

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780090

研究課題名(和文)リパーゼ超誘導制御機構の解明と高界面活性作用蛋白質の機能解析

研究課題名(英文)The studies for the regulatory mechanism of lipA and for function of the surfactant protein, EliA, in *Ralstonia* sp. NT80.

研究代表者

赤沼 元気 (Akanuma, Genki)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：30580063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ステアリルアルコールの培地への添加は、*Ralstonia* sp. NT80株のリパーゼ発現だけでなく、感染関連遺伝子群の発現とPHB生産も誘導することを見出した。ステアリルアルコールによる誘導時には分泌蛋白質EliAも同時に分泌されるが、このタンパク質がリパーゼ発現誘導などを促進していることが分った。eliA遺伝子破壊株では培養上清中のステアリルアルコール量の低下が観察されなかったことから、EliAがステアリルアルコールの認識や取り込みに関与していると予想され、結果としてリパーゼ等の発現誘導を促進していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Stearyl alcohol induced not only the expression of lipase and infection-related secreted proteins but also the synthesis of PHB in *Ralstonia* sp. NT80. The secreted protein, EliA, was also induced by stearyl alcohol and facilitated induction of lipase expression. The content of stearyl alcohol in the culture supernatant was reduced by wild-type cells but not by eliA cells. It is most likely that EliA facilitates the induction of lipase expression, by promoting the recognition and/or incorporation of stearyl alcohol.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：Lipase EliA PHB *Ralstonia*

1. 研究開始当初の背景

リパーゼは、トリアシルグリセロールをグリセロールと脂肪酸に加水分解する活性を持ち (EC 3.1.1.3)、多方面で活躍する有用酵素である。これまでに多くの耐熱性、有機溶媒安定性リパーゼが見出されてきたが、リパーゼの発現、分泌を促進する誘導物質に着目した研究は多くなかった。このような背景のなか応募者は、ステアリルアルコールやパルミチルアルコールなどの高級アルコールや、Polyoxyethylene (POE) 20 oleyl ether が *Pseudomonas (Ralstonia) sp.* NT80 株等においてリパーゼ生産の極めて有効な誘導剤であることを見出していた。これに加え、NT80 株ではステアリルアルコールによるリパーゼ誘導時に、分子量約 15 kDa の界面活性作用を示すタンパク質 (EliA) も大量に分泌することが観察されていた。しかしながら、リパーゼの発現誘導機構、EliA の機能に関しては解明されていなかった。

2. 研究の目的

以上の背景から、ステアリルアルコールによるリパーゼ発現誘導機構を明らかにするため、培地へのステアリルアルコール添加による細胞の反応を理解するとともに、リパーゼ遺伝子 (*lipA*) の転写制御機構を把握することを目的とした。その一方で、分泌タンパク質 EliA がリパーゼ発現誘導に関与している可能性を含め、EliA の機能解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) ステアリルアルコールに対する細胞の反応機構を理解するため、ステアリルアルコール添加時における分泌タンパク質のプロテオーム解析を試みるとともに、透過型電子顕微鏡を用いて細胞の形態を観察した。また、プロテオーム解析に先立ち、NT80 ゲノムの塩基配列解読を試みた。

(2) *lipA* の転写制御機構を明らかにするため、転写因子の探索を試みた。近縁の *Pseudomonas alcaligenes* で見出されているリパーゼの二成分制御系である LipQR のホモログをコードする遺伝子を NT80 ゲノム内で検索し、相同性の高いものを候補として解析した。

(3) EliA の機能を解明するため、*eliA* 遺伝子破壊株を作製し、その表現型を観察した。その一方で、培養上清から EliA を分画精製し、タンパク質溶液の界面活性作用を観察した。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによる NT80 ゲノムの塩基配列解読の結果、コンティグの合計鎖長から推定されるゲノムサイズは約 5.8M、ORF 数は 5,301 だった。また、16S rRNA の配列から、この種を *Ralstonia* 属に分類した。この情報をもとに、ステアリルア

ルコール添加時における培養上清のプロテオーム解析を行い、リパーゼ以外にも Type VI secretion system effector などの感染に關与するタンパク質がステアリルアルコールによって多数誘導されていることを発見した。また、これら感染関連遺伝子が転写レベルで誘導されていることを定量 PCR にて確認した。さらに、透過型電子顕微鏡による観察から、培地へのステアリルアルコール添加によって細胞膜が歪むこと、微生物が合成するポリエステル、PHB の生産も誘導されることを見出した (図 1)。この結果を受け、細胞内の PHB を定量したところ、ステアリルアルコール添加時において、培養時間の経過に伴う PHB の蓄積が観察された。そこで、PHB 合成酵素遺伝子オペロンの先頭に位置する *phaC* の転写量変化を観察したが、ステアリルアルコールによる転写レベルでの誘導は起きていなかった。*Pseudomonas denitrificans* では、細胞内のアセチル CoA 濃度が PHB 合成量を決定しているとの報告がある。恐らく今回のケースでは、ステアリルアルコールの資化によってアセチル CoA が蓄積し、それによって PHB 合成が促進されたと考えられる。



図 1. ステアリルアルコールによる PHB 生産誘導と *eliA* 破壊の影響

(2) *P. alcaligenes* におけるリパーゼ遺伝子の転写因子 LipR ホモログをコードする遺伝子を NT80 ゲノム中に 5 種見出し、これらのうち相同性の高い 2 種について遺伝子破壊株を作製し、リパーゼ発現誘導への影響を観察したところ、一方の遺伝子破壊株 ($\Delta lipR80-1$) で POE20 oleyl ether による *lipA* 発現誘導効率が低下した。さらに、Lip80-1 を大腸菌内で発現、精製し、*lipA* 遺伝子上流域に結合することを確認した。この結果は、LipR80-1 が POE20 oleyl ether によるリパーゼ発現の転写制御因子であることを示すものである。しかし、この遺伝子破壊株ではステアリルアルコールによるリパーゼ発現誘導には影響を与えなかったことから、他の転写因子の存も考えられる。

(3) EliA は n-ヘキサデカンの資化に關与すると予想されている *Pseudomonas aeruginosa* の PA タンパク質と 30% の相同性が認められた。そこで EliA も、長い炭素鎖を持つステアリルアルコールの認識や取り込みに關与する可能性があるとして予想し、*eliA* 遺伝子破壊株を作製した。*eliA* 遺伝子破壊株では、ステアリルアルコールによるリパーゼ発現誘導が

顕著に低下した。培養上清リパーゼ活性においては野生株と比較して最大で 1/10 程度まで減少することが分った(図2)。また、培養上清リパーゼタンパク質量、*lipA* 遺伝子の転写量も *eliA* 破壊導入で著しく低下した。これらの異常は遺伝子相補によってほぼ完全に回復した。従って、分泌タンパク質 EliA はステアリルアルコールによるリパーゼ発現誘導を促進していると言える。

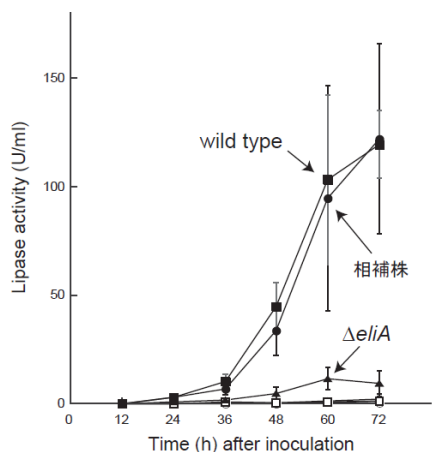


図2. *eliA*破壊によるリパーゼ発現誘導効率低下

このような結果を受け、培養上清中のステアリルアルコール量を GC/MS により定量した。野生株では培養時間の経過とともに培養上清中のステアリルアルコール量の減少が観察された一方で、*eliA* 破壊株ではステアリルアルコールが培養上清中に残存していた(図3)。従って、EliA はステアリルアルコールの認識や取り込みに関与していると予想され、結果としてリパーゼ等の発現誘導を促進していると考えられる。

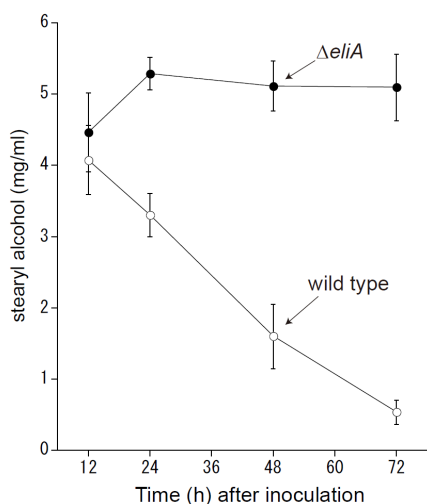


図3. 培養上清中におけるステアリルアルコール量の推移

このような結果に加え、*eliA* 破壊株ではステアリルアルコールによる感染関連遺伝子群の発現誘導、PHB の生産誘導効率も低下することが明らかになった(図1)。近縁にあた

る *Ralstonia solanacearum* や *Burkholderia glumae* は、トマトやイネなどの植物に感染することが知られている。植物根のワックス成分にはステアリルアルコールなどの高級アルコールも含まれている。NT80 も植物に感染すると仮定すると、植物根のワックスを EliA が感知し、感染に関与する遺伝子群の発現誘導を促進しているという可能性も考えられる。実際、感染時にバクテリアが合成するバイオフィーム形成もステアリルアルコールによって誘導され、その効率は *eliA* の遺伝子破壊で低下することも確認している。その一方で、培養上清から分画精製した EliA 溶液には一般的な界面活性剤では Tween 80 よりも高い界面活性作用が認められた。このような特性は、難溶性高級アルコールの認識や取り込みに関与する EliA の機能と関連があるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. EliA facilitates the induction of lipase expression by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80.

Akanuma G, Ishibashi H, Miyagawa T, Yoshizawa R, Watanabe S, Shiwa Y, Yoshikawa H, Ushio K, Ishizuka M.

FEMS Microbiol. Lett. (2013) **339**: 48-56.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. *Pseudomonas* sp. NT-80 株における界面活性作用蛋白質 P15 の機能解析

赤沼元気、宮川貴裕、山口麻衣、石塚盛雄
第 84 回生化学会大会 京都 2011 年

2. *Pseudomonas* sp. NT-80 におけるリパーゼ発現制御因子探索と高生産株の作製

片桐龍之介、大森結加、高取怜、赤沼元気、石塚盛雄
第 84 回生化学会大会 京都 2011 年

3. *Pseudomonas* sp. NT-80 株におけるリパーゼ転写制御因子の機能解析

関谷麻美、片桐龍之介、赤沼元気、石塚盛雄
第 84 回生化学会大会 京都 2011 年

4. *Pseudomonas* sp. NT-80 における耐熱性リパーゼ発現誘導機構の解析

赤沼元気、関谷麻美、吉澤梨絵、牛尾一利、志波優、渡辺智、吉川博文、石塚盛雄
第 6 回ゲノム微生物学会年会 東京 2012 年

5. EliA facilitates the induction of lipase expression by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80.

Akanuma G, Ishibashi H, Miyagawa T,

Yoshizawa R, Watanabe S, Shiwa Y, Yoshikawa H, Ushio K, Ishizuka M.

第 35 回分子生物学会年会 福岡 2012 年

6. Stearyl alcohol induces not only lipase expression but also other secreted proteins in *Ralstonia* sp. NT80.

Yoshizawa R, Akanuma G, Shiwa Y, Watanabe S, Yoshikawa H, Ushio K, Ishizuka M.

第 35 回分子生物学会年会 福岡 2012 年

7. *Ralstonia* sp. NT80 におけるリパーゼ発現誘導促進因子 *EliA* の解析

赤沼元気、石橋隼、宮川貴裕、吉澤梨絵、渡辺智、志波優、吉川博文、牛尾 一利、石塚盛雄

農芸化学会 2013 年度大会 仙台 2013 年

8. *Ralstonia* sp. NT80 におけるリパーゼとその誘導促進因子の発現制御解析

水野佑貴、石橋隼、関谷麻美、吉澤梨絵、赤沼元気、牛尾一利、石塚盛雄

農芸化学会 2013 年度大会 仙台 2013 年

9. *EliA* facilitates the induction of lipase expression by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80.

Akanuma G, Ishibashi H, Miyagawa T, Yoshizawa R, Watanabe S, Shiwa Y, Yoshikawa H, Ushio K, Ishizuka M.

5th Congress of European Microbiologists – FEMS Leipzig, Germany, (2013).

10. Transcriptional analysis of *lipA* and *eliA* genes induced by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80.

Mizuno Y, Sekiya M, Akanuma G, Ushio K, Ishizuka M.

5th Congress of European Microbiologists – FEMS Leipzig, Germany, (2013).

11. 高級アルコールによるリパーゼ・PHB 生産誘導とその促進因子 *EliA* の解析

赤沼元気、吉澤梨絵、永倉茉莉、大塚拓、志波優、渡辺智、吉川博文、牛尾一利、石塚盛雄

第 36 回分子生物学会年会 神戸 2013 年

12. *Ralstonia* sp. NT80 において高級アルコール添加にตอบสนองして発現するタンパク質群のプロテオーム解析

永倉茉莉、吉澤梨絵、大塚拓、赤沼元気、石塚盛雄

第 36 回分子生物学会年会 神戸 2013 年

13. 高級アルコールによるリパーゼ・PHB 生産誘導を促進する分泌タンパク質 *EliA* の機能解析

赤沼元気、多勢真大、鈴木優美、渡辺智、志波優、吉川博文、牛尾 一利、石塚 盛雄

農芸化学会 2014 年度大会 東京 2014 年

14. *Ralstonia* sp. NT-80 において高級アルコール添加にตอบสนองして発現するタンパク質群のプロテオーム解析

大塚拓、永倉茉莉、吉澤梨絵、赤沼元気、石塚盛雄

農芸化学会 2014 年度大会 東京 2014 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

赤沼 元気 (AKANUMA GENKI)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号 : 30580063