

藍藻及び原始植物葉緑体の表層膜安定化機構の解明とその進化的関連性の解析

東北大院・生命、東北大・学際研 児島征司

1. 研究目的

葉緑体は藍色細菌（藍藻）の原始真核細胞への細胞内共生により生じた。藍藻が細胞小器官である葉緑体へと変換する過程では、少なくとも①宿主細胞と（ある程度）同調して分裂増殖すること、②宿主細胞との物質的やり取りを可能にするための表層膜の機能変換、③藍藻DNAの宿主細胞核への大規模移行、の三つが要求される。①・③に関しては研究が大きく進んでいるが、一方で②の表層膜機能変換に関する知見は乏しい。本研究では、藍藻および葉緑体の最外層を形成する外膜に焦点を当て、藍藻から葉緑体への変換過程で外膜にどのような変化があったかを解明することを目的とした。

藍藻はグラム陰性細菌に分類される。グラム陰性細菌の細胞表層は内膜、細胞壁ペプチドグリカン（PG）、外膜で形成される。外膜は生育阻害物質の細胞内への流入および細胞内成分の細胞外への漏出を阻止する透過障壁としての機能を持つ。一方、外膜の安定的維持には細胞あたり 10^6 分子程度の外膜-PG間接着蛋白質を必要とする。従って藍藻が細胞小器官である葉緑体へと変換する過程では、外膜の安定性を保持しつつ、宿主との物質のやり取りを可能にするための外膜機能の変換が必要である（図1）。本変換過程をより詳しく理解するため、藍藻と類似した表層構造を残す、最も原始的な葉緑体とされるcyanelleと呼ばれる灰色藻（*Cyanophora paradoxa*）の葉緑体（藍藻由来の細胞壁ペプチドグリカンを有する）を本研究の対象とした。私はこれまで、グラム陰性細菌の外膜透過性と安定性を研究してきたが（1-5）、本研究では、グラム陰性細菌外膜に関する研究手法をcyanelle外膜に適用し、cyanelleにおける外膜-PG間接着蛋白質の単離・同定および外膜透

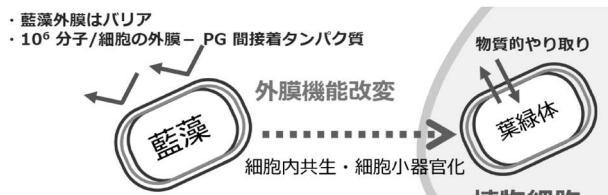


図1 藍藻から原始葉緑体（cyanelle）への変換過程で要求される外膜機能変換。外膜の安定性を保持しつつ、宿主との物質のやり取りを可能にするための外膜機能の変換が必要である。

過性に関与する蛋白質の同定・性質解明を行った。そしてこれらを藍藻（モデルとして *Synechocystis* sp. PCC6803 を使用）外膜と比較した。

2. 研究方法

i) Cyanelle の外膜-PG間接着蛋白質の探索同定・単離精製

Cyanelle を *C. paradoxa* から単離し、超音波破碎した後、超遠心（100,000×g, 1時間, 4°C）で粗膜画分を得た。これを不連続ショ糖密度勾配遠心（60%, 55%, 50%, 45%, 40% ショ糖、SW41Ti ローターで 30,000 rpm, 18時間、室温）に供して外膜-PG画分を密度 1.22 g/cm³ の位置から分取した。これを 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 存在下で 37°C, 15 分間インキュベートして、超遠心（100,000×g, 1 時間、室温）により不溶性画分（PG および外膜-PG間接着蛋白質）を得た。PapC1, 2 の分離精製には、まず 0.1% β -mercaptoethanol を含む 2% LDS 中で 37°C, 15 分間インキュベートすることにより PapC1, 2 を可溶化した。さらに、システイン残基のランダムな再酸化を防ぐために 0.5 M iodoacetamide 中でインキュベートしてチオール基をアルキル化した。その後、ゲルfiltration HPLC により PapC1, 2 を分離した。HPLC 条件：Eluent, 0.1% lithium dodecyl sulfate (LDS) + 0.4 M LiCl in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5); flow rate, 0.5 ml/min; column, Superdex 200 increase 10/300 GL。

ii) PapC1, 2再構成リポソームを用いたチャネル活性測定

解析対象の試料として、PG結合状態、可溶化後、分離精製後の PapC1, 2 を使用した。これらを phosphatidyl choline と dicetylphosphate で構成したリポソームに再構成し、チャネル活性を測定した。方法は Nikaido *et al.* (6) に従った。

iii) PapC1, 2 の遺伝子同定と配列解析

質量分析法と N末端および内部アミノ酸配列分析を併用して *papC1, 2* 遺伝子を同定した。まず、PapC1, 2 を CnBr処理により断片化し、SDS-PAGE でペプチド断片を分離した後、内部アミノ酸配列をプロテインシーカンサーを用いて決定した。EST データベースを検索し、決定したアミノ酸配列をコードする mRNA 配列（断片）を得た。本断片配列の 5'側および 3'側配列を、Rapid amplification of cDNA end (RACE) 法により決定し、全長 cDNA 配列を決定した。また、PapC1, 2 を SDS-PAGE 後、ゲル内 trypsin 消化に供し、ペプチド断片を溶出後、TOF-MS 解析によりペプチド質量スペクトルを決定した。本スペクトルは cDNA 配列に対応するアミノ酸配列から計算

される質量スペクトルと一致することを確認した。

iv) *Synechocystis* sp. PCC6803 (以下 *Synechocystis*) の外膜-PG間接着蛋白質の単離・同定

Cyanelle の外膜-PG間接着蛋白質の単離・同定法と同様を行った。

3. 結果および考察

i) *Cyanelle*外膜を覆う主要膜蛋白質PapC1, PapC2の発見

まず、*Cyanelle*の外膜-PG間接着蛋白質を探査した。*C. paradoxa*のゲノム配列からは既知の外膜-PG間接着蛋白質やPG結合ドメインは検出されないため、生化学的手法による探索を行った。探索は一般的なグラム陰性細菌で用いられる方法を適用した。すなわち、*Cyanelle*の外膜-PG画分をショ糖密度勾配遠心法により分取し、各種界面活性剤処理を穏和な条件（低濃度、常温～37°C）で行い、不溶性画分（PG画分）に分画された蛋白質を外膜-PG間接着蛋白質候補とした。その結果、42および40 kDaの蛋白質が候補として得られた（図2）。候補蛋白質を可溶化後、精製PGと混合するとPGに結合したことから（data not shown）、これらを PapC1, PapC2 (peptidoglycan-associated protein of cyanelle)と名付けた。PapC1, 2は外膜に最も多量（*Cyanelle*一個あたり 3×10^6 分子）に存在する蛋白質であることから、外膜表面積の大部分は PapC1, 2により覆われていると考えられた。PapC1, 2-PG画分の超薄切片の電子顕微鏡観察を行ったところ、PapC1, 2は予想通りPGを覆う单層状の構造物として観察された（図2）。

ii) PapC1, PapC2は非特異的外膜チャネルとして機能する

PapC1, 2は *Cyanelle*表層を形成する单なる構造蛋白質なのか、それとも外膜透過性に関与するタンパク質なのかが興味の焦点となった。機能解析のため、PapC1, 2をリポソームに再構成し各種アミノ酸や糖を基質としてチャネル活性を測定した。その結果、PapC1, 2は基質非特異的な拡散チャネルを形成することがわかった（表1）。チャ

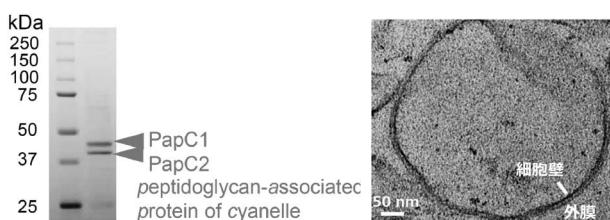


図2 *Cyanelle*の外膜-PG間接着タンパク質の SDS-PAGE 解析（左）と、PapC1, 2-細胞壁（PG）画分の超薄切片電子顕微鏡観察像（右）。染色は Ti-blue およびクエン酸鉛による。

ネル活性はシステイン残基の再酸化防止処理（アルキル化）を行うことで最大化した。チャネルサイズの排除限界はおよそ分子量1,000程度と見積もられた。PapC1, 2を分離精製してチャネル活性を測定すると同様の結果が得られたことから、PapC1, 2はそれぞれ単独でチャネル活性を持つことがわかった。*Cyanelle*外膜の大部分は PapC1, 2で覆われているため、本外膜の透過性は PapC1, 2のチャネル活性に大きく依存すると予想された。外膜をリポソームに再構成し透過性を測定した結果、予想通り分子量約1,000以下の低分子を非特異的に透過することがわかった。

iii) 藻類外膜との比較—PapC1, PapC2は非藻類系統に由来する一

N末端および内部アミノ酸配列解析と質量分析法を併用して遺伝子を同定し、配列解析を行った。PapC1, 2は互いに相同（同一性30%）な遺伝子であったが、既知ドメインや機能解析済みの蛋白質との相同性は見いだされなかった（data not shown）。また、いずれも *Planctomyctes*門細菌の表層蛋白質とゆるやかな相同性（25% identity）を示すのみで、藻類門からは相同蛋白質は全く検出されなかった。藻類外膜との比較解析のため、藻類モデル *Synechocystis*より外膜-PG間接着蛋白質を単離・同定した結果3つの相同な外膜蛋白質Slr0042, Slr1841, Slr1908（それぞれ同一性70%程度）が得られた（図3）。系統分布を調べたところこれらは藻類門内で保存されていることが分かったが、一方で藻類門外および植物系統からは相同蛋白質は検出されなかった（表2）。このことから、藻類由來の外膜-PG間接着蛋白質は植物系統内に持ち込まれておらず、PapC1, 2は非藻類系統にその起源を持つと推察された。

表1 PapC1, 2画分および分離精製後の PapC1, 2 それぞれのチャネル活性。mOD/min はチャネル透過速度を示す指標。GlcNAc は N-acetylglucosamine, Mr は分子量を表す。

Mr	mOD/min (20 µg reconstituted)			
	PapC1 + C2 (reduced/alkylated)	PapC1 + C2 (solubilized)	PapC1 (purified)	PapC2 (purified)
arabinose	150.13	93	56	57
glucose	180.16	87	45	42
GlcNAc	221	87	60	39
lactose	342.3	64	48	52
sucrose	342.3	75	60	39
raffinose	594.53	72	42	45
stachyose	666.58	81	60	52
dextran	~1,000	5	3	8
dextran	~1,500	1	1	1
D-Ala	89.09	89	56	42
L-Ile	131.17	79	65	55
L-Asn	132.12	72	45	53
L-Pro	115.13	85	57	38
L-Phe	165.19	80	53	49
L-Asp	133.1	76	49	60

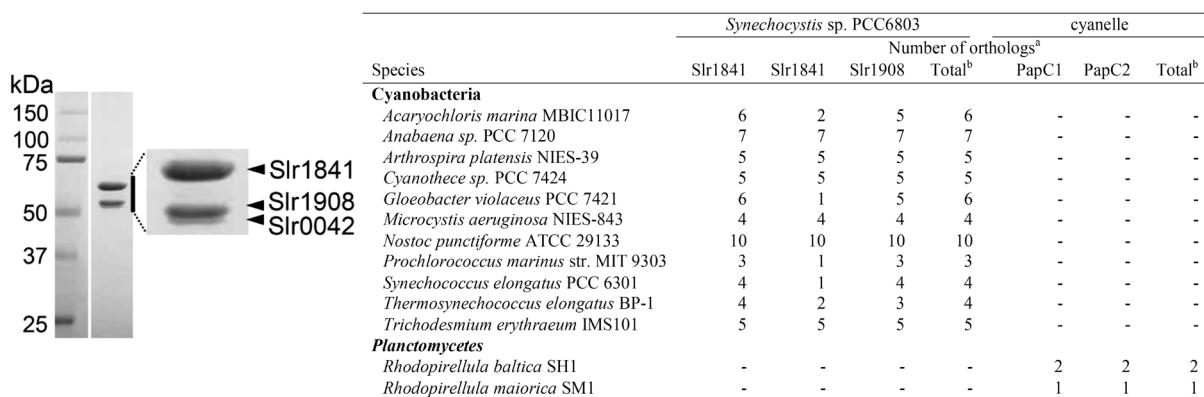


図3 (左) *Synechocystis* の外膜-PG間接着蛋白質の SDS-PAGE 解析。

表2 (右) *Synechocystis* および cyanelle の外膜-PG間接着蛋白質 (Slr0042, Slr1841, Slr1908 および PapC1, 2) の系統分布。各生物種ゲノム上におけるオルソログの数を示した。オルソログは、同一性>25%, sequence coverage>70%, e-value<10⁻⁵を条件とした。

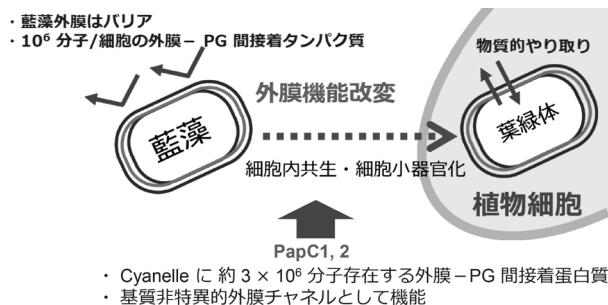


図4 Cyanelle 外膜に存在する新規蛋白質 PapC1, 2 とその機能。藍藻から原始葉緑体への進化過程における外膜機能変換に深く関与すると予想されるが、その起源は非藍藻系統にあると考えられる。

4. 結論

藍藻から原始葉緑体 (cyanelle) への変換には、①外膜透過障壁性の解消のための外膜チャネル、②外膜の安定的維持のための、外膜-PG間接着蛋白質 (グラム陰性細菌では、例外なく一細胞あたり 10⁶ 分子程度存在する) の存在が必須である。本研究で私は、cyanelle の外膜におよそ 3 × 10⁶ 分子存在し、外膜-PG間接着蛋白質であると同時に拡散チャネルとしての機能を有する新規蛋白質 PapC1, 2 を発見した (図4)。PapC1, 2 は上記した①, ②の性質を満たす機能をもつことから、藍藻から葉緑体への進化過程における外膜機能変換に深く関与する蛋白質であると推察した。一方で驚くことにその起源は非藍藻系統にあると考えられ、葉緑体成立過程における外来因子の関与が強く示唆された。

今後の課題は以下の通りである。① *Planctomycetes* 門細

菌の外膜蛋白質を詳細解析し、cyanelle 外膜との類似性を確認・検証する。② PapC1, 2 と PGとの結合作用を詳細解明する。PapC1, 2 は既知 PG結合ドメインを持たないため、蛋白質-PG間相互作用における新規発見が予想される。③ Cyanelle の PG は一般的な細菌では見られない N-acetylputrescine (putrescine はポリアミンの一種) の共有結合による修飾を受けている。本分子の生理機能を、主にポリアミン合成系の阻害剤を使用して解析する。

5. 参考文献

- Kojima S, Ko KC, Takatsuka Y, Abe N, Kaneko J, Itoh Y, Kamio Y. 2010. Cadaverine covalently linked to peptidoglycan is required for interaction between the peptidoglycan and the periplasm-exposed S-layer-homologous domain of major outer membrane protein Mep45 in *Selenomonas ruminantium*. *J Bacteriol* **192**: 5953-5961.
- Kojima S, Kaneko J, Abe N, Takatsuka Y, Kamio Y. 2011. Cadaverine covalently linked to the peptidoglycan serves as the correct constituent for the anchoring mechanism between the outer membrane and peptidoglycan in *Selenomonas ruminantium*. *J Bacteriol* **193**: 2347-2350.
- Kojima S, Kamio Y. 2012. Molecular basis for the maintenance of envelope integrity in *Selenomonas ruminantium*: cadaverine biosynthesis and covalent modification into the peptidoglycan play a major role. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **58**: 153-160.
- Kojima S, Nikaido H. 2013. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E2629-E2634.
- Kojima S, Nikaido H. 2014. High Salt Concentrations Increase Permeability through OmpC Channels of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **289**: 26464-26473.
- Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. 1991. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **266**: 770-779.