

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380047

研究課題名(和文)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解析と応用

研究課題名(英文)Functional analysis and application of phospholipids containing polyunsaturated fatty acids in bacterial cell membrane

研究代表者

栗原 達夫 (KURIHARA, Tatsuo)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：70243087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：Shewanella livingstonensis Ac10 の 1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸-0-アシルトランスフェラーゼ PlsC1 と PlsC4 の機能を解析し、これらがそれぞれエイコサペンタエン酸 (EPA) 含有リン脂質と分岐鎖脂肪酸含有リン脂質を生成することを見いだした。PlsC1 は細胞分裂部位に、PlsC4 は細胞の末端付近に主として局在し、これらが細胞膜の不均一性を生み出すことが示唆された。一方、EPA 含有リン脂質が膜タンパク質のフォールディングを促進することを見いだすとともに、EPA の生理機能解析に有用なプローブ分子を合成した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate 0-acyltransferase isozymes, PlsC1 and PlsC4, from Shewanella livingstonensis Ac10 and found that these enzymes are responsible for the synthesis of phospholipids containing eicosapentaenoic acid (EPA) and branched-chain fatty acids, respectively. PlsC1 was mainly localized at the cell division site, whereas PlsC4 was mainly localized at the polar regions of the cell. Thus these enzymes probably contribute to the biogenesis of heterogeneous cell membrane of this bacterium. We found that EPA-containing phospholipids facilitate folding of a membrane protein and synthesized a probe molecule useful for the analysis of the physiological functions of EPA.

研究分野：分子微生物科学

キーワード：細胞膜 脂質 タンパク質 高度不飽和脂肪酸 エイコサペンタエン酸 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

リン脂質は種々の極性頭部とアシル鎖をもつ多様性に富む分子群であり、生体膜の主要な構成成分として、あらゆる生物において必須の生理的役割を担っている。しかし、構造の異なるリン脂質分子それぞれの特有の機能が明らかにされ始めたのは比較的最近のことである。その知見も、ほとんどが極性頭部に限定されている。アシル鎖に関しては個性に乏しい空気のような存在として認識されることがほとんどで、流動性など膜全体の物性を左右するのは当然のこととして受け入れられているが、特定の膜タンパク質と特異的な相互作用を介して機能を発揮する例や、生体膜におけるマイクロドメイン形成への関与などに関する知見はきわめて限られている。本研究は、このように従来注目されることの少なかったリン脂質アシル鎖の特異的な生理機能に焦点を当て、その解明を目指す。

2. 研究の目的

生体膜は数千種におよぶ脂質分子が会合した二重層を基本構造とするが、個々の脂質分子の分子種特異的な機能が明らかにされた例はきわめて少ない。本研究では、機能性脂質として注目される高度不飽和脂肪酸(PUFA)を含有するリン脂質の機能解明を目指す。PUFA含有リン脂質が、種々の膜タンパク質のフォールディングを促進する分子シャペロンとして機能する可能性や、細菌の細胞分裂に寄与する可能性が本研究代表者のこれまでの研究で示されている。PUFAの一種であるエイコサペンタエン酸(EPA)含有リン脂質を低温誘導的に生産する細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 を用い、この作業仮説を検証する。また、EPA含有リン脂質など、種々のリン脂質がアシル鎖の構造依存的に生体膜の特定領域に集積しマイクロドメインが形成される可能性や、その形成機構を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) *S. livingstonensis* Ac10 の遺伝子操作

S. livingstonensis Ac10 の遺伝子破壊は、本菌で自律複製しないプラスミド pKNOCK-Km^r を用いて行った。標的遺伝子の内部配列を本プラスミドに挿入し、*Escherichia coli* S17-1/ λ _{pir} に導入したのち、接合伝達により *S. livingstonensis* Ac10 に導入した。標的遺伝子との相同組換えによってプラスミド由来の Km^r 遺伝子がゲノムに挿入され、標的遺伝子が破壊された株をカナマイシン耐性を指標として取得した。

S. livingstonensis Ac10 への遺伝子導入にはプラスミド pJRD215 を用いた。GFP 融合型 PlsC4 発現用プラスミドについては、本菌で高発現することが示されているアルキルヒドロキシペルオキシドレダクターゼのプロ

モーターを利用した。

(2) *S. livingstonensis* Ac10 の脂質分析

S. livingstonensis Ac10 の細胞から Bligh-Dyer 法で脂質画分を抽出し、これを ESI-MS で分析することによって、リン脂質組成を調べた。また、脂質画分のメタノリシスで得られた脂肪酸メチルエステルを GC-MS で分析することによって脂肪酸組成を調べた。

(3) *S. livingstonensis* Ac10 の主要外膜タンパク質 Omp74 のフォールディング解析

大腸菌で高発現させた Omp74 を精製し、8 M 尿素または 2% SDS で変性した。変性した Omp74 を EPA 含有リン脂質を含むリポソーム、およびこれを含まないリポソームを用いてリフォールディングさせた。経時的に SDS-PAGE に供し、フォールディングされたものの割合を定量することで、フォールディング速度を求めた。また、Omp74 の N 末端ドメインを、完全長の Omp74 と同様に発現・精製し、変性した後に CD スペクトルを測定し二次構造を解析した。

4. 研究成果

(1) 細菌の細胞膜リン脂質生合成酵素群の機能

EPA を細胞膜リン脂質の成分として含む細菌 *S. livingstonensis* Ac10 においては、1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸-*O*-アシルトランスフェラーゼ PlsC1 が EPA のリン脂質への導入反応を触媒する。本酵素は細胞分裂部位に局在しており、細胞分裂部位における EPA 含有リン脂質が濃縮されたマイクロドメインの形成に寄与している可能性が考えられる。本菌は本酵素のホモログを 5 種類有しているが、そのうちの PlsC4 について、遺伝子破壊株を作製し、リン脂質組成を解析したところ、11-メチルラウリン酸と 13-メチルミリスチン酸を含むリン脂質が顕著に減少していることが明らかとなり、これらの分岐鎖脂肪酸をリン脂質に導入する反応を PlsC4 が担っているものと考えられた。また、GFP 融合型 PlsC4 の蛍光顕微鏡観察から、PlsC4 が細胞の末端領域に局在することが示唆された。以上の結果から、これらの類縁酵素群が特定のリン脂質を特定の部位で生合成することが、細胞膜の不均一性を生み出すことに寄与している可能性が考えられた。

(2) EPA 含有リン脂質が膜タンパク質の構造形成に及ぼす影響

EPA 含有リン脂質は *S. livingstonensis* Ac10 の主要外膜タンパク質 Omp74 のバレル構造へのフォールディングを加速するシャペロン効果をもつ。本研究では、フォールディングへの EPA 含有リン脂質の影響をより詳細に解析した。精製 Omp74 を 8 M 尿素または 2% SDS で変性させ、これをリポソーム溶液と混合することでリフォールディングさせた。Omp74 は尿素処理で完全に

変性したのに対し、SDS 処理では N 末端領域が ヘリックスを形成した部分的にフォールドした状態になることが見いだされた。EPA 含有リン脂質によるフォールディングの加速効果は、SDS で変性させた Omp74 についてもみられた。以上の結果から、Omp74 は ヘリックスを経由して最終的な バレル構造にフォールディングされ、EPA 含有リン脂質は少なくとも ヘリックス形成以降の段階においてシャペロン機能をもつものと考えられた。また、*S. livingstonensis* Ac10 の野生株と EPA 欠損株で Omp74 のコンフォメーションが異なり、本タンパク質のペプチドグリカン結合部位のプロテアーゼ感受性が、EPA の有無で異なることが見いだされた。

(3) 脂肪酸の生理機能解析に有用なプローブ分子の開発

EPA は血管性疾患の予防効果などヒトの健康に寄与する機能性脂肪酸として注目され、また、海洋性 EPA 生産細菌の正常な細胞分裂に要求されることを本研究代表者らに見いだしている。EPA の機能解析に有用なプローブとして 末端にエチニル基 (炭素-炭素三重結合をもつ官能基) を導入した EPA アナログ (cEPA) を合成した。エチニル基は特徴的なラマンシグナルをもつため、cEPA をラマン顕微鏡で可視化できることが期待される。また、エチニル基はアジド基をもつ化合物とクリックケミストリーの手法で特異的に結合させることが可能であるため、そしてエチニル基やアジド基は一般に生体分子には含まれないため、cEPA を含む生体分子 (cEPA で修飾されたタンパク質や脂質など) をアジド基を含む蛍光試薬によって特異的に検出したり、アジドピオチンと結合させたあとでアフィニティー精製することが可能になるものと期待される。

まず、Wittig 反応を 5 回行うことで 5 つの二重結合を導入する方法で cEPA を合成したが、この合成法は全 19 段階の多段階反応であり、収率は 0.0010% と極めて低かった。そこで、合成法の改良を試みた。炭素-炭素三重結合を 4 つ有する化合物を銅触媒を用いたカップリング反応により合成した後、P-2 ニッケルを用いて三重結合を一度の反応で立体選択的に部分還元したのち、Wittig 反応で 1 つの二重結合と ω 末端三重結合を導入した。これにより、全 12 段階の反応により収率 4.4% で cEPA を得ることに成功した。同様の方法で、 ω 末端側の 3 つの炭素原子に結合する水素原子をすべて重水素に置き換えた重水素標識型 EPA の合成にも成功した。

S. livingstonensis Ac10 の EPA 欠損株は、低温での生育速度が低下し、異常に伸長した細胞を形成するが、EPA を培地に添加することで、これらの生育阻害が抑制される。cEPA を培地に添加したところ、天然型 EPA を添加したときと同様、生育遅延と異常な細胞伸長が抑制された。また、cEPA がリン脂質の

アシル鎖として存在することも明らかとなった。以上のことから、本菌において cEPA は天然型 EPA と同様に機能すると考えられた。cEPA 添加菌体の抽出物にアジドピオチン加え、クリックケミストリーの手法で cEPA をピオチン修飾したのち、ストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンし、SDS-PAGE で分析した結果、cEPA 修飾タンパク質と示唆されるシグナルが観察された。

一方、エチニル基をラマン顕微鏡で可視化するための条件検討を行うため、末端にエチニル基を導入したオレイン酸アナログ (cOLA) を合成し、これをリン脂質分子に導入した。得られた cOLA 含有リン脂質を種々の濃度で含むリポソームを調製し、ラマン顕微鏡観察に供した結果、10 mol% 以上の cOLA 含有リン脂質を含むリポソームがエチニル基特有のラマンシグナルによって可視化できることが示された。同様の手法で cEPA 含有リン脂質の可視化も可能になることが期待される。

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 12 件)

Development of a versatile method for targeted gene deletion and insertion by using the *pyrF* gene in the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Ito T, Gong C, Kawamoto J, Kurihara T (2016) *J Biosci Bioeng* 印刷中 査読有

低温菌の低温環境への適応メカニズム, 川本純, 栗原達夫 (2015) *生物工学会誌* **93**: 477-480 査読無

Alkyl hydroperoxide reductase enhances the growth of *Leuconostoc mesenteroides* lactic acid bacteria at low temperatures, Goto S, Kawamoto J, Sato SB, Iki T, Watanabe I, Kudo K, Esaki N, Kurihara T (2015) *AMB Express* **5**: 11 査読有 DOI: 10.1186/s13568-015-0098-3

低温菌のタンパク質と脂質, 川本純, 栗原達夫 (2014) *CSJ カレントレビュー* **17** 極限環境の生体分子 55-61 査読無

長鎖多価不飽和脂肪酸エイコサペンタエン酸の生理機能, 栗原達夫, 川本純 (2014) *医学のあゆみ* 1221-1227 査読無

化学的アプローチによる高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生理機能解析, 栗原達夫, 川本純 (2014) *薬学雑誌* **134**: 507-513 査読有

細菌細胞膜の新しいマイクロドメイン, 栗原達夫, 川本純 (2013) *化学と生物* **51**:

細菌におけ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 (2013) *オレオサイエンス* **13**: 221-229 査読無

Characterization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase from a polyunsaturated fatty acid-producing bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Cho HN, Kasai W, Kawamoto J, Esaki N, Kurihara T (2012) *Trace Nutrients Research* **29**: 92-99 査読有

Functional analysis of an eicosapentaenoic acid biosynthesis protein Orf2 from a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Gong C, Kawamoto J, Esaki N, Kurihara T (2012) *Trace Nutrients Research* **29**: 84-91 査読有

Eicosapentaenoic acid facilitates the folding of an outer membrane protein of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Dai XZ, Kawamoto J, Sato SB, Esaki N, Kurihara T (2012) *Biochem Biophys Res Commun* **425**: 363-367 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.097

Occurrence of a bacterial membrane microdomain at the cell division site enriched in phospholipids with polyunsaturated hydrocarbon chains, Sato S, Kawamoto J, Sato SB, Watanabe B, Hiratake J, Esaki N, Kurihara T (2012) *J Biol Chem* **287**: 24113-24121 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M111.318311

〔学会発表〕(計 37 件)

栗原達夫, 川本純, 小川拓哉, 細菌細胞膜におけるリン脂質の分子種特異的機能と生合成酵素群の特性, BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 平成 27 年 12 月 4 日 神戸国際会議場(兵庫県 神戸市)

栗原達夫, *Shewanella livingstonensis* Ac10 における EPA 含有リン脂質およびその生合成酵素の細胞内局在性, 第 442 回ビタミン B 研究協議会 平成 27 年 10 月 31 日 京都大学楽友会館(京都府 京都市)

栗原達夫, 川本純, 小川拓哉, 趙賢南, 豊竹 洋 佑, Distinct roles of 1-acylglycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase isozymes in membrane phospholipid biogenesis in *Shewanella livingstonensis* Ac10, 第 18 回日本ドイツ酵素工学ワークショップ, 平成 27 年 9 月 14 日 京都大学 益川ホール(京都府 京都市)

栗原達夫, 川本純, エイコサペンタエン酸含有リン脂質の細菌細胞膜における機能とその生合成酵素群の特性, 第 15 回日本蛋白質科学会年会 平成 27 年 6 月 24 日 あわぎんホール(徳島県 徳島市)

栗原達夫, *Shewanella livingstonensis* Ac10 におけるリン脂質への飽和脂肪酸導入を担うアシルトランスフェラーゼ, 第 439 回ビタミン B 研究協議会 平成 27 年 2 月 7 日 キャンパス・イノベーションセンター(東京都 港区)

栗原達夫, 細菌におけるエイコサペンタエン酸含有リン脂質生合成酵素群の細胞内局在性と機能, 第 438 回ビタミン B 研究協議会 平成 26 年 11 月 22 日 大阪工業大学うめきたナレッジセンター(大阪府 大阪市)

栗原達夫, Membrane microdomain enriched in eicosapentaenoic acid-containing phospholipids in *Shewanella livingstonensis* Ac10, Japan-Italy Joint Symposium 平成 26 年 11 月 5 日 東大寺総合文化センター(奈良県 奈良市)

栗原達夫, エイコサペンタエン酸含有リン脂質の生合成を担う細菌アシルトランスフェラーゼ PlsC, 第 435 回ビタミン B 研究協議会 平成 26 年 2 月 1 日 大阪大学中之島センター(大阪府 大阪市)

栗原達夫, 川本純, 低温菌の環境適応を担う細胞膜脂質, 第 29 回日本微生物生態学会大会 平成 25 年 11 月 25 日 鹿児島大学(鹿児島県 鹿児島市)

栗原達夫, 川本純, Roles of eicosapentaenoic acid-containing phospholipids in bacterial cell membrane, EMBO|EMBL Symposium New Approaches and Concepts in Microbiology 平成 25 年 10 月 14~16 日 Heidelberg, Germany

栗原達夫, 川本純, 細菌の細胞分裂と膜タンパク質生合成における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能, 第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

栗原達夫, 化学的アプローチによる高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生理機能解析, 日本薬学会第 133 年会 平成 25 年 3 月 29 日 パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)

栗原達夫, 細菌における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生合成と機能, 日本農芸化学会 2013 年度大会 平成 25 年 3 月 27 日 東北大学 川内北キャンパス(宮城県 仙台市)

栗原達夫, 好冷性細菌の低温適応を担う分子基盤: 細胞膜における高度不飽和脂肪酸の機能, 新化学技術推進協会講演会 平成 24 年 11 月 29 日 京都テルサ (京都府 京都市)

栗原達夫, *Shewanella livingstonensis* Ac10 におけるエイコサペンタエン酸の機能, 特殊環境微生物セミナー 平成 24 年 11 月 22 日 JAMSTEC 横浜研究所 (神奈川県 横浜市)

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局在性, 第 430 回ビタミン B 研究協議会 平成 24 年 11 月 17 日 楽友会館 (京都府 京都市)

栗原達夫, Function of eicosapentaenoic acid-containing phospholipids in bacterial cell membrane, Hirschegg Summer School 2012 平成 24 年 9 月 6 日 Hirschegg, Austria

栗原達夫, 生体膜における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能, 京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニット第 2 回シンポジウム, 平成 24 年 6 月 13 日 京都大学 益川ホール (京都府 京都市)

〔図書〕(計 1 件)

Proteins involved in cold adaptation, Yoshimune K, Kawamoto J, Kurihara T (2013) Cold-adapted Microorganisms (Caister Academic Press) 97-110

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・教授
研究者番号: 7 0 2 4 3 0 8 7

(2) 研究分担者

川本 純 (KAWAMOTO, Jun)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号: 9 0 5 1 1 2 3 8