

# 放線菌シデロフォアの気菌糸誘導メカニズムの解明

小谷 真也

(静岡大学 創造科学技術大学院)

## 研究の目的

鉄獲得は生物にとって生存に非常に重要な要素である。というのも、一次代謝、二次代謝に関与する 100 以上の酵素が鉄硫黄クラスターなどの鉄を含む補助因子を持っているか、またはヘムタンパクに分類されるからである。水溶液中において、鉄は、2 価イオンもしくは 3 価イオンとして存在する。天然環境中において、3 価イオンの溶解性は、生物が存在可能な pH において  $10^{-18}$   $\mu\text{M}$  という非常に低い濃度であり<sup>1)</sup>、細菌細胞は 1  $\mu\text{M}$  の濃度の鉄を必要とすることから、常に不足状態にある。このような低い濃度の鉄イオンを利用するために、細菌は、鉄キレート能を有するシデロフォアという低分子性物質を分泌する。このシデロフォアは、分泌された後、細菌細胞膜に存在するトランスポーターの働きにより、細菌細胞内に取り込まれる<sup>2)</sup>。

病原性細菌が、宿主内で生き残るためには鉄を取り込むことが重要であることから、細菌性疾患の治療法の確立といった観点から、病原性細菌による鉄取り込みシステムが良く研究されている。実際に、シデロフォアの分泌が病原性細菌の病原性を増強させるという報告がある<sup>3)</sup>。このような生理学的重要性のため、病原性細菌からは、pyochelin<sup>4)</sup>、yersiniabactin<sup>5)</sup>、petrobactin<sup>6)</sup>、mycobactin<sup>7)</sup> 等、多数のシデロフォアが発見されている。放線菌由来の特有なシデロフォアとしては、梅沢らが、1985 年に、foroxymithine を単離している<sup>8)</sup>。また、ゲノムマイニングと化学分析の併用により、モデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* からは、coelichelin が発見されている<sup>9,10)</sup>。

*Streptomyces scabies* はジャガイモに被害を及ぼす植物病原性細菌である。それゆえ、病原性のメカニズムを解明するため、全ゲノム解析を含む様々な研究がなされてきた<sup>11,12)</sup>。Thaxtomin A と命名された植物毒素が良く知られており<sup>13)</sup>、この毒素が直接の病原因子であり、植物細胞のアポトーシスを引き起こすことが報告されている<sup>14)</sup>。細胞壊死因子の nec1 もまた *S. scabies* とその関連株に分布している<sup>15-17)</sup>。

また、*Streptomyces griseus* においては、シデロフォアが抗生物質生産を増大させることが報告されている。そこで、本研究では、シデロフォアの細胞内における機能解明を目的として、大量に入手可能な放線菌由来シデロフォア deferoxiamine を利用して、シデロフォアに結合する *Streptomyces coelicolor* 細胞内タンパクの探索を試みた。

## 方法

Deferoxiamine (Sigma-Aldrich) を、Affi-Gel (Bio-Rad) 担体と、0.1M MOPS 緩衝液中、pH 7.5 で反応させることにより、deferoxiamine 固定化アフィニティカラムを作成した。*S. coelicolor* の培養は ISP2 液体培地を用い、27°C で 5 日間行った。培養液より、遠心分離により回収した菌体を、蒸留水で洗浄後、10%SDS を含むバッファ中で、超音波処理を行うことにより、菌体タンパク成分の抽出を行った。得られた粗タンパク抽出液に

最終濃度 10%になるように、トリクロロ酢酸を加え、タンパクを沈殿した。沈殿したタンパクを Tris バッファに溶解した。得られた溶液を、作成したアフィニティカラムに添加し、蒸留水、0.1N NaOH 液の順に添加し、溶出した。溶出した画分は、10%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分析した。

## 結果

泳動した SDS-PAGE ゲルを Fig. 1 に示した。矢印で示したように、0.1N NaOH による溶出画分で、分子量 50 kDa に相当するゲル上の位置に、濃いタンパクのバンドが見られた。そこでこの分子量 50 kDa のタンパクの同定を目的として、SDS-PAGE ゲルよりこのタンパクを含むバンドを切り出した後、トリプシン消化を行なうことにより、マスフィンガープリンティング法による同定を試みた。MALDI-TOF マススペクトル測定の結果、Fig. 2 に示したようなフラグメントパターンが観測された。公表されているマススペクトル解析結果のデータベースを web 上で検索することが可能な MASCOT search を利用して、得られたペプチドフラグメントパターンに対応する *S. coelicolor* タンパク質を検索した結果、dihydrolipoamide dehydrogenase と推定されるタンパク質 (T35296) が、候補として同定された。

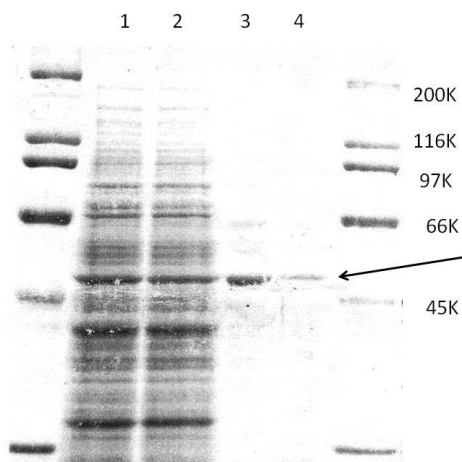


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of protein fractions.

Lane 1, cellular protein fraction; lane 2, flowthrough fraction; lane 3, protein fraction eluted with distilled water; lane 4, protein fraction eluted with 0.1 N NaOH.

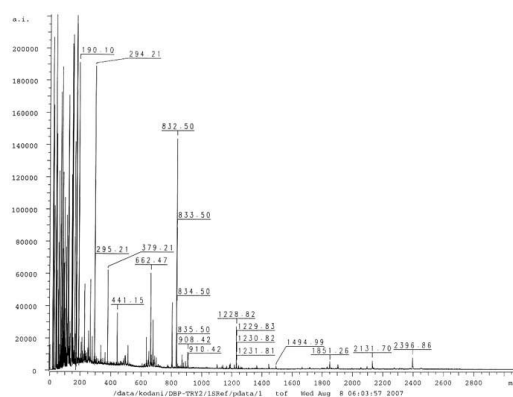


Fig. 2. TOF-MS spectrum of peptides recovered after tryptic digestion of the 50 kDa protein.

## 結論

放線菌における dihydrolipoamide dehydrogenase に関しては、既に報告があり、この酵素が、NAD<sup>+</sup> 依存的に dihydrolipoamide の酸化を触媒する機能を有することが報告されている。今回の実験で、deferoxiamine を固定化したアフィニティカラムを用いて、deferoxiamine 結合タンパクの検索を行った結果、この酵素が得られたのは、この酵素の基質である dihydrolipoamide と deferoxiamine の構造の間に存在する類似性のためだと考えられる。

## 文献

- (1) Weinberg, E. D. *Microbiol. Rev.* **1978**, *42*, 45-66.
- (2) Morrissey, J. A., Cockayne, A., Hill, P. J., and Williams, P. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 6281-6288.
- (3) Miethke, M., and Marahiel, M. A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 413-451.
- (4) Youard, Z. A., Mislin, G. L., Majcherczyk, P. A., Schalk, I. J., and Reimmann, C. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35546-35553.
- (5) Lawlor, M. S., O'Connor, C., and Miller, V. L. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 1463-1472.
- (6) Abergel, R. J., Zawadzka, A. M., and Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2124-2125.
- (7) Luo, M., Fadeev, E. A., and Groves, J. T. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 149-153.
- (8) Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Obata, T., Iinuma, H., Naganawa, H., Hamada, M., and Takeuchi, T. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1985**, *38*, 1813-1815.
- (9) Challis, G. L., and Ravel, J. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *187*, 111-114.
- (10) Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. M., and Challis, G. L. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 265-269.
- (11) Shoemaker, R. A., and Riddell, R. T. *Stain Technol.* **1954**, *29*, 59.
- (12) Loria, R., Kers, J., and Joshi, M. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2006**, *44*, 469-487.
- (13) King, R. R., Lawrence, C. H., Clark, M. C., and Calhoun, L. A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, *13*, 849-850.
- (14) Duval, I., Brochu, V., Simard, M., Beaulieu, C., and Beaudoin, N. *Planta* **2005**, *222*, 820-831.
- (15) Bukhalid, R. A., Chung, S. Y., and Loria, R. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **1998**, *11*, 960-967.
- (16) Cullen, D. W., and Lees, A. K. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 1082-1094.
- (17) Bukhalid, R. A., and Loria, R. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 7776-7783.