

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02888

研究課題名(和文)細菌由来のグルクロン酸含有糖脂質の生物機能と合成マシナリーの解明

研究課題名(英文)Elucidation of biological functions and synthetic machinery of bacterial glucuronic acid-containing glycolipids

研究代表者

沖野 望 (OKINO, Nozomu)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90363324

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)：本研究では、細菌由来のグルクロン酸含有糖脂質に着目して研究を進めた。Z. mobilis由来の α -グルクロナシルセラミド合成酵素(Cer-GlcAT)に関しては、新たにS. yanoikuyaeからSyaCer-GlcATをバクテロイデスから β -ガラクトシルセラミド合成酵素を同定した。また、SyaCer-GlcATの結晶化とX線結晶構造解析により、その高次構造を初めて明らかにした。一方、緑膿菌がリン欠乏時にグルクロナシルジアシルグリセロールに加えて、グルコシルジアシルグリセロールや新規糖脂質を合成することを明らかにすると共に、それら合成酵素の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌由来のスフィンゴ糖脂質にはNKT細胞の活性化能があることから、本研究において、細菌由来の α -グルクロナシルセラミドと β -ガラクトシルセラミドの合成酵素遺伝子が特定できた意義は大きい。また、本研究では α -グルクロナシルセラミド合成酵素のX線結晶構造解析に取り組み、細菌スフィンゴ糖脂質の合成酵素としては初めて、その高次構造解析に成功した。一方、緑膿菌がリン欠乏時に合成するグリセロ型糖脂質に関しても、その合成酵素遺伝子を全て明らかにすることに成功した。これら糖脂質は緑膿菌の薬剤耐性と関わっていることが推定されるので、その阻害剤の開発は緑膿菌に対する新規抗菌剤の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on bacterial glucuronic acid-containing glycolipids and their synthases. We successfully identified α -glucuronosylceramide synthase (Cer-GlcAT) of *Sphingobium yanoikuyae* (SyaCer-GlcAT) and β -galactosylceramide synthase of the intestinal bacterium *Bacteroides fragilis*, as homologs of Cer-GlcAT of *Zymomonas mobilis*. Furthermore, SyaCer-GlcAT was overexpressed in *Escherichia coli*, purified, and crystallized to reveal the synthetic machinery of α -glucuronosylceramide. X-ray crystal structure analysis revealed the first-ever 3D structure of Cer-GlcAT. We also determined the structure of three glycolipids synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphorus deficiency and identified their synthases.

研究分野：生化学

キーワード：細菌スフィンゴ糖脂質 糖転移酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌由来の糖脂質としてはグラム陰性菌のリポ多糖(LPS)やグラム陽性菌のリポテイコ酸(LTA)がよく知られており、これら糖脂質が細菌感染において重要な役割を果たしていることから、生合成経路や生理機能に関する様々な研究がなされている。従来から植物ではリンが欠乏すると自らのリン脂質を分解してリンを得ると共に、その代償として糖脂質を合成することが知られていたが、最近の研究から、細菌においてもリンの欠乏下では自らのリン脂質を分解し、糖脂質のようなリンを含まない脂質を合成することが分かってきた。この際に合成される糖脂質はLPSやLTAの様な複雑な糖脂質ではなく、ジアシルグリセロールにグルコースやグルクロン酸が結合した単純な構造の糖脂質である。しかし、「自然界において細菌がリン欠乏下で本当に糖脂質を合成するのか?」、また、「なぜ、糖脂質を合成するのか?」という疑問に対する明確な答えは得られていなかった。近年、海洋において季節の変化と共にリンの濃度が変動し、実際にリンが欠乏する状況下で様々な細菌がリン脂質を分解して糖脂質を合成することが明らかにされ、リンの飢餓応答時に糖脂質を合成するという機構が植物のみならず、幅広い細菌に備わっていることが明らかになってきた。一方、細菌が合成するLPSやLTAが宿主の免疫によって認識されることは周知の事実であるが、最近の研究から、LPSやLTA以外の細菌由来の糖脂質(グルコシルジアシルグリセロール, GlcDG やグルクロノシルセラミド, GlcACer)にも宿主免疫を活性化する機能があることが明らかにされ、単純な糖脂質の細菌感染における役割にも注目が集まっている。

2. 研究の目的

本研究では我々が最近の研究で *Z. mobilis* に見出した GlcACer 合成酵素の機能解析により、細菌由来のスフィンゴ糖脂質の生理機能を解明すると共に、緑膿菌に見出した糖脂質合成酵素の機能解析により、リン欠乏時に合成される糖脂質の生理機能や細菌感染における役割について解明することで、細菌における糖脂質の新たな生物機能とその合成マシナリーを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. 細菌由来スフィンゴ糖脂質合成酵素の機能解析

Zymomonas mobilis 由来の α -グルクロノシルセラミド合成酵素 (ZmoCer-GlcAT) の生理機能を明らかにするために、ZmoCer-GlcAT 遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換したノックアウトベクターを作成し、相同組換えにより、ZmoCer-GlcAT 欠損株を作成した。次に、野生株と ZmoCer-GlcAT 欠損株から脂質を抽出し、アルカリ分解後に TLC により、脂質を分析した。また、ZmoCer-GlcAT 欠損株で生産量が增大していたスフィンゴ脂質の構造を明らかにするために、ZmoCer-GlcAT 欠損株を大量培養して得た菌体から脂質を抽出し、アルカリ分解後に順相シリカゲルカラムと陰イオン交換カラムにより精製し、LC-MS/MS によりその構造を解析した。一方、野生株と ZmoCer-GlcAT 欠損株を震盪もしくは静置培養し、OD550 の測定により、細胞増殖を観察した。

細菌由来のスフィンゴ糖脂質としては α -グルクロノシルセラミド (α -GlcACer) の他に β -ガラクトシルセラミド (β -GalCer) が知られていることから、 β -GalCer の生産菌である *Bacteroides fragilis* のゲノムから ZmoCer-GlcAT のホモログを探索したところ、候補配列を見出した。そこで、このホモログの遺伝子を人工合成し、大腸菌用の発現ベクターを作成して、大腸菌で発現させた。 β -GalCer 合成酵素の活性は、蛍光標識セラミドである C6-NBD-Cer と UDP-Gal を反応させて、反応産物である C6-NBD-GalCer の生成を TLC で確認した。また、反応産物のアノマー型の解析は HILIC カラムを装着した LC-MS により行った。

2. 細菌由来スフィンゴ糖脂質合成酵素の高次構造解析

細菌スフィンゴ糖脂質の合成マシナリーを明らかにするために *Z. mobilis* 由来の ZmoCer-GlcAT と *S. yanoikuyae* 由来の SyaCer-GlcAT に関して、His-Tag の付加が可能な発現ベクターを構築し、大腸菌を用いて発現させた。Cer-GlcAT を発現させた大腸菌の破碎液から、His-tag を用いたアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過により、Cer-GlcAT を精製し、結晶化のスクリーニングを進めた。得られた結晶の X 線回折実験は Spring 8 のビームラインで行った。

3. 緑膿菌がリン欠乏時に合成する糖脂質の構造解析とその合成酵素の同定

緑膿菌がリン欠乏時に合成する糖脂質の解析を行うにあたり、野生株を 1.0 mM リン酸含有合成培地(リン充分培地)または 0.2 mM リン酸含有合成培地(リン欠乏培地)で培養後、それらの糖脂質及びリン脂質を薄層クロマトグラフィー(TLC)と高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)で解析した。また、緑膿菌がリン欠乏時に合成する糖脂質の中に C 型レクチン受容体の一つである Mincle を活性化する糖脂質を見いだしたことから、Mincle が活性化されるとアルカリホスファターゼが細胞外に分泌される HEK293 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

1. 細菌由来スフィンゴ糖脂質合成酵素の機能解析

Z. mobilis 由来の -GlcACer 合成酵素 (ZmoCer-GlcAT) の機能を明らかにするために、ZmoCer-GlcAT の欠損株を作成し、スフィンゴ糖脂質の解析を行ったところ、ZmoCer-GlcAT の欠損株では -GlcACer が完全に消失していたが、野生株にはほとんど存在しないセラミドホスホグリセロール (CPG) が顕著に蓄積することを見出した。このことは、本酵素が *Z. mobilis* の唯一の -GlcACer 合成酵素であることを示すと共に、*Z. mobilis* には -GlcACer が欠損すると同じマイナスチャージを持つ CPG を合成することで、-GlcACer の欠損を補償する機構が備わっていることを示している。また、野生株と ZmoCer-GlcAT 欠損株の細胞増殖を比較したところ、震盪培養した際には細胞増殖に差が見られなかったが、静置培養をした際に ZmoCer-GlcAT 欠損株の細胞増殖が対数増殖期に抑制されるが、最終的には野生株と同程度まで増殖することが分かった。一方、腸内細菌の一種である *B. fragilis* 由来の -GalCer が宿主の免疫機能を調節することが報告されているが、その合成に関わる糖転移酵素に関する情報は無い。そこで、*Z. mobilis* 由来 GlcACer 合成酵素のホモログを *B. fragilis* のゲノムから探索したところ、23.8%の同一性を示す候補配列を見出した。このホモログを大腸菌で発現・精製し、糖転移酵素の活性を測定したところ、GalCer 合成酵素であることが分かった。さらに、GalCer 合成酵素の反応産物である GalCer のアノマー型を HILIC-LC-MS/MS で分析したところ、-GalCer であることが明らかになった。

2. 細菌由来のスフィンゴ糖脂質合成酵素の高次構造解析

ZmoCer-GlcAT と SyaCer-GlcAT に関して、大腸菌を用いた発現系を構築し、結晶化のスクリーニングを進めた。その結果、SyaCer-GlcAT の結晶を得ることに成功したので、SyaCer-GlcAT に関して、X 線による構造解析を行ったところ、3.0 オングストロームの分解能で回折データを収集し、細菌由来スフィンゴ糖脂質の合成酵素としては初めて、SyaCer-GlcAT の高次構造を明らかにすることに成功した。次に、この高次構造情報を用いて基質である UDP-グルクロン酸とセラミドのドッキングモデルを作成し、UDP-グルクロン酸とセラミドの認識に関わるアミノ酸を推定した。さらに、反応に関わると推定されるアミノ酸と基質認識に関わると推定されるアミノ酸の変異体を作成して、変異体の糖転移酵素の活性を測定することで、SyaCer-GlcAT の反応機構と基質の認識機構をおよそ明らかにすることが出来た。

3. 緑膿菌がリン欠乏時に合成する糖脂質の構造解析とその合成酵素の同定

緑膿菌をリン欠乏の条件で培養すると三種類の糖脂質が合成される。これら糖脂質は TLC と LC-MS を用いた解析から、GlcADG と GlcDG に加えて、未知の糖脂質 (LipidX) であることが分かった。そこで、LipidX に関して、精製と構造解析を試みたところ、LipidX がグルクロノシルジアシルグリセロールにヘキサミン (グルコサミン) が結合した新規な糖脂質であることを明らかにした。GlcADG と GlcDG の合成酵素についてはそれぞれ、PA0842 と PA3218 を同定した。また、LipidX に関しては、PA0842 によって合成された GlcADG に *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が転移され、その後で脱アセチル化酵素の作用により、グルコサミンに変換されることが推定される。一方、Mincle を発現する HEK293 細胞を用いたレポーターアッセイにより、これら 3 種類の糖脂質の中でグルコシルジアシルグリセロール (GlcDG) に Mincle の活性化能があることも明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okino, N. Li, M. Qu, Q. Nakagawa, T. Hayashi, Y. Matsumoto, M. Ishibashi, Y. Ito, M.	4. 巻 295
2. 論文標題 Two bacterial glycosphingolipid synthases responsible for the synthesis of glucuronosylceramide and -galactosylceramide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10709-10725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013796	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9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 沖野 望
2. 発表標題 宿主免疫を活性化する細菌由来の糖脂質を合成する糖転移酵素
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会（誌上開催）ミニシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖野 望、曲 清俊、李 夢白、石橋洋平、伊東 信
2. 発表標題 細菌由来グルクロノシルセラミドと -ガラクトシルセラミド合成酵素の同定
3. 学会等名 第39回 日本糖質学会年会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zhu H, Ishibashi Y, Okino N
2. 発表標題 Analysis of glycolipids of Pseudomonas aeruginosa under phosphate starvation conditions
3. 学会等名 JSBBA WEST 3rd Student Forum（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Qu Q, Ishibashi Y, Okino N
2. 発表標題 Identification and characterization of a bacterial -galactosylceramide synthase
3. 学会等名 JSBBA WEST 3rd Student Forum (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖野 望、曲 清俊、石橋洋平、伊東 信
2. 発表標題 バクテロイデス由来 -ガラクトシルセラミド合成酵素の同定と解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nozomu Okino, Mengbai Li, Yohei Ishibashi, Makoto Ito
2. 発表標題 Identification and functional characterization of ceramide UDP-glucuronosyltransferase in <i>Zymomonas mobilis</i>
3. 学会等名 60th International Convergence on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖野 望、李 夢白、石橋 洋平、伊東 信
2. 発表標題 <i>Zymomonas mobilis</i> はグルクロノシルセラミドが欠損するとセラミドホスホグリセロールを合成する
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 Nozomu Okino, Makoto Ito
2. 発表標題 Identification and functional analysis of the bacterial glucuronosylceramide synthase
3. 学会等名 11th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖野 望
2. 発表標題 細菌由来グルクロン酸含有糖脂質合成酵素の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 (招待講演)
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
研究 分 担 者	角田 佳充 (KAKUTA Yoshimitsu) (00314360)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	

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
---------	---------