

## 関口順一・山本博規

目的別テーマ：バイオファイバー生合成機構の解明

17 年度研究テーマ

15-2-14：細胞壁合成・修飾・分解機構の研究

### ABSTRACT

*Biosynthesis, modification and degradation of cell wall are stringently controlled in bacteria. First of all, we demonstrated that a novel ycdD gene encodes a vegetative cell wall hydrolase. 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. A 6xHis-tag-fused YcdD (h-YcdD) protein retained a murein hydrolase activity. The RP-HPLC and mass spectrometry showed that h-YcdD 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. Second we investigated that the major cell separation enzyme, CwlE, in B. subtilis specifically bound to naked peptidoglycan in cell wall. In addition, immunofluorescence microscopy 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. Moreover, very similar helical patterns upon the lateral cell surface were observed in the essential MreB cytoskeleton-depleted cells. These results strongly suggested that peptidoglycan 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。その生合成・修飾・分解は、絶妙なバランスが保たれることにより維持されている。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。細胞壁合成・修飾・分解のメカニズムを詳細に解明することは、新たなバイオポリマー・バイオファイバー創製において重要なヒントになり得る可能性が考えられる。そこで本課題では枯草菌における新たな細胞壁溶解酵素の細胞壁分解特性を明らかにすること、栄養増殖期の細胞分離において重要な役割を演じている細胞壁溶解酵素 CwlE の細胞分裂面への局在メカニズムの解明、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修飾機構の解明を目的として研究を行った。

### 一年間の研究内容と成果

枯草菌の新たな細胞壁溶解酵素である YcdD は、N 末端に分泌シグナル配列を持ち、C 末端にファージ由来の LD-endopeptidase 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。また大腸菌を用いて大量発現させた 6His-YcdD 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 LD-endopeptidase であることが解った。これ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。

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 CwlE は分裂面及び分裂後の両極に局在すること、CwlE 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、および細胞壁構成成分中のペプチドグリカンの特異的に認識して結合し、テイコ酸等の陰イオンポリマーによりその結合が阻害されることを明らかにしてきた。本年度は必須遺伝子産物であるテイコ酸合成蛋白質を枯渇させた細胞において、CwlE は分裂面及び分裂後の両極だけでなく筒状のシリンジ部分にも螺旋状に局在する事が明らかになった。またさら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同様に、細胞側面のシリンジ部分において CwlE の螺旋状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度が異なる

っており、さらに細胞側面のシリンジ部分では MreB 依存的かつ螺旋状にテイコ酸による修飾が行われている可能性が示唆された。

## 展望

細胞壁の生合成・修飾・分解機構を総合的に研究することにより様々な応用面への発展が期待できる。さらに微生物を使った物質生産において、細胞が溶解されにくい宿主の開発につながる可能性が考えられる。またテイコ酸によるペプチドグリカンの修飾メカニズムの解明につながる可能性がある。