

細菌の環境応答と適応に関する分子生物学的研究



東京大学生物生産工学研究センター 特任准教授 古園(松田) さおり

はじめに

微生物，特に細菌について興味を惹かれるのは，生き物としては単純なシステムを持ちながら，類稀な環境への適応能力と多様な代謝能力を持つ点にあると思う。我が国の農芸化学分野ではそうした微生物の能力をものづくりや有用酵素のソースとして利用してきた。私は，生き物として単純なシステムを持つ細菌が周囲の環境にいかに応答し適応するのに興味を持ち，主に分子生物学的なアプローチでそのメカニズムを探ってきた。特に，分子が機能する場となる細胞内環境因子（pH や Na^+ イオン濃度，代謝）が分子の機能発現にどのように関わるかに注目してきた。

1. 細菌の pH および塩環境適応に関わるマルチサブユニット型 Na^+/H^+ アンチポーターに関する研究

細菌の中には動・植物が生存できないような極限的環境に好んで棲息するものがある。好アルカリ性細菌はそのような極限環境微生物の1つであり，*Bacillus halodurans* C125株の好アルカリ性因子として新規な Na^+/H^+ アンチポーターが発見された。その後，このアンチポーターのホモログは好アルカリ性細菌に限らず広く細菌に分布しており，6ないしは7つの遺伝子産物で構成されるマルチサブユニット複合体として機能することが明らかとなった¹⁾。本アンチポーター (Sha/Mrp) が *B. subtilis* や *Pseudomonas aeruginosa* では Na^+ ホメオスタシスにおいて中心的な役割を持ち，胞子形成や病原性に関わることを明らかにした²³⁾。 *B. subtilis* の *sha/mrp* 欠損株は，低濃度 NaCl で増殖はあまり影響を受けないが，胞子形成が著しく阻害される。また，対数増殖後の胞子形成への移行期に低濃度 NaCl を添加しても胞子形成は阻害される。移行期では σ^H の活性化やリン酸リレー系などの分子イベントが動く。このような時期が厳密な Na^+ ホメオスタシスを必要としたことから，細胞内環境の恒常性維持や制御が分子の機能発現にとって想像以上に重要なのではいかとの視点を得た。 *P. aeruginosa* の *sha/mrp* 欠損株はマウスモデルで病原性が低下したことから，本アンチポーターが感染菌抑制のための分子標的候補となる可能性を示した。

2. タンパク質のアシル化修飾と細菌の栄養応答に関する研究

翻訳後修飾は，タンパク質が与えられた状況で機能を発現するために不可欠なステップである。翻訳後修飾の情報はゲノムに書き込まれておらず，その全体像は未解明の部分が多いが，近年の質量分析をベースとしたプロテオミクス技術の進歩により翻訳後修飾を詳細に調べることが可能となってきた。その結果，タンパク質は想像以上にヘテロな集団であることが明らかになりつつある。またゲノムワイドな研究から，遺伝子発現量の変化だけでは十分説明できない代謝変化が見出されており，翻訳後レベル制御の重要性が再認識されている。近年細菌からヒトまで普遍的な翻訳後修飾として知られるようになったタン

パク質のアシル化修飾について，微生物における栄養応答や代謝制御との関わりに注目して現在研究に取り組んでいる。

2-1. *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産とアシル化修飾

C. glutamicum は，L-グルタミン酸を初めとする我が国のアミノ酸発酵工業において重要な位置を占める細菌である。本菌のグルタミン酸生産は，Tween 40 添加などの刺激により誘導されることが知られている。誘導刺激は細胞膜上のメカノセンシティブチャネルを開口させグルタミン酸を排出させるが，同時にグルコースからグルタミン酸合成に向う代謝流量の増加が起こることが代謝フラックス解析により示されている。一方で，それを担う代謝酵素の発現量は必ずしも上昇しておらず，代謝流量の増加に翻訳後レベル制御が関与する可能性が考えられた。私たちは，代表的なアシル化修飾であるアセチル化とスクシニル化がグルタミン酸生産誘導刺激に応答して大きく変動することを見出した⁴⁾。全体の傾向として，グルタミン酸生産条件ではアセチル化が抑制され，スクシニル化が増加していた。このアシル化修飾変化はグルタミン酸生産に直接的に関与する中央代謝経路の代謝酵素にも起こっており，グルタミン酸生産に必須なオキサロ酢酸供給の補充経路であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の活性が653番目のリジン残基 (K653) のアセチル化により負に制御されることを明らかにした。また，PEPC-K653の脱アセチル化酵素としてサーチュインホモログである NCgl0616 を同定した。さらに，NCgl0616 による K653 脱アセチル化はグルタミン酸生産条件での PEPC 活性化に寄与することを示し，グルタミン酸生産におけるタンパク質 (脱) アセチル化の意義の一端を明らかにした⁵⁾。

グルタミン酸生産条件では，2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ (ODH) 活性の低下を伴うことが知られている。ODH 活性の抑制には OdhI と呼ばれる制御因子が関与する。OdhI はリン酸化に依存して分子フォールディング状態を変化させ，非リン酸化型 OdhI が ODH の E1 サブユニット (OdhA) に結合して ODH 活性を阻害する。OdhI の 132 番目のリジン残基

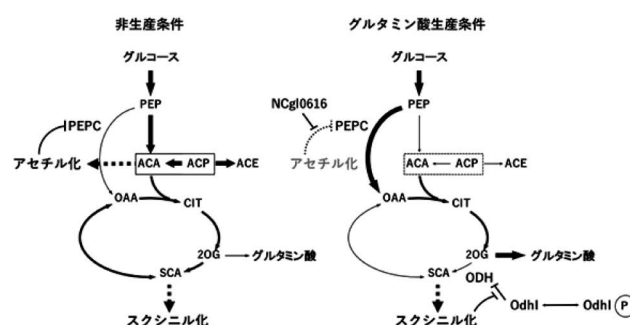


図1. グルタミン酸生産とアシル化修飾の関係

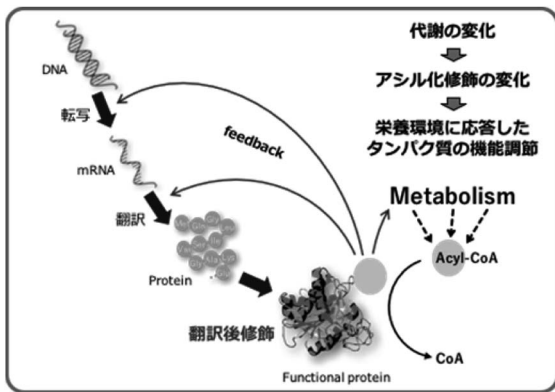


図2. アシル化修飾と細菌の栄養応答

(K132) のスクシニル化は、OdhA との相互作用を阻害し、その結果ODH活性は維持されグルタミン酸生産に対して負の効果をもたらすことを明らかにした⁶⁾。本研究を通して、OdhI は従来知られていたリン酸化だけでなくアシル化による制御を受けることを示し、OdhI制御に関する知見を広げることができた。

2-2. 代謝や栄養環境に依存して変化するアシル化修飾

アシル化修飾のうち代表的なアセチル化とスクシニル化は、解糖系やクエン酸回路より供給されるアセチル CoA やアセチルリン酸、スクシニル CoA をアシル基供与体とする。細菌は炭素源の種類や培養フェーズによって解糖系とクエン酸回路への依存度を変化させる。*B. subtilis* を対象とした定量アシローム解析から、代謝酵素をはじめとするさまざまなタンパク質にアセチル化とスクシニル化を見出し、それらが栄養条件や培養フェーズによって変動することを明らかにした⁷⁾。

現在はリボソームや RNA ポリメラーゼのアシル化修飾に注目している。修飾状態の異なる RNA ポリメラーゼやリボソームは、転写・翻訳機能において果たして同等なのか、それとも転写や翻訳の特異性に影響を与えることにより栄養環境に応じた遺伝子発現制御のメカニズムとなりうるのか興味を持たれる。*B. subtilis* の翻訳伸長因子 EFTu は主要なアセチル化タンパク質であるが、培地条件や培養フェーズによってアセチル化とスクシニル化の状態が顕著に変化する。翻訳活性を負に制御する EFTu のスクシニル化部位の同定に成功し(論文投稿中)、その過程で翻訳機能に必須でない主要なアセチル化部位を見出し、翻訳外機能や翻訳の特異性に関わる可能性について現在調べている。

おわりに

細菌におけるアセチル化とスクシニル化は、反応性の高いアセチルリン酸やスクシニル CoA による非酵素的なメカニズムによるものが大多数であり、ある種の代謝ストレスとの見方もある。一方、細胞がどのような栄養環境を経てきたかの痕跡(記憶)をとどめていると捉えることもできる。代謝を反映して変化するアシル化修飾が、細菌の栄養環境応答や代謝制御にどのように関わるのか、今後も探求していきたい。

最近の研究で、中央代謝系を構成する酵素群は超酵素複合体

(メタボロン)を構成していることが明らかになりつつある。アシル化修飾がメタボロンの再構築を介して代謝フラックスを変化させる可能性を考えている。多くの有機酸やアミノ酸は中央代謝系から分岐して生産される。アシル化修飾のメタボロン形成における新たな役割が見えてくれば、有用物質生産のための新たなアプローチや代謝制御のための標的を提示できることが期待される。農芸化学分野における「微生物によるものづくり」への貢献と、生物種を超えた普遍的なアシル化修飾の意義の発見を目指して、今後も細菌におけるアシル化修飾研究を進展させていきたい。

(引用文献)

- 1) Kajiyama Y., *et al.* Complex formation by the *mrpABCDEF* gene products, which constitute a principal Na^+/H^+ antiporter in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 189: 7511-4 (2007).
- 2) Kosono S., *et al.* Function of a principal Na^+/H^+ antiporter, ShaA, is required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 182: 898-904 (2000).
- 3) Kosono S., *et al.* Characterization of a multigene-encoded sodium/hydrogen antiporter (Sha) from *Pseudomonas aeruginosa*: its involvement in pathogenesis. *J. Bacteriol.*, 187: 5242-5248 (2005).
- 4) Mizuno Y., Nagano-Shoji M., *et al.* Altered acetylation and succinylation profiles in *Corynebacterium glutamicum* in response to conditions inducing glutamate overproduction. *MicrobiologyOpen*, 5: 152-173 (2016).
- 5) Nagano-Shoji M., *et al.* Characterization of lysine acetylation of a phosphoenolpyruvate carboxylase involved in glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.*, 104: 677-689 (2017).
- 6) Komine-Abe A., Nagano-Shoji M., *et al.* Effect of lysine succinylation on the regulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase inhibitor, OdhI, involved in glutamate production in *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81: 2130-2138 (2017).
- 7) Kosono S., *et al.* Changes in the acetylome and succinylome of *Bacillus subtilis* in response to carbon source. *PLoS One*, 10 (6): e0131169 (2015).

謝辞 ここに紹介させていただいた一連の研究は、理化学研究所工藤環境分子生物学研究室・吉田化学遺伝学研究室、東京大学生物生産工学研究センター微生物機能代謝工学寄付部門にて行ったものです。これまで一緒に研究に携わり苦勞をともにしてくれた共同研究者の方々に深く感謝いたします。寄付講座のアドバイザーとしていつも親身にご指導くださりまた本賞へのご推薦を賜りました東京大学生物生産工学研究センターの西山真先生に心より御礼申し上げます。細菌のアシル化修飾というやりがいのある研究テーマに引き合わせてくださいました理化学研究所の吉田稔先生に厚く御礼申し上げます。Sha/Mrp アンチポーターに関する研究は、理化学研究所にて工藤俊章先生のご指導のもとで行いました。研究員としての姿勢と心構えを教えていただいたことに感謝申し上げます。最後に、寄付部門を支援していただいている協和発酵キリン並びに協和発酵バイオ株式会社に厚く御礼申し上げます。