

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02127

研究課題名(和文)細菌細胞膜におけるリン脂質アシル鎖多様性創出のメカニズムと生理的意義の解明

研究課題名(英文) Diversity of acyl groups of phospholipids in bacterial cell membranes: Its generation mechanism and physiological significance

研究代表者

栗原 達夫 (KURIHARA, Tatsuo)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：70243087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜リン脂質の sn-2 位アシル鎖多様性創出を担うリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素(LPAAT)の機能を解析した。Escherichia coli に新奇 LPAAT である YihG を見出し、基質特異性やべん毛形成との関係を明らかにした。好熱菌 Thermus thermophilus HB8 の LPAAT の精製に成功し、諸性質を明らかにした。低温菌 Shewanella livingstonensis Ac10 の LPAAT パラログ PlsC4 と PlsC5 を不活性化させた変異株を作製し、それぞれの基質特異性や PlsC4 の低温適応への関与を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜を構成するリン脂質には大きな構造多様性がある。構造が異なる種々のリン脂質を適切に作り分けることは、生体膜の機能発現に必須である。本研究はリン脂質のアシル鎖多様性を生み出す酵素群の機能を明らかにしたものであり、生体膜構築機構の解明に向けた基盤的知見をあたえるものである。また、膜のリン脂質組成は物質の膜透過性に影響を及ぼすことから、微生物細胞を利用した発酵生産など、物質の膜透過性が生産効率に影響するプロセスを開発する上で、膜リン脂質組成の制御機構に関する理解は重要であり、そのような観点から、本研究は応用微生物学的にも意義深い。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT), which is responsible for the generation of sn-2 acyl chain diversity in bacterial membrane phospholipids. We identified a novel LPAAT, YihG, in Escherichia coli, and clarified its substrate specificity and its relationship to flagellar formation. We succeeded in purification of LPAAT of Thermus thermophilus HB8 and clarified its various properties. Mutant strains of Shewanella livingstonensis Ac10 with inactivated LPAAT paralogs, PlsC4 and PlsC5, were generated, and the substrate specificities of these LPAATs and the involvement of PlsC4 in low temperature adaptation were demonstrated.

研究分野：分子微生物学

キーワード：生体膜 リン脂質 リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 高度不飽和脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜を構成するグリセロリン脂質の極性頭部と疎水性尾部には大きな構造多様性があり、そのような多様性は膜の機能発現に重要と考えられている。疎水性尾部としては、鎖長、飽和度、分岐の有無などが異なる種々のアシル鎖がグリセロール骨格に結合しており、膜流動性保持への必要性という観点だけでは説明できない多様性がみられる。リン脂質アシル鎖多様性創出のメカニズムについては、動物細胞におけるリモデリング経路に着目した研究が進展している。一方、*de novo* 経路での多様なアシル鎖導入に着目した研究は少ない。リン脂質の *de novo* 生合成経路ではリゾホスファチジン酸の *sn*-2 位にアシル鎖が導入されるが、この反応はリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 (LPAAT) によって触媒される。LPAAT はほぼすべての真核生物と真正細菌に保存されている。真正細菌は、主要な LPAAT (PlsC) に加えて、そのパラログを有することが多く、それらの類縁酵素群がリン脂質アシル鎖多様性創出に寄与していることが推定される。しかし、それらの機能を比較解析した研究例はきわめて限られている。特に、LPAAT は膜タンパク質であるため活性を保った状態で可溶性・精製することが難しく、精製酵素を用いた生化学的研究はほとんど行われてこなかった。また、LPAAT パラログの欠損などによって膜リン脂質組成を改変し、膜リン脂質の分子種特異的な機能を探る研究もきわめて限定的であった。

2. 研究の目的

LPAAT は細菌の膜リン脂質アシル鎖の多様性創出において主要な役割を担うと考えられる。本研究では、リン脂質アシル鎖多様性創出のメカニズム解明に向けて、細菌が有する種々の LPAAT ホモログの機能を明らかにすることを目的とした。また、さまざまな LPAAT の変異株を作製することで細胞膜のリン脂質組成を改変し、その表現型を解析することによって、リン脂質の分子種特異的な機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株、培養条件、遺伝子操作

Escherichia coli

E. coli BW25113 とその *yihG* 欠損株はナショナルバイオリソースプロジェクトから入手した。LPAAT の *in vivo* での活性評価には *plsC* の温度感受性変異株である *E. coli* JC201 (*J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 17215) を用いた。培養には LB 培地とトリプトン培地を用い、必要に応じて抗生物質を添加した。*yihG* と *plsC* の発現には、L-アラビノースで発現誘導が可能なプラスミド pBAD-Cm^R (*Biomolecules* (2020) **10**, 745) を用いた。

Thermus thermophilus HB8

T. thermophilus HB8 は理研バイオリソース研究センターから入手した。本菌の LPAAT (TtPlsC) の遺伝子を pET21a に導入し、C 末端に His₆ タグが融合した TtPlsC を発現するプラスミドを構築した。本プラスミドを導入した *E. coli* C43(DE3) をアンピシリン添加 M9YG 培地中、37 で OD₆₀₀ = 0.4~0.6 まで培養したのち、18 で 1h 培養し、その後、0.1 mM IPTG を添加して 18 で 20-24 h 培養した。

Shewanella livingstonensis Ac10

pyrF を選択マーカーとした相同組換えによって、*S. livingstonensis* Ac10 のゲノムに変異を導入し、触媒残基 His と Asp をともに Ala に置換した不活性型 PlsC4 および PlsC5 を発現する株を作製した。親株および変異株を、必要に応じて抗生物質を添加した LB 培地にて 4 で培養した。

(2) 脂質分析

pBAD-Cm^R 由来のプラスミドを保持する *E. coli* については、0.2% (w/v) L-アラビノースを添加したトリプトン培地にて 37 で OD₆₀₀ = 0.4~0.6 まで培養した。*S. livingstonensis* Ac10 は LB 培地にて 4 で OD₆₀₀ が 1 程度になるまで培養した。菌体から Bligh-Dyer 法 (*Can. J. Biochem. Physiol.* (1959) **37**, 911) でリン脂質を抽出し、エレクトロスプレー質量分析に供した。また、リン脂質をホスホリパーゼ A2 で加水分解することで得られた *sn*-2 位由来の脂肪酸をガスクロマトグラフィー質量分析に供した。

(3) *E. coli* の運動性とべん毛形成の解析

E. coli の運動性は、軟寒天プレート上での菌体生育領域の広がりを指標として評価した。また、位相差顕微鏡観察によって遊泳速度を測定した。べん毛形成は透過型電子顕微鏡で観察した。また、ウェスタンブロット解析によってべん毛成分 FliC を定量した。

(4) TtPlsC の精製

His₆ 融合型 TtPlsC を発現させた *E. coli* C43(DE3) 細胞を破砕したのち、超遠心分離によって膜画分を調製した。界面活性剤として 2.2 mM CYMAL-6 を含む緩衝液で可溶化したのち、Ni-

キレートレジンをを用いたアフィニティークロマトグラフィーで目的タンパク質を精製した。

(5) TtPlsC の活性測定

sn-1 位にパルミトイル基をもつリゾホスファチジン酸 (0.5 mM) をアシル基受容体、種々のアシル CoA (パルミトイル CoA、ラウロイル CoA、ミリストイル CoA、ステアロイル CoA、アラキドイル CoA、パルミトレオイル CoA、オレオイル CoA、イソ型ヘプタデカノイル CoA、アンテイソ型ヘプタデカノイル CoA) (0.5 mM) をアシル基供与体として、80 °C、pH 9.0 で TtPlsC の反応を進めた。副生成物である CoA のチオール基を DTNB で定量することによって酵素活性を測定した。

4. 研究成果

(1) *E. coli* の新奇 LPAAT の発見と機能解析

E. coli では、従来、1 種類の LPAAT (PlsC) のみが見出されていた。一方、本研究代表者は、*S. livingstonensis* Ac10 が 5 種の LPAAT ホモログ (PlsC1-5) を有し、PlsC4 が分岐鎖脂肪酸のリン脂質への導入を担うことを示すとともに、*E. coli* の機能未知タンパク質 YihG が PlsC4 と 39.1% の相同性を持つことを見出した。そこで、*E. coli* の YihG の機能解析を行った。まず、*E. coli* の PlsC の温度感受性変異株に、L-アラビノース添加によって YihG を高発現するプラスミドを導入し、L-アラビノース添加 LB 培地での非許容温度における生育を調べた。その結果、YihG の高発現で本株の生育不全が抑制されたことから、YihG が LPAAT 活性を有すると考えられた。次に、YihG 高発現株と PlsC 高発現株のリン脂質 *sn-2* 位のアシル鎖組成を解析した。その結果、YihG 高発現株ではミリスチン酸 (14:0) と *cis*-バクセン酸 (18:1 11) の相対量が PlsC 高発現株と比較して有意に高かった。このことから、YihG は 14:0 と 18:1 11 に対する活性が PlsC よりも高いと考えられた。一方、*E. coli* の *yihG* 欠損株のリン脂質 *sn-2* 位のアシル鎖組成を解析した結果、18:1 11 の相対量が野生株と比較して有意に低かったことから、生理的条件下において YihG は 18:1 11 をリン脂質に導入すると考えられた。さらに、運動性をもつ細胞の割合と遊泳速度が *yihG* 欠損によって増加することが見出された。また、*yihG* 欠損株ではべん毛成分である FliC の増加とべん毛の形成が観察された。以上から、YihG 依存的に生成する膜リン脂質の存在下では FliC の生産やべん毛の形成が抑制され、運動性が低下するものと考えられた。

(2) *T. thermophilus* HB8 の LPAAT の特性解析

LPAAT の構造機能相関の解明を目的として、好熱菌 *T. thermophilus* HB8 の LPAAT (TtPlsC) を精製し、特性を解析した。本菌の膜リン脂質アシル鎖の大部分はメチル基の分岐を有するが、精製酵素は分岐アシル鎖のほか、飽和および不飽和の直鎖アシル鎖をリン脂質に導入することが示された。配列解析の結果、基質特異性が狭い LPAAT に比べて、TtPlsC の N 末端領域は短いことが見いだされ、このことが TtPlsC が広い基質特異性を有する要因である可能性が考えられた。

(3) *S. livingstonensis* Ac10 における高度不飽和脂肪酸代謝変換機構の解析

エイコサペンタエン酸 (EPA) の *de novo* 生合成能を有する *S. livingstonensis* Ac10 が、培地中に添加したドコサヘキサエン酸 (DHA) を EPA に変換して膜リン脂質に取り込む代謝変換系も有することを見だし、この変換反応に関与する 2,4-ジエノイル CoA レダクターゼとアシル CoA デヒドロゲナーゼを同定した。

(4) *S. livingstonensis* Ac10 における LPAAT パラログの機能解析

多くの細菌が複数の LPAAT パラログを有することが知られているが、それらの基質特異性や生理機能に関する知見はきわめて限られている。本研究では低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 の 2 種の LPAAT パラログ (PlsC4 と PlsC5) の機能を解析した。まず、これらの活性部位アミノ酸残基をコードするゲノム上の配列を部位特異的に改変し、PlsC4 と PlsC5 をそれぞれ不活性化した変異株を作製した。これらの変異株のリン脂質組成解析と脂肪酸組成解析により、PlsC4 がイソ型トリデカン酸含有リン脂質、PlsC5 がパルミトレイン酸含有リン脂質の生成に寄与していることが示された。また、PlsC4 不活性化型変異株では、4 °C での生育速度の低下が観察された。バイオインフォマティクス解析により、PlsC4/PlsC5 のオーソログおよびこれらと近縁の酵素群が多く、 α -プロテオバクテリアに存在しており、これらが、細菌に普遍的に存在する主要 LPAAT (PlsC) とは系統的に離れた新しい LPAAT のクレードを形成していることが示された。以上の結果から、これらの細菌が機能的に異なる LPAAT パラログを有し、これらの働きによって生育環境に適した膜リン脂質組成が生み出されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yusuf Yustina, Ogawa Takuya, Kawamoto Jun, Kurihara Tatsuo	4. 巻 528
2. 論文標題 Role of acyl-CoA dehydrogenases from <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 in docosahexaenoic acid conversion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 453 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Fumiaki, Imai Tomoya, Aoki Wataru, Ueda Mitsuyoshi, Kawamoto Jun, Kurihara Tatsuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of a Putative Sensor Protein Involved in Regulation of Vesicle Production by a Hypervesiculating Bacterium, <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 629023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.629023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Toyotake Yosuke, Nishiyama Masayoshi, Yokoyama Fumiaki, Ogawa Takuya, Kawamoto Jun, Kurihara Tatsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 A Novel Lysophosphatidic Acid Acyltransferase of <i>Escherichia coli</i> Produces Membrane Phospholipids with a cis-vaccenoyl Group and Is Related to Flagellar Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Takuya, Hirose Kazuki, Yusuf Yustina, Kawamoto Jun, Kurihara Tatsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Bioconversion From Docosahexaenoic Acid to Eicosapentaenoic Acid in the Marine Bacterium <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.01104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Takuya, Suwanawat Nittikarn, Toyotake Yosuke, Watanabe Bunta, Kawamoto Jun, Kurihara Tatsuo	4. 巻 84
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid acyltransferase from the thermophilic bacterium <i>Thermophilus</i> HB8 displays substrate promiscuity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1831 ~ 1838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1771169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Chen, Jun Kawamoto, Soichiro Kawai, Akihiro Tame, Chiaki Kato, Tomoya Imai, Tatsuo Kurihara	4. 巻 10
2. 論文標題 Isolation of a novel bacterial strain capable of producing abundant extracellular membrane vesicles carrying a single major cargo protein and analysis of its transport mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 3001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.03001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kouhei Kamasaka, Jun Kawamoto, Chen Chen, Fumiaki Yokoyama, Tomoya Imai, Takuya Ogawa, Tatsuo Kurihara	4. 巻 526
2. 論文標題 Genetic characterization and functional implications of the gene cluster for selective protein transport to extracellular membrane vesicles of <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 525 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nittikarn Suwanawat, Takuya Ogawa, Jun Kawamoto, Tatsuo Kurihara
2. 発表標題 In vitro characterization of lysophosphatidic acid acyltransferase (PlsC) from <i>Escherichia coli</i>
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原達夫
2. 発表標題 DHAからEPAへの代謝変換に関するアシルCoAデヒドロゲナーゼ
3. 学会等名 ビタミンB研究委員会 第460回研究協議会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川拓哉、廣瀬和樹、Yustina Yusuf、川本純、栗原達夫
2. 発表標題 海洋性細菌による ω -3高度不飽和脂肪酸の新奇代謝変換能
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaki Kuboshima、Nittikarn Suwanawat、Jun Kawamoto、Takuya Ogawa、Tatsuo Kurihara
2. 発表標題 Comparative analysis of lysophosphatidic acid acyltransferase homologs
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川拓哉、Yustina Yusuf、川本純、栗原達夫
2. 発表標題 低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 における ω -3系高度不飽和脂肪酸の代謝様式の解析
3. 学会等名 第21回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野咲梨、小川拓哉、川本純、栗原達夫
2. 発表標題 低温菌 <i>Shewanella vesiculosa</i> HM13 における膜小胞生産への膜リン脂質の関与
3. 学会等名 第21回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川拓哉、廣瀬和樹、川本純、栗原達夫
2. 発表標題 海洋性 <i>Shewanella</i> 属細菌による ω -3 系高度不飽和脂肪酸の変換経路の解明
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川本純、米田雄紀、小川拓哉、栗原達夫
2. 発表標題 細菌における長鎖多価不飽和脂肪酸結合型タンパク質の探索
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川拓哉、廣瀬和樹、川本純、栗原達夫
2. 発表標題 <i>Shewanella</i> 属細菌における新規エイコサペンタエン酸生産経路の解析
3. 学会等名 酵素・補酵素研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原達夫
2. 発表標題 細菌生体膜機能発現の分子基盤：膜リン脂質・膜小胞研究の新展開
3. 学会等名 第33回ケミカルバイオロジー研究所セミナー / 第105回生物科学フロンティアセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusina Yusuf、廣瀬和樹、小川拓哉、川本純、栗原達夫
2. 発表標題 Polyunsaturated fatty acid conversion in <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yustina Yusuf、廣瀬和樹、小川拓哉、川本純、栗原達夫
2. 発表標題 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 の多価不飽和脂肪酸の変換における FadE の役割
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保嶋美咲、小川拓哉、川本純、栗原達夫
2. 発表標題 低温菌 <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 におけるリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 PlsC5 の機能解析
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yustina Yusuf、廣瀬和樹、川本純、小川拓哉、栗原達夫
2. 発表標題 In vitro and In vivo analysis of FadH protein from <i>Shewanella livingstonensis</i> Ac10 involved in DHA conversion
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保嶋美咲、Nittikarn Suwanawat、川本純、小川拓哉、栗原達夫
2. 発表標題 リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素ホモログの比較解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関