

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06976

研究課題名(和文)細菌由来の新奇糖脂質合成酵素の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel bacterial glycosyltransferases

研究代表者

沖野 望 (OKINO, NOZOMU)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90363324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*Zymomonas mobilis*のセラミドグルクロノシルトランスフェラーゼ(Cer GlcAT)と緑膿菌のジアシルグリセロールグルクロノシルトランスフェラーゼ(DAG GlcAT)の機能解析により、細菌由来糖脂質の生理機能の解明を目指した。*Z. mobilis*のCer GlcATに関しては、大腸菌で発現させた酵素を用いて本酵素の性質を明らかにすると共に、欠損株の作成により、本酵素が*Z. mobilis*の唯一のCer GlcATであることを示した。一方、緑膿菌のDAG GlcATはリンの欠乏時に発現誘導されて、グルクロノシルジアシルグリセロールを合成することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the physiological functions of bacterial glycolipids by functional analysis of ceramide glucuronosyltransferase (Cer GlcAT) of *Zymomonas mobilis* and diacylglycerol glucuronosyltransferase (DAG GlcAT) of *Pseudomonas aeruginosa*. We first cloned and expressed *Z. mobilis* Cer GlcAT in *E. coli* and purified the enzyme using Ni-affinity and gel filtration chromatography. Using the purified enzyme, we revealed that the enzyme was highly specific for UDP-glucuronic acid and ceramide as donor and acceptor substrates, respectively. We also established the knockout strain and elucidated that this enzyme was the sole Cer GlcAT of *Z. mobilis*. Next, we cloned PA0842 of *P. aeruginosa* and expressed it in *E. coli*. We detected the DAG GlcAT activity when UDP-glucuronic acid and diacylglycerol were used as donor and acceptor substrates, respectively. Furthermore, we found that PA0842 was induced to produce glucuronosyl DAG under phosphate-deficient conditions.

研究分野：生物化学

キーワード：糖脂質 緑膿菌 糖転移酵素 グルクロノシルジアシルセラミド グルクロノシルジアシルグリセロール

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質は、動物細胞の細胞表面で細胞増殖因子や接着分子等とともにマイクロドメイン(脂質ラフト)を形成し、これらの機能を調節していることや細胞表面のスフィンゴ糖脂質が病原細菌や細菌毒素の受容体になっていることが知られている。一方、スフィンゴ糖脂質は原核生物にはほとんど存在していないが、一部にスフィンゴ糖脂質を持つ細菌がいることが知られている。これらの細菌の多くはグラム陰性菌に分類されるスフィンゴモナス科の細菌で、一般的なグラム陰性菌と異なり、外膜にリポ多糖(LPS)を持たない代わりにスフィンゴ糖脂質を持っている。

真核生物のスフィンゴ糖脂質の合成と分解に関しては、多くの糖転移酵素や分解酵素の実体が明らかにされ、スフィンゴ糖脂質の様々な生理機能が細胞・個体レベルで解明されている。一方、細菌のスフィンゴ糖脂質の合成と分解に関しては、化学構造が幾つか報告されているだけで、合成や分解に関わる酵素の同定が進んでおらず、その機能もよく分かっていない。

我々は、緑膿菌がセラミダーゼを生産することを発見して以来、緑膿菌セラミダーゼの生理機能に関する研究を進めてきたが、その過程で、緑膿菌にスフィンゴミエリンを添加して培養すると、緑膿菌の病原因子として知られる溶血性ホスホリパーゼC(スフィンゴミエリナーゼ、PlcH)やセラミダーゼ遺伝子と共に、機能未知の糖転移酵素遺伝子(PA0842)の発現が増加することを見出した。PA0842はジアシルグリセロールにグルコースを転移して、グルコシルジアシルグリセロールを合成する酵素のホモログであることが分かっているが、緑膿菌におけるグリセロ糖脂質の知見はこれまでにない。

2. 研究の目的

本研究では我々が最近の研究で見出した二つの細菌由来の糖転移酵素の機能解析を行い、スフィンゴモナス科細菌におけるグルクロノシルセラミド(スフィンゴ糖脂質)と緑膿菌における未知糖脂質の生理機能を解明することを目的とした。具体的には、*Z. mobilis*由来のグルクロノシルセラミド合成酵素(Cer GlcAT)と緑膿菌由来の糖転移酵素の酵素学的性質の解析を行う。また、当該酵素の欠損変異株を作成して野生株との比較を行い、それぞれの酵素の生理機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) *Z. mobilis* 由来 Cer GlcAT の大腸菌を用いた発現と酵素学的性質の検討

Z. mobilis 由来 Cer GlcAT 遺伝子が大腸菌用の発現ベクターにクローニングし、Cer GlcAT の大腸菌用発現ベクターを構築する。次に大腸菌の破碎液から Cer GlcAT を精製す

る方法を確立し、精製した酵素を用いて酵素学的な性質を調べると共に、Cer GlcAT の結晶化を試みる。

(2) *Z. mobilis* 由来 Cer GlcAT のノックアウト株の作成と脂質の分析

Z. mobilis 由来 Cer GlcAT の欠損株を作成するために、クロラムフェニコール耐性遺伝子を用いたノックアウトベクターを作成し、*Z. mobilis* の野生株に導入して Cer GlcAT の欠損株をスクリーニングする。Cer GlcAT 欠損株が取得できたら、欠損株から脂質を抽出して脂質の分析を行う。また、細胞増殖などを比較し、Cer GlcAT の生理機能解析を行う。

(3) 緑膿菌 PA0842 の大腸菌を用いた発現と酵素学的性質の検討

緑膿菌由来の糖転移酵素候補遺伝子(PA0842)を大腸菌用の発現ベクターにクローニングし、PA0842 の発現ベクターを構築する。次に、大腸菌の破碎液から PA0842 を精製する方法を確立し、精製した酵素を用いて糖転移酵素の活性測定を行うことで、PA0842 の基質特異性を明らかにする。

(4) 緑膿菌 PA0842 のノックアウト株の作成と脂質の分析

緑膿菌 PA0842 の欠損株を作成するために、テトラサイクリン耐性遺伝子を用いたノックアウトベクターを作成し、緑膿菌の野生株に導入し、PA0842 の欠損株をスクリーニングする。欠損株が取得できたら、欠損株から脂質を抽出して脂質の分析を行う。また、細胞増殖などを比較し、PA0842 の生理機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) *Z. mobilis* 由来 Cer GlcAT の大腸菌を用いた発現と酵素学的性質の検討

Cer GlcAT を大腸菌で発現させて、ニッケルアフィニティーカラムとゲル濾過により精製することで、本酵素を SDS-PAGE でほぼシングルバンドに精製する方法を確立した。次に、精製した酵素を使用して基質特異性を調べたところ、本酵素は脂質受容体としてジアシルグリセロールではなくセラミドを、糖供与としては UDP-グルクロン酸のみを利用するという高い特異性を示す Cer GlcAT であることが明らかになった。さらに、本酵素を用いて酵素合成した反応産物を精製して LC-MS で分析したところ、GlcACer が合成されたことが確認できた。

(2) *Z. mobilis* 由来 Cer GlcAT のノックアウト株の作成と脂質の分析

Z. mobilis 由来の Cer GlcAT の生理機能を明らかにするために、本酵素の欠損株を作成して、TLC により脂質の分析を行ったところ、Cer GlcAT 欠損株の GlcACer は完全に消失し

ていたが、野生株にはほとんど存在しない未知のスフィンゴ脂質が合成されていることが明らかになった。そこで、Cer GlcAT 欠損株からこのスフィンゴ脂質を精製し、LC-MSにより構造を解析した。その結果、この脂質がセラミドホスホグリセロール (CPG) であることが明らかになった。このことは本酵素が *Z. mobilis* の唯一の Cer GlcAT であることを示すと共に、*Z. mobilis* には GlcAT の欠損により消失した GlcACer の機能を同じマイナスチャージを持つ CPG により補償しようとする機構が備わっていることを示唆している。

(3) 緑膿菌由来 PA0842 の大腸菌を用いた発現と酵素学的性質の検討

PA0842 の糖転移酵素としての活性を明らかにするために、大腸菌で発現させた PA0842 をニッケルアフィニティーカラムで精製して各種脂質受容体や糖供与体を用いて糖転移酵素の活性を測定した。その結果、PA0842 がジアシルグリセロールにグルクロン酸を転移するジアシルグリセロールグルクロノシルトランスフェラーゼ (DAG GlcAT) であることが明らかになった。

(4) 緑膿菌由来 DAG GlcAT のノックアウト株の作成と脂質の分析

PA0842 がグルクロノシルジアシルグリセロール (GlcADG) 合成酵素であることが明らかになったことから、PA0842 (DAG GlcAT) の生理機能の解析を試みた。GlcADG は植物においてリンが欠乏した時に合成されることが明らかにされていることから、緑膿菌をリンの欠乏条件下で培養して TLC により、脂質の分析を行った。その結果、リンの欠乏条件下で GlcADG が合成されていることが分かった。さらに、PA0842 (DAG GlcAT) の欠損株を作成して、リンの欠乏条件下で培養して脂質の分析を行ったところ、PA0842 (DAG GlcAT) の欠損株では GlcADG が合成されていないことが明らかになった。このことは、PA0842 がリンの欠乏条件下で GlcADG を合成する唯一の酵素であることを示している。続いて、リンの欠乏条件下で培養した緑膿菌から脂質を抽出して、LC-MS によりリン脂質の解析を行ったところ、ホスファチジルグリセロールアミンやホスファチジルグリセロールが分解されて減少していることが明らかになった。これらのことは、緑膿菌はリンが欠乏する条件下では、自らの細胞膜のリン脂質を分泌型ホスホリパーゼ C である PlcH の作用によって分解してリンを得る一方で、同時に発現する DAG GlcAT (PA0842) によって GlcADG を合成することで生体膜の恒常性を保っていることが強く示唆された。また、PlcH は緑膿菌の病原因子の一つとして知られていることから、緑膿菌の宿主感染時における GlcADG の生理的役割にも興味を持たれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. 沖野 望、伊東 信
スフィンゴシンに特異的な転写制御因子を介した緑膿菌セラミダーゼの発現誘導機構とその生理的意義
生化学 90(2):178-182 (2018)、査読無し
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2018.900178

2. Kwak CY, Park SY, Lee CG, Okino N, Ito M, Kim JH
Enhancing the sialylation of recombinant EPO produced in CHO cells via the inhibition of glycosphingolipid biosynthesis.
Sci. Rep. 7, 13059 (2017)、査読有り
doi: 10.1038/s41598-017-13609-4

3. Okino N, Ito M
Molecular mechanism for sphingosine-induced *Pseudomonas* ceramidase expression through the transcriptional regulator SphR.
Sci. Rep. 6, 38797(2016)、査読有り
doi: 10.1038/srep38797

[学会発表](計9件)

1. 沖野 望
細菌セラミダーゼからスフィンゴ脂質生物学を斬り開く
2017年度 生命科学系学会合同年次大会
(ConBio 2017) 2017年12月6日-9日、神戸国際会議場

2. 李 夢白、沖野 望、石橋洋平、伊東 信
Zymomonas mobilis のセラミド UDP グルクロン酸転移酵素の同定
2017年度 生命科学系学会合同年次大会
(ConBio 2017)、2017年12月6日-9日、神戸国際会議場

3. Nozomu Okino, Makoto Ito
Transcriptional regulation of *Pseudomonas* ceramidase through the sphingosine-specific transcriptional regulator SphR
58th International Conference on the Bioscience of Lipids, 2017年9月10日-14日、ETH, Zurich, Switzerland

4. 沖野 望、伊東 信
緑膿菌のグルクロノシルジアシルグリセロール合成酵素の生理的意義
第36回 日本糖質学会年会、2017年7月19日-21日、旭川市民文化会館

5. 沖野 望、伊東 信
スフィンゴシンに特異的な転写制御因子による緑膿菌セラミダーゼの遺伝子発現機構、
第 59 回 日本脂質生化学会、2017 年 6 月
15 日-16 日、京都大学百周年時計台記念館

6. 沖野 望
緑膿菌に見出した糖脂質合成酵素の生理機能とそのホモログの分布
平成29年度 比較グライコーム研究会、2017
年6月10日、九州大学伊都キャンパス

7. 沖野 望、伊東 信
緑膿菌中性セラミダーゼの発現調節機構とその生理学的意義、
第 9 回セラミド研究会、2016 年 10 月 27 日-28
日、東京ユビキタス協創広場 CANVAS

8. 沖野 望、伊東 信
緑膿菌ゲノムにおいてスフィンゴ脂質分解酵素遺伝子の近傍に位置する糖脂質合成酵素遺伝子、第 35 回 日本糖質学会年会、2016
年 9 月 1 日-3 日、高知市文化プラザかるぼーと

9. Nozomu Okino, Makoto Ito
Identification of a transcriptional regulator SphR for ceramidase expression in *Pseudomonas aeruginosa*
第 10 回スフィンゴテラピィ研究会、2015 年
6 月 16 日-18 日、ホテルアローレ

〔その他〕

ホームページ

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kaishika/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

沖野 望 (NOZOMU OKINO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：90363324