

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450101

研究課題名(和文)高級アルコールによるリパーゼとポリエステル生産誘導機構の解明

研究課題名(英文)The regulatory mechanisms of the induction of lipase expression and polyester production by stearyl alcohol

研究代表者

赤沼 元気 (AKANUMA, Genki)

立教大学・理学部・助教

研究者番号：30580063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ステアリルアルコールによるリパーゼ生産菌のリパーゼとポリエステル生産誘導機構について調査し、リパーゼの発現を誘導する転写因子の同定に成功した。また、ステアリルアルコールによって発現誘導されるアルコール脱水素酵素を発見し、この酵素がリパーゼの発現誘導に重要であることを見出した。さらに、ステアリルアルコールに対する細胞の反応全般に分泌タンパク質EliAが必要であることを発見した。

研究成果の概要(英文)：The transcriptional factor which activates the transcription of gene encoding lipase was determined. Moreover, we found the alcohol dehydrogenase which plays important role for induction of lipase expression by stearyl alcohol. The EliA, a secretory protein, is essential for the lipase-producing bacterium to respond to stearyl alcohol.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リパーゼ ポリエステル 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。一方、バクテリアが生産するポリエステル、Polyhydroxyalkanoates (PHA) は生分解性プラスチックであり、石油資源の枯渇が迫る現在では再生可能な素材として注目されている。このような背景のなか応募者らは、 β -プロテオバクテリアに属する *Ralstonia* sp. NT80 (NT80) において、リパーゼと PHA 生産がステアリルアルコール等の難溶性高級アルコールで著しく誘導されることを見出していた。しかしながら、細胞内外におけるどのような機構によってこれらの有用酵素・物質が生産誘導されるのか、その全体像は解明されていなかった。このリパーゼ生産誘導機構の解明を目指した研究を行う中で、高級アルコールによるリパーゼ・PHA 生産誘導を促進する分泌タンパク質、EliA を発見していた。しかし、その機能の詳細は分かっていなかった。

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、PHA 生産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 の機能を解析し、これら有用物質の生産誘導機構への作用機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EliA はステアリルアルコールの資化に関わることがこれまでの結果から示唆されていた。また、透過型電子顕微鏡解析から細胞表面にステアリルアルコールが吸着しているように見えた。そこで、EliA とステアリルアルコールとの相互作用と、EliA の局在を調査した。

(2) *eliA* の転写誘導は *lipA* の転写時期よりも早いから、誘導機構の初期反応とも言える。そこで、*eliA* の転写制御因子を同定するため、*eliA* 転写調節領域をベイトとしたプルダウンアッセイを試みた。

(3) ステアリルアルコール添加時には、リパーゼと PHA の生産のみならず、細胞膜の形状が変化するなどの変化も観察されていた。ステアリルアルコール添加に対する細胞の反応を理解することは、誘導機構に関わる因子の同定にも繋がると考え、誘導時における分泌・膜・細胞質のタンパク質発現パターンの変動を観察した。これらの解析を *eliA* 破壊株についても行い、EliA 欠損の影響を併せて検証した。

(4) これまでに、リパーゼ遺伝子の転写促進因子 (*LipR80-1*) の一つを同定していたが、遺伝子破壊の影響は界面活性剤を誘導剤と

して用いた場合に限定されており、ステアリルアルコールによる誘導効率は低下しなかった。そこで *lipA* が複数の転写因子によって制御されている可能性を考え、特にステアリルアルコール添加時に機能する転写因子を探索した。

(5) ステアリルアルコール添加時には、細胞の形状変化も観察されていた。この変化とリパーゼと PHA 生産との関係を把握するため、膜脂肪酸組成変動を解析した。

4. 研究成果

(1) 高級アルコールによるリパーゼ発現誘導の促進因子である EliA の機能を解明するため、まずその局在を観察した。細胞質、膜、分泌画分を対象とし、抗 EliA 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った結果、EliA は主に培養上清に局在しており、膜への局在はわずかであることが分かった。この結果を受け、EliA が培養上清中で高級アルコールと相互作用する可能性を考え、精製 EliA とステアリルアルコールの相互作用を *in vitro* で検討した。しかし、二者の間に有意な相互作用は観察されなかった。今後の条件検討が必要だが、EliA は高級アルコールに対して間接的に作用する可能性も考えられる。

(2) *eliA* 遺伝子の転写因子を同定する目的で、*eliA* 転写調節領域の DNA を固定したアフィニティークラムを用いて相互作用するタンパク質を探索した。その結果、3 種のタンパク質が検出され、うち 1 種のタンパク質 (NT1506) に DNA 結合ドメインが認められた。そこで NT1506 の遺伝子破壊株を作製し、*eliA* の転写活性、及びリパーゼ生産量への影響を検証したが、大きな変化は認められなかった。プルダウンアッセイの条件は十分に検討したと考えられるため、*eliA* 遺伝子の転写因子同定には別のアプローチが必要であると思われる。

(3) 高級アルコールに対する細胞の反応全般を把握する目的で分泌・細胞質・膜タンパク質のプロテオーム解析を行った。ステアリルアルコールの添加によって、分泌タンパク質の構成が大きく変化することが 1 次元の SDS-PAGE の結果から示唆されていた。そこでリパーゼと PHA 生産が強く誘導される培養開始から 72 時間後の培養上清からタンパク質を調製し、二次元電気泳動で展開した。検出されたタンパク質スポットは Peptide Mass Fingerprinting (PMF) による同定を試みた。その結果、30 種のタンパク質同定に成功し、そのうち 10 種が分泌タンパク質であると予想された。これらのタンパク質のうち、リパーゼと EliA を含む 4 種がステアリルアルコールによって特異的に発現誘導されていると考えられた。そこでこれらのタンパク質をコードする遺伝子の転写量を RT-qPCR 法で測定したところ、4 種全ての遺

伝子の転写がステアリルアルコール添加によって誘導されることが確認できた（図1、peptidase は negative control）。

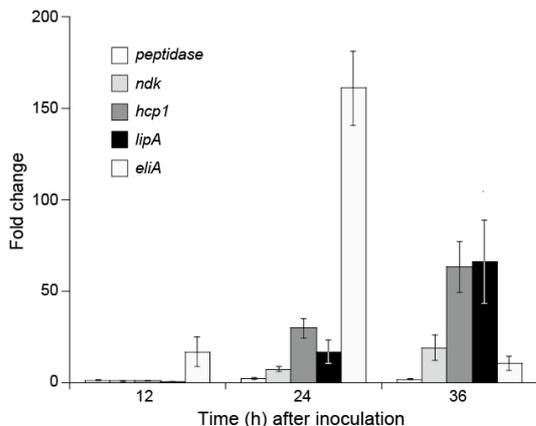


図1. ステアリルアルコールによる複数の分泌タンパク質遺伝子の転写誘導

ステアリルアルコールによって誘導される分泌タンパク質には、Type 6 secretion system の細胞外部分を形成する Hcp1 も含まれていた。分泌システムを構成するタンパク質であることから、誘導システムへの関与も予想されたが、*hcp1* 遺伝子破壊のリパーゼ生産への影響は観察されなかった。

一方、ステアリルアルコール添加によって誘導される膜タンパク質を把握するためのプロテオーム解析も試みた。72 時間培養した細胞から膜タンパク質を調製し、二次元電気泳動で展開後、PMF 法で同定した。その結果、外膜タンパク質を 22 種、内膜タンパク質を 3 種同定することに成功した。このうち 4 種がステアリルアルコールによって特異的に発現誘導されるものだった。これらのタンパク質には、浸透圧ストレスに反応する OmpW や、バイオフィーム形成に関わる RagC が含まれていた。これらのタンパク質の発現は、やはり転写レベルで誘導されていた。OmpW のリパーゼ発現誘導への関与については検証できていないが、ステアリルアルコール添加がバイオフィーム形成を促進することは確認しており、今回の結果を支持するものである。

さらに、細胞質タンパク質のプロテオーム解析も同様に行い、47 種のタンパク質同定に成功した。このうち 8 種がステアリルアルコール添加時に特異的に誘導されていた。これらのタンパク質の中には、ストレス応答やステアリルアルコールの代謝に関与するものが多く含まれていた。ステアリルアルコールによって誘導される細胞質タンパク質のうち、アルコール脱水素酵素 (ADH) をコードする遺伝子を破壊したところ、リパーゼの生産誘導の低下が認められた。*adh* 欠損株ではステアリルアルコール由来の白濁が野生株よりも解消されにくいことから、ステアリルアルコールの代謝に関与していると予想される。この結果は、ステアリルアルコールの

細胞内における代謝がリパーゼ生産誘導に重要であることを示唆するものである。

一連のプロテオーム解析から、ステアリルアルコールによって発現が誘導されるタンパク質を複数同定することに成功したが、EliA 欠損株ではこれらのタンパク質の発現誘導はかからなかった。EliA 欠損株では、PHA 生産、バイオフィーム形成も誘導されないことから、ステアリルアルコールに対する細胞の応答全般に EliA が必要であると見える。

(4) ステアリルアルコール添加を感知し、リパーゼの発現を誘導する転写因子を同定するため、*Pseudomonas alcaligenes* におけるリパーゼ転写促進因子、LipR のホモログをコードする 5 種の遺伝子を対象に欠損株を作製した。その結果、LipR80-4 と名付けた転写因子候補欠損株でステアリルアルコール添加時のリパーゼ生産誘導が低下することを見出した。*lipR80-4* 欠損株では *lipA* の転写活性は低下し、その影響は遺伝子相補によって見られなくなった（図2）。これを受け、精製 LipR80-4 を使った electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行い、*lipA* 上流域へ直接結合することを確認した（図2）。

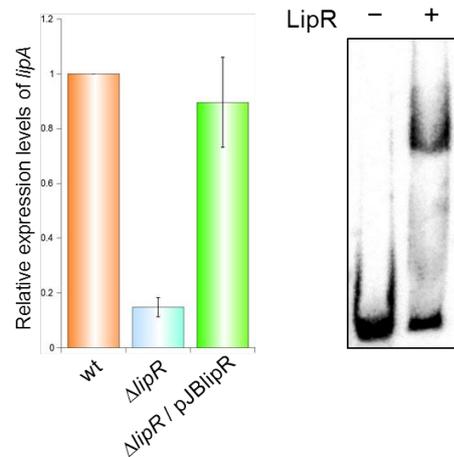


図2. LipR80-4によるlipA転写誘導とlipA転写調節領域への結合

さらに、DNaseI footprint 解析などにより、LipR80-4 の結合配列が *lipA* 転写開始点上流 -73 ~ -47 の領域であることを同定した。一方、*lipR80-4* 上流には二成分制御系センサーキナーゼをコードすると考えられる遺伝子 *lipQ80-4* が存在するため、LipR80-4 がリン酸化を受けることで活性化することが予想された。*lipQ80-4* の欠損株では *lipA* の転写誘導効率低下が観察されたため、LipR80-4 のリン酸化部位をアミノ酸置換解析によって同定した。その結果、59 番目の Asp 残基リン酸化が *lipA* の転写誘導に重要であることが判明した。従って、NT80 株のステアリルアルコールによるリパーゼ生産誘導は、

LipQR80-4 二成分制御系によってコントロールされていると言える。

(5) 培地へのステアリルアルコール添加時には細胞膜の形状が変化することを電子顕微鏡観察から見出していた。これを受けて膜の脂肪酸組成変化を解析した結果、リパーゼ生産誘導時には炭素数 16、17 の脂肪酸含有量が増加する一方で、炭素数 18 の脂肪酸含有量が低下することが判明した。EliA 欠損株では膜脂肪酸組成変動が観察されなかったことから、リパーゼ生産と細胞膜の状態には密接な関係があると考えられる。

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 3 件)

1. “Ribosome dimerization is essential for the efficient regrowth of *Bacillus subtilis*”
Akanuma G, Kazo Y, Tagami K, Hiraoka H, Yano K, Suzuki S, Hanai R, Nanamiya H, Kato-Yamada Y, Kawamura F.

Microbiology. (2016) **162**: 448-458.

doi: 10.1099/mic.0.000234.

(査読有)

2. “EliA is required for inducing the stearyl alcohol-mediated expression of secretory proteins and production of polyester in *Ralstonia* sp. NT80”

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

Microbiology. (2016) **162**: 408-419.

doi: 10.1099/mic.0.000225.

(査読有)

3. “Defect in the formation of 70S ribosomes caused by lack of ribosomal protein L34 can be suppressed by magnesium”

Akanuma G, Kobayashi A, Suzuki S, Kawamura F, Shiwa U, Watanabe S, Yoshikawa H, Hanai R, Ishizuka M.

Journal of Bacteriology (2014) **196**: 3820-3830.

doi: 10.1128/JB.01896-14.

(査読有)

[学会発表](計 4 件)

1. *Ralstonia* sp. NT-80 株におけるリパーゼ誘導促進因子の機能解析

千濱良太、石橋隼、栗井貴子、赤沼元気、牛尾一利、石塚盛雄

第 39 回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2016 年 12 月 1 日

2. *Ralstonia* sp. NT-80 株におけるリパーゼ転写調節因子 LipR80-4 の機能解析

多勢 真大、関谷 麻美、赤沼元気、石塚盛雄

日本農芸化学会 2016 年度大会

札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

2016 年 3 月 29 日

3. *Ralstonia* sp. NT80 株におけるリパーゼ転写調節因子 LipR80-4 の機能解析

多勢 真大、関谷 麻美、赤沼元気、石塚盛雄

日本農芸化学会 2015 年度大会

岡山大学(岡山県岡山市)

2015 年 3 月 27 日

4. 高級アルコールに対する微生物の反応

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

グラム陽性菌ゲノム機能会議

いこいの村 庄内(山形県鶴岡市)

2014 年 9 月 5 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤沼元気(AKANUMA Genki)

立教大学・理学部・助教

研究者番号: 30580063

(2) 研究分担者

石塚盛雄(ISHIZUKA Morio)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号: 50168241