

休眠細胞におけるタンパク質修飾機構の解析

桑名利津子

Protein Modification System in Dormant Cells

Ritsuko KUWANA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, 45-1 Nagaotoge-cho,
Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

(Received May 13, 2009)

Dormancy in an organism is an adaptive response to environmental stress. The initiation, maintenance, and breaking of dormancy are adaptations to environmental signals. In active cells, an environmental response is genetically controlled general phenomenon. However, no such system is available in dormant cells, in which almost all gene expression is repressed. Bacterial spores are dormant and highly resistant to many environmental stresses. I analyzed the protein profile of *Bacillus subtilis* spores by a combination of SDS-PAGE and LC-MS/MS to reveal protein modification in dormant cells. I found that protein modification was mediated by spore built-in enzymes YabG (a protease) and Tgl (a transglutaminase) in the spores of *B. subtilis*. The rearrangement of spore coat proteins caused by the activities of these built-in enzymes proceeded independently of gene expression or *de novo* protein synthesis in dormant cells. The results suggest that some built-in enzymes are activated under certain conditions and thereafter become involved in the modification of proteins and other cellular materials in dormant cells. I propose the idea that “Active” adaptation in active cells is dependent on gene expression, and that “Quiet” adaptation in dormant cells is dependent on the activity of some built-in enzymes independently of gene expression or *de novo* protein synthesis. Other enzymes are involved in restoration of dormancy in response to signals such as the nutrition.

Key words—dormant cell; spore; adaptation; protein modification; processing; cross-linkage

1. はじめに

休眠は、栄養源の枯渇や生存に適さない環境下などにおける生物の生存戦略として極めて重要な意味を持つ。一般的には植物の種子や孢子、あるいは真菌や細菌の孢子などが休眠細胞として知られている。ほかにも動物の冬眠や昆虫の発生休止を始め、がん細胞の増殖停止や、ウイルス感染細胞が長期間体内に潜伏しているなどの現象も休眠と係わりが深い。種子や孢子などの休眠細胞では代謝がほとんど停止しており、タンパク質新生は行われないと考えられるが、温度変化などの外部刺激により発芽能などの性質が変わることが知られている。このような現象は休眠細胞中において、タンパク質新生を伴わないならぬ物質的な変化を示唆しているが、そ

の分子機構の詳細はほとんど明らかにされていない。休眠及び発芽の分子機構を明らかにし、人為的な制御を可能にすることは医療や衛生分野への応用も期待される。

2. 枯草菌孢子のプロテオーム解析

Bacillus 属や *Clostridium* 属細菌は栄養増殖に適さない環境条件になると、熱・化学物質・放射線などに対して抵抗性を備えた孢子を形成する。休眠細胞である孢子ではタンパク質新生が停止し、代謝もほとんど行われていない。枯草菌孢子は DNA を含むコア、ペプチドグリカン層からなるコルテックス、タンパク質からなるコートの上層構造からなっている。休眠状態の孢子は栄養増殖に適した環境条件になると、そのシグナルを受け取り、一連のタンパク質分解が起こる。そしてタンパク質新生が回復し、発芽後成長を経て再び栄養増殖を行う。

本研究では、休眠状態の孢子におけるタンパク質修飾を明らかにするためにプロテオーム解析を行った。材料として枯草菌野生株 168 のほか、孢子形成

摂南大学薬学部 (〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町 45-1)

e-mail: kuwana@pharm.setsunan.ac.jp

本総説は、平成 20 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

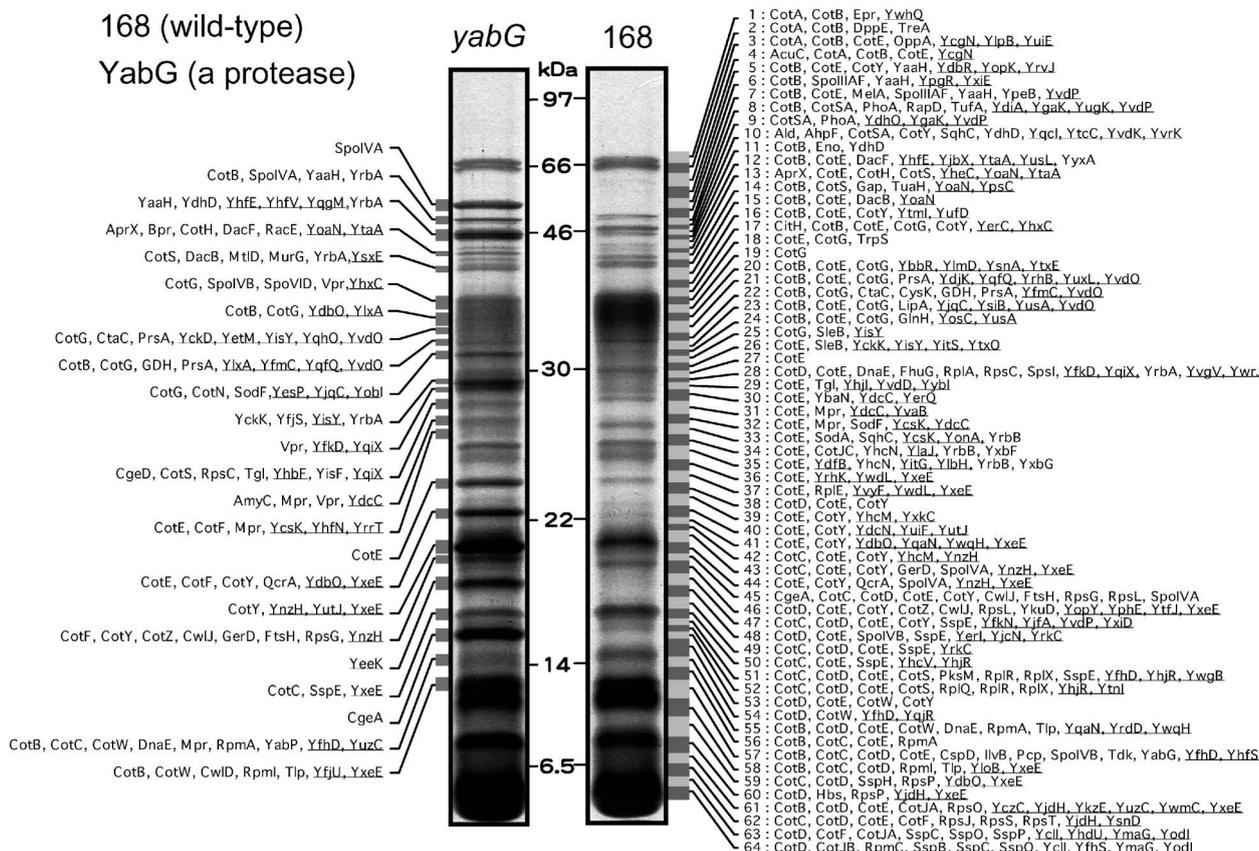


Fig. 1. The Protein Profile of *B. subtilis* Spores

Proteins were extracted from mature spores of *B. subtilis* 168 wild-type and *yabG* mutant cells. The *yabG* gene of *B. subtilis* encodes a sporulation specific protease which is involved in the processing of several spore coat proteins. The protein samples were analyzed by a combination of SDS-PAGE and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Uncharacterized proteins are underlined.

期特異的プロテアーゼ YabG 変異株を用いた。YabG 変異株孢子ではその基質となるタンパク質が分解されないことから、野生株孢子と異なるタンパク質組成を示す。¹⁾ 精製孢子から可溶化したタンパク質を SDS-PAGE で分離し、そのゲル片を LC-MS/MS により解析した (Fig. 1)。野生株孢子からは 154 種類、YabG 変異株孢子からは YabG 変異株孢子に特異的な 89 種類のタンパク質が同定された。そのうち 101 種類のタンパク質は機能既知であり、85 種類のタンパク質は機能未知であった。また機能既知 101 種類のうち 52 種類のタンパク質は孢子形成期特異的なタンパク質であった。²⁾ 同定された多くのタンパク質は、ゲノム解析による推定分子量と一致していた。一方で、明らかに分解あるいは架橋などの修飾を受けていると思われるタンパク質も多数検出された。

3. 時間と熱に依存したスポアコートタンパク質の修飾システム

コートタンパク質が相互に架橋されることによりスポアコートは強固な構造となり、孢子を様々な外的傷害性因子から保護すると考えられている。Figure 1 に示した通り、枯草菌孢子には少なくとも 150 種類以上のタンパク質が含まれており、スポアコートには酵素活性を持つタンパク質も存在する。²⁾ 枯草菌が孢子を形成する過程で、コートタンパク質の修飾を行う YabG や Tgl (トランスグルタミナーゼ) などの酵素が発現し、スポアコートに局在している。¹⁻⁴⁾ Tgl はペプチド間のグルタミンとリジン残基を架橋する酵素で、原核生物だけではなく、真核生物まで広く存在している。また Tgl の至適活性温度は 37°C と 60°C にある。*Bacillus* 属や *Clostridium* 属において、加熱処理による孢子的発芽誘導はよく知られているが、加熱処理によって変化する物質は明らかにされていなかった。Tgl が加

熱処理による孢子の性質変化に関与すると推定し、それを証明するために以下の実験を行った。

発芽に関与するコートタンパク質 GerQ は Tgl の基質として知られており、37°C で孢子が成熟するにしたがって単量体 (23 kDa) から架橋され、40 kDa の高分子量体となる [Fig. 2(A)]. GerQ タンパク質の架橋が開始される時期には、既に代謝が抑制され、タンパク質新生も起こらない。40 kDa-GerQ タンパク質は、YabG 変異株孢子では検出されず、Tgl 変異株孢子では野生株と比較してわずかしら検出されなかった [Fig. 2(B)]. このことから GerQ タンパク質は YabG と Tgl の共通の基質であることがわかった。次に YabG 変異株孢子を 60°C で 20 分間加熱処理を行うことにより 40 kDa-GerQ タンパク質が形成された [Fig. 2(C)]. YabG 変異株孢子に Tgl の阻害剤である硫酸アンモニウムを添加し、60°C で加熱処理をしたところ、40 kDa-GerQ タンパク質は形成されなかった [Fig. 2(D)]. これらのことから 60°C で起こる GerQ タンパク質の修飾は Tgl に特異的な反応であることがわかった。³⁾

枯草菌野生株孢子ではタンパク質新生停止後、2つのシステムによりタンパク質修飾が行われていると考えられる。1つ目は時間経過によるタンパク質の修飾である [Fig. 3(A)]. 基質タンパク質は、始めに YabG により分解され、中間体となり、Tgl により架橋され最終産物となる。またこの時 Tgl 以外にも架橋反応を行う酵素があるかもしれない。2つ目は加熱処理によるタンパク質の修飾である [Fig. 3(B)]. 加熱処理により、Tgl が活性化し、基質タンパク質を中間体から最終産物へと修飾・架橋反応を行う。また Tgl 以外にもタンパク質の修飾を行う酵素があるかもしれない。これらのようなタンパク質修飾のシステムはタンパク質が翻訳後すぐに修飾されるのではなく、時間経過や温度依存によりタンパク質新生から遅延して修飾反応が起きている。休眠細胞である枯草菌孢子において、Tgl は失活することなく保持されており、加熱処理により活性化し、タンパク質を修飾することが明らかとなった。コートタンパク質が修飾されることでスポアコートの構造が変化し、孢子内部への外部シグナル伝達が容易になることによって発芽の誘導が行われているのかもしれない。

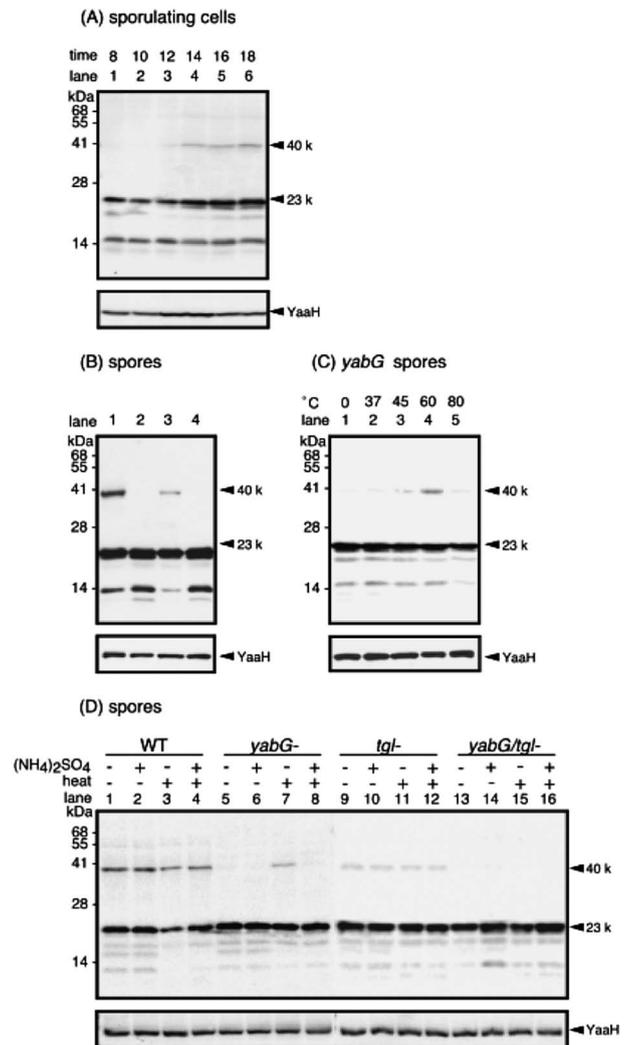


Fig. 2. Immunoblotting Analysis of Germination Protein GerQ

(A) GerQ is crosslinked as sporulation proceeds. Protein samples were prepared from wild-type sporulating cells (lanes 1–6). The times shown are hours after cessation of exponential growth. (B) GerQ is the common substrate of YabG and Tgl. Purified spores were prepared and protein samples were solubilized from wild-type spores (lane 1), *yabG* mutant spores (lane 2), *tgl* mutant spores (lane 3), and *yabG/tgl* double-mutant spores (lane 4). (C) GerQ crosslinking is controlled by temperature. Purified spores were prepared and incubated for 20 min at 0°C, 37°C, 45°C, 60°C, or 80°C. The temperature (°C) of the heat treatment is shown at the top. Proteins of *yabG* mutant spores were solubilized (lanes 1–5). (D) The enzyme activity of Tgl is inhibited by ammonium sulfate. Purified spores were prepared and equilibrated spore samples were incubated for 5 min on ice with 20 mM ammonium sulfate (pH 7.2) (even-numbered lanes) or control buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.6; odd-numbered lanes). Spores were next analyzed either directly (lanes 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, and 14) or after incubation at 60°C for 20 min (lanes 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, and 16). Protein was solubilized from wild-type spores (lanes 1–4), *yabG* mutant spores (lanes 5–8), *tgl* mutant spores (lanes 9–12), or *yabG/tgl* mutant spores (lanes 13–16). Arrowheads show the position of GerQ (upper panel). YaaH was analyzed as a loading control by using anti-YaaH antiserum for detection (lower panel).

スポアコートに存在する修飾酵素は安定な状態で保持されていることがわかった。またその修飾酵素は加熱処理などの外的要因により活性化され、タン

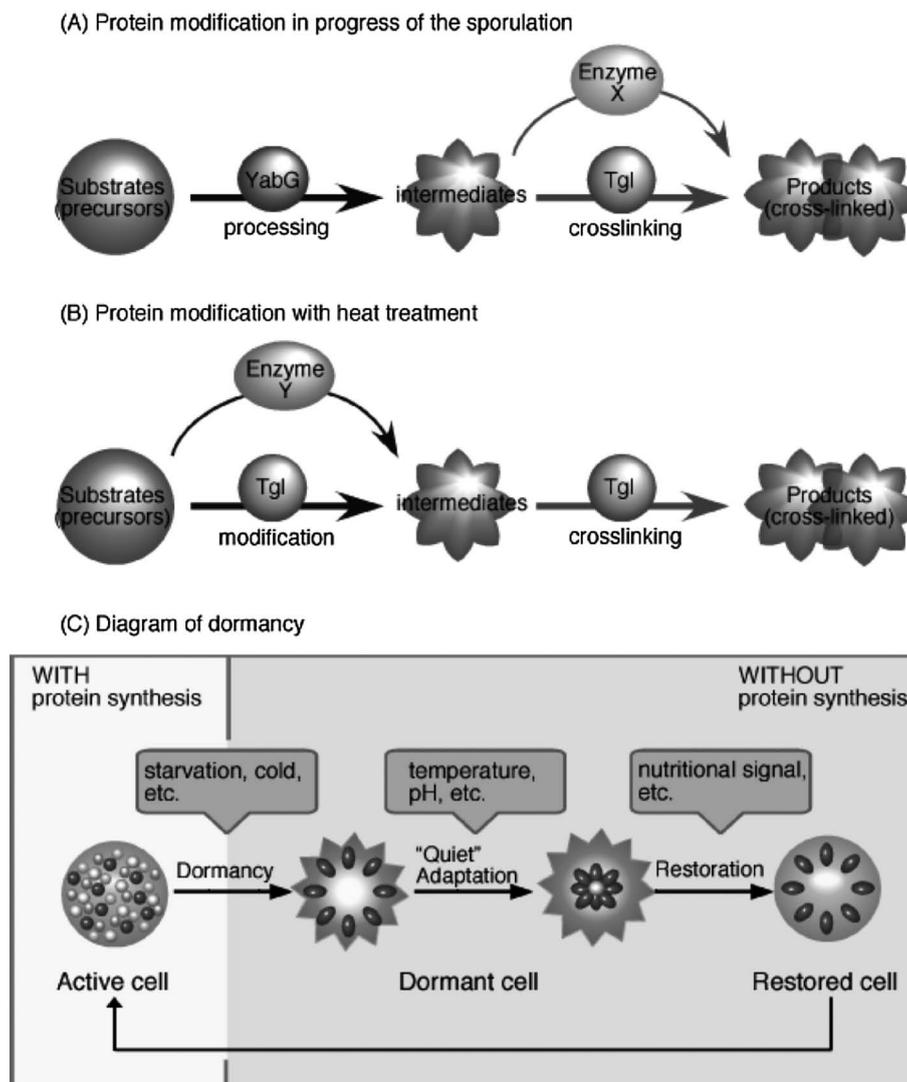


Fig. 3. Scheme for Activity of the Protein Modification System in Dormant Cells

A possible model for the crosslinking of coat proteins is shown. Coat proteins are synthesized in precursor forms in the mother cell compartment during sporulation. Some coat proteins are processed or cleaved into intermediates by a protease such as YabG, after which they are further modified by other enzymes. (A) Protein modification is progressed during sporulation at 37°C. Precursor proteins (substrates) are first processed into intermediates by YabG. The proteins are next probably crosslinked by Tgl and/or Enzyme X. (B) Protein modification is occurred with heat treatment at 60°C. Precursor proteins (substrates) are first modified into intermediates by Enzyme Y but are not modified by YabG. The proteins are then probably crosslinked by Tgl. Because a temperature of 60°C is optimal for the enzymatic activity of Tgl, the two-step modification of precursors into crosslinked products is presumably mediated by Tgl alone. (C) Diagram of “Quiet” adaptation during dormancy. “Active” adaptation, which requires control of gene expression, is a general phenomenon seen in response to adjust environmental conditions such as nutritional starvation or extreme temperature in active cells. The “Active” adaptation is not available in dormant cells, in which almost all gene expression is repressed. Under certain conditions, some built-in enzymes are activated and become involved in the modification of proteins and other cellular materials in dormant cells. The “Quiet” adaptation is dependent on the activities of built-in enzymes in dormant cells, without induction of gene expression or *de novo* protein synthesis. Other enzymes are involved in the restoration of dormancy in response to signals such as nutritional status.

パク質新生を伴わずに翻訳後修飾を行うことができる。また熱以外にも水分量、pH、塩濃度など一般的に酵素活性に影響する要素も休眠細胞におけるタンパク質修飾機構に関与し、休眠細胞の環境応答に重要な役割を担っている可能性がある [Fig. 3 (C)]. 活動中の細胞は遺伝子発現プロファイルを変化させることにより外部環境に適応することができる。本研究では、休眠細胞でも環境変化に適応す

ることを分子レベルで明らかにした。このようなシステムは、活動中の細胞における適応 (“Active” Adaptation) に対して、休眠細胞における「静かなる適応 (“Quiet” Adaptation)” と言うべきであろう。「静かなる適応」は枯草菌孢子に限られるものではなく、休眠細胞において普遍的に存在するかもしれない。

4. さいごに

微生物の胞子は一般的に熱や薬品に抵抗性を持つため、防除が困難であり、食品や医薬品の衛生管理を行う上で重要な存在となっている。休眠細胞から発芽への引き金となる発芽剤やスポアコートタンパク質修飾酵素の阻害剤をデザインすることで、静菌的な発芽抑制により細菌汚染を防ぐことが可能になると考えられる。また胞子には Tgl のように加熱処理で活性化する酵素のほかに、ユニークな酵素が存在しているかもしれない。それらを利用することにより人為的に活性をオンオフできる酵素の開発や、耐熱性あるいは耐化学薬品性の酵素を開発できる可能性もある。

謝辞 本研究は摂南大学薬学部微生物学研究室で行われ、渡部一仁教授、高松宏治博士、今村大輔博士に深く感謝いたします。タンパク質同定にご指

導ご協力を頂きました奈良先端科学技術大学院大学の小笠原直毅教授、北海道大学の笠原康裕准教授に心より感謝いたします。本研究の一部は科学研究費補助金（若手 B）の助成を受けて行われました。

REFERENCES

- 1) Takamatsu H., Kodama T., Imamura A., Asai K., Kobayashi K., Nakayama T., Ogasawara N., Watabe K., *J. Bacteriol.*, **182**, 1883–1888 (2000).
- 2) Kuwana R., Kasahara Y., Fujibayashi M., Takamatsu H., Ogasawara N., Watabe K., *Microbiology*, **148**, 3971–3982 (2002).
- 3) Kuwana R., Takamatsu H., Watabe K., *J. Biochem.*, **139**, 887–901 (2006).
- 4) Takamatsu H., Imamura A., Kodama T., Asai K., Ogasawara N., Watabe K., *FEMS Microbiology Letters*, **192**, 33–38 (2000).