

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590095

研究課題名(和文) 感染細菌のリポ多糖リモデリングが宿主適応で果たす役割に関する研究

研究課題名(英文) Lipopolysaccharide remodeling in bacterial adaptation to host

研究代表者

川崎 清史 (Kawasaki, Kiyoshi)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60270641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： リポドA修飾酵素LpxRによる脱アシル化修飾をされたリポドAを精製してその活性を非修飾型リポドAおよびLPS合成酵素LpxM欠損株から得られる生合成中間体リポドAと比較したところ、非修飾型リポドAよりも活性は低い、生合成中間体よりも活性が高いことがわかった。外膜小胞(Outer membrane vesicle, OMV)生成の分子機構を探るために大腸菌からOMVを精製してその構成タンパク質を分析した。W3110株の場合、鞭毛成分が含まれることが特徴であった。鞭毛タンパク質欠損株ではOMV形成が減少することから鞭毛形成がOMV形成に関連していると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Lipid A deacylated by outer membrane enzyme LpxR is less active than unmodified lipid A, but more active than lipid A precursor purified from LpxM mutant. These results suggest that lipid A modification by LpxR is beneficial for bacterial adaptation to host.

Outer membrane vesicle was prepared from *E. coli* W3110, and the structure of lipid A and its protein composition were examined. Specific lipid A modification was not observed. On the other hand, it was revealed that the outer membrane vesicle contained flagellin, a component of flagella. The ability to form flagella, including the synthesis of flagella proteins, affected the production of outer membrane vesicles.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：エンドトキシン Toll-like receptor 細菌 外膜

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌の最外層に位置する外膜外層は主にリポ多糖で構成されている。このリポ多糖層は細菌の細胞外物質に対するバリアーとして機能する一方で、細菌に特徴的に見られる物質である。我々哺乳動物の免疫系はリポ多糖、特に膜アンカー部位であるリピド A 部位、を異物として積極的に認識して活性化することが知られている。グラム陰性菌の病原細菌もリポ多糖層を外膜に持つが、感染時と非感染時とでリポ多糖の構造が変化する。このリポ多糖リモデリングが宿主応答との関わりの中で細菌の病原性にどのような影響を与えているのか明らかにすることは重要な研究課題である。

## 2. 研究の目的

リピド A の 3' 位を脱アシル化するリモデリングが宿主の TLR 認識に与える効果を明らかにする。また外膜小胞 (Outer membrane vesicle) と呼ばれる小胞が外膜から形成されるが、この形成過程の分子機構をリポ多糖リモデリングに関わるかを含めて解析する。

## 3. 研究の方法

リピド A の 3' 位を脱アシル化したリピド A を精製した。そして脱アシル化されてい

ない非修飾型リピド A と Toll-like receptor 4 刺激活性を比較した。また、外膜小胞のリピド A 構造を分析してリモデリングが分泌の分子機構に関与するか調べた。また同時に外膜小胞のタンパク質組成を解析して分泌に関与するタンパク質を解析した。

## 4. 研究成果

LPS のリピド A 修飾酵素 LpxR による脱アシル化修飾をされたリピド A を精製してその Toll-like receptor 4 刺激活性を非修飾型リピド A および LPS 合成酵素 LpxM の欠損変異株から得られる生合成中間体リピド A と比較したところ脱アシル化リピド A は非修飾型リピド A よりも活性は低いが、生合成中間体よりも活性が高いことがわかった。LpxR はリピド A 部位の構造を変化させて活性を調節する役割があると考えられる。一方、その活性調節の生理的意義等については今後の検討課題である。

グラム陰性菌は外膜を起源とする外膜小胞 (Outer membrane vesicle, OMV) が分泌される。OMV は LPS などの脂質、様々な病原性タンパク質、薬剤耐性などの遺伝物質としての核酸、などが含まれることが知られており、最近の病原性に関わると考えられている。この OMV 生成の分子機構

を探るために大腸菌から OMV を精製してその構成タンパク質を分析した。W3110 株の場合鞭毛成分が含まれることが特徴であった。鞭毛タンパク質欠損株では OMV 形成が減少することから鞭毛形成が OMV 形成に関連していると考えられた。一方、外膜小胞のリピド A 構造を分析したところ、特徴的な構造は認められなかった。リポ多糖のリピド A 部位の構造変化が OMV 形成に何らかの役割を果たしている直接的な証拠は得られなかった。しかしその可能性が否定されたわけではない。この可能性については今後も検討が必要であると思う。

#### 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 2 件)

1. Takayuki Manabe, Mayu Kato, Takayuki Ueno, and Kiyoshi Kawasaki: Flagella proteins contribute to the production of outer membrane vesicles from *Escherichia coli* W3110. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 査読有 (2013) vol.441, 151-156  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.022.

2 . Kiyoshi Kawasaki, Mai Teramoto, Rie

Tatsui, and Shoko Amamoto: Lipid A 3'-O-deacylation by *Salmonella* outer membrane enzyme LpxR modulates the ability of lipid A to stimulate Toll-like receptor 4. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 査読有(2012) vol. 428, 343-347, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.054.

{ 学会発表 }(計 8 件)

1 . 上野貴之、川崎清史 リポ多糖刺激による THP1 細胞からの TNF 分泌に異物貪食が協調的に作用する 第 86 回日本生化学会 2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

2 . 眞鍋貴行、加藤まゆ、川崎清史 大腸菌 W3110 株の鞭毛形成は細胞外分泌小胞の分泌を誘導する 日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 30 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

3 . 辰井理恵、西川実季、天本翔子、寺本舞、川崎清史 リポ多糖のリピド A 部位の LpxR による脂肪酸修飾が生物活性に与える影響 日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 30 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

4 . 上野貴之、川崎清史 ヒトマクロファージ様細胞において貪食がリポ多糖刺激に伴う TNF 産生に及ぼす影響の解析 日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 30 日 パシフィ

コ横浜（神奈川県）

5．眞鍋貴行、加藤まゆ、川崎清史 大腸菌 W3110 株の Outer Membrane Vesicle 分泌には鞭毛形成が重要である 第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場他（福岡県）

6．眞鍋貴行、川崎清史 大腸菌 W3110 株の膜小胞形成には鞭毛タンパク質をコードする fliC が重要である 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 30 日 北海道大学（北海道）

7．後藤史子、中村映理子、川崎清史 CD14 欠損のサルモネラ細胞内増殖への影響 第 61 回日本薬学会近畿支部会 2011 年 10 月 22 日 神戸学院大学（兵庫県）

8．寺本舞、天本翔子、川崎清史 細菌外膜酵素によるリポ多糖修飾がその生物活性に与える影響 第 61 回日本薬学会近畿支部会 2011 年 10 月 22 日 神戸学院大学（兵庫県）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

<http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/r>

<d/html/japanese/researchersHtml/2791/27>

91\_Researcher.html

6．研究組織

(1)研究代表者

川崎 清史（KAWASAKI KIYOSHI）

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60270641