

ルーメン細菌の表層膜結合主要タンパク質の構造および機能解明とその応用

高塚 由美子

(東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻)

グラム陰性のルーメン菌 *Selenomonas ruminantium* は、外膜安定化に必須の構成成分としてペプチドグリカン結合ポリアミン(カダベリン並びにプトレシン)を有するが、ポリアミン合成制御機構ならびにペプチドグリカン結合型ポリアミンと相互作用する表層膜側の因子については未だ不明である。ごく最近、本菌の表層膜主要タンパク質が細菌表層に規則的配列構造を構成する surface layer (S-layer) タンパク質と高い相同性を示すことが見出された。一般の S-layer タンパク質は細胞表面に存在するが、本主要タンパク質は外膜挿入型と推察されている。本研究では、本タンパク質の構造を分子レベルで解明すると共に、機能に関してポリアミンとの相互関係を解明する。今回(1)本表層膜主要タンパク質をコードする遺伝子のクローニングに成功すると共に(2)カダベリンの合成に係わるリジン脱炭酸酵素の合成制御機構を明らかにした。

(1) 本表層膜主要タンパク質(45 kDa タンパク質)をコードする遺伝子のクローニング

44 kDa タンパク質をコードする遺伝子を *S. ruminantium* の染色体 DNA から大腸菌にクローニングした。本遺伝子は 1296bp から成り 418 アミノ酸残基をコードしていた。本タンパク質はN末端に一般の細菌に見られるシグナルペプチドを有していた。本遺伝子挿入プラスミド pOM45 保有大腸菌 B1a21(DE3) 株は 45 kDa タンパク質を大量に発現した。

(2) *S. ruminantium* におけるリジン脱炭酸酵素の合成制御機構

本菌のカダベリンを合成するリジン脱炭酸酵素(LDC)はオルニチンも認識し、一次構造はオルニチンに特異的な真核生物のオルニチン脱炭酸酵素(ODC)と高い相同性を持つ。一方で、本LDC活性が菌体生育の定常期初期に急激に消失し、これが“22-kDaタンパク質”を介した分解によるものであることを見出した。さらに本タンパク質の特性を明らかにした。

カダベリンを培地に添加しても菌体内LDCの分解速度に変化は見られないが、プトレシンを添加すると、見かけの半減期が10分以上短縮することが明らかになった。この現象は、ポリアミン誘導性の調節因子であるアンチザイム(分子量26.5k)を介したODCの発現制御機構を持つ真核生物でのみ確認されており、本酵素の発現制御機構が動物細

胞の ODC における機構と類似していることが示唆された。アンチザイムは ODC と複合体を形成することから、LDC をリガンドとしたアフィニティーカラムを作製しプトレシン存在下で生育させた本菌の細胞質画分を供した結果、25kDa と 22kDa の LDC に特異的に結合するタンパク質を検出した。このうち ” 22-kDa タンパク質 ” は、プトレシンの添加により発現量が 20 倍に誘導された。 ” 22-kDa タンパク質 ” 自身には LDC 分解活性がなかったが、*in vitro* 分解活性測定系に添加すると LDC の分解を大きく促進したことから、本タンパク質が LDC の分解を促進する制御因子であることが明らかになった。 ” 22-kDa タンパク質 ” のこのような特徴は、動物細胞におけるアンチザイムと類似しているが、N 末端 30 アミノ酸残基の配列において両者に相同性は全く認められず、本タンパク質が新規のタンパク質であることが判明した。

これまで、原核生物 LDC および ODC と真核生物 ODC とは構造的に大きく異なり、発現制御機構も全く違うものと考えられてきた。しかし今回の我々の報告により *S. ruminantium* の LDC は真核生物 ODC のアンチザイムを介した分解制御機構のような厳密な制御を受けていることが明らかとなった。一方で、マウス ODC における短寿命のシグナルといわれる PEST 配列が本菌の LDC には存在していないことから、本酵素の分解制御機構は PEST 配列が関与する真核生物の分解機構とは異なり、よりシンプルな新規の機構と推定される。本研究の LDC のアンチザイム様タンパク質分解促進因子を介した新規のタンパク質分解機構は生物における選択的タンパク質分解制御機構のモデル系となり得るものである。選択的なタンパク質分解の再構成系として、LDC、分解促進因子およびプロテアーゼからなる再構成 LDC 分解系を確立し、三者の相互作用を解明することができれば、細菌はもとより複雑困難な真核生物でのポリアミンの生化学的研究、さらには選択的なタンパク質分解制御機構の研究にも応用しうる基盤的技術となりことが期待される。

本研究成果は以下の論文（レビュー）の一部としてまとめられた。

• Yumiko Takatsuka and Yoshiyuki Kamio, Molecular dissection of the *Selenomonas ruminantium* cell envelope and lysine decarboxylase involved in the biosynthesis of a polyamine covalently linked to the cell wall peptidoglycan layer, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (1) 1-19, 2004.