

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570130

研究課題名（和文） 細菌細胞膜の物質透過における長鎖多価不飽和脂肪酸の役割

研究課題名（英文） Role of long-chain polyunsaturated fatty acids
in the membrane transport in bacteria

研究代表者

奥山英登志 (OKUYAMA HIDETOSHI)

北海道大学・大学院地球環境科学研究所・准教授

研究者番号：90125295

研究成果の概要（和文）：細菌がもつエイコサペンタエン酸（EPA）の物質の膜透過に与える影響について、EPA 合成酵素遺伝子を導入した大腸菌の異物排出タンパク質 TolC, AcrA, AcrB 遺伝子欠損株の抗生物質感受性の違いによって調べた。これらのタンパク質遺伝子のいずれかを欠く細胞では EPA をもつことで抗生物質耐性が上昇し、二次元電気泳動の結果から EPA の存在は AcrA タンパク質の含量を増大させることが示された。EPA は異物排出系の機能促進に関わると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the function of eicosapentaenoic acid (EPA) in the bacterial cell membrane, *Escherichia coli* lacking either *tolC*, *acrA*, or *acrB* gene was transformed with the EPA biosynthesis *pfa* genes. The susceptibility of these recombinants possessing EPA against antibiotics was compared with that of their reference cells without EPA. Recombinants with EPA were more resistant to antibiotics than their references without EPA. Electrophoresis of the hydrophobic protein fraction of the recombinants indicated that more AcrA protein was accumulated in the cells with EPA than in those without EPA, suggesting that EPA might be involved in the exclusion of antibiotics by the TolC-AcrAB system in the bacterial cell membranes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜・長鎖多価不飽和脂肪酸・EPA・膜透過性・TolC-AcrAB・異物排出系・抗酸化・チオエステルゼ

1. 研究開始当初の背景

ある種の海洋細菌はエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸などの長鎖多価不飽和脂肪酸（LCPUFA）を膜リン脂質成分とし

てもつ。その具体的な事例は研究が進むとともに増えてきているが、これらの細菌におけるLCPUFAの機能はよくわかっていない。LCPUFAをもつ菌が深海や極地などの低温環境

から単離されてことや、実験室でその菌を培養する場合、培養温度が低いほど、その全脂肪酸中の含量が高いことなどから、細菌が低温下で膜流動性を維持する際に役立っていると考えられてきた。しかし、最近ではLCPUFAをもつ菌の分布が必ずしも低温環境に限定されないことが明らかになってきている。

申請者らは既に細菌細胞膜が、過酸化水素 (H_2O_2) などの膜拡散性物質に対して、その透過を妨げる効果 (膜遮蔽効果) を持つことを明らかにしている。

2. 研究の目的

(1) LCPUFAの膜遮蔽効果が抗生物質を含む他のさまざまな増殖阻害物質に対しても見られるかどうかを明らかにする。

(2) 膜遮蔽効果はリン脂質を構成するLCPUFAと対 (ついで) になる脂肪酸による構造的 (物理的) 効果であると予想されているが、LCPUFAが個別の膜機能に与える影響について調べる。

(3) LCPUFAを持つ細菌の分布についてより詳細に調べる。

(4) LCPUFAの合成に関わる *pfa* 遺伝子のより詳細な構造と機能について調べる、ことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 菌株として EPA をもつ *Shewanella marinintestina* IK-1 とその EPA 欠損変異株の IK-1Δ8 株、および *pfa* 遺伝子を導入した大腸菌 EPA+株とその対照株 EPA-株を用いた。必要に応じて大腸菌 K-12 株とその外膜ポアタンパク質 OmpC と OmpF の遺伝子と膜排出系遺伝子である TolC, AcrA, AcrB 遺伝子のいずれかを欠く変異体を Yale 大学の Coli Stock Center から入手し、それらを *pfa* 遺伝子で形質転換したものを用いた。

(2) 細菌のさまざまな増殖阻害物質を使い、マイクロタイタープレートで最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) を調べた。増殖の有無は目視によった。

(3) 細胞膜の調製、脂肪酸の分析は定法に従った。タンパク質の分析は二次元電気泳動法によった。

4. 研究成果

(1) EPAの存在が、細胞膜の異物排出系の機能に直接かかわっているか否かを、大腸菌 K-12株及び *ompC*, *ompF*, *tolC*, *acrA*, *acrB*欠損株に *pfa* 遺伝子を導入した EPA+株と同じ株に *pfa* 遺伝子の一部を欠くコンストラクトを導入した EPA-株を作成し、増殖阻害物質とし

て膜拡散性の *tert*-butylhydroxide (t-BHP)) に加えて、アンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシンなどの抗生物質に対する MIC を測定した。その結果、親株、*ompC*, *ompF* 導入株は EPA+株が EPA-株に比べて高い MIC を示した。この結果は、上記の物質が外膜を透過する際、EPAは OmpC, OmpF タンパク質の機能に関与しないことを示唆する。一方、TolC-AcrAB を構成するタンパク質のいずれかを欠く変異株においては、t-BHP に対しては EPA を持つ株の方が MIC を示したが、全ての抗生物質については、EPAの有無にかかわらず、MICは同じ値を示した。この結果は、これらの形質転換株において、膜拡散性物質の場合は、EPAの膜遮蔽効果が機能している (膜排出系タンパク質はかかわらない) が、抗生物質の排出に関しては TolC-AcrAB が関与しており、これらのタンパク質機能の一部または全部に EPA が関わっていることがわかる。

EPA を合成する大腸菌と対照の大腸菌のタンパク質を電気泳動により解析し、EPA の存在が特定のタンパク質量 (蓄積量) に影響を与えるかどうか検討した。EPA+株とその対照株では、その 2 次元電気泳動プロファイルに違いがあった。特に等電点約 7.5、分子量約 40000 の疎水性タンパク質の蓄積量は EPA をもつ株に多かった。このタンパク質は等電点と分子量から AcrA であると推定される。AcrA は AcrB と TolC を繋ぐ役割を果たすと考えられていたが、近年では細胞内膜と細胞外膜を引き付け、複合体形成の補強をしていると考えられている。EPA+株でより高い AcrA が存在することは、この株がより高い抗生物質耐性を示し要因になっていると考えられる。たのは、AcrA タンパク質が、EPA が存在することで強く発現し、細胞内膜と細胞外膜を引き付け、排出タンパク質である AcrB と TolC の複合体形成をより強く補強し、活性を増大させた結果である可能性が示唆される。

TolC-AcrAB は一体として機能するので、現時点では EPA が影響を与えるタンパク質は特定できていない。今後二次元電気泳動法などによりタンパク質の特定が必要である。

S. marinintestina IK-1 と IK-1Δ8 株、および大腸菌 EPA+株とその対照株 EPA-株に疎水性のプロトノフォアである carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) を加用したとき、EPA をもつ株はその対照株に比べてより低い MIC を示した。この結果は H_2O_2 などの親水性を用いた場合と逆の結果であった。疎水度の高い CCCP は EPA が存在するため疎水度が高くなった細胞膜内に長くとどまり、より低濃度でも増殖阻害効果を示すことを示して

いる。以上の結果から、LCPUFAの膜遮蔽効果は細胞膜の疎水度と増殖阻害物質の疎水度(親水度)の化学的差異に基づく現象であり、個別の膜タンパク質の機能は関与していないことを示している。

AcrAタンパク質と思われるタンパク質はそのN-末アミノ酸がブロックされているために現時点ではアミノ酸のシーケンスができないため、同定されていない。

(2) 北海道沿岸から採取した海藻サンプルからEPA産生菌を単離し、*Shewanella oshoroensis* OSH8株と同定した。この菌はEPAに加えて、超長鎖多価不飽和炭化水素であるヘントリアコンタノナエン(C31:9)をもつ。

(3) オエステラーゼ(TE)活性の関与について検討した。EPA合成遺伝子*pfaA-E*のみからなるベクターpEPAΔ1, 3, 4, 9を導入した大腸菌はEPAを合成する。この結果は、EPA合成には、1) ホストである大腸菌のTEがEPA合成に関与している 2) Pfa上に未同定のTE活性ドメインが存在する、ことを示唆する。しかし、TE欠損大腸菌をホストにし、*pfaA-pfaE*からなるEPA合成遺伝子群クローン化されているベクターを導入してもEPAが合成されることから、ホストのTEはEPA合成に関与していないと考えられる。また、EPA合成細菌由来のTE遺伝子ホモログをpEPAΔ1, 3, 4, 9とともに大腸菌に導入したところ、EPAの含量は減少したが、形質転換細胞あたりの脂肪酸含有量は増加した。これは、TEホモログが大腸菌のEPA以外の脂肪酸合成系と反応したためであり、*pfa*遺伝子外部に存在するTEはEPA合成に関与しないと考えられる。EPA合成菌である

Photobacterium profundum SS9のPfaCタンパク質上にはデヒドラターゼドメインが存在する。このDHドメインをコードするDNA断片を、pEPAΔ1, 3, 4, 9とともに大腸菌に導入したところ、EPA合成が停止した。この結果は、DHドメインをPfaから独立させたため、合成途上のEPAが切り出され、EPA合成が進まなかったためと考えられる。即ち、Pfa上のDHドメインがEPA合成におけるTE活性を担っていると予想される。

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6件)

- ① 吉田磨仁、奥山英登志、折笠善丈 (2013)

細菌の長鎖多価不飽和脂肪酸合成酵素遺伝子 オレオサイエンス 13: 211-200. 査読なし

- ② Bin Haji Mohd Taha, AI, Kimoto T, Kanada T, Okuyama, H (2013) Growth optimization of thraustochytrid strain 12B for the commercial production of docosahexaenoic acid. Food Sci. Biotechnol. 22(S): 1-6. DOI 10.1007/s10068-012-. 査読あり
- ③ Sugihara S, Bin Haji Mohd Taha AI, Motoigi T, Ueno, A, Shimizu, T, Kaneko, T, Watanabe, K, Yumoto, I, and Okuyama, H (2012) *Shewanella oshoroensis* sp. nov., a mesophilic eicosapentaenoic acid and hentriacontanonaene-producing bacterium. Res. J. Microbiol. 7; 131-138. DOI: 10.3923/jm.2012.131.138. 査読あり
- ④ Hori R, Nishida T, and Okuyama H (2011) Hydrophilic and hydrophobic compounds antithetically affect the growth of eicosapentaenoic acid-synthesizing *Escherichia coli* recombinants. Open Microbiol. J. 5: 114-118. DOI.10.2174/1874285801105010114. 査読あり
- ⑤ Nishida T, Hori R, Morita N, and Okuyama H (2010) Membrane eicosapentaenoic acid is involved in the hydrophobicity of bacterial cells and affects the entry of hydrophilic and hydrophobic compounds. FEMS Microbiol. Lett. 306: 91-96. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.01943.x. 査読あり
- ⑥ Motoigi T and Okuyama H (2010) Fatty acid and hydrocarbon composition in tropical marine *Shewanella amazonensis* strain SB2B^T. J. Basic Microbiol. 51: 484-489. DOI: 10.1002/jobm.201000427. 査読あり

[学会発表] (計3件)

- ① 本猪木太朗、Rodriguez-Guilbe, Baerga-Ortiz A、折笠善丈、奥山英登志 (2012) 細菌の多価不飽和脂肪酸合成に関わるチオエステラーゼについて. 日本生化学会北海道支部例会. 2012年07月20日. 北海道大学獣医学部.
- ② Okuyama H (2011) Thraustochytrids and related microorganisms are a new commercial source of

docosahexaenoic-acid-containing phospholipids 国際微生物会議-2011 (招待講演) 2011.09.08 札幌市コンベンションセンター(北海道)

- ③ Hori R, Nishida T, Watanabe K, and Okuyama H (2010) 細菌の低温適応と細胞の疎水度 国立極地研究所 極域生物シンポジウム 2010年11月30日 国立極地研究所 立川市

[図書] (計2件)

- ① Bin Haji Mohd Taha, AI, Ahmed RZ, Motoigi T, Watanabe K, Kurosawa N, and Okuyama H (2013) Lipids in cold-adapted microorganisms. *In* Cod-Adapted Microorganisms. Ed. By Yumoto I, Caister Academic Press, UK. In press.
- ② Bin Haji Mohd Taha AI, Okuyama H, Ohwada T, Yumoto I, and Orikasa Y (2012) Exogenous catalase gene expression as a tool for enhancing metabolic activity and production of biomaterials in host Microorganisms. *In* Innovations in Biotechnology Ed by Agbo EC. InTech - Open Access Publisher, ISBN: 978-953-51-0096-6

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：ヘントリアコンタノナエンの製造方法とその機能の利用方法

発明者：奥山英登志 杉原慎二、中野渡瞳

権利者：株式会社ロム、株式会社プログレッション

種類：特許

番号：特許出願2010-187624

出願年月日：2010年8月5日

国内外の別：国内

○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://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/okylab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 英登志 (OKUYAMA HIDETOSHI)

北海道大学・大学院地球環境科学研究院・准教授

研究者番号：90125295