

平成30年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06328

研究課題名(和文)細菌における生体膜の不均一性を生み出すアシル基転移酵素の研究

研究課題名(英文) Studies on acyltransferases that create the heterogeneity of biological membrane in bacteria

研究代表者

小川 拓哉 (Ogawa, Takuya)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：40756318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：低温性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 に由来する1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素(PlsC)の5つのホモログ酵素(SIPlsC1～SIPlsC5)の機能解析に取り組んだ。1) SIPlsC1の精製および活性測定の方法を確立し、酵素学的な特性を明らかにした。2) SIPlsC3が構造未知の黄色色素の生合成に関与することが示唆され、PlsCファミリーの新奇機能を見出した。また、3) PlsCの結晶構造解析を目的として、好熱性の *Thermus* 属細菌由来のPlsCを精製し、酵素学的特性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I analyzed the functions of five homologs (SIPlsC1-SIPlsC5) of 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (PlsC) from the psychrotrophic bacterium *Shewanella livingstonensis* Ac10. 1) I established the methods of purification and enzymatic assay for SIPlsC1 and revealed its enzymatic characteristics in vitro. 2) It was indicated that SIPlsC3 is involved in the biosynthesis of a yellow pigment of which the chemical structure is as yet unidentified, suggesting a novel function of PlsC-family enzymes. In addition, 3) aiming at the crystal structure analysis of PlsC, I purified a thermostable PlsC from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* and revealed its enzymatic characteristics.

研究分野：酵素、微生物

キーワード：リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 低温適応 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、生体膜は均一な膜系と見なされ、脂質やタンパク質などの分子が膜中を自由に拡散することが考えられてきた。しかし近年、特定の脂質やタンパク質が膜中で集合し、機能性のマイクロドメインを形成することが明らかになってきた。このような膜領域の形成は真核生物だけでなく、真正細菌においても、リン脂質の1分子種であるカルジオリピンが細胞の極に集まるといった報告例がある。

(2) 南極海水から単離された低温性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、多価不飽和脂肪酸の1種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を低温誘導的に生産することで特徴付けられる。EPA は、本菌の低温環境下での生育に重要であり、EPA 非生産性の変異株は4において生育不全を示す。(*J. Bacteriol.*, 2009, 191:632-40)。また、当研究グループでは、本菌において EPA を sn-2 位に有するリン脂質が細胞膜上でマイクロドメインを形成し、本菌の細胞分裂に重要な役割を果たすことも見出している (*J. Bio. Chem.*, 2012, 287:24113-21)。

(3) 生体膜を構成するリン脂質の脂肪酸組成は膜の物性 (流動性、透過性、膜厚など) に影響を与える。このため、細胞は生命活動を維持するために温度などの外部環境の変化に応答してリン脂質の脂肪酸組成を調節することが知られている。リン脂質には2つの脂肪酸アシル基が結合しているが、このうち sn-2 位のアシル基は、1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 (PlsC) のはたらきによって導入される (図1)。生成物であるホスファチジン酸は種々の細胞膜リン脂質の前駆体であるため、PlsC の特性は膜の脂肪酸組成を決める一因であると言える。

2. 研究の目的

(1) *S. livingstonensis* Ac10 は PlsC のホモログ酵素を5つ有する (SIPlsC1~SIPlsC5)。in vivo の実験結果から、EPA は専ら SIPlsC1

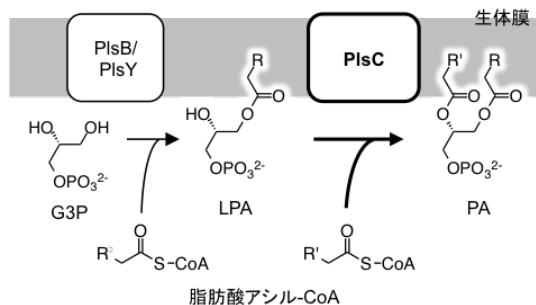


図1. アシル基転移反応の概略図。

G3P, グリセロール-3-リン酸; LPA, リゾホスファチジン酸; PA, ホスファチジン酸; PlsB/PlsY, G3P アシル基転移酵素

によってリン脂質に取り込まれることがわかっている (*Trace Nutr. Res.*, 2012, 29:92-9)。一方で、SIPlsC4 は異なる基質選択性を示し、iso-トリデカン酸のような分岐鎖脂肪酸をリン脂質に導入する。また、緑色蛍光タンパク質を融合することで細胞内局在を観察した結果、これらの2つの PlsC ホモログは細胞の異なる領域に局在することが示唆された (未発表データ)。

(2) 以上の先行研究の結果から、5つの PlsC ホモログ間で酵素機能や細胞内局在が異なり、このことが不均一な膜系の形成や、環境変化に応じて脂肪酸組成をすばやく調節することを可能にしていることが考えられた。この仮説のもと、本研究では PlsC ホモログの機能解析に取り組んだ。

(3) また、研究の過程で活性型の PlsC の精製に成功したことを受け、未解明であった PlsC の立体構造の解析を目的として、構造的な安定性が期待される好熱菌 *Thermus thermophilus* の PlsC (TtPlsC) の精製と機能解析にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) SIPlsC1 を組換えタンパク質として大腸菌 *Escherichia coli* C43(DE3) 中で異種発現させた。PlsC は膜タンパク質であると予想されたため、本発現株から膜画分を調製し、4種の界面活性剤を用いて SIPlsC1 の可溶化条件を検討した。その後、可溶化された SIPlsC1 をアフィニティークロマトグラフィにより精製した。各ステップにおいて、SDS-PAGE 解析および定性的な活性測定を行い、SIPlsC1 の発現および酵素活性の有無を調べた。

(2) PlsC の反応副生成物である補酵素 A (CoA) を Ellman 試薬を用いて定量することで、PlsC の定量的な活性測定法を確立した。この手法に基づいて、精製した SIPlsC1 の酵素学的な特性 (至適反応温度・pH、熱安定性、金属イオン要求性、基質選択性) を分析した。

(3) SIPlsC3 の機能を調べるため、当該遺伝子の欠損株と野生株の脂質を抽出し、質量分析および薄層クロマトグラフィ (TLC) により比較分析した。その結果、欠損株に脂溶性の黄色色素の蓄積が認められたため、その化学構造 (全体構造および部分分解産物) を TLC および HPLC により分析した。また、野生株および本欠損株の H₂O₂ 耐性を試験することで、本色素の抗酸化活性を調べた。

(4) SIPlsC1 と同様に、*E. coli* C43(DE3) を宿主とした TtPlsC の発現系を構築した。界面活性剤を用いて TtPlsC を膜画分から可溶化させ、アフィニティークロマトグラフィにより精製した。また、前述の Ellman 試薬を用いた活性測定法により、精製した TtPlsC の

酵素学的な特性を分析した。

4. 研究成果

(1) SIPIsC1 が *E. coli* 中でも活性を持ったかたちで発現されることが確認された。そこで、膜からの可溶化および精製を試みたところ、界面活性剤として 6-cyclohexyl-1-hexyl-D-maltoside (CYMAL-6) を用いることで、活性を保持したまま SIPIsC1 を精製できることを見出した。精製 SIPIsC1 は高い純度で得られ (図 2) 収量は菌体 1 g あたり約 0.2 mg であった。活性を保持したかたちで PlsC の精製に成功したのは、2017 年に報告された *Thermotoga* 属細菌由来の PlsC に続いて 2 例目である。

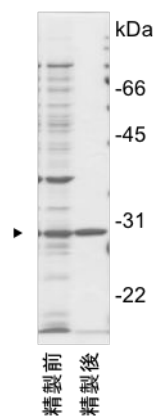


図 2. 精製した SIPIsC1 の SDS-PAGE 分析結果。
▶ は SIPIsC1 (推定分子量, 28.1 kDa) のバンドの位置を示す。

(2) 精製した PlsC の反応を定量的に評価するアッセイ系はこれまでに例がなかったため、Ellman 試薬を用いた定量方法を開発した。この方法を用いて SIPIsC1 の酵素学的特性を分析した結果、至適反応条件は 20~25 °C、pH 9.0 であった。低温菌由来の酵素らしく、SIPIsC1 は熱処理 (40 °C、30 分など) によって容易に活性を消失した。また、SIPIsC1 の活性の発現には Mg^{2+} などの二価金属イオンが必要であった。

さらに、基質選択性を分析したところ、SIPIsC1 は EPA をはじめとする多価不飽和脂肪酸のアシル-CoA に選択的であり、また一価の不飽和脂肪酸の CoA 体にも反応性を示したが、一方で飽和脂肪酸の CoA 体とは反応しなかった (図 3)。このことは前述の *in vivo*

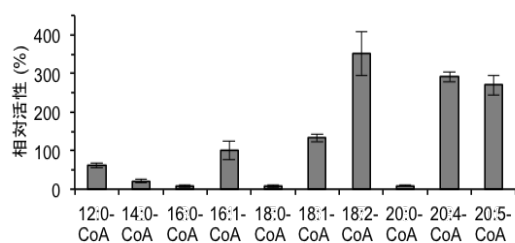


図 3. 各種脂肪酸アシル-CoA に対する基質特異性の分析結果。
アシル基は脂肪酸の「炭素数 : 不飽和度」に基づいて略記した (例, 18:1 はオレイン酸を示す)。

の実験結果 (*Trace Nutr. Res.*, 2012, 29:92-9) と異なっており、細胞中においては EPA を選択的にリン脂質に導入する仕組みが存在することが考えられた。

(3) SIPIsC3 の遺伝子欠損株の脂質を分析したところ、リン脂質組成に野生株との差は見られなかったが、本欠損株において脂溶性の黄色色素が蓄積していることを見出した。TLC 分析の結果、本色素は極性があり、カロテノイドやキノンといった非極性の色素とは異なる化学構造を持つことが示唆された。このことから、SIPIsC3 はリン脂質ではなく色素の生産に関わることが考えられ、PlsC ファミリーの新しい機能として位置づけられた。また、本欠損株は野生株と比べて H_2O_2 に対して耐性を示し、本色素に抗酸化活性があることが示唆された。

(4) TtPlsC は *E. coli* 中で良好に発現し、CYMAL-6 を用いて可溶化および精製することで、活性を保持したまま調製することができた。このことから、CYMAL-6 を用いた精製方法が PlsC ファミリーの酵素に広く適用できる可能性が期待された。精製酵素の特性を分析した結果、TtPlsC は SIPIsC1 と異なり、幅広い脂肪酸の CoA 体に反応性を示すことがわかった。また、30 分間の熱処理を施した際の変性中点は 60-70 °C であり、期待した通りに安定性が高く、結晶構造解析に適した酵素であった。

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)

(1) Takuya Ogawa, Asako Tanaka, Jun Kawamoto, Tatsuo Kurihara, Purification and characterization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase with a substrate preference for polyunsaturated fatty acyl donors from the eicosapentaenoic acid-producing bacterium *Shewanella livingstonensis* Ac10, *Journal of Biochemistry*, 2018, 164 巻, 33-39 頁, 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvy025

[学会発表](計 9 件)

(1) 小川拓哉ほか、Purification and enzymatic characterization of bacterial 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsC、The Fifth International Conference on Cofactors & Active Enzyme Molecule 2016、2016 年
(2) 小川拓哉ほか、真正細菌型 1-アシルグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 PlsC の精製と酵素学的特性解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年

(3) 小川拓哉ほか、低温性 *Shewanella* 属細菌由来 1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 PlsC の酵素学的特性解析、極限環境生物学会 2016 年度例会、2016 年
(4) 小川拓哉ほか、低温性 *Shewanella* 属細菌の色素生産に關与するリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素ホモログの機能解析、日本農芸化学会大会 2017 年度大会、2017 年
(5) 小川拓哉ほか、細菌型リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素の精製とキャラクタリゼーション、第 64 回日本生化学会近畿支部例会、2017 年
(6) Nittikarn Suwanawat、小川拓哉ほか、Purification and characterization of a thermostable 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase (PlsC)、酵素補酵素研究会 2017、2017 年
(7) 小川拓哉ほか、EPA 生産菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 のリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素の精製と特性評価、特殊環境微生物セミナー2017、2017 年
(8) 小川拓哉、Purification and characterization of a lysophosphatidic acid acyltransferase from an eicosapentaenoic acid-producing bacterium *Shewanella livingstonensis* Ac10、International workshop on microbes in hostile environments、2017 年
(9) Nittikarn Suwanawat、小川拓哉ほか、*Thermus* 属細菌由来リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素の基質特異性の解析、日本農芸化学会大会 2018 年度大会、2018 年

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
小川 拓哉 (OGAWA, Takuya)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号 40756318

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
()