

氏名 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

15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

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 Bacillus subtilis. PdaA-deficient spore did not lead to germination and this mutant completely lacked muramic- δ -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. On the other hand, cell surface targeting of peptidoglycan hydrolases was investigated by the immuno-fluorescence microscopy with 3xFLAG tagged protein, and localization of three proteins was identified.

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。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も思われる。そこで本課題では、枯草菌の細胞壁について、特にペプチドグリカンの修飾の観点から解析を行った。

一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、胞子中にもペプチドグリカンが存在する。後者のペプチドグリカンを特にコルテックスと呼ばれており、栄養細胞のペプチドグリカンと幾つかの点で異なっている、胞子コルテックスはその成分にムラミン酸- δ -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。私たちはこの遺伝子の解析を分子生物学的、酵素化学的に行った。多糖デアセチラーゼのホモログと考えられている PdaA といわれる遺伝子産物を精製し、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をペプチド鎖を除去する酵素、L-アラニンアミダーゼで反応させ、ペプチド鎖を除いたグリカンを基質とした場合は PdaA により顕著に脱アセチル化が行われた。これらの結果より、コルテックス中のムラミン酸- δ -ラクタムの生合成経路を提唱した。

一方細菌細胞が増殖し、2つに分裂するとき、細胞を囲んでいた細胞壁も必ず切断される必要がある。そこでそのような部位(細胞分裂部位)を認識し、結合する蛋白を明らかにする目的で、細胞壁溶解酵素に 3xFLAG タグをつけ、細胞増殖時の細胞壁溶解酵素の局在を、3xFLAG に対する 1次抗体、1次抗体に対する FITC conjugated の 2次抗体を使い、蛍光顕微鏡で局在部位を同定する手法を開発した。その結果、主自己溶解酵素 CwlB (LytC) は細胞表層全体に局在するのに対し、LysM ドメインを持つ細胞壁溶解酵素 CwlF (LytE), CwlE (LytF) はともに細胞分裂・分離部位に局在していた。このように細胞壁溶解酵素の結合部位が異なることは、細胞壁の構造が、細胞分裂・分離部位と他の部位で異なることを示唆している。

展望

細胞表層構造を人為的に修飾できるため、微生物を使った物質生産にとって、細胞が溶解されにくい細胞表層構造に変化させることができる可能性がある。また PdaA がキチン脱アセチル化酵素と高いホモロジーがありキチンの修飾の側件からも興味深い。一方後者の研究成果から細胞分裂・分離部位に局在する細胞壁溶解酵素が、分裂・分離面で如何に細胞壁を限定分解しているかを明らかにできる可能性がある。