

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20360372

研究課題名（和文）好冷微生物の低温環境適応を可能にする分子基盤の解明

研究課題名（英文）Analysis of the molecular basis for cold adaptation of psychrotrophic bacteria

研究代表者

栗原 達夫 (KURIHARA TATSUO)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：70243087

研究成果の概要（和文）：*Shewanella livingstonensis* Ac10 の低温適応機構を解析した。低温誘導性タンパク質の同定と機能解析を行い、細胞膜ストレス応答に関わる PspA や細胞分裂に関わる MreB が低温適応に関与することを見いだした。一方、エイコサペンタエン酸含有リン脂質が種々の膜タンパク質と相互作用し、それらの構造形成や機能発現を介助することによって、低温環境における正常な膜機能の発現に重要な役割を担っていることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Cold-adaptation mechanism of *Shewanella livingstonensis* Ac10 was analyzed. We identified cold-inducible proteins of this bacterium and analyzed their functions. We found that PspA involved in the response to membrane stress and MreB involved in cell division are important for cold adaptation. We also found that phospholipids containing eicosapentaenoyl group interact with various membrane proteins and affect their folding and properties to maintain the function of the cell membrane at low temperatures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：微生物科学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：微生物、特殊環境、好冷微生物、低温適応、生体膜、タンパク質、脂質

1. 研究開始当初の背景

近年、0℃付近の低温環境に適応した好冷微生物の生理機能解析や応用開発が活発に行われている。好冷微生物やそれらが生産する低温活性酵素を利用することにより、熱安定性の低い化合物を基質や生成物とする新しい反応プロセスの構築、寒冷地や冬季における環境浄化や物質変換、広い温度域で使用可能なセンサーの開発など、新しい産業プロセスや製品の開発が可能になると期待される。このような観点から種々の低温活性酵素

が単離され、産業的な応用が試みられてきた。また、これらの酵素が低温で高い活性を示す分子機構の解析や、その知見に基づいて酵素の反応至適温度・熱安定性をタンパク質工学的に改変する試みが精力的に行われてきた。我々のグループも極地などから新規好冷微生物を分離し、それらが生産する低温活性酵素の特性などを明らかにしてきた。

好冷微生物の低温適応機構の解明は基礎生物学的に意義深いばかりでなく、種々の温度域で微生物を利用し、更なる高機能化を図

る上でも重要である。しかしながら、低温活性酵素を生産すること以外に、好冷微生物が低温環境に適応するために獲得してきた機構に関する知見はきわめて限定的である。特に生体膜は低温でゲル化するなど温度変化に最も感受性の高い成分であるにもかかわらず、その低温適応機構は不明な状態に置かれている。そこで好冷微生物の低温適応機構の詳細を特に生体膜の機能に焦点を絞って解析することとした。

2. 研究の目的

微生物を 0°C 付近以下の低温域で利用する低温生物学の確立に向けた研究の一環として、好冷微生物の低温適応の分子基盤を明らかにすることを目的として研究を実施した。ゲノム情報が明らかにされ、遺伝子操作法なども確立している南極海水由来の低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を主な研究対象とすることにした。特に 0°C 付近の低温で機能するユニークな生体膜に焦点を絞り、その成分として低温で誘導合成される膜タンパク質と高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能解明を目指した。生物の環境温度適応に関する基本的なメカニズムが明らかになるとともに、低温での物質生産などに微生物を利用する上でも重要な知見が得られることが期待された。

3. 研究の方法

(1) 低温誘導性膜タンパク質の同定と機能解析

S. livingstonensis Ac10 を 4°C と 18°C で培養し、それぞれの菌体からショ糖密度勾配遠心分離法によって内膜画分を調製した。二次元電気泳動によって 4°C で誘導生産されている内膜タンパク質を検出し、ペプチドマスフィンガープリンティングによって同定した。同定されたタンパク質の遺伝子を相同組み換えによって破壊し、生育におよぼす影響を解析した。

(2) 高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能解析

S. livingstonensis Ac10 のエイコサペンタエン酸 (EPA) 生合成酵素遺伝子を相同組み換えによって破壊し、EPA 欠損変異株を作製した。野生株および EPA 欠損株の形態を光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察するとともに、DNA や膜を蛍光試薬で染色して蛍光顕微鏡によって観察した。EPA 含有リン脂質、および類縁の脂肪酸をアシル鎖として含むリン脂質を有機合成し、菌体に添加して生育への影響を調べた。細胞膜の流動性は蛍光物質ピレンの膜内での拡散性を指標として評価した。脂質組成の分析は ESI-MS によって行った。膜タンパク質の *in vitro* でのリフォールディングを調べる実験では、変性させた膜タ

ンパク質を種々の脂質組成のリポソームとインキュベートした。膜タンパク質のフォールディング状態は、SDS-PAGE での移動度、トリプトファン残基の蛍光スペクトル、CD スペクトルなどを指標として解析した。

4. 研究成果

(1) 低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 の低温適応に関する低温誘導性タンパク質の解析

低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 の低温適応機構を明らかにするため、本菌が低温誘導的に生産する膜タンパク質を解析した。その結果、外膜タンパク質のフォールディングや輸送に関わる内膜タンパク質 (DegP)、外部環境や細胞膜ストレスに関わるタンパク質 (PspA、AtoS)、細胞分裂に関わるタンパク質 (MreB) の生産量が、低温で増加していることがわかった。本菌の低温環境適応におけるこれらの低温誘導性内膜タンパク質 (Ald、AtoS、DegP、FtsY、MreB、PspA、SdhA、SurA) の生理的役割を解析するために、それぞれの遺伝子破壊株を作製し、4°C と 18°C での生育速度への影響を解析した。その結果、*ftsY* 遺伝子破壊株と *sdhA* 遺伝子破壊株は培養温度に関係なく生育速度が低下することが見いだされた。一方、*pspA* 遺伝子破壊株と *mreB* 遺伝子破壊株は、低温での生育能が低下したことから、PspA による細胞膜の安定化、および MreB の関与する細胞分裂、細胞骨格形成が、本菌の低温での生育に重要であることが示唆された。

(2) 低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 の低温適応に関する高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能解析

S. livingstonensis Ac10 は低温誘導的に高度不飽和脂肪酸の一種である EPA を生産する。EPA はリン脂質のアシル鎖成分として生体膜に存在する。EPA 生合成遺伝子の破壊で得られた EPA 欠損株は、本菌にとって比較的高い温度である 18°C では野生株と同様に生育したが、4°C では著しく生育が阻害されていた。低温では、EPA 欠損株の細胞分裂阻害や、細胞内での異常な膜形成が見られた。

不飽和脂肪酸を含有するリン脂質は一般に生体膜の流動性保持に重要であると考えられているが、蛍光物質ピレンを用いて測定した流動性については EPA 欠損株と野生株で顕著な差が見られなかった。一方、*sn-2* 位に EPA およびそのアナログを含むホスファチジルエタノールアミン (PE) を化学合成して EPA 欠損株に添加し、低温での生育におよぼす効果を調べた。アナログとしては、炭素数 20 で二重結合数を変えたもの、炭素数 18 で二重結合数および位置を変えたもの、およびドコサヘキサエン酸 (DHA) の 11 種を用いた。その結果、EPA または DHA を含む PE のみが生育を野生株のレベルまで

回復させた。その他のアナログを添加した場合の生育特性の比較から、EPA は膜流動性保持以外の機能をもつことが示唆された。本菌の細胞膜全体の流動性に関しては EPA 以外の高濃度で存在する不飽和脂肪酸を含有するリン脂質などの寄与が大きく、全脂肪酸に占める割合が 5% に過ぎない EPA の寄与は小さいものと考えられた。

一方、EPA の欠損によって特異的に量が変わる膜タンパク質が見いだされ、また、特定の膜タンパク質を強制的に高生産することによって EPA 欠損株の生育が回復することも見いだした。これらの結果は、生体膜に含まれる EPA 含有リン脂質が特定の膜タンパク質の機能発現に重要であることを示しており、それらの間に特異的な相互作用のあることが強く示唆された。

大腸菌の外膜タンパク質 OmpA のホモログで、*S. livingstonensis* Ac10 において低温誘導的に生産される外膜タンパク質 Omp74 の立体構造形成における EPA 含有リン脂質の機能を解析した。その結果、EPA 含有リン脂質は低温での Omp74 の膜への組み込み、および立体構造形成を促進し、C 末端側の構造変化を誘導することが示された。

次に、低温誘導性内膜タンパク質として同定された PspA と MreB について、EPA との相互作用を解析した。各遺伝子を高発現するベクター (pJRDpspA, pJRDmreB) を EPA 欠損株に導入することで、EPA 欠損株の低温での生育障害におよぼす影響について解析した。その結果、*pspA* 高発現プラスミドを導入することで EPA 欠損株の低温での生育速度が向上し伸長した菌体の形成が抑制されることがわかった。以上の結果から、EPA の欠損は、PspA の生産量、もしくは細胞膜における安定性などの機能発現に影響しているものと考えられた。

以上の結果から、EPA 含有リン脂質は、*S. livingstonensis* Ac10 の細胞膜において種々のタンパク質と相互作用し、それらの構造形成や機能発現を介助することによって、低温環境における正常な膜機能の発現に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(3) 好圧好冷菌 *Shewanella violacea* DSS12 における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能解析

S. livingstonensis Ac10 と近縁で深海由来の好圧好冷菌 *S. violacea* DSS12 における EPA 含有リン脂質の機能を調べた。EPA 生合成遺伝子を破壊したところ、常圧 (0.1 MPa) での生育には影響が見られなかったが、高圧 (30 MPa) での生育速度は著しく低下し、細胞が異常に伸長する様子が観察された。細胞分裂サイトで環状構造 (Z-ring) を形成する FtsZ に対する抗体、および DNA を染色する DAPI を用いて免疫蛍光顕微鏡観察を行った結果、

高圧で培養した EPA 欠損株の細胞中には複数の核様体が存在し、また複数の Z-ring が不規則な間隔で形成されることが示された。EPA 含有リン脂質は本菌の細胞分裂後期に重要な役割を担っているものと考えられた。

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 13 件)

① Identification of cold-inducible inner membrane proteins of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, by proteomic analysis, Park J, Kawamoto J, Esaki N, Kurihara T (2012) *Extremophiles* **16**: 227-236 査読有

② Eicosapentaenoic acid plays a role in stabilizing dynamic membrane structure in the deep-sea piezophile *Shewanella violacea*: a study employing high-pressure time-resolved fluorescence anisotropy measurement, Usui K, Hiraki T, Kawamoto J, Kurihara T, Nogi Y, Kato C, Abe F (2012) *Biochim Biophys Acta* **1818**: 574-583 査読有

③ Favourable effects of eicosapentaenoic acid on the late step of the cell division in a piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* DSS12, at high-hydrostatic pressures, Kawamoto J, Sato T, Nakasone K, Kato C, Mihara H, Esaki N, Kurihara T (2011) *Environ Microbiol* **13**: 2293-2298 査読有

④ *In vitro* refolding of an OmpA homolog, a major cold-inducible outer membrane protein, from a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Dai X-Z, Kawamoto J, Esaki N, Kurihara T (2011) *Journal of Japanese Society for Extremophiles* **10**: 90-96 査読有

⑤ Differential roles of internal and terminal double bonds in docosahexaenoic acid: Comparative study of cytotoxicity of polyunsaturated fatty acids to HT-29 human colorectal tumor cell line, Sato SB, Sato S, Kawamoto J, Kurihara T (2011) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **84**: 31-37 査読有

⑥ Thermal stability of cytochrome c(5) of pressure-sensitive *Shewanella livingstonensis*, Masanari M, Wakai S, Tamegai H, Kurihara T, Kato C, Sambongi Y (2011) *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 1859-1861 査読有

⑦ Piezotolerance of the respiratory terminal

oxidase activity of the piezophilic *Shewanella violacea* DSS12 as compared with non-piezophilic *Shewanella* species, Tamegai H, Ota Y, Haga M, Fujimori H, Kato C, Nogi Y, Kawamoto J, Kurihara T, Sambongi Y (2011) *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 919-924 査読有

⑧好冷性細菌が生産する高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生理機能, 川本純, 栗原達夫 (2011) *バイオサイエンスとインダストリー* **69**: 305-307 査読無

⑨低温細菌における長鎖高度不飽和脂肪酸の生合成と機能, 栗原達夫, 川本純, 江崎信芳 (2010) *蛋白質核酸酵素* **55**: 94-99 査読無

⑩Eicosapentaenoic acid plays a beneficial role in membrane organization and cell division of a cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Kawamoto J, Kurihara T, Yamamoto K, Nagayasu M, Tani Y, Mihara H, Hosokawa M, Baba T, Sato SB, Esaki N (2009) *J Bacteriol* **191**: 632-640 査読有

⑪低温細菌における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能, 栗原達夫 (2009) *生化学* **81**: 716-719 査読無

⑫好冷性細菌の低温適応に関わるタンパク質とリン脂質, 栗原達夫, 川本純, 江崎信芳 (2009) *生化学* **81**: 1072-1079 査読無

⑬低温下で機能する酵素, 栗原達夫, 江崎信芳 (2009) *化学工学* **73**: 324-327 査読無

〔学会発表〕 (計7件)

①栗原達夫, 細菌細胞膜における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能: 局在化と膜タンパク質生合成における機能, 日本農芸化学会 2012 年度大会 平成 24 年 3 月 25 日 京都市

②栗原達夫, 細菌細胞膜におけるリン脂質の局在化と生理機能, 京都大学微生物科学寄附研究部門主催シンポジウム「微生物科学研究の現状と展望」 平成 23 年 6 月 23 日 京都市

③Kurihara T, Construction of protein expression system by using cold-adapted bacteria as the host, MicroPerm Workshop 平成 22 年 11 月 8 日 Potsdam, Germany

④Kurihara T, Phospholipids involved in cold adaptation of an Antarctic psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, NAIST Global COE International Symposium 2009 Environmental Adaptation 平成 21 年 11 月 13 日 奈良県生駒市

⑤Kurihara T, Cold-adaptation mechanism of an Antarctic psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Xth SCAR International Biology Symposium 平成 21 年 8 月 27 日 札幌市

⑥栗原達夫, 海洋性低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 における高度不飽和脂肪酸の機能, マリンバイオテクノロジー学会 平成 20 年 5 月 25 日 京都市

⑦Kurihara T, Cold-adaptation mechanisms and applications of an Antarctic psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, BIT Life Sciences 1st Annual World Congress of iBio2008 平成 20 年 5 月 19 日 中華人民共和国・杭州市

〔図書〕 (計1件)

①栗原達夫, 株式会社エヌ・ディー・エス, 酵素利用技術大系 好冷酵素の特性と利用法 (2010) 239-243

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 達夫 (KURIHARA TATSUO)
京都大学・化学研究所・准教授
研究者番号: 70243087

(2) 研究分担者

江崎 信芳 (ESAKI NOBUYOSHI)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号: 50135597
(平成 20 年度)

三原 久明 (MIHARA HISAAKI)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号: 30324693
(平成 20 年度)

川本 純 (KAWAMOTO JUN)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号: 90511238
(平成 21-22 年度)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: