

細菌による細胞外膜小胞への選択的タンパク質輸送機構の解析
Analysis of the selective protein loading to bacterial extracellular membrane vesicles

京都大学 化学研究所 川本 純

研究成果概要

本研究では、京都大学化学研究所スーパーコンピュータシステムを利用し、新規の細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 より見いだされたユニークなタンパク質輸送機構の解明に取り組んだ。現在までに単離されている全ての細菌が、ナノサイズのカプセル状粒子を細胞外に分泌する。これらの細胞外微粒子は、細胞外膜小胞 (Extracellular membrane vesicles, EMVs) や外膜小胞 (Outer membrane vesicles, OMVs) と称される。EMVs は、細菌間もしくは細菌-宿主間の情報伝達ツールとして機能し、細菌の細胞塊形成 (バイオフィルム) や宿主への感染といった細菌の生存戦略に重要な役割を果たしていると考えられている。一方で、細菌による EMVs 生産は、新しい微生物機能として生物工学的にも注目集めており、EMVs を基盤とする薬物送達やワクチン開発、ナノリアクターや異種タンパク質分泌生産系構築の足場としての応用が期待されている。これまでに、細菌による EMVs 生産経路として、細胞表層の突出と切り出し経路 (Blebbing and pinching-off pathway) と溶菌を伴う経路 (Explosive cell lysis) の 2 つの経路が提唱されているが、詳細な分子基盤については不分明な点が多い。アジの腸管より採取されたグラム陰性細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 は、EMVs を大腸菌や類縁菌に比べて高生産する。さらに、本菌の EMVs には機能未知タンパク質 P49 がほぼ単独の主要な積荷タンパク質として輸送されている。P49 は既存の配列データベース検索からは、機能があきらかな類縁タンパク質が存在せず、そのアミノ酸配列から機能を推定することができない新規のタンパク質であった。P49 の生理機能解明や改変可能領域の同定を目的に、P49 の結晶構造解析に取り組んだ。得られた結晶を大型放射光施設 SPring8 の放射光 X 線構造解析に供し、スーパーコンピュータシステムをもちいたタンパク質立体構造予測 (AlphaFold2) から得られた構造予測モデルをもちいたフィッティング解析から、その構造をあきらかにした。本タンパク質は、ホモ二量体構造を形成しており、各サブユニットは比較的堅牢な構造の 2 つのドメイン (domain A と domain B) と、柔軟な構造ドメイン (domain C) から構成されていた。さらに、domain A と domain B の複数のアミノ酸残基に氷晶防止剤 (Cryoprotectant) としてもちいたグルコース分子が結合していた。P49 は EMV 表層を覆う莢膜多糖 (Capsular polysaccharide, CPS) と相互作用することで EMV 表層に結合する糖鎖結合タンパク質であることが生化学実験よりあきらかになっている。本結晶構造から見いだされた糖結合領域は、CPS と P49 の相互作用に関連する領域であることが予想され、本領域の点変異解析より、P49 選択的な EMVs への積荷輸送の詳細が解明されると期待される。