

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14882

研究課題名(和文)アーキア膜脂質の生産によるバクテリア細胞膜強化の試み

研究課題名(英文)Trials to strengthen bacterial cell membrane by the production of archaeal membrane lipids

研究代表者

邊見 久(Hemmi, Hisashi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：60302189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アーキアの膜脂質の構造は、バクテリアや真核生物といった他生物の膜脂質とは大きく異なっている。その構造の違いにより、アーキア膜脂質で構成された膜はイオンなどの小分子の透過性が低く、その性質が極限環境におけるアーキアの生育を可能にしていると考えられている。そこで我々はアーキア膜脂質をバクテリアである大腸菌に生産させることで、その細胞膜の強化を図っている。本研究では、アーキア膜脂質の生産量を向上させるために、前駆体生合成経路の大腸菌への導入を実施した。また、膜の強化に対してより高い効果が期待される、超好熱性アーキア特異的な膜脂質の生合成経路を明らかにし、同脂質の大腸菌における生産系を構築した。

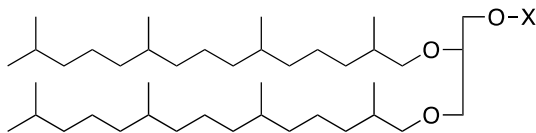
研究成果の概要(英文)：The structures of membrane lipids from archaea are different from those from other organisms, bacteria and eukaryotes. The difference causes the low permeability of membrane composed of archaeal membrane lipids to small molecules such as ions, which is considered to enable archaea to grow under extreme conditions. Thus, we have forced the bacterium *Escherichia coli* to produce archaeal membrane lipids in order to strengthen its cell membrane. In this study, we introduced a biosynthetic pathway of the precursors of archaeal membrane lipids in *E. coli* to increase their production levels. And, we elucidated the biosynthetic pathway of membrane lipids specific to a hyperthermophilic archaeon, which are expected to have greater effects on the strengthening of membrane, and constructed the production system of the lipids in *E. coli*.

研究分野：酵素化学

キーワード：アーキア 膜脂質 イソプレノイド 微生物生産 メバロン酸経路

1. 研究開始当初の背景

アーキアの膜脂質は、いくつかの構造的特徴により、その他の生物、すなわち真核生物およびバクテリアの膜脂質とは明確に区別されている。第1に、炭化水素鎖の構造がその他の生物の膜脂質に見られる直鎖アルキル鎖ではなく、複数のメチル基による分岐構造を持つイソプレノイド鎖であることである。このイソプレノイド鎖は一般に炭素数20で完全飽和しており、その分岐構造は膜の透過性に大きく影響すると考えられている。第2に、炭化水素鎖とグリセロール部分との結合様式が、他生物の膜脂質のエステル結合とは異なり、エーテル結合になっている。エステル結合に比べてエーテル結合の方が化学的に安定であるため、この特徴は極端な pH などの極限環境におけるアーキアの生育に役立っている可能性がある。第3に、グリセロール部分の生合成前駆体は、他生物の膜脂質では *sn*-グリセロール 3-リン酸であるのに対し、アーキア膜脂質では *sn*-グリセロール 1-リン酸という、前者の光学異性体となっている。これはアーキアとその他の生物の膜脂質の生合成経路が完全に異なることを示す特徴と言え、それらの生物が辿った進化経路の違いを感じさせる。これ以外に、炭化水素鎖や極性頭部の構造多様性などにも違いが存在している。



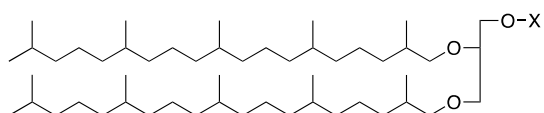
アーキア膜脂質 (Xは極性頭部)

いずれにせよ、アーキア膜脂質と他生物の膜脂質の構造的な特徴により、アーキアの細胞膜は高温や高塩濃度、極端な pH といった極限環境での生育に適した特性を有する。人工的に再構成した膜系であるリポソームを利用した研究により、アーキア膜脂質によって構成されたりポソームは、他生物の膜脂質によって構成されたものに比べて著しく低いイオン透過性、小分子透過性を示すことが明らかにされている。この低い膜透過性は広い温度範囲で維持され、したがって、極限環境においても、膜のイオンポテンシャルとそれによるエネルギー生産を維持することができるのである。さらに重要な点は、アーキア膜脂質と他生物の膜脂質により構成された混成リポソームが、たとえアーキア膜脂質の比率が25%程度であっても、他生物の膜脂質のみで構成されたりポソームに比べて格段に低い膜透過性を示したということである。つまり、大腸菌などのバクテリアにアーキアの膜脂質を生産させれば、高い塩濃度や有機溶媒の存在、もしくは細胞内でバイオ燃料などの脂溶性の有用化合物が大量に生産されるような状況においても、その細胞膜の

安定性を維持し、菌の生育阻害を回避する手段となりうる。

2. 研究の目的

上述した背景をもとに、アーキア膜脂質を大腸菌に生産させ、細胞膜を安定化することを本研究の目的とした。我々の研究グループでは、すでに大腸菌におけるアーキア膜脂質の生産系を構築していたため、以下の2項目からなる研究方針を立てた。第1に、食塩を含む培地における大腸菌の生育を指標に、アーキア膜脂質生産の効果を調べることにした。ただし、我々が構築したアーキア膜脂質生産系では、バクテリア細胞膜におけるアーキア膜脂質の比率はごくわずかであり、そのため菌の表現系の変化を検出するのは困難であった。そこで、イソプレノイドの生合成前駆体供給経路であるメバロン酸経路を同大腸菌株に導入し、アーキア膜脂質の生産量の向上を図ることとした。遺伝子導入は過去に報告例の多いプラスミドを用いた方法に加え、CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集による大腸菌ゲノム内への挿入を試みた。第2に、より低い透過性を示すリポソームを構成することがわかっている、超好熱性アーキア特異的な膜脂質の大腸菌における生産を目指した。しかし、超好熱性アーキアの膜脂質としては、通常より長い炭素鎖をもつ C25,C25-アーキオールコア脂質や、一般的なアーキア膜脂質が炭素鎖の末端同士で結合して二量化したカルドアーキオールコア脂質が知られているものの、それらの生合成経路は部分的にしか解明されていなかった。そこで既知のアーキア膜脂質生合成経路を参考に、C25,C25-アーキオールコア脂質の生合成に関わる酵素を同定し、それらの遺伝子を大腸菌に導入することで同脂質の生産を試みることにした。



C25,C25-アーキオールコア脂質 (Xは極性頭部)

3. 研究の方法

メバロン酸経路の導入によるアーキア膜脂質生産量の増強

主として酵母、もしくは放線菌に由来する、一連のメバロン酸経路遺伝子を含むプラスミド、pJBEI-2999 および pAC-Mev を入手し、アーキア膜脂質生合成用プラスミドである pBAD-ALB4 を持つ大腸菌に導入した。さらに、細胞に取り込まれた後にメバロン酸へと変換されるメバロノラクトンを添加することで、イソプレノイドであるアーキア膜脂質の生産量向上を目指した。さらに、pJBEI-2999 をもとに必要な遺伝子を含むカセットを作製し、これを CRISPR/Cas9 システムと共に大腸菌に導入することで、相同組

換えによるゲノムへの遺伝子挿入を図った。アーキア膜脂質の生産量は、大腸菌から脂質を抽出した後に、LC-MS や 2 次元 TLC によって測定した。大腸菌の食塩に対する耐性は、0.1~0.5 M の食塩を含む寒天培地上での生育を比較することで行なった。

C25,C25-アーキオールコア脂質の生合成経路の解明と大腸菌での生産

通常のアーキアがもつ C20,C20-アーキオールコア脂質の既知生合成経路を参考に、同経路に関わる複数酵素のホモログ遺伝子を、C25,C25-アーキオールコア脂質を主要な膜成分とする超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* より探索した。それらの遺伝子を大腸菌に発現させ、得られた組換えタンパク質の酵素活性を、放射標識した基質と TLC を使った系により検出した。

さらに、それらの遺伝子群を同一のプラスミドに挿入し、これを大腸菌に導入することで C25,C25-アーキオールコア脂質の生産を試みた。放射標識基質の合成が困難であったプレニル基還元酵素ホモログについては、この大腸菌での生産系を利用することで酵素活性の検出を行なった。アーキア膜脂質の検出は LC-MS を用いて行なった。

4. 研究成果

メバロン酸経路の導入によるアーキア膜脂質生産量の増強

LC-MS 分析により、我々が作製した元々の大腸菌の系におけるアーキア膜脂質の生産量はごく微量に過ぎないことが示されていた。そこで、プラスミドによるメバロン酸経路遺伝子の細胞内導入と培地へのメバロノラクトンの添加を行なった結果、アーキア膜脂質の生産量は 10 数倍にまで向上した。その際の大腸菌細胞膜におけるアーキア膜脂質の割合は、2 次元 TLC による分析の結果、最大で数%に達すると推定された。しかし、高生産株の生育は非常に遅く、分析に際して growth phase を合わせるのが難しかった。その原因は、アーキア膜脂質の生産というよりも、複数のプラスミドの維持のために必要とされた抗生物質にあり、2 個のプラスミドによる 10 個以上の異種遺伝子の導入には無理があると感じられた。そこで、CRISPR/Cas9 システムによってメバロン酸経路遺伝子をゲノム中に挿入し、必要な抗生物質を減らすことを発案した。メバロン酸経路の遺伝子を含む相同組換え用 DNA カセットを作製し、これを CRISPR/Cas9 によりゲノム中の任意の箇所を切断するように設計したプラスミドと同時に大腸菌に導入した。その結果、全長 10 kb 程度の遺伝子断片をゲノム中に挿入することに成功した。しかしながら、得られた大腸菌株中でのメバロン酸経路の酵素活性は予想外に低く、イソプレノイドの生産性向上の効果は得られなかった。原因としては、挿入した遺伝子断片に変異など

の問題があったか、挿入したゲノム上の遺伝子座の近くに逆向きのプロモータが存在するなどの問題があったのではないかと考えている。

結局、最もアーキア膜脂質の割合が高かった、プラスミドによりメバロン酸経路を導入した大腸菌株を用い、食塩に対する耐性を調べた。コントロールとしてはメバロン酸経路を有するがアーキア膜脂質生合成経路を持たない株を用い、複数の濃度で食塩を含む寒天培地(メバロノラクトンを含む)上での生育を調べた。しかし、明確な差は検出されなかった。最近、オランダの研究グループによってアーキア膜脂質の生産が大腸菌に与える影響についての報告がなされた。彼らはブタノールを添加した培地において、アーキア膜脂質生産株の生育が向上したこと、また、同株が凍結処理に対しても耐性を示すことを報告している。したがって、食塩以外のストレスを指標とすれば表現系の違いが示せた可能性が高い。ただし、上述の研究グループが作製した大腸菌株ではアーキア膜脂質の比率が 20%にまで達しており、それが結果の違いとして現れた可能性もある。したがって我々には、大腸菌におけるアーキア膜脂質生産量をさらに向上させる必要がある。我々が最近アーキアから見出した新奇なメバロン酸経路の導入が、そのために有効であるかもしれない。

C25,C25-アーキオールコア脂質の生合成経路の解明と大腸菌での生産

A. *pernix* の全ゲノム配列から、既知のアーキア膜脂質生合成酵素に相同なタンパク質の遺伝子を探索し、2つのプレニル基転移酵素と1つのプレニル基還元酵素、それぞれホモログ遺伝子を見出した。まず、プレニル基転移酵素ホモログに関しては、大腸菌に組換えタンパク質を発現させ、それらを精製して酵素活性の有無を検証した。その結果、両タンパク質共に活性を有し、さらに C25 の生合成前駆体に対して高い特異性を示すことが明らかになった。これらの結果より、これらの酵素は C25,C25-アーキオールコア脂質の生合成に関与していることが明らかになった。

次に、上述のプレニル基転移酵素の遺伝子に加え、それらの基質の生産に関わる既知酵素遺伝子を同一のプラスミドに挿入し、pBAD-C25ALB4 を作製した。同プラスミドを導入した大腸菌から脂質を抽出し、LC-MS で分析したところ、不飽和イソプレノイド鎖を持った C25,C25-アーキオールコア脂質の前駆体が検出された。そこでプレニル基還元酵素のホモログ遺伝子をこのプラスミドに挿入し、それを有する大腸菌の脂質を分析したところ、還元された C25 イソプレノイド鎖を有する C25,C25-アーキオールコア脂質の生産が確認された。これにより、超好熱性アーキア *A. pernix* に特異的な同脂質の生合成

経路の全容を明らかにすることができた。同脂質の生産が大腸菌に及ぼす影響は、通常のアーキア膜脂質より強いと予想され、将来の細胞膜安定化への利用が期待される。

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 5 件)

Yoshifumi Hayashi, Tomokazu Ito, Tohru Yoshimura, and Hisashi Hemmi, Utilization of an intermediate of the methylerythritol phosphate pathway, (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate, as the prenyl donor substrate for various prenyltransferases, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press, (2018) 査読有
DOI: 10.1080/09178451.2017.1398064

Ryo Yoshida, Tohru Yoshimura, and Hisashi Hemmi, Biosynthetic machinery for C₂₅, C₂₅-diether archaeal lipids from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 497, 87-92, (2018) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.028

Hajime Hayakawa, Fumiaki Sobue, Kento Motoyama, Tohru Yoshimura, and Hisashi Hemmi, Identification of enzymes involved in the mevalonate pathway of *Flavobacterium johnsoniae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 487, 702-708, (2017) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.120

Kento Motoyama, Hideaki Unno, Ai Hattori, Tomohiro Takaoka, Hiroshi Ishikita, Hiroshi Kawaide, Tohru Yoshimura, and Hisashi Hemmi, A single amino acid mutation converts (*R*)-5-diphosphomevalonate decarboxylase into a kinase, *J. Biol. Chem.*, 292, 2457-2469 (2017) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M116.752535

邊見 久, 大腸菌をプラットフォームとしたアーキア膜脂質合成研究、*酵素工学ニュース*, 76, 11-15 (2016) 査読無
DOI: なし

[学会発表](計 19 件)

吉田 稜、吉村 徹、邊見 久、大腸菌内における C₂₅ アーキア膜脂質合成経路の構築、2018 年度日本農芸化学会大会、2018 年 3 月 18 日、名城大学(名古屋)

邊見 久、アーキアにおけるメバロン酸経路の多様性、日本ゲノム微生物学会、2018 年 3 月 5 日、京都大学(京都市)

邊見 久、古細菌の耐熱性と膜脂質の関係、*Biothermology Workshop 2017*、2017 年 12 月 25 日、東京大学(東京都)

江見晃一、吉村 徹、邊見 久、*Methaonsarcina mazei* 由来ヘテロマー型 *cis*-プレニルトランスフェラーゼの機能解析、*ConBio2017*、2017 年 12 月 6、7 日、神戸ポートアイランド(神戸市)

Hisashi Hemmi, Kento Motoyama, Ai Hattori, Hideaki Unno, Hiroshi Kawaide, Tohru Yoshimura, Diversity and evolution of the mevalonate pathways in archaea, Italy-Japan Joint Symposium: New Trends in Enzyme and Microbial Science in the Translational Biology Era, 2017 年 10 月 18 日、National Research Council of Italy (イタリア、ナポリ市)

本山賢人、川出 洋、吉村 徹、邊見 久、部位特異的変異導入による *Thermoplasma acidophilum* 由来メバロン酸 3-キナーゼの機能改変、第 27 回イソプレノイド研究会例会、2017 年 9 月 15 日、東邦大学(船橋市)

邊見 久、本山賢人、吉村 徹、アーキアにおけるジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼホモログとメバロン酸経路の進化、日本 Archaea 研究会第 30 回講演会、2017 年 9 月 1 日、東北大学(仙台市)

Hisashi Hemmi, Kento Motoyama, Hiroshi Kawaide, Tohru Yoshimura, Mutation-induced conversion of diphosphomevalonate decarboxylase into a kinase, *TERPNET 2017*, 2017 年 7 月 19 日、Dalian International Conference Centre (中国、大連市)

本山賢人、川出 洋、吉村 徹、邊見 久、部位特異的変異導入による好熱性古細菌由来メバロン酸 3-キナーゼの基質特異性および触媒機能の改変、2017 年度酵素補酵素研究会、2017 年 6 月 24 日、秋保リゾートホテルクレセント(仙台市)

本山賢人、吉村 徹、邊見 久、 α -アミノ酸置換によるメバロン酸 3-キナーゼのジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼへの変換、2017 年度日本農芸化学

会大会、2017年3月18日、京都女子大学(京都市)

林 佳史、伊藤智和、吉村 徹、邊見 久、非メバロン酸経路の中間体をドナー基質としたプレニル基転移酵素の反応、2017年度日本農芸化学会大会、2017年3月19日、京都女子大学(京都市)

早川 祝、祖父江史明、吉村 徹、邊見久、Bacteroidetes 門バクテリア *Flavobacterium johnsoniae* のメバロン酸経路、2017年度日本農芸化学会大会、2017年3月19日、京都女子大学(京都市)

Hisashi Hemmi, Evolution of the mevalonate pathways in Archaea, 2nd US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers, 2017年3月4日、東京工業大学(東京都)

本山賢人、吉村 徹、邊見 久、好熱性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* 由来メバロン酸 3-キナーゼの機能改変、第89回日本生化学会大会、2016年9月26日、仙台国際センター(仙台市)

邊見 久、アーキアにおけるメバロン酸経路の多様性とその進化、第89回日本生化学会大会、2016年9月27日、仙台国際センター(仙台市)

本山賢人、川出 洋、吉村 徹、邊見 久、変異解析による好熱性アーキア *Sulfolobus solfataricus* 由来ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼの反応機構の再検証、第26回イソプレノイド研究会例会、2016年9月20日、長崎県立大学シーボルト校(長崎県)

Hisashi Hemmi, Kento Motoyama, Ai Hattori, Tohru Yoshimura, Conversion of 5-diphosphomevalonate decarboxylase into 3-kinase, The 5th International Conference on Cofactors and Active Enzyme Molecule 2016, 2016年9月5日、黒部市宇奈月国際会館「セレネ」(富山県)

本山賢人、吉村 徹、邊見 久、好熱性アーキア由来ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼの変異解析、2016年度日本生物工学会中部支部例会、2016年8月5日、名古屋大学(名古屋市)

邊見 久、服部 愛、海野英昭、郷田秀一郎、本山賢人、吉村 徹、好熱性アーキア *Sulfolobus solfataricus* 由来ジホス

ホメバロン酸デカルボキシラーゼの耐熱性に寄与するサブユニット間ジスルフィド結合、日本 Archaea 研究会第29回講演会、2016年7月8日、東洋大学(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

邊見 久 (HEMMI, Hisashi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：60302189

(4) 研究協力者

本山賢人 (MOTOYAMA, Kento)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生

小久保拓也 (KOKUBO Takuya)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生

吉田 稜 (YOSHIDA Ryo)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生