

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 分子微生物科学研究領域

川本 純

研究成果概要

回遊性魚類より単離された新規の細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 は、約 80 nm に均一化された細胞外膜小胞を高生産する。本菌の膜小胞の表層には、機能未知のタンパク質 P49 が、ほぼ単一の積荷タンパク質として含まれていたことから、本菌が有する P49 選択的な積荷輸送機構を有していることが予想された。この仕組みを応用することで、天然のナノキャリアである細菌由来の膜小胞の表層改変が可能となり、本菌の膜小胞をプラットフォームとする新規のワクチンやナノリアクター、異種タンパク質の分泌生産システムの開発が期待される。本研究では、スーパーコンピュータシステムを利用した構造予測と X 線結晶構造解析、積荷タンパク質をコードする遺伝子の周辺遺伝子の生理機能解析から、P49 選択的な膜小胞への輸送機構の解明に取り組んだ。

P49 遺伝子の周辺には細菌の表層多糖の生合成に関連する糖転移酵素やフリップアーゼ、糖鎖輸送タンパク質などのホモログ遺伝子が見出された。これらの遺伝子を破壊することで得られた表層糖鎖欠損株では、P49 は膜小胞表層には輸送されず、培養上清に放出されることがわかった。これらの結果は、本菌の表層糖鎖が P49 の足場として機能し、本タンパク質を膜小胞表層に結合させる可能性が示唆された。さらに、表層糖鎖欠損株の培養上清から精製された P49 について本菌の表層糖鎖との *in vitro* 結合アッセイの結果、本タンパク質が表層糖鎖と直接結合する糖鎖結合タンパク質であることがわかった。精製タンパク質の X 線結晶構造解析の結果から、本菌は 3 つのドメイン構造を有しており、ドメイン 1-2 とドメイン 3 が柔軟なリンカーで連結していることが示唆された。*In silico* によるドッキングシミュレーションや構造類似性解析から、ドメイン 3 と糖鎖との直接的な相互作用の存在が示唆された。以上の結果から、*S. vesiculosa* HM13 の膜小胞表層において、表層糖鎖と P49 の柔軟なドメイン 3 との直接的な相互作用によって、選択的に膜小胞表層に輸送されている可能性が示された。