

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－フランス研究交流）

1. 研究課題名：「超好熱性 Thermococcales 属古細菌のウイルス様脂質膜小胞体の分子機能とその形成機構の解明」
2. 研究期間：平成 21 年 4 月～平成 24 年 3 月
3. 支援額： 総額 18,702,000 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	松井郁夫	産業技術総合研究所(AIST) バイオメディカル研究部門	主任研究員
研究者	三尾和弘	AIST、バイオメディシナル 研究センター	研究員
研究者	横山英志	静岡県立大学薬学部	講師
研究者	松井えり子	AIST、バイオメディカル研 究部門	研究員
研究者	平本加奈	AIST、バイオメディカル研 究部門	テクニカル スタッフ
参加研究者 のべ 5 名			

フランス側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	Patrick Forterre	Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologi e, UMR CNRS 8621	教授
研究者	Jacques Oberto	CNRS	主任研究員 CR1
研究者	Marie Gaudin	Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologi e	学生(博士課 程)
研究者	Riosuke Fujika ne	ANR	研究員
研究者	Evelyne Margu et	CNRS	CNRS エン 지니어
研究者	Danièle Dadell e	CNRS	エンジニア
参加研究者 のべ 6 名			

5. 研究・交流の目的

膜小胞体の生細胞からの放出は重要な生理学的過程で細菌や真核生物で良く研究されている。細菌でのケースはシグナル伝達、目的となる細菌への悪性因子の配送、宿主防衛やそのための反応の修飾に機能すると報告された。真核細胞では、膜小胞体の様々な形態、例えばエクソソームやエクトソームはロングレンジのシグナル伝達、膜系あるいは細胞質系の物質輸送、免疫反応の修飾等に機能すると報告されている。古細菌からの膜小胞体の発見は極めて最近であり、我々は超好熱性古細菌Thermococcales属菌の共通の性質として、普遍的に膜

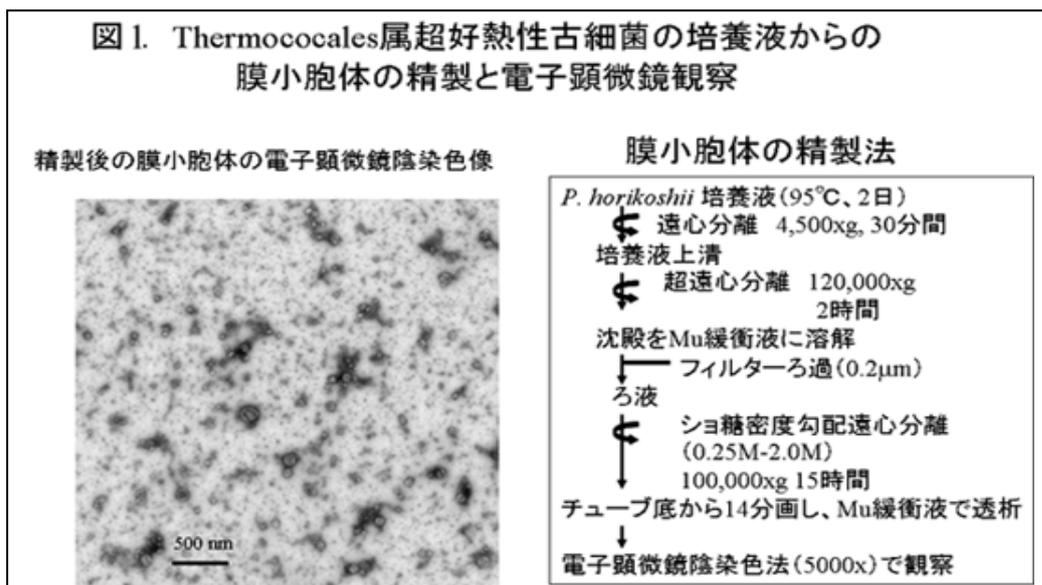
小胞体が産生されることを発見した。本研究交流では *Thermococcales* 属菌の膜小胞体の細胞間DNA輸送体としての機構解明を進めた。自然界におけるDNA安定性と遺伝子水平伝搬に対する理解は、自然環境下の遺伝子散布（遺伝子操作生物や薬剤耐性遺伝子の拡散、海洋中での遺伝子伝播）に関する我々の知識を飛躍的に高める等の大きな波及効果を社会にもたらす。さらに、膜小胞体を介する物質輸送（vesicle trafficking）の欠陥は、狂牛病、アテローム性動脈硬化症、II型糖尿病、アルツハイマー病を含む多くのヒト疾病の発現に深く関与している。従って、膜小胞体の形成と進化の理解は、この様な病気に対する分子医薬の開発に大きく貢献する。

6. 研究・交流の成果

6-1 研究の成果

本研究交流では、日本側の膜タンパク質生化学と構造生物学に関する高い専門性とフランス側の超好熱菌の培養や遺伝学に関する専門性を組み合わせ、ウイルス様膜小胞体の分子機能とその形成機構解明を目指した。

具体的には *Thermococcales* 属超好熱性古細菌の培養液から超遠心分離法、フィルター濾過法、ショ糖密度勾配超遠心分離法を組み合わせ、膜小胞体の精製法を確立した（図 1）。本図に示す様に、精製の最終過程のショ糖密度勾配超遠心分離終了後にチューブ底から内容物を順番に取り出し、14 分画した。この電子顕微鏡像は 5 番目のサンプルである。



さらに、ストマチンおよび *Stomatin partner protein* (STOPP) の特定部位の合成ペプチドを用い、それを抗原とするウサギ抗体を調整した。精製抗体を用いて、*Pyrococcus horikoshii* の膜小胞体からの Western blotting 法でストマチンと STOPP 分子確認に成功し、ストマチンと STOPP が膜小胞のバイオマーカーであることを明らかにした。

また、*Thermococcus kodakaraensis* のストマチン遺伝子のノックアウト変異株 (KO 変異株) を造成し（図 2）、野生株と KO 変異株の生育曲線、無機硫黄粒子

への吸着能、電子顕微鏡での膜小胞体サイズと形態、生産量の比較等の形質の比較検討を行った。

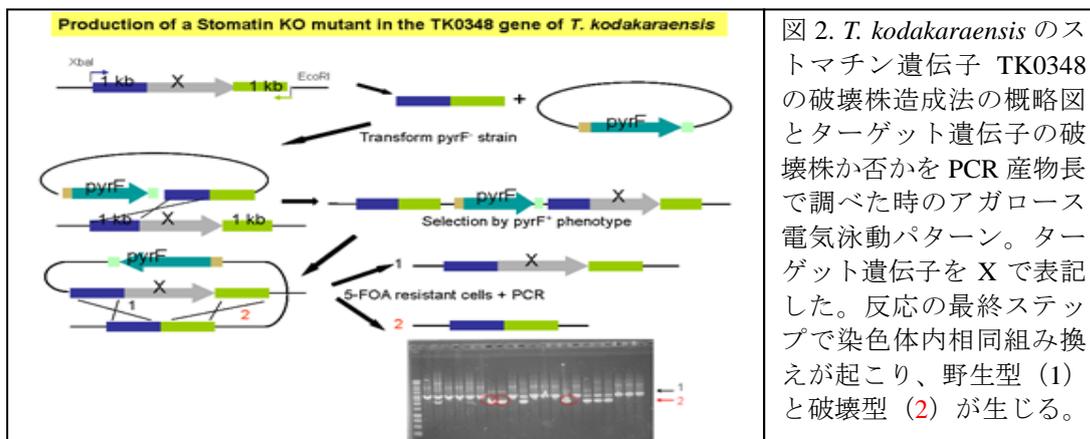


図 2. *T. kodakaraensis* のストマチン遺伝子 TK0348 の破壊株造成法の概略図とターゲット遺伝子の破壊株か否かを PCR 産物長で調べた時のアガロース電気泳動パターン。ターゲット遺伝子を X で表記した。反応の最終ステップで染色体内相同組み換えが起こり、野生型 (1) と破壊型 (2) が生じる。

その結果、*T. kodakaraensis* のストマチン KO 変異株では低温ショックを与えると細胞の生育が抑制されることを発見した。この際の野生株の転写レベルを RT-PCR 法で解析すると、低温ショックでストマチン遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。ストマチンは温度によるストレスを軽減する機能を有することが明らかになった。膜小胞体生産量は KO 変異株で減少が見られたものの、残念ながら、膜小胞体のサイズと形態には KO 変異株と野生株では顕著な差異は検出できなかった。

一方、我々はストマチン(PH1511)とオペロンを構成するパートナータンパク質 (Stomatin partner protein, STOPP) の N-末端ドメイン(PH1510N)がストマチン特異的膜プロテアーゼであることを報告した。PH1510N の単量体は不活性で、2 量体のみが活性であるが、その活性化機構は不明であった。そこで、このストマチン特異的プロテアーゼの基質ペプチド共結晶を作成し、その分子構造を X 線結晶構造解析法で明らかにした。この共結晶構造から、プロテアーゼドメインが 2 量体を形成し、二つの活性クレフトが連なり、単一結合モードで一本のストマチンの C-末端疎水性ポリペプチドを偽回文構造として認識する機構が明らかになった (図 3)。

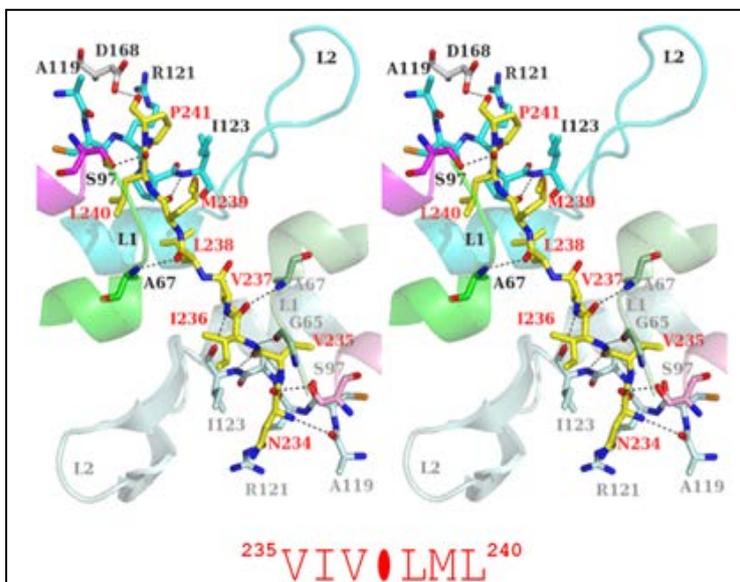


図 3. ストマチン特異的プロテアーゼである PH1510N ダイマーと基質ポリペプチドの相互作用を示すステレオ図。A 鎖 (左上) と B 鎖 (右下) は各々濃色と淡色で描き分けられた。黄色のスティックは偽回文構造として認識される基質ポリペプチドを示す。その一次配列はステレオ図の下に赤英字で示された。

一方、*Thermococcus nautilus* 株の膜小胞体に結合した環状 DNA を発見し、このプラスミド様 DNA が膜小胞内に局在することを証明した。次いでその塩基配列を解析し、プラスミド様 DNA 分子にコードされる膜小胞形成に関連する遺伝子の同定を行なった。また、シャトルベクター pLC70 の宿主細胞や他の株への感染能を解析し、膜小胞体が Thermococcales 属菌の遺伝子伝搬ツールとなりうることを証明した。さらに *T. nautilus* 株の膜小胞中から新規環状 DNA (pTN3) を見出した。pTN3 は *T. kodakaraensis* の integrated ウイルス TKV4 と相同性を示す多くのホモログタンパク質をコードしていた。この結果は、pTN3 は自身の伝搬に膜小胞体を使うウイルスゲノムであるという驚くべき可能性を示唆した。

以上の様に、日本とフランスが交流事業に取り組むことで、ウイルス様脂質膜小胞体の生物学的多様性と遺伝子水平伝搬に果たす驚くべき生理機能を解明した。さらに、膜小胞形成に関する stomatin と STOPP タンパク質群の機能解明への端緒を開くことができた。

6-2 人的交流の成果

つくば研究支援センターで日仏(JST-CNRS)合同セミナー2009“新規ウイルス様膜小胞体と Thermococcales 属菌での機能”を開催した。また、翌年、パスツール研究所で種々の Thermococcales 属菌から単離した膜小胞の分子組成を焦点とした CNRS- JST 国際合同セミナー2010 “Membranes and lipid vesicles from archaea, bacteria, and eukarya” を開催した。さらに、米国イエローストーンで開催された国際学会 Thermophiles2011 において、フランス側と日本側は本課題に関連する研究結果を2課題発表した。その後 CNRS- JST 研究打合せ会 2011 を開催し、最終的な共同研究論文の取りまとめを行った。なお、この研究交流体制を利用し、日本側の若手研究者は3ヶ月間 P. Forterre 教授研究室に滞在し、膜小胞の主要成分であるオリゴペプチド結合蛋白質 OppA のクローニング、組み換えタンパク質発現、タンパク質結晶化などの習熟の機会を得た。現在もフランス側と共同研究を継続している。さらに、フランス側学生も本研究交流で得た研究成果に基づき博士課程を無事終了し、学位を取得する見込みである。このように本交流事業は若手研究者の養成に大きく貢献した。

7. 主な論文発表・特許等（5件以内）

相手国側との共著論文については、その旨を備考欄にご記載ください。

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、 出願番号、出願人、発明者等	備考
論文	Kuwahara, Y., Unzai, S., Nagata, T., Hiroaki, Y., Yokoyama, H., Matsui, I., Ikegami, T., Fujiyoshi, Y., and Hiroaki, H. “Unusual thermal disassembly of the SPFH domain oligomer from <i>Pyrococcus horikoshii</i> ” (2009) <i>Biophys. J.</i> , 97, 2034-2043.	
論文	Yokoyama H. “Three-dimensional structure of membrane protein stomatin and function of stomatin-specific protease” (2010) <i>Yakugaku Zasshi</i> , 130, 1289-1293.	
論文	Yokoyama H., Takizawa N., Kobayashi D., Matsui I., and Fujii S. “Crystal structure of a membrane stomatin-specific protease in complex with a substrate peptide” (2012) <i>Biochemistry</i> , in press.	

論文	Gaudin M., Gaudiard E., Schouten S., Houel-Renault L., Lenormand P., Marguet E., and Forterre P. "Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA" (2012) <i>Environmental Microbiology Reports</i> , in press.	