6His, retained cell wall hydrolase activity and the substrate bond specificity indicated that it is a DL-endopeptidase in vitro. *CwlO* was secreted in culture medium during the vegetative growth phase. Second, we defined that a *ycdD* gene product also retains a cell wall hydrolase activity. The amino acid sequence of *YcdD* exhibited high similarity with some predicted LD-endopeptidases and was very similar to some bacteriophage lysins. The *ycdD* gene was transcribed during the vegetative growth phase. Localization analysis indicated that the *YcdD*-3xFLAG fusion protein was secreted into culture medium but not on cell surface. The RP-HPLC and mass spectrometry showed that 6xHis-tag-fused *YcdD* (h-*YcdD*) protein only cleaves the linkage between L-Ala and D-Glu, which indicated that *YcdD* is an LD-endopeptidase. This is the first example of the LD-endopeptidase characterized in *B. subtilis*. Finally, a new peptidoglycan hydrolase, *CwlS* (*YojL*), exhibits high amino acid sequence similarity to *LytE* (*CwlF*) and *LytF* (*CwlE*), which are associated with cell separation. The N-terminal region of *CwlS* has four tandem repeat regions (*LysM* repeats) predicted to be a peptidoglycan-binding module. The C-terminal region exhibits high similarity to the cell wall hydrolase domains of *LytE* and *LytF* at their C-terminal ends. The C-terminal region of *CwlS* could hydrolyze the linkage of D- $\gamma$ -glutamyl-meso-diaminopimelic acid in the cell wall of *B. subtilis*, suggesting that *CwlS* is a DL-endopeptidase.  $\beta$ -Galactosidase fusion experiments and Northern hybridization analysis suggested that the *cwlS* gene is transcribed during the late vegetative and early stationary phases. A *cwlS* mutant exhibited a cell shape similar to that of the wild type; however, a *lytE lytF cwlS* triple mutant exhibited aggregated microfiber formation. Moreover, immunofluorescence microscopy showed that FLAG-tagged *CwlS* was localized at cell separation sites and cell poles during the late vegetative phase. The localization sites are similar to those of *LytF* and *LytE*, indicating that *CwlS* is involved in cell separation with *LytF* and *LytE*.

Next we investigated that the *LysM* domain of *LytF* specifically recognized naked peptidoglycan in cell wall. In addition, immunofluorescence microscopy of *CwlE*-6xFLAG with several mutants in the teichoic acid biosynthesis pathway indicated that the *CwlE*-6xFLAG localized upon not only cell separation sites and poles but also cylindrical part of the rod-shaped cells in a helical manner. These results strongly suggested that peptidoglycan modification by major and minor wall teichoic acids might mainly occur in the cylindrical part of a rod-shaped cell. Moreover, very similar helical patterns upon the lateral cell surface were observed in the essential *MreB* cytoskeleton-depleted cells. These results strongly suggested that cell wall modification by major and minor wall teichoic acids might mainly occur in an *MreB*-dependent manner upon the lateral cell surface.

## 研究目的

細菌の細胞壁は、バイオポリマー・バイオファイバーの中でも最も複雑で多機能な物質である。浸透圧からの細胞の保護とともに、細胞外との相互作用に関係する糖や蛋白質、細胞壁の修飾・分解や蛋白質分解に関わる酵素などの局在部位の場も提供している。枯草菌では細胞分裂の際に合成される隔壁部分と、筒状のシリンジ部分では異なる細胞壁合成メカニズムが機能していることが明らかになっている。細胞壁は静的なものではなく、常に細胞増殖に応じて合成・修飾・分解されており、それらがどのように細胞表層で保たれているかを知ることは、バイオポリマー・バイオファイバー創製の新しいモデルとなり得ると思われる。そこで本課題では枯草菌の新たな細胞壁溶解酵素・修飾酵素の特性を明らかにすること、及び細胞壁の重要な構成成分である陰イオンポリマーのテイコ酸がどのように細胞壁を修飾しているのかそのメカニズムの解明を目的として研究を行った。

## 5年間の研究内容と成果

細菌の細胞壁の主要成分としてペプチドグリカンがよく知られているが、枯草菌では栄養細胞のペプチドグリカンとともに、胞子中にもコルテックスと呼ばれるペプチドグリカンが存在する。胞子コルテックスはその成分にムラミン酸- $\delta$ -ラクタム構造を含み、この構造は胞子の発芽にとって必須の役割を担っている。即ちこの構造の欠損は、胞子が発芽出来なくなり、それゆえ胞子を形成したあとは増殖が出来ない細胞となる。多糖デアセチラーゼのホモログである PdaA を精製し、*in vitro* で基質に栄養細胞のペプチドグリカンを使って反応させたところ、ペプチドグリカンの脱アセチル化はほとんど生じなかった。しかしペプチドグリカンのペプチド鎖を、L-アラニンアミダーゼ処理により除いたグリカンを基質とした場合では、PdaA により顕著に脱アセチル化が行われた。また最終的には PdaA が、*N*-アセチルムラミン酸デアセチラーゼであることを酵素化学的に証明した。

枯草菌の新たな細胞壁溶解酵素である YvcE (Cwl0) は、N 末端に分泌シグナル配列を持ち、C 末端に DL-endopeptidase family II に分類される細胞壁溶解酵素群とアミノ酸レベルで高い相同性を有している。この酵素は栄養増殖期に生産され、細胞壁結合画分ではなく培養液中に分泌されることが明らかになった。また C 末端側の細胞壁溶解酵素ドメインのみを含む C-Cwl0-6His 蛋白質は強い細胞壁溶解活性を示した。さらに細胞壁の分解産物について逆相 HPLC を用いて解析した結果、予想されたように DL-endopeptidase であることが解った。

またファージ由来の LD-endopeptidase とアミノ酸レベルで高い相同性を示す YcdD は、栄養増殖期に生産され、細胞壁結合画分ではなく培養液中に分泌されることが明らかになった。また大腸菌を用いて大量発現させた 6His-YcdD 蛋白質は顕著な細胞壁溶解活性を示した。さらに細胞壁の分解産物について逆相 HPLC を用いて解析した結果、予想されたように LD-endopeptidase であることが解った。この結果は、枯草菌において酵素学的に LD-endopeptidase であることが証明された最初の例である。

また細胞分離酵素である LytE や LytF と高い相同性を有する CwlS (YojL) は、N 末端に 4 回の LysM リピートを持ち、C 末端に DL-endopeptidase family II に分類されるドメインを有している。転写解析により、この酵素は栄養増殖後期から定常期初期に生産されることが明らかになった。*cwlS* の単独変異株は野生株と比べてほとんど変化は見られなかった。しかしながら *lytE*, *lytF*, *cwlS* の三重変異株は、顕著に繊維状化した細胞が絡まった表現型を示した。さらに CwlS-3xFLAG を用いた局在部位解析により、この酵素は LytE や LytF と同様に、細胞の分裂面及び両極に局在することが明らかになった。これらの結果は、CwlS が枯草菌における第 3 の細胞分離酵素であることを示していた。

これまでの研究により細胞分離に関与する細胞壁溶解酵素 LytF が、栄養細胞の分裂面及び分裂後の両極に局在し、LytF の N 末端側に存在する LysM ドメインがこの酵素の局在性に重要な役割を演じていることを明らかにした。また細胞壁結合実験の結果から、LysM ドメインは細胞壁のペプチドグリカンの特異的に認識・結合していることを明らかにした。またペプチドグリカンがテイコ酸等の陰イオンポリマーにより修飾されていると LysM ドメインは結合できないことも解った。さらに LytF-6xFLAG を用いた局在解析により、細胞壁のマイナーテイコ酸合成遺伝子を破壊した株では LytF は筒状のシリンジ部分にも螺旋状に局在し得ることが明らかになった。また必須遺伝子であるテイコ酸合成遺伝子産物 (Tag0, TagF, TagA) を枯渇させた場合にも、同様な螺旋状の局在パターンが観察された。これらの結果から分裂面とシリンジの部分では細胞壁のテイコ酸による修飾が異なっており、分裂面及び分裂後の両極の細胞壁はテイコ酸による修飾が非常に乏しい、もしくはほとんど受けていない可能性が考えられた。一方、細胞側面のシリンジ部分ではテイコ酸が豊富であり、その修飾は螺旋状に行われている可能性が示唆された。さらに興味深いことに、機能未知のアクチン様細胞骨格蛋白質である MreB を枯渇させた場合にも、細胞側面のシリンジ部分において LytF の螺旋状局在パターンが観察された。このことから細胞側面のシリンジ部分では、テイコ酸による細胞壁の修飾が MreB 依存的かつ螺旋状に行われている可能性が考えられた。