

27. バクテリアにおける細胞骨格蛋白質の機能解明

信州大学 繊維学部 応用生物学系

准教授 山本博規

信州大学 繊維学部 応用生物学系

助教 福島達也

1. 研究目的

細菌細胞壁におけるペプチドグリカン (PG) は細菌にとって必須のコンポーネントであり、原核生物特異的な構造であることから、その生合成機構は新規抗菌物質のスクリーニングにおいて非常に興味深いターゲットとなっている。またこれまでのポストゲノム解析により、枯草菌のPGを修飾している細胞壁テイコ酸 (WTA) 生合成遺伝子群も、その多くが増殖に必須であることがわかっている。当研究室ではPG特異的に結合する細胞分離酵素LytFの局在メカニズムを調べる過程で、細胞側壁のWTA修飾が(細胞骨格蛋白質である)MreB依存的に螺旋状に行われている可能性を見出した。しかしながらこの結果はWTAを直接検出したものではなく、LytFがPG特異的に結合する性質を利用することにより、WTA修飾されていないPG領域を検出した結果であった。そこで本研究では、グルコースを特異的に認識するレクチンであるConcanavalin Aを用いて、WTAに含まれるグルコースを直接検出することにより、細胞壁のWTA修飾機構を明らかにすることを試みた。また、新たに合成された細胞壁のどの部位でWTA修飾が行われているのか、さらにその位置の制御がどのようなメカニズムにより行われているのかを明らかにすることを目的とした。

2. 研究概要

2.1 細胞側壁におけるWTA修飾パターンの観察

major WTAを修飾しているグルコースを特異的に認識することが明らかになっている蛍光標

識レクチンConcanavalin A (ConA-TMR)を用いて、細胞壁のmajor WTA修飾がどのようなパターンで行われているのか明らかにすることを試みた。この目的のために、major WTAのグルコース修飾を担っている酵素をコードしている*tagE*の発現を、IPTG制御可能な条件変異株を構

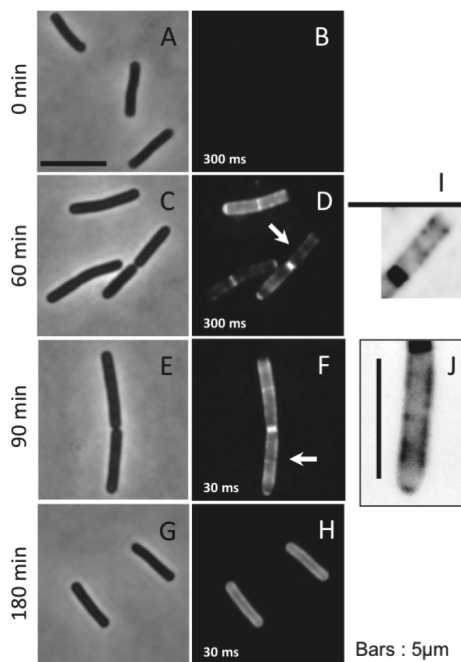


図1 *tagE*誘導細胞におけるWTA修飾パターンの観察
位相差イメージ (A, C, E, G)、ConA-TMR染色イメージ (B, D, F, H)、および矢印の細胞を拡大し、明暗を反転させた (I, J)。撮影時の露光時間はConA-TMR染色イメージ中に示した。

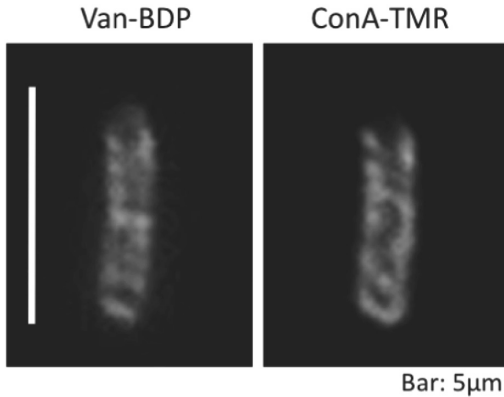


図2 TagE 誘導細胞における Van-BDP および ConA-TMR による共染色

染した。IPTGを添加していない状態の培養液にIPTGを添加すると、新たにグルコース修飾がなされた major WTA が細胞壁に取り込まれ始める。その様子を経時的に観察した結果を図1に示した。IPTG添加後60 minの細胞側壁に螺旋状の染色パターンが観察され始め、その後細胞全体が均一に染色された。このことは、細胞側壁のWTA修飾が螺旋状に行われている可能性を強く示唆していた。

2.2 細胞側壁におけるPG合成部位とWTA修飾部位の一致性

枯草菌の細胞側壁におけるPG合成は、螺旋状に行われていることが報告されている。そこで螺旋状に行われている細胞側壁のmajor WTA修飾部位と、PG合成部位が同じ場所で行われているのかどうか明らかにすることを試みた。この目的のために、前述のtagE条件変異株を用いて、ConA-TMRと抗生物質であるバンコマイシンの蛍光標識化合物 (Van-BDP) との共染色を行った。図1で観察された螺旋状のmajor WTA修飾パターンと、新たに合成されたPG合成部位が一致するかどうか観察した。その結果、細胞側壁におけるPG合成部位と、major WTA修飾部位は、ほぼ一致していることが明らかになった(図2)。この結果は、細胞側壁におけるPG合成とWTA修飾は、非常に近い場所で行われている可能性を強く示唆していた。

2.3 WTA修飾と細胞骨格蛋白質との関連性

枯草菌の細胞側壁におけるPG合成位置の制御は、アクチン様細胞骨格蛋白質のMreBおよびMblによって行われていることが明らかになっている。そこで細胞側壁におけるWTA修飾部位の制御に、細胞骨格蛋白質が関与しているのかどうか明らかにすることを試みた。この目的のためにmreBホモログの条件変異株を構築し、それらの株におけるConA-TMR染色パターンを調べた。その結果、MreB枯渇細胞の細胞側壁においてのみ、ConA-TMRによって染色されない螺旋状のパターンが観察された(図3)。すなわちMreBを枯渇させた細胞では、新たなPG合成部位において、WTA修飾が行われていない可能性が考えられた。この結果から、細胞側壁で行われている螺旋状のWTA修飾は、MreBにより制御されている可能性が示唆された。

3. 発表

1. 山本博規, バクテリアにおける細胞骨格蛋白質

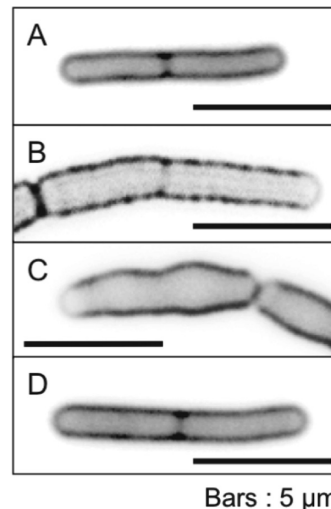


図3 各種アクチン枯渇細胞における観察されたConA-TMR染色パターン
野性株 (A) および MreB (B)、Mbl (C)、MreBH (D) 枯渇細胞について ConA-TMR 染色を行い、得られた画像の明暗を反転させた。

- 質の機能解明, 倉田奨励金研究報告, 40巻, 99-101 (2010)
2. 山本博規, 細菌細胞壁の合成・修飾・分解機構の解明, 財団法人長瀬科学技術振興財団研究報告集, 21巻, 89-96 (2010)
 3. 久米田慶裕, 萩野裕哉, 関口順一, 山本博規, 枯草菌における細胞壁テイコ酸修飾メカニズムの解析, グラム陽性菌ゲノム機能会議 (木曾, 2010)
 4. 矢澤一也, 山根久彌, 渡邊卓巳, 山本博規, 枯草菌LytFの局在性におけるリポテイコ酸の影響, グラム陽性菌ゲノム機能会議(木曾, 2010)
 5. 橋本昌征, 山本博規, 関口順一, 枯草菌における細胞の分離, 繊維と工業, 65巻, 282-286 (2009)
 6. 矢澤一也, 山根久彌, 山本博規, 枯草菌LytFの局在に及ぼすリポテイコ酸の影響, 日本農芸化学会 (東京, 2010)