

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450118

研究課題名(和文)細菌リポタンパク質新規脂質修飾の生合成酵素同定

研究課題名(英文)The identification of enzymes for catalyzing unusual N-acylated bacterial lipoproteins

研究代表者

中山 洋(Nakayama, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：80321793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低G+Cグラム陽性細菌のリポタンパク質はNアシル化酵素ホモログを持たないため、Nアシル化されないと考えられてきた。しかし、私たちはこれらの細菌のリポタンパク質からNアシル化修飾を検出し、これらの細菌がNアシル化酵素を含む未知の生合成酵素群を持つことを示唆した。本研究では、質量分析によるNアシル化検出系を改良し、感度・スループットを有意に向上させた。次に、この方法により枯草菌遺伝子破壊株などからの生合成酵素探索を試みた。現時点では責任遺伝子を同定できていないため、継続して探索を行う。

研究成果の概要(英文)：Since the lipoprotein N-acyltransferase homologs are not found in the genomes of low G+C Gram-positive bacteria, these bacteria are thought to have only N-terminal-free diacylated lipoproteins. However, we have discovered novel types of N-acylated lipoproteins in these bacteria, indicating that they have unusual N-acyltransferases and related enzymes. In this study, mass spectrometry-based method was improved significantly to detect the N-acylation of lipoproteins in a few picomole amount in a day or two. Then, a strain that have only diacylated lipoproteins was sought from the gene disrupted strains and genome deletion mutants of *Bacillus subtilis*. The search is still continued.

研究分野：分析化学

キーワード：リポタンパク質 Nアシル化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

細菌リポタンパク質は、その N 末端システイン残基の側鎖および アミノ基への共有結合脂質をアンカーとして生体膜に局在し、代謝、接着、情報伝達など細菌の生存に重要な役割を担う。この修飾構造は、Toll 様受容体 (TLR)2 により認識され宿主免疫系を活性化する。リポタンパク質は脂質修飾に基づきジアシル型とトリアシル型構造に分類され、このうちジアシル型は TLR2 が TLR6 と形成するヘテロダイマーにより認識され、トリアシル型は TLR2 と TLR1 のダイマーに認識されるというモデルが提出されていた。大腸菌などグラム陰性菌と結核菌などアクチノバクテリアのリポタンパク質は連続して働く一連の酵素 (Lgt, Lsp, Lnt) により脂質修飾を受け成熟し、機能する。このうち 3 番目のジアシル型に膜脂質からアシル基を転移しトリアシル型を合成する Lnt のホモログは低 G+C 含量グラム陽性菌やマイコプラズマのゲノム上に検出されないため、これらの細菌ではジアシル型リポタンパク質のみを持ち、したがって、TLR2/6 のリガンドとなると考えられてきた。しかし、私達は、黄色ブドウ球菌、枯草菌、腸球菌などの低 G+C 含量グラム陽性菌やマイコプラズマのリポタンパク質が N アシル化を含む脂質修飾構造であることを直接的に証明した。これら予想外の脂質修飾構造を受けて、私達は低 G+C 含量グラム陽性菌やマイコプラズマには未知の生合成酵素が存在することを提案した。グラム陰性菌で主要なトリアシル型に加え、2 つの新規構造、すなわちアセチル化した「N アセチル型」およびシステイン側鎖がモノアシルグリセロールで修飾された「リゾ型」構造が複数の細菌種に分布することが明らかとなった。また、このうち N アセチル型を生合成する N アセチル型合成酵素 Lnt は、*B. subtilis* などの膜脂質分析でアセチル基を含む膜脂質が検出されていないことから、膜脂質を基質としないと考えられる。現時点で細胞外アセチル化に利用できるアセチルドナーは知られておらず、どのような基質をもちいた反応が興味深い。グラム陰性菌では、リポタンパク質の効率的な外膜局在に N アシル化が必須なため、リポタンパク質生合成酵素群が細胞増殖に必須である。一方、低 G+C 含量グラム陽性菌やマイコプラズマには外膜は存在せず、また膜アンカーとしてはジアシル型で十分なことから、これらの細菌では N アシル化にグラム陰性菌とは別の機能があると考えられる。動物細胞に寄生生活し 480 種の遺伝子しか持たない *Mycoplasma genitalium* のリポタンパク質もトリアシル型であり、この菌の生存に N アシル化が重要であることを示唆している。他の菌でも同様にそれぞれのニッチへの適応に重要な因子、例えば細菌表層構造と宿主免疫系や他の細菌との相互作用因子、として働いている可能性があり、Lnt の生理的機能

の解明は新規抗菌・制菌剤の開発に結び付く可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、単なる膜アンカーに留まらない細菌の脂質修飾の生理的意義、例えば、寄生や共生における宿主、その他の微生物や環境との相互作用における役割、を明らかにすることである。本申請は、こうした研究を進めるために必要な、脂質修飾生合成酵素の同定を目指す。具体的には以下に示す仮定に基づき、N アセチル化酵素 Lnt を枯草菌から同定し、変異株を取得し将来の研究に向けた基盤を築くことを主目標とする。また、同定した Lnt 遺伝子の系統的な解析を行い Lnt を含むリポタンパク質脂質修飾酵素の進化的な理解を深める。

仮定 1: 枯草菌には N アセチル化を触媒する膜タンパク質 Lnt が存在する。

仮定 2: Lnt は増殖に必須で無い(上流酵素である枯草菌の Lgt, Lsp は増殖に非必須である)。

仮定 3: Lnt 遺伝子は低 G+C グラム陽性細菌・マイコプラズマ間で保存されている。

### 3. 研究の方法

Lnt の同定のための対象細菌として枯草菌を選択した。その理由は、既に私達が新規脂質修飾構造である複数の N アセチル型リポタンパク質を生合成することを見出しており、これらの知見を利用できること、およびナショナルバイオリソースプロジェクト(国立遺伝研)から染色体広域欠失株(最大でゲノムの約 20%を欠失)および遺伝子破壊株(研究開始時点で非必須遺伝子破壊株 2,092 株利用可能)が利用できることから、遺伝子破壊株などの探索に適していると考えられるからである。これらの枯草菌株から N アセチル化を欠いたジアシル型リポタンパク質の発現を指標として株を選択するスクリーニングを行った。修飾構造の判定は、枯草菌リポタンパク質のトリプシン消化により生じるリポペプチドの質量(アセチル基を失うことによる 42Da の質量変化)および MS/MS パターン(アミノ基へのアセチル化であることの確認)をいずれもマトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)質量分析で測定することにより行った。また、補助的に配列比較による *in silico* 解析を行いスクリーニングの優先順位などの参考とした。Lnt 遺伝子破壊株候補を見出した場合には Lnt 遺伝子を相補して N アセチル型リポタンパク質を再度合成することを確認し、Lnt 同定とすることとした。

### 4. 研究成果

#### (1) 脂質修飾の検出系の改良

従来私たちが開発してきた MALDI 質量分析をもちいた脂質修飾の検出・同定法は新規構造の解析を目的としたものであり、試料当たり

3日程度の時間と100pmol程度の試料を必要とし、並列に4~5試料程度分析可能だったので、探索には不十分だった。そこで、まず探索用途に耐えるように検出方法の改良を行った。具体的には、細胞からのリポタンパク質の分画およびMALDI質量分析用の試料プレートへの添加方法を検討した。

#### リポタンパク質の分画法

従来の調製法は、細胞抽出液から非イオン界面活性剤Triton X-114をもちいた二相分配によりリポタンパク質を濃縮し、エタノール沈殿により界面活性剤の部分的な除去を行った後にSDS電気泳動し、CBB染色により検出したリポタンパク質バンドをトリプシンでゲル内消化し、生じたペプチド混合物から脂質修飾ペプチドをメタノール/クロロホルム溶液による二相分配で濃縮・精製するものだった。Triton X-114分画などの工程をスキップ、または電気泳動からゲル内消化を溶液状態での酵素消化に変更して試料を調製し、質量分析によりリポタンパク質を検出出来るか確認したところ、細胞抽出液を直接電気泳動し、ゲル内消化、メタノール/クロロホルム抽出により脂質修飾ペプチドを濃縮して検出出来る条件を確立できた。最も時間の掛かる電気泳動からゲル内消化の工程を溶液状態での消化に変更出来れば、スループットの大幅な向上が期待できたが、溶液消化では尿素などの変性剤・Triton系の界面活性剤なども含めた夾雑物質の影響で脂質修飾ペプチドの質量分析データが得られなかった。

MALDI試料プレートへの試料アプライ法  
2つのアプライ法(先にマトリックス溶液と混合してからプレートに滴下し、乾燥する方法とマトリックス溶液を先に滴下してからそこに試料溶液を添加する方法)、2つのマトリックス溶液(試料溶液と同じメタノール/クロロホルム溶液あるいはアセトニトリル/0.1%取りフルオロ酢酸溶液)の組み合わせを検討した。その結果、先にマトリックスのアセトニトリル/0.1%取りフルオロ酢酸溶液を滴下してから、その液滴に試料溶液を添加する方法が最も良い結果を与えることがわかった。これは、主には液滴が試料プレート上で拡がってしまわないことに起因すると考えている。

これらの改良の結果、ピコモル程度で十分Nアセチル化の有無を判定できる条件を見出した。これは約50倍の高感度化である。また、1試料当たりの処理時間は1.5日~2日程度となり、並列して8試料程度を処理できるようになったため、遺伝子破壊株などの評価が可能な方法を確立出来たと考えた。

(2) Nアセチル化酵素遺伝子の探索  
まず、改めてBlastp, FASTAにより、大腸菌、結核菌のLntのホモログを枯草菌タンパク質

から探したが、予想通り有意なホモログは見つからなかった。そこで、枯草菌、黄色ブドウ球菌などグラム陽性菌やマイコプラズマ間で保存されていること、SOSUIなど複数の膜貫通領域予想ソフトウェアで膜貫通領域を含む膜タンパク質と判定されること、機能が未知であることを指標に遺伝子に優先順位を付した。

次に、ナショナルバイオリソースプロジェクトから入手可能なゲノム縮小株および遺伝子破壊株をもちいて、上述の優先順位を加味しNアセチル化酵素遺伝子の機能を失っている株を質量分析により検出した脂質修飾構造を指標として検索した。Nアセチル化酵素が機能しない場合、ジアシル型のリポタンパク質が特異的に検出されるはずであり、この構造を含むリポペプチドの計算質量値を検索した。ゲノム縮小株では、野生株と同様にNアセチル化したリポタンパク質のみが検出されたため、この範囲にはNアシル化酵素は存在しないことが明らかとなった。続いて上述の優先順位に基づき個別の遺伝子破壊株をもちいて同様に検索を進めた。しかし、増殖が遅い破壊株からはリポタンパク質を検出が難しく、検索が当初予定通り進まなかった。現時点でNアセチル化反応が特異的に失われた株を見出すことは出来ていない。引き続き検索を行うと共に生化学的な方法などでLntの同定を目指す予定である。

#### 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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 1件)

Hajime Tokuda, Peter Sander, Bok Luel Lee, Suguru Okuda, Thomas Grau, Andreas Tschumi, Juliane K Brulle, Kenji Kurokawa and Hiroshi Nakayama

Bacterial lipoproteins: Biogenesis, Virulence/Pathogenicity and Trafficking In Bacterial membranes: Structural and molecular biology, 2014, pp131-174.

(査読無し)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]  
ホームページ等

<http://www.csrs.riken.jp/jp/labs/bcu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 洋 (Nakayama Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：80321793

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし