

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29日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658028

研究課題名（和文）

高度不飽和脂肪酸含有リン脂質のシャペロン機能の解明と膜タンパク質高生産への応用

研究課題名（英文）

Investigation of Chaperone Function of Phospholipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids and Their Application to Overproduction of Membrane Proteins

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

研究成果の概要（和文）：*Shewanella livingstonensis* Ac10 は低温でエイコサペンタエン酸含有リン脂質（EPA-PLs）を生産する。本菌の低温誘導性主要外膜タンパク質 Omp74 のフォールディングにおける EPA-PLs の役割を解析した。野生株とエイコサペンタエン酸欠損株において Omp74 が異なる立体構造を形成していることを見いだした。リポソームを用いた *in vitro* 実験により、EPA-PLs は Omp74 の膜への組み込み、および立体構造形成を促進する分子シャペロン様の機能を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：*Shewanella livingstonensis* Ac10 produces eicosapentaenoic acid-containing phospholipids (EPA-PLs) at low temperatures. We analyzed the role of EPA-PLs in the folding of Omp74, a major cold-inducible outer membrane protein of this bacterium. We found that the conformation of Omp74 in the mutant lacking EPA-PLs is different from that in the wild-type strain. *In vitro* experiments using liposomes showed that EPA-PLs function as a chemical chaperone in the membrane integration and folding of Omp74.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：分子微生物科学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物、生体膜、高度不飽和脂肪酸、エイコサペンタエン酸、リン脂質、膜タンパク質、フォールディング

1. 研究開始当初の背景

生体膜は数千種におよぶ脂質分子が会合

した二重層を基本構造とするが、個々の脂質分子の特異的な機能が明らかにされた例は

きわめて少ない。本研究代表者は、高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 含有リン脂質の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) 含有リン脂質 (EPA-PLs) を低温誘導的に生産する海洋性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の細胞膜における EPA-PLs の機能を解析し、以下の知見を得た (*J. Bacteriol.* (2009) **191**, 632、一部未公表)。

- ・ EPA 生合成能を欠失した変異株では、低温で細胞分裂不全が見られる。
- ・ EPA 生合成能を欠失した変異株と野生株で膜流動性に大きな差はない。
- ・ EPA 欠損で一部の膜タンパク質 (外膜主要タンパク質 Omp や TolC 等) の含量が減少する。

PUFA 含有リン脂質は膜流動性の保持に重要な分子であると一般に考えられているが、本菌の膜流動性は、含量の多いモノ不飽和脂肪酸 (全脂肪酸の約 50%) を含むリン脂質で保持されており、少量 (約 5%) しか存在しない EPA の寄与は小さいと考えられる。一方、一部の膜タンパク質に対する影響はきわめて顕著であり、ある種の Omp に関しては、EPA 欠損により、ほぼ完全に膜面分から消失した。このような結果から、EPA-PLs が一部の膜タンパク質のフォールディングを促進する低分子ケミカルシャペロンとして機能し、特に低温での構造形成に重要な役割を担う可能性を考えるに至った。PUFA の C-C 結合回転を伴うコンフォメーション変化は飽和脂肪酸のコンフォメーション変化よりも起こりやすいことが計算機科学的手法で示されている (*Chem. Phys. Lipids* (2008) **153**, 76)。多様なコンフォメーションをとりうることで膜タンパク質と適切に相互作用し、シャペロンとして機能するために重要であることも考えられる。

2. 研究の目的

PUFA 含有リン脂質が膜タンパク質フォールディングを促進する分子シャペロンとして機能するという作業仮説を、PUFA の一種である EPA を含有するリン脂質を低温誘導的に生産する海洋性細菌 *S. livingstonensis* Ac10 を用いて検証する。生体膜におけるリン脂質の分子種特異的な機能、特にアシル鎖の構造特異的な機能に関する知見は乏しい。本研究はリン脂質アシル鎖と膜タンパク質の特異的な相互作用を明らかにしようとするもので、類似する先行研究がほとんどなく、新規性の高い研究課題である。本菌の主要な低温誘導性外膜タンパク質である Omp74 を主な対象として、本タンパク質の膜への組み込みや構造形成に対する EPA-PLs の影響を解析する。

3. 研究の方法

- (1) EPA 欠損株と *omp74* 欠損株の作製: EPA 欠損株は既に取得済みのものを用いた (*J. Bacteriol.* (2009) **191**, 632)。*omp74* は、*pyrF* を選択マーカーとして、相同組み換えの手法で欠損させた。
- (2) Omp74 の精製: 大腸菌を宿主とし、T7 プロモーターを用いて、Omp74 を封入体として高発現させた。封入体を精製したのち、界面活性剤 (2% (w/v) *N*-ラウロイルサルコシンまたは 1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム) を用いて Omp74 を可溶化した。
- (3) リポソームの調製: クロホルムに溶解した 0.5 μmol のリン脂質をガラス管内で乾燥してフィルム状とし、50 μl の TED 緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 8.0) を添加後、激しく攪拌し、さらに液が透明になるまでバスソニケーターで超音波処理することでリポソームを調製した。
- (4) Omp74 のリフォールディング: 変性させた精製 Omp74 を、リポソーム液で希釈することで、リポソーム膜への組み込みとリフォールディングを行った。
- (5) リポソームスウェリングアッセイ: 乾燥させたリン脂質と Omp74 がフィルム状に付着したガラス管に、デキストラン T-50 を含む溶液を添加してデキストラン T-50 が内包されたリポソームを調製し、得られたプロテオリポソーム液を、アラビノースまたは分子量の異なる種々のポリエチレングリコールを含む溶液で希釈した。アラビノースまたはポリエチレングリコールが Omp74 を透過してリポソーム内に入り込むことにより引き起こされるリポソームのスウェリングを、440 nm での濁度測定によって分析した。
- (6) EPA-PLs 細胞内局在性解析: エイコサペンタエン酸基を *sn*-2 位にもち、極性頭部に 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl (NBD) 基をもつ蛍光標識プローブを合成し (*J. Biol. Chem.* (2012) **287**, 24113)、細胞に添加して、蛍光顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

- (1) 南極海水から単離された低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 は低温で EPA-PLs を生産する。本菌の低温誘導性主要外膜タンパク質 Omp74 の生理機能の解明と、本タンパク質のフォールディングにおける EPA-PLs の役割の解明を目的として研究を行った。

本菌における Omp74 の生理機能を解明するために、相同組換えにより *omp74* 破壊株を作製した。*omp74* 破壊株においては、1 M NaCl 存在下での生育速度が低下するとともに、5 M NaCl 添加による高浸透圧ショックや 34°C での熱ショックに対する感受性が増

加していた。以上のことから、Omp74 は高浸透圧や高温に耐性のある安定な細胞膜を形成する構造タンパク質としての機能をもつものと推察された。

また、精製した Omp74 を再構成したリポソームを用いて Omp74 の膜透過活性を解析した結果、Omp74 はアラビノースの膜透過活性をもつことが示され、ポーリンとして機能することがわかった。

一方、野生株と EPA 欠損株において Omp74 が異なる立体構造を形成していることを見いだした。Omp74 の立体構造形成と EPA-PLs の関連を詳細に解析するために、化学合成した EPA-PLs を含むリポソームと、精製した Omp74 を用いた *in vitro* 再構成実験を行った。本菌の細胞膜に最も多く存在するパルミトレイン酸を有するホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルグリセロール (PG)、および *sn*-2 位に EPA を導入した PE、PG から成るリポソームを製作し、精製した Omp74 を再構築して CD スペクトル解析を行った結果、EPA は Omp74 のフォールディングを促進させることがわかった。EPA-PLs を含むリポソームで、Omp74 は速やかに膜表層と相互作用し β -シート構造を形成した。

また、Omp74 とリポソームを 18°C で 72 時間静置し、トリプトファン蛍光スペクトル解析を行った結果、EPA 存在下で Omp74 のトリプトファンの蛍光強度が減少したことから、Omp74 は EPA 含有リン脂質に依存してトリプトファン残基周辺の pH 環境を変化させるものと考えられた。

Omp74 の膜透過活性に対する EPA 含有リン脂質の影響を解析するために、Omp74 を介して様々な分子量のポリエチレングリコールを透過させた。その結果、EPA の有無は Omp74 の膜透過活性に影響しなかった。

以上の結果から、EPA-PLs は Omp74 の膜への組み込み、および立体構造形成を促進する分子シャペロン様の機能を有し、EPA-PLs の有無は、Omp74 の膜孔形成とは関連しないドメインの構造変化に影響することが示唆された。

(2) *S. livingstonensis* Ac10 は EPA をリン脂質の *sn*-2 位アシル鎖成分として有し、EPA 欠損によって細胞分裂阻害が引き起こされる。蛍光標識エーテル型リン脂質を用いることにより、細胞分裂部位において EPA 依存的な生体膜マイクロドメインが形成されることを見いだした。細胞分裂部位に EPA 含有リン脂質が形成するマイクロドメインが、細胞分裂において重要な機能を担うものと推定された。EPA 含有リン脂質が細胞分裂部位に局在化する仕組みについては、細胞分裂部位に局在するタンパク質との相互作用による可能性や、分裂部位に生み出される大き

く曲がった膜に EPA 含有リン脂質の構造が適合していることによる可能性が考えられる。細胞分裂部位の細胞膜に形成されるマイクロドメインにおいて EPA-PLs が細胞分裂関連タンパク質と相互作用し、その構造形成や機能発現に関与する可能性が示唆される。

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 7 件)

- ① Xian-Zhu Dai, Jun Kawamoto, Satoshi B. Sato, Nobuyoshi Esaki, and Tatsuo Kurihara: Eicosapentaenoic acid facilitates the folding of an outer membrane protein of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2012) **425**, 363-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.097 査読有
- ② Sho Sato, Jun Kawamoto, Satoshi B. Sato, Bunta Watanabe, Jun Hiratake, Nobuyoshi Esaki, and Tatsuo Kurihara: Occurrence of a bacterial membrane microdomain at the cell division site enriched in phospholipids with polyunsaturated hydrocarbon chains. *J. Biol. Chem.* (2012) **287**, 24113-21. doi: 10.1074/jbc.M111.318311 査読有
- ③ Jungha Park, Jun Kawamoto, Nobuyoshi Esaki, and Tatsuo Kurihara: Identification of cold-inducible inner membrane proteins of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, by proteomic analysis. *Extremophiles* (2012) **16**, 227-36. doi: 10.1007/s00792-011-0422-z 査読有
- ④ Hyun-Nam Cho, Wataru Kasai, Jun Kawamoto, Nobuyoshi Esaki, and Tatsuo Kurihara: Characterization of 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase from a polyunsaturated fatty acid-producing bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Trace Nutrients Research* (2012) **29**, 92-9. <http://www.jtnrs.com/sym29/19-No-P-14.pdf> 査読有
- ⑤ Chunjie Gong, Jun Kawamoto, Nobuyoshi Esaki, and Tatsuo Kurihara: Functional analysis of an eicosapentaenoic acid biosynthesis protein Orf2 from a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Trace Nutrients Research* (2012) **29**, 84-91. <http://www.jtnrs.com/sym29/18-No-P-13.pdf> 査読有
- ⑥ Xian-Zhu Dai, Jun Kawamoto, Nobuyoshi Esaki, and Tatsuo Kurihara: *In vitro*

refolding of an OmpA homolog, a major cold-inducible outer membrane protein, from a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Journal of Japanese Society for Extremophiles* (2011) **10**, 90-6. 査読有

- ⑦ Jun Kawamoto, Takako Sato, Kaoru Nakasone, Chiaki Kato, Hisaaki Mihara, Nobuyoshi Esaki, and Tatsuo Kurihara: Favourable effects of eicosapentaenoic acid on the late step of the cell division in a piezophilic bacterium, *Shewanella violacea* DSS12, at high-hydrostatic pressures. *Environ. Microbiol.* (2011) **13**, 2293–8. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02487.x 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 栗原達夫「化学的アプローチによる高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生理機能解析」日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、横浜市 パシフィコ横浜
- ② 栗原達夫「細菌における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の生合成と機能」日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、仙台市 東北大学
- ③ 栗原達夫「好冷性細菌の低温適応を担う分子基盤：細胞膜における高度不飽和脂肪酸の機能」新化学技術推進協会講演会、2012 年 11 月 29 日、京都市 京都テルサ
- ④ 栗原達夫「*Shewanella livingstonensis* Ac10 におけるエイコサペンタエン酸の機能」特殊環境微生物セミナー、2012 年 11 月 22 日、横浜市 JAMSTEC 横浜研究所
- ⑤ 栗原達夫「Function of eicosapentaenoic acid-containing phospholipids in bacterial cell membrane」Hirschegg Summer School 2012、2012 年 9 月 6 日、Marburger Haus, Hirschegg, Austria
- ⑥ 栗原達夫「生体膜における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能」京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニット第 2 回シンポジウム、2012 年 6 月 13 日、京都市 京都大学
- ⑦ 栗原達夫「細菌細胞膜における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能：局在化と膜タンパク質生合成における機能」日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都市 京都女子大学
- ⑧ 栗原達夫「Molecular probes to analyze the dynamics of eicosapentaenoic-acid-containing phospholipids and their interaction with membrane proteins」第 30 回内藤コンファレンス、2011 年 6 月 28 日-7 月 1 日、札幌市 シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ
- ⑨ 栗原達夫「細菌細胞膜におけるリン脂質

の局在化と生理機能」京都大学微生物科学寄附研究部門主催シンポジウム「微生物科学研究の現状と展望」、2011 年 6 月 23 日、京都市 芝蘭会館

- ⑩ 栗原達夫「Function of phospholipids containing eicosapentaenoic acid in the bacterial cell membrane」Wageningen University and Research Centre/Kyoto University Joint Workshop、2011 年 4 月 26 日、京都市 京都大学
- ⑪ 栗原達夫「Construction of protein expression system by using cold-adapted bacteria as the host」MicroPerm Workshop、2010 年 11 月 8 日、Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Potsdam, Germany

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川本 純 (KAWAMOTO JUN)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：90511238