

る。さらに、APE\_1267.1 タンパク質発現産物についてはタンパク質の結晶化に成功した (図 1)。

最後に本研究を遂行するにあたり、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学会奨励会に深く感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 大島敏久, 櫻庭春彦, 川上竜巳, 里村武範, 津下英明. 日本応用酵素協会誌, **43**, 33 (2008).
- 2) Satomura, T., Kawakami, R., Sakuraba, H., and Ohshima, T.

*J. Biol. Chem.*, **277**, 12861 (2002).

- 3) Sakuraba, H., Takamatu, Y., Satomura, T., Kawakami, R., and Ohshima, T. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1470 (2001).
- 4) Tani, Y., Itoyama, Y., Nishi, K., Wada, C., Shoda, Y., Satomura, T., Sakuraba, H., Ohshima, T., Hayashi, Y., Yabutani T., and Motonaka, J., *Anal. Sci.*, **25**, 919-23 (2009).
- 5) Satomura, T., Zhang, X. D., Hara, Y., Doi, K., Sakuraba H., and Ohshima, T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1075-1082 (2011).

## リボソーム蛋白質が分解制御因子として機能する新規ポリアミン合成制御機構に関与するプロテアーゼの特性解明

山形大学大学院理工学研究科 高塚由美子

### 【背景と目的】

ポリアミンは、分子中にアミノ基を 2 個以上有する低分子脂肪族アミン類の総称であり、すべての生体内に遊離の形で存在し、核酸や蛋白質の合成促進・酵素活性の調節など多岐にわたる生理作用を発揮することが知られている。ところが、反芻動物の第一胃（ルーメン）の主要共生菌で偏性嫌気性の *Selenomonas ruminantium* 他、数種のグラム陰性細菌においては、細胞壁ペプチドグリカン (PG) に、カダベリン、プトレシン、およびスベルミジン等のポリアミンが共有結合して存在し、外膜の安定化に必須の役割をもつ<sup>1)</sup>。生体高分子に共有結合したポリアミンの新規な生理機能の例であるとともに、細菌の表層構造安定化因子としては通説であるムレインリボ蛋白質を欠くこれらの細菌における、新規な表層膜安定化機構としてその詳細の解明が期待されている。2010 年には新知見として、*S. ruminantium* の外膜主要蛋白質 Mep45 と PG 結合型カダベリンとの相互作用が本安定化機構に重要であることが解明され<sup>2)</sup>、さらに本菌ではカダベリンが PG 結合型ポリアミンの分子種として、薬剤耐性や高温での生育において、他のポリアミンでは置き換えられない機能をもつことも証明された<sup>3)</sup>。

一方、*S. ruminantium* において PG 結合型主要ポリアミンはカダベリンであるが、カダベリン生合成に必須な本菌のリジン/オルニチン脱炭酸酵素 (LDC/ODC) は、既知の原核生物酵素とは構造・性質ともに全く異なり、真核生物オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) と同起源を有する。さらに、本酵素蛋白質は菌体生育の定常初期において急激に分解される厳密な制御を受け、本分解機構には本菌のリボソーム構成蛋白質 L10 [発見当初は 22 kDa 蛋白質 (P22)

と命名] が分解促進因子として機能することが明らかにされた<sup>1), 4)</sup>。L10 の本機能は、「原核生物には存在しない」とされていたアンチザイム (真核生物 ODC 分解制御におけるポリアミン誘導性の調節蛋白質) に類似しているが、現在までに、他の蛋白質の分解に積極的に関わるようなリボソーム蛋白質の機能についての報告はないことから、本新規蛋白質分解制御機構の解明は、リボソーム蛋白質の新機能解明にもつながる可能性がある。これまでに本制御機構および PG 結合型ポリアミンの機能について明らかとなっている事項を、図 1 に概説した。

*S. ruminantium* の LDC/ODC 分解制御機構に関わるプロテアーゼについては、細胞質内に存在する ATP 依存性セリンプロテアーゼであることが明らかにされているが<sup>1), 4)</sup>、その精製および特性解明には至っていない。本研究では、生物で初めて見出されたりボソーム構成蛋白質 L10 が分解促進因子として機能する LDC/ODC 分解制御機構の全容解明を目標に、まず本機構に関わるプロテアーゼの特性解明を目的とした。

### 【結果および考察】

#### 1. ATP 依存性セリンプロテアーゼ候補遺伝子の取得

これまで、*S. ruminantium* から本プロテアーゼの精製を試みてきたが、LDC/ODC 酵素蛋白質の分解を指標とする活性測定方法の煩雑さに加えて、精製過程において非常に失活しやすい本プロテアーゼの性質から、成功していなかった。そこで今回は、東北大学大学院農学研究科および NITE (独立行政法人製品評価技術基盤機構) との共同研究によって、2009 年に決定された *S. ruminantium* の全ゲノム配列 (投稿準備中) を参考にしたアプローチにより、本プロテアーゼの候補となる ATP 依存性セリンプロテアーゼ遺伝子を取得することとした。

*S. ruminantium* のゲノム上に予測されていた 3,734 の open reading frames (2009 年 11 月時点) の中から、まずペプチダーゼ候補遺伝子 123 件を抽出し、これらについて

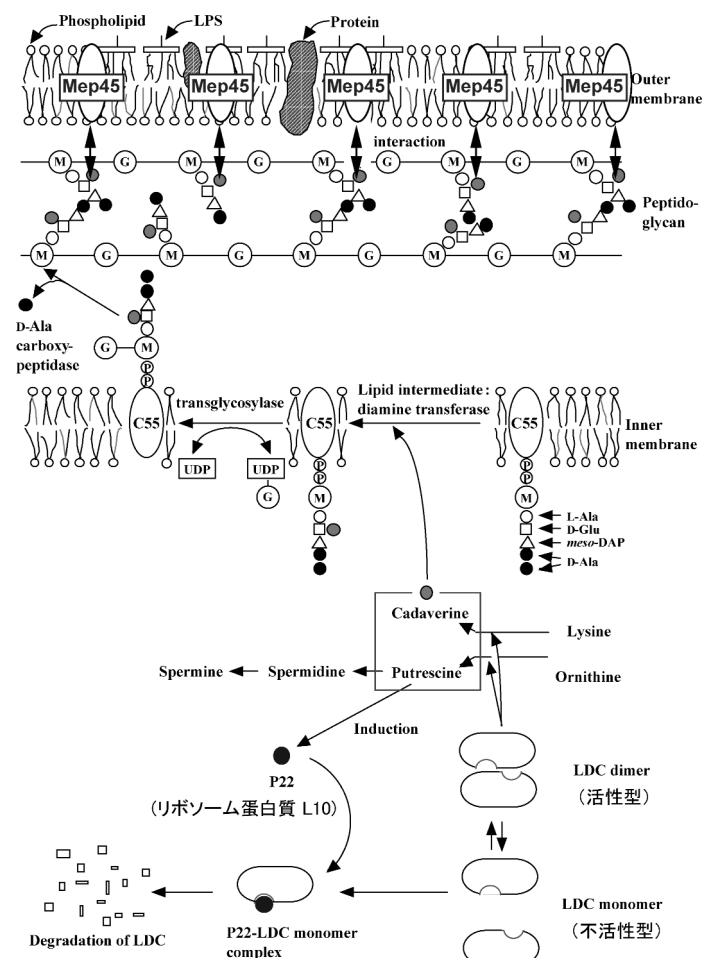


図1 *S. ruminantium* におけるカダベリン結合型ペプチドグリカン (PG) の合成, Mep45 を介した外膜-PG 安定化機構, および P22 (L10) を介した LDC 分解制御機構 (文献 1 の図を一部改変). 真核生物 ODC と同起源を有し, ODC 活性も併せもつ本菌の LDC/ODC (図中では LDC と記載) は, 細胞質でカダベリンとブトレシンの両方を合成する. カダベリンは, 細胞質膜に存在する lipid intermediate:diamine transferase により PG に組み込まれ, 外膜主要蛋白質 Mep45<sup>2)</sup> のペリプラズムに露出した S-layer homologous domain との相互作用により外膜-PG 間の強固なリンカー形成に必須に働く. 一方, 定常期初期に PG のポリアミンが飽和すると細胞質内には遊離ポリアミンが蓄積し, ブトレシンにより P22 (L10) が誘導される. P22 は LDC 単量体のアンチザイム結合部位に解離定数  $10^{-11}$  M の強度<sup>4)</sup>で結合して P22-LDC 複合体を形成し, これが ATP 依存性セリンプロテアーゼに認識されて, LDC が P22 とともに分解される.

ペプチダーゼのデータベースである MEROPS<sup>5)</sup>を参照した結果, セリンプロテアーゼ候補遺伝子が 13 件抽出された. さらに ATP 依存性と推測されるプロテアーゼ遺伝子を絞り込んだ結果, SR1\_chromosome\_0011 (ATP-dependent protease, 1,989 bp, 662 アミノ酸残基をコード), SR1\_chromosome\_1624 (ATP-dependent protease La, 2,304 bp, 767 アミノ酸残基をコード), および SR1\_chromosome\_1626 [ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (*clpP*), 612 bp, 203 アミノ酸残基をコード] の 3 遺伝子が候補として浮かび上がった. この中でも特に, SR1\_chromosome\_1626 遺伝子に着目した. 本遺伝子産物と推定される ClpP 型プロテアーゼは, 真核生物 ODC の分解に関わる巨大プロテアーゼ複合体である 26S プロテアソームの原型ともされ, リング上の 7 量体あるいはそれ

が二つ積み重なった 14 量体を形成し, 蛋白質分解活性の発現には AAA<sup>+</sup> super family に属する ATP 結合サブユニット (リング上の 6 量体を形成し, ATPase 活性を有する) との巨大複合体を形成する必要がある. また, 基質となる蛋白質に存在するプロテアーゼ複合体により認識されるシグナル配列, または認識を仲介するアダプター蛋白質が必要であることも知られており, *S. ruminantium* LDC/ODC 分解機構における L10 がアダプターとして機能している可能性も考えられた. 他の 2 つの候補遺伝子産物と相同性の高いプロテアーゼにおいては, このようなアダプター因子は必要ないとされている.

以上のことより, まず SR1\_chromosome\_1626 遺伝子産物である ClpP 型プロテアーゼによる *S. ruminantium* LDC/ODC の L10 依存的な分解を検証するため, 本遺伝

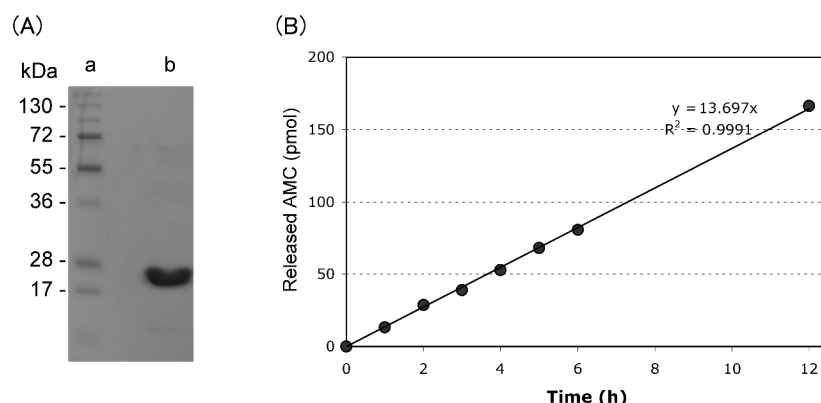


図2 精製プロテアーゼ標品の SDS-PAGE および ペプチダーゼ活性測定.

(A) *S. ruminantium* ClpP (sClpP) 精製標品の SDS-PAGE. a: 分子量マーカー, b: sClpP 精製標品. (B) 精製標品を用いたペプチダーゼ活性測定. Suc-Leu-Tyr-AMC を基質とし, ペプチダーゼ活性により遊離する AMC の量を, 蛍光強度 (Ex 360 nm, Em 455 nm) から換算した. 反応系 50  $\mu$ l には, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM Suc-Leu-Tyr-AMC, および 20  $\mu$ g sClpP 精製標品を含み, 反応は 37 $^{\circ}$ C, 遮光下で行った. 精製標品を含まないコントロールでは, 12 時間後においても蛍光は検出されなかった.

子をクローニングすることとした. また, AAA<sup>+</sup> family に属する ATP 結合サブユニット相当遺伝子 (*clpX*) として, 本菌ゲノム上には SR1\_chromosome\_1625 (1,266 bp, 421 アミノ酸残基) および SR1\_chromosome\_0349 (1,278 bp, 425 アミノ酸残基) の 2 つが存在したが, 前者が SR1\_chromosome\_1626 (*clpP*) の下流に位置してクラスターをとっていたため, 同時にクローン化を行った.

## 2. 候補プロテアーゼの大量発現系の構築と組換え蛋白質の精製

*S. ruminantium* の培養菌体から調製した熱抽出物を鋳型とし, PCR により得た SR1\_chromosome\_1626 (*clpP*) および \_1625 (*clpX*) を含む約 1.9 kbp の増幅断片を, プラスミド pET15b にクローン化して両遺伝子の発現用プラスミド pXP7 を構築した. pXP7 からは, T7 プロモーターの制御下に *clpP* および *clpX* をタンデムに発現させられると予想した. pXP7 を大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し発現を誘導した結果, 可溶性画分に SR1\_chromosome\_1626 遺伝子産物 (*S. ruminantium* ClpP, 以後 sClpP と記す) と推定される約 24 kDa の蛋白質が大量に得られた. しかし, クラスター下流の SR\_chromosome\_1625 (*clpX*) 遺伝子産物については明確な発現を確認できなかったことから, 別途, 単独での発現系を構築中である.

大量発現を確認できた sClpP の精製を, 当初, 組換え蛋白質の N 末端側に付加した His-tag を利用して Co<sup>2+</sup> カラムを用いて試みたが, どうしてもカラムに吸着させることができなかった. 後にも述べるが, 組換え sClpP の N 末端配列部分が, 高次構造をとった sClpP 7 量体の内部に入り込んでいることなどが原因と推測された. そこで, ポ

リエチレンイミンを用いた塩析, DEAE-5PW 陰イオン交換クロマトグラフィー, およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行い, 100 ml の培養菌体 (265 mg 湿菌重) から SDS-PAGE で単一バンドとなる精製標品 1.6 mg を得た (図 2-A).

## 3. 精製プロテアーゼ標品のペプチダーゼ活性測定, および N 末端アミノ酸配列の解析

ゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出結果より, 精製標品中の sClpP は 14 量体と 7 量体が 8:2 の比率で存在していると推測された (データ省略). 一般に, ClpP 型プロテアーゼの 14 量体は, ATP 結合サブユニットとの複合体を形成していない状態では, 短いペプチドを分解できることが知られている. 基質として N-succinyl-Lue-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Suc-Lue-Tyr-AMC) を用い, ペプチダーゼ活性により遊離する AMC の蛍光強度を測定することでペプチダーゼ活性を評価した<sup>6)</sup>. その結果, sClpP 精製標品が本活性を有することが確認でき, 比活性は 0.685 pmol/h $\cdot$  $\mu$ g of protein と求められた (図 2-B). これは, 大腸菌 ClpP のペプチダーゼ活性 (1.667 pmol/h $\cdot$  $\mu$ g of protein)<sup>6)</sup>と比較すると, 約 1/2,430 という低い値であった. 他の既知の ClpP 型プロテアーゼとの違いについては諸性質を検討し, 本プロテアーゼの特性を明らかにする必要がある.

また, 抗 His-tag 抗体による免疫染色において, 菌体破碎直後は検出できた組換え sClpP が, 精製標品では染色されないという現象が見られたことから (データ省略), 精製標品の N 末端アミノ酸配列の解析を行った. その結果, 付加した His-tag を含むベクター由来の 20 アミノ酸

残基, およびそれに続く sClpP 由来の 2 アミノ酸残基までが消化されていた。精製過程において自己分解が起きている可能性が示唆されたが, His-tag 配列が検出される状態でも  $\text{Co}^{2+}$  カラムに吸着しなかったことや, ClpP 型プロテアーゼの活性中心が 7 量体リング構造の内部にあることなどを含め, 自己分解については今後の詳細な検討が必要である。

#### 【今後の課題】

sClpP 組換え蛋白質の精製およびペプチダーゼ活性の確認までは行うことができたが, 本プロテアーゼによる LDC/ODC 分解の確認には至っていない。ATP 結合サブユニット (ClpX) と推定される 2 種類の遺伝子産物の組換え体を取得し, sClpP との相互作用や組み合わせの違いによる基質特異性の差異などの特性も検討した上で, 本プロテアーゼの L10 依存的な LDC/ODC 分解活性について検

証することが, 今後の課題である。

最後になりましたが, 本研究を遂行するにあたり, 研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) Takatsuka, Y. and Y. Kamio. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1-19 (2004).
- 2) Kojima, S., K.-C. Ko, Y. Takatsuka, N. Abe, J. Kaneko, Y. Itoh, and Y. Kamio. *J. Bacteriol.*, **192**, 5953-5961 (2010).
- 3) Kojima, S., J. Kaneko, N. Abe, Y. Takatsuka, and Y. Kamio. *J. Bacteriol.*, **193**, 2347-2350 (2011).
- 4) Yamaguchi, Y., Y. Takatsuka, S. Matsufuji, Y. Murakami, and Y. Kamio. *J. Biol. Chem.*, **281**, 3995-4001 (2006).
- 5) <http://merops.sanger.ac.uk/>, 2009 年 11 月時点における Release 8.5 を使用した。
- 6) Woo, K. M., W. J. Chung, D. B. Ha, A. L. Goldberg, and C. H. Chung. *J. Biol. Chem.*, **264**, 2088-2091 (1989).

#### 葉緑体分裂開始因子 FtsZ のライブイメージング解析

東京大学大学院総合文化研究科

(現 上智大学理工学部物質生命理工学科) 藤原 誠

#### 【背景と目的】

葉緑体に代表される二層膜オルガネラ色素体は, 光合成, 脂肪酸合成など植物細胞で多彩な機能を担う。色素体は, 進化的にシアノバクテリアの祖先が派生したものであり, 高等植物では組織や外界環境に応じて複雑に分化する。一般に一細胞あたりの色素体数は数十から数百に達し, それは既存の色素体の分裂によって決まる。過去十数年間, 葉緑体の分子制御に関しては詳細な解析がなされてきた。結果, 葉緑体分裂は原核生物由来の保存的機構と細胞内共生過程で得た膜分裂機構が協調してはたらくプロセスであること, 分裂の初期イベントは核コード・原核型 FtsZ がストロマ側内包膜面上でリング構造 (FtsZ リング) を形成することなどが示されてきた<sup>1)</sup>。

近年, 私たちは, 核コード・FtsZ の一つ FtsZ1 と GFP との融合タンパク質 (FtsZ1-GFP) を発現するシロイヌナズナ系統を用いて, 葉緑体分裂開始メカニズムの研究を進めてきた<sup>2)</sup>。形質転換植物における GFP 使用の利点は, 広範な組織の中から任意の場所を選び, 時間軸に沿って分子やオルガネラの挙動を追跡できる点にある。私たちは偶然, シロイヌナズナ花粉の中にも FtsZ1-GFP シグナルが存在することに気が付いた。多くの植物では色素体は母性遺伝し, それには花粉色素体と核様体 DNA の挙動が深く

関与している。2009 年当時, 花粉色素体のライブ動態に関する知見はなかった。FtsZ1-GFP は葉緑体ストロマと FtsZ リング双方を標識しうることから<sup>2)</sup>, 花粉の色素体解析にも有用であることが期待された。本研究は<sup>3)</sup>, FtsZ1-GFP を用いて花粉色素体の動態と FtsZ の役割を検証したものである。

#### 【結果】

##### 1. 花粉における FtsZ1-GFP の局在

花粉粒中の FtsZ1-GFP シグナルは微弱であったため, まず高感度蛍光観察条件を求めた。以下の実験はその条件に基づいて行った。FtsZ1-GFP の発現特異性及び細胞内局在を明らかにするため, 蛍光色素 Hoechst 33342 により核染色を行った。FtsZ1-GFP は雄原細胞や精細胞では検出されず, 花粉栄養細胞特異的であった。続いて電子顕微鏡により花粉色素体を検出し, GFP の蛍光パターンと比較した。色素体の大きさ・形は GFP が標識する構造と一致した。以上より, FtsZ1-GFP は基本的に色素体ストロマ全体に局在することが示唆された (図 1a)。

##### 2. 花粉色素体の増殖における FtsZ の役割

FtsZ1-GFP で標識された色素体は, 栄養細胞全体に散らばっていた (図 1a)。成熟花粉の色素体は直径 0.3-3.1  $\mu\text{m}$ , 数は一細胞あたり 25-80 個であった。成熟前の花粉も調べたところ, 色素体は直径 0.7-4.1  $\mu\text{m}$ , 数は一細胞あたり 27-93 個であった。即ち, 花粉形成の後期過程で色素体数の劇的な増加は認められなかった。