

細菌細胞のストレスに対する応答と

その緑色蛍光タンパク質変異体を用いたモニタリング法の開発

土 戸 哲 明*・坂 元 仁**

Stress Responses in Bacterial Cells and Development of Their Monitoring Methods by Using Mutated Green Fluorescent Proteins

Tetsuaki TSUCHIDO, Jin SAKAMOTO

1. 細菌細胞とそのストレスへの対応

生物細胞が、環境ストレスにどのように対応するかの問題は、最近の分子生物学的研究によってかなり理解されるようになってきている。とくに、熱や低温、放射線、酸化などのストレスについては盛んに検討され、多くの固有なシステムも存在するが、進化の過程を経て原始生命体から生物の種を超えてそれらの遺伝子が保存されていることも知られるようになってきている。これら細菌におけるストレス応答は、細胞の死滅メカニズムという生死に関わる基礎的な問題であるとともに、応用的にも食品や医療・医薬、諸環境における微生物制御の根幹的問題でもある¹⁾。

ここでは、ストレスの代表例として熱をとりあげ、最もよく研究が進んでいる細菌（バクテリア）の大腸菌と枯草菌について、それらのストレス応答システムを紹介する。そしてさらに、下村脩博士のノーベル賞受賞で一躍一般にも知られるようになったオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein、以下 GFP と略する）の変異によってセンサー特性を持たせるようにし、ストレスのモニタリングツールとした開発例を紹介する。

2. 細菌細胞のストレスに対する応答システム

まず、細菌とはどういうものか簡単に触れておこう。

主要な微生物には真正細菌、古細菌、真菌があり、我々がふつう新聞やテレビなどで目にしたり、耳にする細菌はほとんどが真正細菌である。この細菌は、そ

の細胞壁の構造の違いから、グラム染色によって染まるグラム陽性細菌と染まらないグラム陰性細菌があり、大腸菌は後者の、枯草菌は前者の代表的なものである。グラム陽性細菌の細胞壁の基本構造は厚いペプチドグリカンであるが、グラム陰性細菌ではこの層が比較的薄く、その代わりに外側に外膜をもっている。この違いは、それぞれの細菌の細胞質の浸透圧が異なることに起因するとみられており、そのことが、おおざっぱに言って、前者が物理的ストレスに強いものに対して後者は化学的ストレスに強いという性質をもたらす。

さて、ストレスといってもいろいろあり、熱や低温、紫外線を含む放射線などの物理的なもの、酸化剤などから発生する活性酸素、酸やアルカリ、浸透圧など化学的なもの、また栄養源飢餓やファージ感染など生物学的なものがある。ストレスが致死的な作用を発揮する場合は細胞の死滅を、また非致死的な作用を生ずる場合は発育の阻害や停止をもたらす。半致死（亜致死ともいう）な作用の場合は細胞損傷を起こし、ストレスがなくなるとその後細胞は損傷の修復を行う。ストレスの作用の程度の違いはあれ、微生物細胞はそれらのストレスに対する個々の応答システムを用意し、それらを作動させてストレス環境下でも適応したり、ストレス後に損傷を修復して生き残ろうとする。

微生物に限らず細胞の一般的なストレス応答システムは一連の反応で構成される（図1）²⁾。それに関わる因子は、ストレスの刺激を受けるセンサー、それが発するシグナルを変換して伝えるトランスデューサー、さらにそれが働きかけるレギュレーター、それに発現が支配されているストレス遺伝子群、そしてそれらから発現されてストレス下での適応や生存のため

原稿受付 平成23年9月1日

*化学生命工学部 生命・生物工学科 教授

**同 特任助教

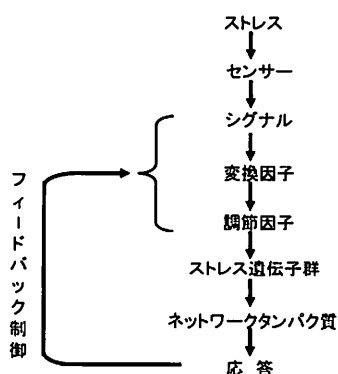


図1 細菌細胞におけるストレス応答の概念図²⁾。

に機能するストレスタンパク質群である。一般にこれらストレスタンパク質群はストレス負荷直後では緊急対応のため一過的に多量合成されるが、しばらくするとフィードバック制御がかかって定常的なレベルに収束する。

ここで、次項以降に出てくる用語の問題の紹介を兼ねて、専門外の読者や生命・バイオ系の低学年の学生のみなさんのために、遺伝子発現システムの基本について触れておこう。一般に、DNA上の遺伝子の発現は、次のように行われる。まず、RNAポリメラーゼによって遺伝子のDNA塩基配列が伝令RNA(mRNA)に写し取られる(転写)。次に、そのRNAの塩基配列が、タンパク質製造工場であるリボソーム上で転移RNA(tRNA)によって運ばれてきたアミノ酸の配列に転換されつつ、それらのアミノ酸が順次つなぎ合わされてタンパク質(酵素)がつけられる(翻訳)。どの遺伝子を読むかはRNAポリメラーゼの σ 因子が決定する。種類の異なる σ 因子がある場合、どの σ 因子がRNAポリメラーゼの本体酵素(コア酵素)に結合して働くかによって異なった遺伝子が読み取られ、その結果つけられてくるタンパク質は異なる。つまり、異なる σ 因子はそれぞれが支配する特定のグループの遺伝子の発現を一括して制御している。遺伝子の発現の制御では、 σ 因子だけでは転写がおこらず、これを助ける作用をもち遺伝子を発現させる方に働く正の制御因子(アクチベーター)が関わる場合や、さらに逆に通常は発現しないように遺伝子上流に結合して抑えていて、必要な時になるとはずれて遺伝子を発現させる負の制御因子(リプレッサー)が関わる場合もある。このような場合は、ストレス発生のシグナルによって、アクチベータータンパク質が活性化して遺伝子上流の特定部位に結合するか、あるいはリプレッサータンパク質が不活性化して結合部位から外れることにより、ストレス時に必要な遺伝子の発現が起動・活性化されることになる。

以上の基礎知識をもとに、ストレスの典型としてとりあげた熱に対する細菌細胞の応答システムについて、最近の知見を含め、その概要を紹介しよう。

3. 熱ストレス応答システム

通常の増殖時に働いている主要な σ 因子は、大腸菌では σ^{70} (σ^D とも書く)、枯草菌では σ^A であるが、加熱ストレスにさらされた場合、別の σ 因子—大腸菌では主に σ^{32} (σ^H ともよばれる)、枯草菌では σ^B —が作動し、それらの制御因子の働きによって多くの種類の熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein, 以下HSP)がつけられる。このHSP合成システムは、大腸菌では比較的簡単であるが、枯草菌では複雑で σ 因子以外にもアクチベーターやリプレッサーが関与するいくつかの制御系がストレス応答に関与する。それぞれのシステムについてもう少し説明しよう^{3, 4)}。

大腸菌では、栄養培地中で非致死の温度に加熱(たとえば30℃から42℃)されても、増殖の速度は低下せず、むしろ少し速くなるが、細胞内ではこれに対応する熱ストレス応答(熱ショック応答ともいう)が作動する。もともと、平常時に細胞内に一定量つけられていたHSPのうち、分子シャペロンとよばれる他のタンパク質の構造形成を助ける因子のDnaKおよびGroEL/GroESの2つのセットのグループのタンパク質が、細胞内に増えてきた熱変性タンパク質と結合するようになり、それまで結合の相手であった σ^{32} 因子を遊離する。さらに、分子内水素結合によって細胞内で翻訳されない形の2次構造をとっていた σ^{32} のmRNAが高温で伸びて一本鎖状となり、リボソームと結合できるようになる。これによってその翻訳が行われて細胞内の σ^{32} のレベルが数分以内に上昇し、それがRNAポリメラーゼのコア酵素と結合する。その結果、染色体上のあちこちに散在している σ^{32} の支配下にある熱ショック遺伝子群からHSPが多量に生産されるようになる(図2)。その後しばらくすると、合成されたDnaK/DnaJ/GrpEの量が上昇してこれらが再び σ^{32} に結合し、HSPの合成を部分的に抑制するようになる。この結果、HSPは高温での一定の発現量に落ち着くことになる。 σ^{32} のレベル変動には、プロテアーゼとして細胞膜に局在して会合できない膜タンパク質や損傷を受けた膜タンパク質を分解するFtsHというタンパク質も関与している。

大腸菌のHSPは、上に挙げたもののほか著者らの研究室で調べられたIbpAとIbpB(small HSPとよばれる)を含む分子シャペロンやFtsHのほかいくつかのプロテアーゼが主なものであるが、そのほかDNA修飾・修復関連タンパク質や転写機構に関係す

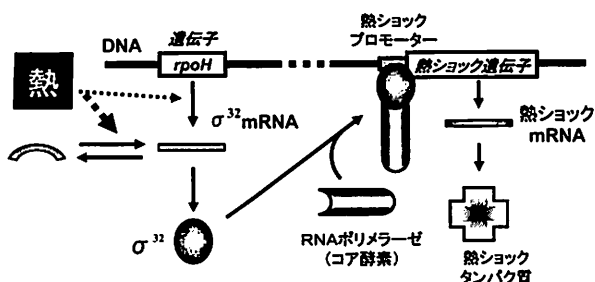


図2 大腸菌における σ^{32} 因子による熱ショック応答の概念図²⁾。

加熱によって細胞内で不活性な構造をとっていた σ^{32} が活性型となり、翻訳されて細胞内の σ^{32} が増えるとともに $rpoH$ 遺伝子からの転写も活発化する。 σ^{32} はRNAポリメラーゼコア酵素と結合し、 σ^{32} が認識する熱ショックプロモーターをもつ熱ショック遺伝子の転写・翻訳が行われて熱ショックタンパク質が合成される。

るものなど100以上のものが報告されている。面白いことに、通常の増殖時の遺伝子発現を制御する σ^{70} もこれに含まれている。これらの多くは細胞質に存在するが、一部は細胞質膜やペリプラズムに局在する。増殖が十分起こる状況の42℃への熱ショック処理では σ^{32} とともに σ^{70} も機能しており、その支配下のタンパク質も活発に発現している。

高温での生存には σ^{32} だけではなく、表層ストレス応答の制御因子の σ^E や定常期や炭素源飢餓など一般ストレス応答とよばれる種々のストレスへの応答に共通して関わる発現制御因子の σ^S も必要である。高温への温度シフトによる σ^S の誘導は σ^{32} よりもゆっくりで程度も小さい。熱ストレスに関わる σ^S の役割については、高温で発生する活性酸素の消去酵素の合成とタンパク質や細胞膜に対して保護作用をもつトレハロースの生産であらうとされている。 σ^E については次項で述べる。

一方、枯草菌のHSPは200近くあり、その制御には主に以下の4つのシステムが関与しているが、80近くの遺伝子についてはその制御機構がなお不明である。

i) 大腸菌の σ^{32} に相当する熱ショック専門の σ 因子はなく、最多の熱ショック遺伝子を発現させる主要なものは、枯草菌における一般ストレス応答を司る σ^B である。しかし大腸菌での一般ストレス応答を制御する σ^S と違って σ^B の発現システムは迅速に対応する。
ii) 枯草菌のDnaK/DnaJ、GroEL/GroESなど熱ショック応答の中核的なものの発現はリプレッサーのHrcAタンパク質の制御によっている。HrcAがリプレッサー

機能を発揮するにはGroEL/GroESによって一定の割合でリフォolding（再折り畳み）されている必要があるが、加熱処理によって細胞内に変性タンパク質が増えるとGroEL/GroESがその方に結合し、HrcAタンパク質は変性してリプレッサーとして作用できず、その支配下の遺伝子が発現することになる。iii) 別のリプレッサーのCtsRはHSPのClpPペプチダーゼの発現を抑制しているが、熱ストレスによって変性タンパク質が増えるとその分解の一翼を担うClpCPに結合していたアルギニンキナーゼのMcsBが遊離し、CtsRをリン酸化して抑制を解放する。iv) 2成分制御系のCsrR-CsrS系では、細胞膜に局在するCsrSが細胞壁と細胞膜の界面近くの変性タンパク質を認識して結合していたCsrRを脱離させる。これによって、細胞膜局在のHSPプロテアーゼであるHtrAとHtrBの発現が活性化される。

4. 表層ストレス応答システム

熱ショック応答で述べた細菌の熱ストレスへの対応戦略はほとんど細胞質におけるものであるが、より致命的な温度では細胞膜やペリプラズムを含む細胞表層の損傷が起こり、それに対する修復が必要となる。表層ストレス応答については、最近の研究により、熱に限らず種々の環境ストレスへの対応だけでなく平常時でも細胞表層の形態形成の目的で機能する、多様で複雑な制御システムが明らかになりつつある。大腸菌では、 σ^E 、Cpx、Psp、Rcs、Baeの少なくとも5つの応答系が、枯草菌では2成分制御系のLiaRS、ECF(細胞質外機能) σ 因子とよばれる σ^W 、 σ^M 、 σ^X などが関与する応答系がある。このうち熱ストレスによって作動するものとしては大腸菌の σ^E 応答系があり、これはエタノールやある種の抗生物質処理によっても誘導される。枯草菌でも σ^X と σ^M について熱ストレスとの関係が報告されているが、その詳細は不明である。ここでは大腸菌の σ^E 制御系の概要を紹介する^{3, 5)}。

著者らのかつての研究などによって、大腸菌を50℃以上の温度にさらすと細胞膜やペリプラズムを含む細胞表層にさまざまな損傷が起こることがわかっている。これに対するストレス応答のために機能する因子が σ^E で、その活性化の機構を図3に示す。熱ストレスがない状態の細胞では、 σ^E はその抗 σ^E 因子で細胞質膜タンパク質であるRseAにそのN末端側で結合して不活性である。さらに付加的な制御因子としてペリプラズムタンパク質であるRseBがRseAのC末端側に結合し、DegSと別のプロテアーゼのRsePによるRseAの切断を調節している。 σ^E の発現は σ^E 自身によって自己制御されている。熱ストレスがかか

表1. ストレス評価用 GFP センサーの種類と特性¹⁾

種 類	ストレス評価の原理	模式概念図
① 環境ストレス直接評価型センサー	通常のプロモーターの支配下に置き、通常細胞質で発現し、細胞内のpH、塩素イオン、酸化などの環境変化による蛍光変化を測定。胞子の場合には耐熱型 GFP を使用。	
② 細胞内局在型ストレスセンサー	シグナルペプチドを連結し、そのアミノ酸配列に細胞内各部（大腸菌では外膜、ペリプラズム、細胞質膜など）に局在する信号を設計。細胞の局在的な環境変化を測定。環境変化の評価は①と同じ。	
③ プロモーターアッセイ用ストレスセンサー	ストレス応答誘導の制御因子が認識するプロモーター活性を、目的プロモーターの下流に連結した GFP の発現による蛍光強度によって評価。さらに、2重プロモーターアッセイ系では、細胞個々で異なる発現量を標準化するため、同一ベクター内に平常時用 GFP と異なるストレス発現用 GFP をそれぞれのプロモーターの下流に配置し、それらの蛍光強度の比によってプロモーター活性の強度を測定。	
④ FRET 型ストレスセンサー	2つの蛍光波長の異なる GFP 分子をリンカーで連結し、ドナー分子の励起によって生ずる蛍光が、エネルギー移動によってアクセプター分子の蛍光を誘起する。この放出蛍光の強度を測定。ストレスによってドナー GFP に構造変化を起こし、それによってアダプター GFP に蛍光を放出させる。環境変化の評価は①と同じ。	

ると、まず外膜タンパク質のポーリン（親水性低分子の透過孔を形成するタンパク質）が変性し、ポーリンの内部に埋もれていたC末端側にある保存配列のモチーフが露出してペリプラズム局在プロテアーゼのDegSの活性型を安定化させ、このDegSがRseAを分解する。RseAの分解はRseBが遊離するとさらに進行する。RseBはペリプラズム中に変性タンパク質が増えることによってRseAから離れると考えられているが、別途脂質やリポタンパク質と結合する説も出されている。 σ^E はRseAの分解によってRseAから遊離し、RNAポリメラーゼコア酵素と結合してこれ

に支配されている遺伝子群を発現させる。

σ^E 支配下の遺伝子には、転写因子の *rpoE*, *rpoH*, *rpoD*（これらはそれぞれ、 σ^E , σ^{32} , σ^{70} の構造遺伝子）、翻訳因子の *fusA*、調節因子の *rseA*, *rseB*, *rseC*、ペリプラズムフォールディング因子として *skp*, *dsbC*, *fkpA*, *surA*、プロテアーゼの *degP* (*htrA*), *rseP*、リポ多糖体およびリン脂質合成関係の遺伝子群、センサータンパク質のほか、多くの機能未知のタンパク質の各遺伝子群がある。

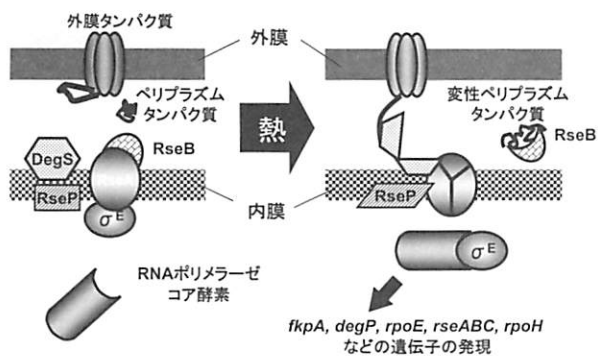


図3 大腸菌における σ^E 因子による表層ストレス応答の概念図²⁾。

加熱によって外膜ポリンタンパク質が変性し、その一部の構造の変化をDegSプロテアーゼが認識して自身のプロテアーゼ活性を発揮し、抗 σ^E 因子のRseAを分解する。RseAの分解は、これに結合するRseBがペリプラズムのタンパク質変性の増加によって離脱することによっても進行し、またRsePプロテアーゼも関与する。RseAの分解によって活性が制御されていた σ^E は遊離し、RNAポリメラーゼコア酵素と結合して σ^E 支配下の遺伝子群が発現する。

5. GFP変異体を用いたストレスモニタリング¹⁾

さて、冒頭に述べた微生物制御分野における実用的な見地からの重要な問題の1つとして、細菌細胞にストレスがかかったことをどう検出し、さらにその程度をどう評価するかということが挙げられる。ここで紹介するGFP変異体を応用したストレスセンサーは、表1に示すように、それぞれこれらの目的にかなう特性をもつよう分子設計することによって作製できる。そしてさらに、それを細胞内に発現させ、非破壊的な方法の1つとして、細胞がストレスにさらされたときのGFPの蛍光強度の変化を計測することが可能である。しかも、GFPセンサーは、その遺伝子の塩基配列を試行錯誤的に変化させた変異体をいろいろ作製して、種々の環境因子に対する特異的なセンサー機能をもたせることもできる。たとえば、部位特異的な変異によってセンサー自体を耐熱性にした、システインの置換導入によってSH基を付加し、それらの間のジスルフィド結合を形成させることによって酸化還元反応のセンサーとすることなどである。表1に示したGFPセンサーの作製の戦略とその応用例をいくつか紹介しよう。

第1は、pHや塩素イオン、酸化反応や温度など環

境因子の変化に特異性をもつストレスセンサーの開発である。細菌細胞の加熱損傷をモニタリングするには、高温で安定なものを作製する必要がある。著者らは、種々のpHセンサー、塩素イオンセンサー、酸化センサーを作製し、熱や食塩ショックなどの損傷解析に利用している。このセンサーの要件としては、測定範囲内において安定に目的の環境因子の変化のみを感知して蛍光が変化することである。

第2は、細胞内局在型センサー、つまり細胞質内で発現後細胞表層の異なる部位にGFPを輸送・局在化させるGFPセンサーの開発である。通常のペプチド状態で細胞質膜を透過させるSEC輸送系に依存するI型シグナルペプチドとGFPとを融合させた場合、GFPの速いフォールディングのために輸送過程で目詰まりを起こし、局在化に失敗する場合が多い。ただ、融合フレームの検討や比較的低温での発現誘導によってペリプラズム空間への輸送が成功する場合がある。しかし、これよりもさらに有効な輸送方法は、TAT (twin-arginine transport) 輸送系のシグナルペプチドとGFPとの融合である。このTAT輸送系は、フォールディング済みのTATシグナルペプチドを持つタンパク質や、それとサブユニットを形成するTATシグナルペプチドを含まない巨大分子まで一緒に輸送することができる。著者らは、TATシグナルペプチドに脂質修飾を受けて膜局在化するII型シグナルペプチドのlipo box (L-X-X-C) 部分を融合させたキメラシグナルペプチドを設計しており、これらを用いて細胞質以外の外膜や内膜など特定の場所での損傷や構造変化の検出に活用している。

第3は、プロモーターアッセイ用ストレスセンサーの開発である。種々のストレス応答によってそれぞれ固有の制御遺伝子が支配するストレス遺伝子群が発現が誘導されるが、その誘導の支配下にある遺伝子の発現におけるプロモーター活性を当該プロモーターの下流に連結したGFP遺伝子の発現によって評価するためのセンサーである。これまでの転写レポーターとしては、特定遺伝子のプロモーターとlacZ遺伝子との融合による β -ガラクトシダーゼ誘導合成系を用い、その酵素活性を測定する方法が以前から一般に用いられてきたが、GFPの蛍光を用いれば細胞破碎のプロセスが不要となる。さらにこの発展版として次の例がある。内部標準用として平常時に作動する σ^{70} 支配のlacUV5プロモーターの下流に赤色蛍光タンパク質であるDsRed2やmCherryの遺伝子を連結しておき、一方のストレス応答用に試験対象の目的プロモーター下流にEGFP遺伝子を連結したプロモーター活性測定用ベクターが作製されている。これらの比をとるこ

とにより、個々の細胞ごとにストレス処理によるプロモーターの活性上昇を調べることができる。

第4は、2種類の異なる蛍光タンパク質を用いたFRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer、蛍光共鳴エネルギー移動) によるレシオメトリックセンサーの開発である。レシオメトリックセンサーには単独の蛍光タンパク質の特定条件での励起波長シフトを用いた蛍光タンパク質変異体である pHluorin、roGFPs や、2種類の異なる蛍光タンパク質を連結させた FRET 型などがある。FRET は、2種の異なる蛍光タンパク質の一方の蛍光波長が別の蛍光タンパク質の励起波長と重なる場合、例えば CFP と YFP をリンカーで連結して CFP を励起したとき、その蛍光は隣接した YFP に励起エネルギーとして利用され、YFP が黄色蛍光を発する。このときのリンカーに、特定条件での相互作用に関わるドメインや特異的プロテアーゼの認識配列、または片方が特定の条件で消光するような蛍光タンパク質変異体を用いれば、両者の蛍光量の絶対値ではなく蛍光強度比の算出値によって、個々の細胞による蛍光タンパク質の発現量の違いに影響されることなく、細胞内で起こる環境変化をリアルタイムでかつ非破壊の細胞で計測できる。

これらのセンサーをうまく利用すれば、ストレス処理による細胞損傷を多様に評価することができる。著者らは、損傷解析の目的に応じて種々の特性をもつ種々の蛍光タンパク質変異体を作製し、大腸菌、枯草菌およびその胞子内に発現させて、各種のストレスによる細胞損傷を多角的に解析している。

6. おわりに

微生物細胞は熱などのストレスにさらされたとき、他の生物細胞と同様に、受身的になされるがままただ増殖停止や損傷・死滅するわけではない。ストレスを受けても適応したり、損傷を受けてもそれを修復する能力をもっている。熱ストレスの場合、この適応や修復の過程では熱ショック応答や表層ストレス応答などのストレス応答機構が作動し、細胞はなんとか増殖しようとしたり、必死に生き残ろうとする。したがって、致死性ストレスであっても、細胞の生死はストレスにさらされた直後に必ずしも決定しているのではない。また、このような適応中や修復中の細胞は、平常時よりも耐熱性に変化することが知られていることから、微生物の耐熱性も一義的に規定できるものではないといえる。

食品や医療、諸環境における微生物制御の分野では、ストレス処理による方法が多用されるが、その適正な処理条件の設計において、微生物のストレス応答を理

解し、耐性挙動を把握する必要がある。この目的のため、ここで紹介した GFP 変異体の利用は有効であると思われる、今後さらに有用なストレスセンサーとしての開発を期待したい。

引用文献

- 1) 土戸哲明、坂元 仁：有害菌制御のためのストレス微生物学概論。日食微誌、26, 70-75 (2009)。
- 2) Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. and Schaechter, M. : *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*. p. 353. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts (1990)。
- 3) 土戸哲明：熱損傷菌の分子生物学。防菌防黴、34, 497-506 (2006)。
- 4) Lim, B. and Gross, C. A. : Cellular response to heat shock and cold shock. In *Bacterial Stress Responses*, 2nd ed. (Storz, G. and Hengge, R. ed.), pp. 93-114. ASM Press, Washington, D. C. (2011)。
- 5) Ades, S. E., Hayden, J. D. and Laubacher, M. E. : Envelope Stress. In *Bacterial Stress Responses*, 2nd ed. (Storz, G. and Hengge, R. ed.), pp. 115-131. ASM Press, Washington, D. C. (2011)。