

## 微生物「超チャネル」に関する分子生物学的・構造生物学的研究



京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 教授 村田 幸作

細胞表層は、情報の受容と伝達、エネルギーの生産と変換、物質の透過と輸送など多様な機能を担い、それぞれに特化された構造体が関与している。しかし、局所的、かつ微細な構造と機能を除けば、細胞表層は構造的・機能的にほぼ均等と見なされ、細胞表層分子の流動・再編を伴う巨大な構造体の形成は想定しにくい。

多糖（アルギン酸）資化性細菌として分離されたスフィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属細菌 A1 株は、細胞表層分子（襞分子）の流動・再編により、アルギン酸を取り込む巨大な構造体「体腔」を形成する。この体腔と連動した輸送装置は、既存のチャネル、トランスポーター、あるいはポンプなどとは本質的に異なる。「超チャネル」と命名したこの新規、かつ高度な分子装置の全体像を分子生物学的、構造生物学的観点から解析し、細菌細胞表層の動的構造、ならびに高分子物質の輸送機構と分解機構に関して多くの事実を明らかにした。

本講演では、体腔形成細菌 A1 株の特性、体腔の構造と機能、体腔の分子移植、鞭毛タンパク質や糖質関連酵素の構造機能相関とその進化的考察および応用、ならびに自然形質転換現象 (DNA 輸送) の普遍性の理解など、高分子物質の輸送にかかる微生物「超チャネル」について得られた成果を紹介する。内容は多岐にわたるが、「微生物における巨大物質の輸送と代謝の高次バイオシステム」として集約されるものである。

## 1. 多糖輸送の細菌「超チャネル」

## 1.1 取り込み—体腔の形成と機能—

スフィンゴモナス属細菌（グラム陰性）は、ショードモナス属細菌から再分枝された細菌群である。本菌群は、外膜にリボ多糖をもたず、代わりに真核細胞の膜成分であるスフィンゴ糖脂質を含む。また、一般的に細胞表層は多数の襞分子で覆われている。ダイオキシンなどの環境汚染物質分解能も高く、応用微生物学上重要な菌群でもある。A1 株のさらなる特徴は、高分子物質（アルギン酸）の資化に際し、細胞表層に「体腔」（口径 0.1~0.2 μm の孔構造）を形成することにある（図 1）。体腔形成細菌は、微生物学史上初めての記述である。

スフィンゴモナス属細菌としては初めて A1 株のゲノム DNA (4.6 Mb) とプラスミド DNA (pA1: 46 kb) の全塩基配列を決定し、本菌群の遺伝学的特性と機能多様性、および形質伝播機構を統合的に解析する基盤を確立した。A1 株の遺伝情報と外膜プロテオミクスにより、体腔は襞分子の再編によって形成される開閉自在の器官であり、体腔特異的タンパク質によりアルギン酸を濃縮してペリプラズムに輸送する機能をもつことを明らかにした。つまり、体腔形成細胞の外膜には、主に 8 種類のタンパク質〔鉄複合体トランスポーター（4 種類: p1~p4）、鞭毛タンパク質フライジエン（2 種類: p5, p6）、リボタンパク質(p7)、顆粒結合タンパク質(p8)〕が発現し、これらタンパク質の協働によりアルギン酸の細胞表層への濃縮とペリプラズ

ムへの輸送が行われる。

鞭毛非形成性の A1 株では、フライジエン p5, p6 は鞭毛纖維の形成には関与せず、外膜にあって強力なアルギン酸結合能 ( $K_d = \sim nM$ ) を示す。この能力は大腸菌鞭毛タンパク質にも確認され、フライジエンの普遍的な性質であると考えられる。フライジエン p5 の立体構造を決定することにより、アルギン酸結合ドメインを同定し、フライジエンの外膜局在性を T4 ファージの宿主への接着機構との関連から推定した。また、フライジエン p5, p6 の二重変異は致死的であり、単独変異では体腔形成も不全になることから、フライジエンは細胞生存を左右する細胞表層構造とその機能の制御に関与していることを明らかにした。

これらの結果より、細菌細胞表層の流動性と新規な器官「体腔」創出機構、体腔と他の細胞表層装置（メソーム、エンドサイトーシスなど）との構造的・進化的相関、およびフライジエンと鞭毛の起源・進化・機能の理解に有用な視座を与えた。

## 1.2 輸送—巨大物質輸送機構と体腔移植—

A1 株のペリプラズムには、多糖（アルギン酸）結合タンパク質（2 種類: AlgQ1, AlgQ2）が存在する。それらの立体構造を決定し、水 1 分子の出入を駆動力とした新規ドメイン開閉機構による多糖の結合・解離の詳細を明らかにした。結合タンパク質に捕捉されたアルギン酸は、内膜の ABC トランスポーターに渡され、細胞質に輸送される（図 2）。この輸送体の立体構造と輸送の制御機構を明らかにし、体腔と連動した高分子物質特異的 ABC トランスポーターの存在を立証した。これは、大腸菌の異物排出系である AcrAB-TolC システムなどとは本質的に異なる新規な輸送体である。これにより、巨大物質の資化に関する細菌の新しい分子機構の存在を示した。

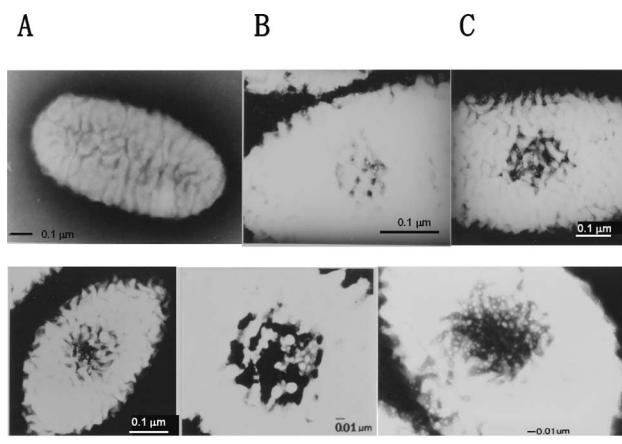


図 1 体腔の形成

培養時間: A, 0 時間; B, 3 時間; C, 7 時間; D, 21 時間。E, F, 体腔部位の拡大（体腔部位での襞分子の消失とアルギン酸顆粒の集積を示す）。

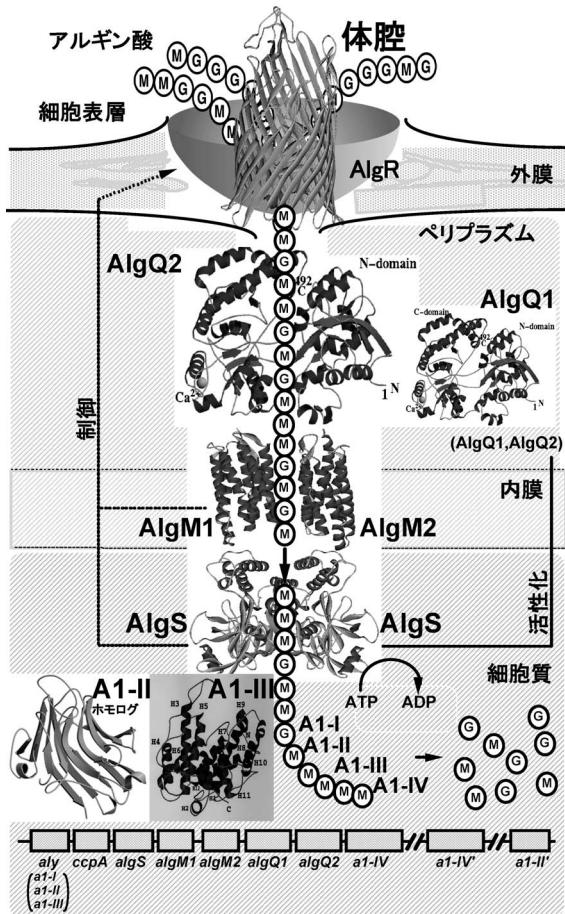


図2 「超チャネル」の全容

体腔と連動した巨大物質の輸送・分解経路、および経路の立体構造と制御（体腔形成制御・輸送活性制御）機構。

体腔の形成は、ABC トランスポーターの構成成分〔透過酵素（AlgM1, AlgM2）またはABC タンパク質（AlgS）〕によって制御される（図2）。この結果に基づき、体腔を他細菌に分子移植する細胞改変技術（分子移植工学）を確立し、ダイオキシンやポリプロピレングリコールなど分子構造や分子サイズを問わず多様な物質を強く分解する細菌の育種に途を拓いた。

### 1.3 分解酵素の構造機能相関と進化的考察

①糖質関連酵素 「超チャネル」によって細胞質に輸送されたアルギン酸は、多糖（アルギン酸）リーゼ（A1-I~IV）によって分解される（図2）。そこで、A1 株、緑膿菌、*Agrobacterium* 属細菌のアルギン酸リーゼ（7 種類）、および枯草菌のキサンタンリーゼとゲランリーゼの生合成機構や立体構造を決定することにより、多糖リーゼに共通した成熟化機構、触媒中心構造、モジュール（リッドループ）運動を伴う新規β-脱離反応機構などを明らかにし、『一次構造が全く異なるにもかかわらずウロニ酸を厳密に認識し、β-脱離反応で糖鎖を切断する』多糖リーゼの共通機能を分子レベルで説明した。さらに、立体構造に基づく新規分類法、新規ファミリーと進化系統樹の構築などにより、多糖リーゼの全体像を明らかにした。不飽和グルコシドヒドロラーゼ（UGH）[2種類：多糖リーゼ反応産物に共通して作用する枯草菌の新規酵素] や N-アシル-D-グルコサミン 2-エピメラーゼ（レニン結合タンパク質）の立体構造も決定し、一群の糖質関連酵素がα/α-バレル構造の基本骨格を保存して進化した証拠を示した。さらに、上記UGH

ヒアルロン酸リーゼのような多糖リーゼが協働した新規細菌感染機構の存在を指摘した。UGH の立体構造解析により、グルコシド結合ではなく、炭素-炭素二重結合に水分子を付加する新規な加水分解酵素（機構）の存在も示した。これらの構造生物学的研究により、糖質関連酵素の構造機能相関や進化などの理解に有用な多くの知見を明らかにした。

②ポリリン酸依存酵素（NAD キナーゼ、グルコースキナーゼ）アルギン酸の一部は鉄イオンとの複合体として輸送され、その再解離やさらなる代謝には NADP (H) 依存酵素が関わる。そこで、NAD キナーゼを総合的に解析し、微生物には ATP 依存 NAD キナーゼとポリリン酸（Pn）/ATP 依存 NAD キナーゼ（1980 年に発見）の 2 種類が存在することを明確にした。結核菌の Pn/ATP 依存 NAD キナーゼと土壤由来 *Arthrobacter* 属細菌の Pn/ATP 依存グルコキナーゼの立体構造を決定し、Pn 依存酵素の構造機能相関を初めて解明した。これにより、すべての NAD キナーゼがホモ多量体構造をとらなければならない必然性（サブユニット会合により初めて基質結合部位が形成される）を明確にするとともに、原核細胞型グルコキナーゼと真核細胞型ヘキソキナーゼ間の構造的・進化的相関に関する論議に決着を与えた。さらに、立体構造情報に基づく NAD キナーゼの NADH キナーゼへの分子変換に成功するとともに、結核菌 Pn/ATP 依存 NAD キナーゼと Pn を用いた NADP 生産法を工業化した。これらの研究により、微生物 NAD キナーゼの全容、糖キナーゼとリン酸供与体の進化機構、ならびに Pn 依存酵素の物質生産における有用性を明らかにした。

### 2. DNA 輸送の酵母「超チャネル」

酵母 (*S. cerevisiae*) の対数増殖期初期細胞に自然形質転換（様）能を見いだし、筆者らが先に開発したリチウム処理法に匹敵する新規な形質転換法を確立した。細胞の死滅・損傷を伴わない本形質転換系を用いて遺伝子破壊株（約 5,000 株）の形質転換能を網羅的に解析し、DNA 取込み能がエンドサイトーシス関連遺伝子（Arp2/3 複合体とその活性化タンパク質群の遺伝子）の破壊により激減することから、DNA「取込み」がアクチン分子の動態を決定的因素として含むエンドサイトーシス（様）機構で進行することを明らかにした。また、形質転換能が、ゴルジ体・小胞体局在 P 型 ATPase 遺伝子 (*PMR1, SPF1*) や cAMP 分解酵素遺伝子 (*PDE2*) の破壊により顕著に増大することも見いだし、DNA 輸送の酵母「超チャネル」が多くの細胞機能と密接に連関した現象であることを示した。この研究は、自然形質転換が微生物界の普遍的な現象であることを示すとともに、高頻度形質転換系の確立など酵母バイオテクノロジーの進展にも寄与するものと考えられる。

本研究は、主に（旧）京都大学食糧科学研究所食糧安全利用学分野と（現）所属専攻生物機能変換学分野で行ったものである。多大なご協力をいただいた橋本 渉助教授、河井重幸助手、ボスドク研究員、院生・学生諸君、ならびに X 線結晶構造解析と共に進めていただいた京都大学大学院農学研究科の三上文三教授にお礼申し上げます。また、常にご指導ご鞭撻をいただいた恩師京都大学名誉教授の柄倉辰六郎先生、木村 光先生はじめとする多くの先生方、ならびに田辺製薬株式会社（旧）応用生化学研究所所長の千畠一郎博士にお礼申し上げます。