

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660065

研究課題名(和文)脂溶性分子シャペロンとしての高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の応用

研究課題名(英文) Application of eicosapentaenoic acid-containing phospholipids as a lipophilic protein chaperone

研究代表者

川本 純 (Kawamoto, Jun)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：90511238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖多価不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸(EPA)は、人の健康維持に必須の生理活性脂肪酸である。EPAは主に生体膜を構成するリン脂質のアシル鎖成分として存在し、生体膜の物理化学的特製を変化させることで周辺の膜タンパク質の機能を制御していると考えられている。本研究では、EPA含有リン脂質と膜タンパク質の相互作用機構に着目し、EPA生産性の特殊環境微生物 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の EPA 生合成遺伝子破壊株の膜タンパク質生産能を解析した結果、EPAの欠損は特定の膜タンパク質の小胞分泌を促進することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Eicosapentaenoic acid (EPA), one of polyunsaturated fatty acids, has various beneficial effects on human health. EPA is naturally found as an acyl chain of membrane phospholipids and changes the physicochemical properties of the membrane, such as the thickness, elasticity, permeability, and fluidity, to modulate functions of membrane proteins. In this study, we focused on the membrane protein production of an EPA-less mutant of a psychrotrophic EPA-producing bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, which is isolated from Antarctic seawater and inducibly produces EPA-containing phospholipids at low temperatures. We found that, in the EPA-less mutant, a specific membrane protein was exported to the extracellular region via membrane vesicle production, suggesting that the defect of EPA facilitates a protein unfolding of specific proteins and induces the protein secretion pathway.

研究分野：分子微生物科学

キーワード：低温菌 エイコサペンタエン酸 Outer membrane vesicle *Shewanella*

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代の幕開けとともに、多様な生物を対象にしたタンパク質研究は増加の一途である。特に物質輸送や認識、シグナル伝達、エネルギー産生といった重要な生理機能を担う膜タンパク質への関心が高まっている。生体膜は主にリン脂質と膜タンパク質で構成され細胞と細胞外を隔てている。膜タンパク質は疎水的な脂質膜環境で多様な三次元構造を形成し、外部刺激に応答した構造変化や他の膜タンパク質との相互作用を介して種々の機能を担っていることが知られている。生体膜で進行する生命現象の理解には、対象となる膜タンパク質の生化学的諸性質の解析が求められる一方で、膜タンパク質研究における最大のボトルネックは、目的タンパク質の高生産系および活性を保持したまま可溶化・精製の困難さにあり、一般的なタンパク質生産系で高生産され、種々の界面活性剤存在下で適切に可溶化・精製できる膜タンパク質は限定的である。

これまでに、多様な低温環境より採取された低温適応細菌（低温菌）を宿主とした低温タンパク質生産系の開発に取り組んできた。低温菌は、地球上の生命圏の 70% 以上を覆う極地や深海、高山といった低温環境を好む生物群であり、地球上で最大の生存可能域を獲得した生物種といえる。低温菌は、大腸菌に代表される常温菌や、産業用酵素の生産源である好熱菌、超好熱菌が生育できない 15°C 以下で良好に生育し、氷点下付近でも生育可能であり、低温環境での物質循環を担う。低温菌を組換えタンパク質生産系の宿主とすることで、常温付近では不安定な熱安定性の低いタンパク質や、加水分解酵素といった常温付近で宿主細胞に対して毒性を有する毒性タンパク質の生産に適している。また、低温で目的タンパク質を翻訳させることで、目的タンパク質は緩やかに高次構造を形成することで、封入体の形成を抑制することが期待される。以上のように、低温菌は組換えタンパク質生産の宿主として有用であると考えられ、本研究では成熟型膜タンパク質生産の宿主細胞としての低温菌の活用を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では、効率的な成熟型膜タンパク質調製のプラットフォームとして、長鎖多価不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を構成成分とする生体膜を有する低温適応細菌を宿主としたタンパク質生産系の開発、および宿主細菌における EPA 含有リン脂質と膜タンパク質の相互作用の生理的意義の解明に取り組んだ。

南極海水より採取された低温適応細菌（低温菌）*Shewanella livingstonensis* Ac10 は低温誘導的に EPA 含有リン脂質を生産する。EPA 含有リン脂質の生合成遺伝子を破壊した EPA 欠損株 ( $\Delta$ EPA) は、本菌の至

適生育温度である 18 °C では野生株と同様に生育したが、4 °C での生育能が顕著に低下した。さらに、 $\Delta$ EPA では低温での細胞分裂が正常に進行せず、伸長した細胞を形成することが明らかとなった。また、EPA の有無が本菌の膜流動性に及ぼす影響を解析した結果、EPA の欠損は膜全体の流動性には影響しないことが明らかとなった。さらに  $\Delta$ EPA を詳細に解析した結果、EPA の欠損は特定の膜タンパク質の構造形成に影響すること、また EPA 含有リン脂質は膜タンパク質の *in vitro* での二次構造形成を促進することがわかった。以上の結果から、本菌において EPA 含有リン脂質は疎水的シャペロン様機能を担っていることが示唆された。

本研究では、EPA 含有リン脂質の膜タンパク質シャペロン様機能を活用した低温膜タンパク質生産系が有用であると考え、下記の研究に取り組んだ。(1) 網羅的トランスクリプトーム解析による低温誘導性プロモータ領域の探索。(2) 膜タンパク質の高次構造形成における EPA 含有リン脂質の影響の解析。(3) 低温菌による膜小胞生産と EPA 含有リン脂質の生理的役割の解析。以上の解析を通して、膜タンパク質生産に応用可能なプロモータ領域の探索と膜タンパク質の機能発現における EPA 含有リン脂質の生理的意義について解析した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 網羅的トランスクリプトーム解析による有用プロモータ領域の探索

低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 を宿主とした低温タンパク質生産系に応用可能な低温で高い転写活性を有するプロモータ領域の同定を目的とし、RNA-seq 解析を行った。4 °C もしくは 18 °C で培養した菌体から全 RNA を抽出し、リボゾーム RNA を除去した後に cDNA ライブラリーを構築し、次世代シーケンサーによる転写物解析に供した。マッピング解析と発現量解析から、4 °C もしくは 18 °C で転写量が 2 倍以上増加する遺伝子群を探索した。

### 3-2. 膜タンパク質の高次構造形成における EPA 含有リン脂質の影響の解析

*S. livingstonensis* Ac10 が低温誘導的に生産する外膜ポーリンタンパク質 Omp74 は、8-12 回膜貫通型の  $\beta$ -バレルタンパク質である。 $\Delta$ EPA において、Omp74 は野生株とは異なる構造で存在していたことから、EPA 含有リン脂質は Omp74 の低温での構造形成を制御していることが示唆された。本タンパク質の低温での構造形成プロセスにおける EPA 含有リン脂質の影響を解析するために、EPA 含有リン脂質存在下で Omp74 の *in vitro* 再構成を行い、Omp74 の  $\beta$ -シート形成を円偏光二色性分光解析 (CD 解析) を用いて解析した。

### 3-3. 低温菌による膜小胞生産と EPA 含有リン脂質の生理的役割の解析

近年、細菌が産生する菌体外膜小胞 (Outer membrane vesicle, OMV) が注目されている。OMV は現在までに単離されている全てのグラム陽性、陰性細菌で生産されることが確認されている。OMV は、直径 20-300 nm の球状の小胞で、核酸やタンパク質、様々な代謝物が膜によって覆われている。OMV は細胞とは異なる膜タンパク質で構成されることから、選択的なタンパク質の移行機構の存在が示唆され、この選択的タンパク質の小胞分泌システムは膜タンパク質生産やワクチンの産生といった微生物機能を用いた物質生産の新たなプラットフォームとして注目されている。本研究では、膜小胞を介したタンパク質の菌体外への輸送機構の解明を目的とし、低温下での異種タンパク質生産に利用されてきた南極海水由来の低温適応性グラム陰性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の膜小胞生産に着目した。本菌の膜小胞を単離し、その形態的・生化学的特性を解析した。また、膜リン脂質組成の変化が本菌の膜小胞生産能におよぼす影響を解析した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 網羅的トランスクリプトーム解析による有用プロモータ領域の探索

低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 の RNA-seq 解析を行った結果、培養温度に応じて転写量が 2 倍以上増加する遺伝子を約 750 種同定した。これらのうち、低温での転写レベルが顕著に増加する遺伝子群の温度依存的な転写制御に関わる遺伝子領域は、低温物質生産用プロモータとして利用可能であると考えられた。同定された低温誘導性遺伝子の上流配列から予測プロモータ領域を獲得することに成功した。これら低温誘導性プロモータは、本菌を宿主とした低温膜タンパク質生産に応用可能と考えられた。

##### 4-2. 膜タンパク質の高次構造形成における EPA 含有リン脂質の影響の解析

CD スペクトル測定より、Urea で変性した Omp74 は二次構造を形成していないが、SDS で変性した Omp74 は  $\alpha$  ヘリックスを形成していることがわかった。希釈法により *in vitro* 再構成を行った結果、Omp74 を SDS で変性した場合は、Urea で変性した時よりも早く fold したバンドが観察された。以上の結果より、Urea で変性した場合、Omp74 は完全に変性した状態からの初期段階を経た folding が起き、SDS で変性した場合は、部分的に二次構造が形成され、高次構造形成が進行しており、Omp74 が多段階的に folding している可能性が考えられた。EPA 含有リン脂質は Omp74 の folding を促進することから、EPA 含有リン脂質は Omp74 の初期段階の folding を促進することで、低温環境下で

の高次構造形成を促進している可能が示唆された。EPA 含有リン脂質は極性頭部に比べて相対的に嵩高い疎水性尾部をもつ逆コン型リン脂質と考えられており、リン脂質二重膜の膜圧や弾性、透過性や流動性といった膜の物理化学的特性を変化させることで、膜タンパク質の活性や局在を制御していると考えられている。本結果から、EPA 含有リン脂質は膜タンパク質生産プロセスにおいて、標的膜タンパク質の親水的な環境から疎水的な膜環境への移行を促進し、さらに膜中での高次構造形成の初期段階を促進することが示唆されたことから、EPA 含有リン脂質で構成される生体膜を有する *S. livingstonensis* Ac10 は異種成熟型膜タンパク質の生産の宿主細胞として有用であると期待された。また、EPA 含有リン脂質の細胞内局在や生産量を制御することで、効率的な膜タンパク質生産系の構築が可能になると期待される。

##### 4-3. 低温菌による膜小胞生産と EPA 含有リン脂質の生理的役割の解析

4 °C で定常期まで培養した *S. livingstonensis* Ac10 の培養上清を超速心に供し、ネガティブ染色した再懸濁液を透過電子顕微鏡 (TEM) で観察した結果、膜小胞の存在があきらかとなった。また、極低温電子顕微鏡をもちいて膜小胞を観察した結果、本菌の主な膜小胞は直径約 100 nm で、一重膜構造を有していた。動的光散乱 (DLS) 法をもちいて培養上清中に存在する粒子の流体力学的半径を測定した結果、50 nm にピークをもつ粒径分布が得られた。このことから、本菌は直径約 100 nm の膜小胞を分泌することがあきらかとなった。また、本菌の膜小胞は、二重膜構造や、鎖状に連結した構造、多重膜構造など多様な構造を形成することがわかった。

膜リン脂質組成の変化が、4 °C における *S. livingstonensis* Ac10 の膜小胞生産能におよぼす影響を解析するために、本菌のリン脂質膜合成に関与する遺伝子破壊株における OMV 生産能を評価した。低温誘導的に生産される エイコサペンタエン酸 (EPA) の生合成酵素 (Orf5) と、リン脂質の sn-2 位に EPA あるいは分岐鎖脂肪酸を導入するアシル基転移酵素 (PlsC1, PlsC4) それぞれの欠損株について、TEM による観察から培養上清中に膜小胞の存在が確認された。

脂溶性蛍光試薬 FM4-64 をもちいて、野生株とそれぞれの欠損株の膜小胞生産能を比較した。すべての欠損株において、野生株よりも膜小胞生産能が顕著に上昇していた。特に、orf5 を欠く  $\Delta$ EPA の膜小胞生産能は、野生株の 5 倍であった。さらに、DLS 解析により膜小胞の粒径分布を解析した結果、 $\Delta$ EPA が分泌する膜小胞は、野生株と比較して、平均直径が大きいことがわかった。以上の結果から、本菌において EPA の欠損および

EPA 含有リン脂質と分岐鎖脂肪酸含有リン脂質の減少は膜小胞生産を促進し、膜小胞の形状を変化させることが示された。

4 °C で培養した *S. livingstonensis* Ac10 の野生株と ΔEPA における全細胞破碎液と膜小胞を SDS-PAGE に供した結果、本菌の膜小胞は細胞とは顕著に異なるタンパク質群で構成されることがわかった。膜小胞タンパク質をペプチドマスフィンガープリンティング法で解析し、4 種のタンパク質を同定した。本菌の膜小胞には、鞭毛フック関連タンパク質 (FlgL)、低温誘導性ポーリン (Omp176) の 2 種の外膜タンパク質に加えて、内膜局在性が予測される転写制御因子 LysR と機能未知タンパク質が含まれていた。このことから、本菌は外膜タンパク質だけではなく、内膜に由来するタンパク質を小胞分泌を介して菌体外に輸送していることが示唆された。また、ΔEPA 株の膜小胞に含まれる Omp176 の量が増加していることから、膜小胞を介した Omp176 の菌体外輸送は ΔEPA で促進されていることがわかった。Omp176 は低温誘導的に生産される膜タンパク質で、EPA の減少は膜中における Omp176 の安定性に影響することがわかっていることから、ΔEPA における OMV 生産の増加は Omp176 のミスフォールディングストレスによって誘導される可能性が示唆された。

本研究によって、膜リン脂質組成の変化は膜小胞生産能を上昇させ、ΔEPA 株の膜小胞には Omp176 が高濃度で内包されていることがあきらかとなった。EPA 欠損株における Omp176 の膜小胞への移行機構を解明することで、*S. livingstonensis* Ac10 の膜小胞分泌を介した低温下での異種タンパク質生産システムの構築が期待された。以上の成果は、*Extremophiles* 誌に発表した。

#### 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 1 件)

Characterization of extracellular membrane vesicles of an Antarctic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, and their enhanced production by alteration of phospholipid composition. Yokoyama F, Kawamoto J, Imai T, Kurihara T., *Extremophiles*. 2017 Apr 22. doi: 10.1007/s00792-017-0937-z.

[学会発表] (計 2 件)

日本農芸化学会 2016 年度本大会, 2016/03/30

低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の菌体外膜小胞の解析

横山 文秋、川本 純、今井 友也、小川 拓哉、栗原 達夫

11<sup>th</sup> International congress on Extremophiles 2016. Sep. 16-19 2016, Kyoto Japan

Molecular Characterization of Eicosapentaenoic Acid-Containing Membrane Vesicles Produced by a Psychrotrophic Bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

Fumiaki Yokoyama, Jun Kawamoto, Tomoya Imai, Takuya Ogawa, Tatsuo Kurihara

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~mmsicr/mmstojp/Top.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本 純 (Jun KAWAMOTO)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号 : 90511238

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

栗原 達夫 (Tatsuo KURIHARA)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号 : 70243087

(4) 研究協力者

( )