

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580122

研究課題名(和文)細胞膜の動態計測から探る深海性好圧性細菌の圧力適応機構の解明

研究課題名(英文) Piezo-adaptation of deep-sea microbes analyzed by measurements of the membrane dynamics

研究代表者

阿部 文快 (Abe, Fumiyo)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30360746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：深海の好圧性細菌は高水圧への適応を果たしている。細胞膜は物質透過とエネルギー生産に重要だが、一般に高圧や低温によって機能阻害される。本研究では細胞膜の物性の観点から、好圧性細菌における高圧適応機構を解析した。様々な深度から単離された *Shewanella* 属、*Moritella* 属および *Photobacterium* 属の細菌を培養後、蛍光偏光試薬 TMA-DPH を用いた時間分解蛍光偏光解消法を行って、膜の秩序因子とアシル鎖の回転拡散係数 D を測定した。その結果、より高い圧力に適応した種ほど膜が剛直であることがわかった。このことは、好圧性細菌の細胞膜は柔軟であるという従来のイメージとは大きく異なるものである。

研究成果の概要(英文)：Deep-sea piezophiles have adapted to high-pressure environments. The cell membrane is important for substrate transports and energy production, and its functions are generally sensitive to high pressure. This study investigates the microbial adaptation to high pressure in terms of membrane dynamics. Deep-sea isolates of *Shewanella*, *Moritella* and *Photobacterium* were subjected to time-resolved anisotropy measurement using TMA-DPH as a polarization probe to measure the membrane order and the rotational motion of the acyl chains. I found that bacterial strains isolated from deeper habitats had more rigid cell membrane. This view is distinct from common belief that deep-sea microbes have more fluid cell membrane.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：深海好圧性細菌 細胞膜 膜物性 時間分解蛍光偏光解消法 高圧適応

1. 研究開始当初の背景

数百気圧の高圧環境は深海を特徴づける因子であり、一般に大気圧下 (0.1 MPa) の生物には阻害的である。高圧は脂質二重層の流動性を低下させ秩序を高める。Dipalmitoylphosphatidylcholine 膜のゲル/液晶相転移温度は 0.1 MPa で 42°C だが、100 MPa では 64°C である。人工膜とのアナロジーから加圧に伴う様々な膜タンパク質機能の失陥は、高圧による脂質の物性変化のためと解釈されている。しかし、高圧下で生細胞の膜物性を計測した例はこれまでなかった。我々は出芽酵母を材料とし、細胞膜の動的構造を *in vivo* 解析する技術を開発してきた。単一光子計数法による蛍光寿命測定で蛍光偏光解消法を行うものである (以下、時間分解蛍光偏光解消法)。この手法により、酵母エルゴステロール合成変異 *erg2* 株では、膜の剛直性が失われシクロヘキシミドに超感受性を示すこと、また抗真菌剤フルコナゾールの投与で蓄積する 14 α -methyl-3,6-diol (C6 位に余分な OH 基を持つためかさ高い) が、細胞膜の剛直性を劇的に低下させることを明らかにした。

琉球海溝深度 5,110 m から単離された *Shewanella violacea* DSS12 株は、30 MPa, 8°C を至適とする好圧性細菌で、細胞膜にエイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5) を有する。EPA やドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6) など多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は人工膜の相転移温度を下げるので、生体膜では流動性を高めるとされている。確かに低温や高圧環境から PUFA を高率で含む細菌が数多く単離される。しかし、高圧・低温適応における PUFA の関与については議論が分かれる。*Photobacterium profundum* SS9 は 28 MPa, 9°C を至適とする好圧性細菌だが、EPA を欠損しても野生型と同様、高圧下で増殖する。ところが一価不飽和脂肪酸 (MUFA) の *cis*-パクセン酸 (C18:1) を欠くと高圧感受性を示す。一方、20 MPa,

20°C を至適とする *Shewanella piezotolerans* WP3 では EPA 欠損が高圧下での増殖遅延を引き起こす。低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は EPA を欠損すると細胞が異常伸長する。こうして EPA や MUPA の重要性は次々と明らかになるものの、それらが膜の動的構造におよぼす効果が高圧下で実測された例はなかった。我々は最近、高圧時間分解蛍光偏光解消測定 (High-Pressure Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Measurement; HP-TRFAM) システムを開発し、次のことを明らかにした。*S. violacea* DSS12 株では、EPA を欠損すると (*pfaAΔ*) 50 MPa における増殖が阻害された。意外にも野生株の膜は EPA 欠損株よりむしろ剛直で、アシル鎖の回転ブラウン運動も遅いことがわかった。さらに、150 MPa まで加圧しても野生株の膜はほとんど変化しないのに対し、EPA 欠損株の膜は過度に圧縮され、高圧による撓動を受けることがわかった。これは、PUFA 含量が高ければ高圧・低温適応に有利であろう、という既成概念への反証であり、むしろ加圧しても膜の状態が変化しないことが重要である、という新たな概念を提起するものである。

2. 研究の目的

深海に棲息する好圧性細菌は、EPA や DHA などの多価不飽和脂肪酸を有し、高圧・低温下で膜機能を調節している。生体膜の流動性や剛直性の維持は、化学物質の膜透過性や膜タンパク質機能に重要であり、微生物の環境適応を理解する上で不可欠である。しかし膜の動的構造は脂質分析のみで明らかにすることはできず、膜物性そのものを実測しなければならない。本研究は、我々が開発した高圧時間分解蛍光偏光解消測定システムを基盤とし、海洋の様々な深度から得られた細菌について、膜の特性と多価不飽和脂肪酸の役割を解明するものである。*Shewanella* 属細菌は浅海から 10,000 m の深海まで海洋に幅広く棲息し、生体膜の圧力適応を理解するのに

最適な材料である。実験には *Shewanella* 属のほか、同じ γ -プロテオバクテリアに属する *Moritella* 属と *Photobacterim* 属の細菌、および大腸菌 *Escherichia coli* を用いた。

3. 研究の方法

実験材料として、常温菌 *S. oneidensis* (0 m)、低温菌 *S. livingstonensis* (0 m)、好冷好圧菌 *S. violacea* (5,110 m)、*S. benthica* (6,356 m)、*M. marina* (1,200 m)、*M. abyssi* (2,815 m)、*M. profunda* (2,815 m)、*M. japonica* (6,353 m) および大腸菌 *E. coli* (0 m) を用いた。なお、括弧内は分離された深度で、0 m は大気圧下で棲息することを示す。*E. coli* を除く菌株は、研究代表者が海洋研究開発機構の招聘上席研究員だった際に同機構から分譲されたものである。用いた低温菌と好冷好圧性細菌は、10°C 以下であれば大気圧 (0.1 MPa) 下での培養が可能である。そこでまず、これらのうち低温菌と好冷好圧菌については Marine Broth 2216 を用いて大気圧下、10°C で振とう培養した。常温菌については、LB 培地を用いて *S. oneidensis* は 30°C、*E. coli* は 37°C で振とう培養した。また、高圧条件下で培養した際の膜物性の変化を調べるため、各菌体をポリプロピレンチューブに封入し、高圧容器内で 0.1, 30 および 50 MPa、10°C で終夜培養した。そして遠心分離によって菌体を回収し解析に用いた。蛍光偏光解消法のための標識試薬としては、主に TMA-DPH と DPH が用いられている。正電荷を持つ TMA-DPH は膜の極性頭部付近に、非極性の DPH は膜の中央部に局在する。ただし DPH は細胞内で非特異凝集を示す場合があるため、蛍光顕微鏡下で標識の妥当性を評価した。菌体を TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7.0) で 2 回洗浄し、OD₆₀₀=0.3~0.6 になるよう懸濁した。HP-TRFAM においては、蛍光標識菌体を高圧光学セルに封入し、0.1~100 MPa までの圧力を段階的に負荷し、375 nm のパルスレーザーで励起したときの蛍光偏光を時間分解測定

した。

蛍光偏光解消はナノ秒オーダーの時間変化を反映するため、個々の分子動態に重要な示唆を与える。遷移モーメントを持つ TMA-DPH や DPH を偏光で励起すると、特定方向を向いた分子だけ選択的に励起される。励起光の偏光に平行な蛍光偏光成分を I_H 、垂直な成分を I_V としたとき、

$$r(t) = [I_H(t) - GI_V(t)] / [I_H(t) + 2GI_V(t)]$$

で定義される量が蛍光異方性 (Fluorescence anisotropy) である。 t は励起後の時間、 G は装置関数である。 r_0 が最大で TMA-DPH では 0.395、回転運動が激しければ減衰が速い。本法はピコ秒パルスレーザーを用いて数ナノ秒の蛍光寿命を測定する手法で、脂質アシル鎖の回転ブラウン運動速度や回転角などを計測することができる。次式から導かれる回転相関時間 θ (ns) がナノ秒の分子の振る舞いを反映する。

$$r(t) = r_0 \exp(-t/\theta)$$

ここで無限時間経過後の異方性を r_∞ としたとき、秩序因子 S と回転拡散係数 D_w は次式で表される。膜が乱雑なほど S は低く、アシル鎖の分子運動が激しいほど D_w は高くなる。

$$S = (r_\infty / r_0)^{1/2}$$

$$D_w = (r_0 - r_\infty) / 6\theta r_0$$

本研究では、 S と D_w によって細胞膜の物性を評価した。

4. 研究成果

0.1 MPa, 10°C で各菌株を培養し、TMA-DPH あるいは DPH で標識を行った。蛍光顕微鏡で菌体を観察したところ、0.5 μ M TMA-DPH では細胞膜と思われる領域に蛍光が検出された。しかし、DPH では 5 μ M までの濃度下でほとんど蛍光が検出されず、緩衝液中に凝集物が出現した。DPH を溶解する方法をいくつか検討したが、凝集物の出現を押さえることはできなかった。よって、DPH の使用は不適切と判断し、本実験では TMA-DPH を用いることにした。一般に細菌

細胞膜の脂肪酸組成は増殖期の細胞密度により大きく変化する。従って、本実験では対数増殖期にある菌体を用いた。0.5 μM TMA-DPH で菌体を標識し、0.1 MPa, 10°C で蛍光偏光解消測定を行った。各菌株の膜の秩序因子 S とアシル鎖の回転拡散係数 D_w が、各細菌が分離された深度とどのような関係にあるのかを調べた。その結果、 S 値は 0.65~0.75 の値を示し、分離深度とは明確な相関が見られなかった。一方、 D_w 値は分離深度が深いほど小さな値を示した。すなわち、より深部に棲息する細菌ほど、0.1 MPa, 10°C の条件下でアシル鎖の回転速度が遅く、膜が剛直であることが示唆された。ただし、*M. japonica* のみ相関関係から除外された。同じ測定結果を至適増殖圧力に対してプロットした。なお、各菌株の至適増殖圧力は能木らの報告に準じた。 S には至適増殖圧力との相関は見られなかったが、 D_w 値については *M. japonica* を含め明確な相関が見られ、至適増殖圧力が高いものほど小さな値を示した。すなわち、より高い圧力を好む細菌ほど、0.1 MPa, 10°C の条件下でアシル鎖の回転速度が遅く、膜が剛直であることが示唆された。 D_w と脂肪酸組成の関係についてまだ私たちは調べていないが、能木らの詳細な解析結果（能木裕一、私信）を見る限り、多価不飽和脂肪酸の割合や不飽和脂肪酸全体が占める割合と D_w の間に明瞭な関係性は見いだされなかった。*Shewanella* 属の好冷性細菌は、超長鎖多価飽和炭化水素 C31:9 ヘントリアコンタノナエン (hentriacontanonaene) を持つことが報告されている。こうした炭化水素はリン脂質の脂肪酸アシル鎖の隙間を埋め、回転運動を抑制するものと考えられる。今回用いた深海性細菌が C31:9 ヘントリアコンタノナエンを含有するかどうかは不明であり、今後ガスクロマトグラフィーによる分析で明らかにする予定である。一方、膜タンパク質の存在はアシル鎖を束縛し、生体膜を剛直化する

方向に作用する。よって、脂質に対する膜タンパク質の比が、より深部から得られた細菌ほど高い可能性も考えられる。いずれの要因にしても、より高い圧力環境に適応した深海性細菌では細胞膜が剛直なことから、さまざまな膜タンパク質の機能が、流動性の低い膜環境に適応した設計になっているのかもしれない。

次に、培養時の圧力が膜物性にどのような影響を及ぼすのかを検討した。各菌体を 0.1, 30 および 50 MPa で終夜培養後、除圧して大気圧下で膜物性を測定した。ところが *S. violacea* において、同じ 0.1 MPa であっても振とう培養と密閉容器を用いた静置培養とで D_w 値に大きな差異が生じ、後者の条件で D_w 値が著しく高くなることがわかった。今のところその原因は不明だが、膜に対する高圧効果を議論するに十分な比較対照とは言えない。*Moritella* 属の菌株においては、30 あるいは 50 MPa での高圧培養後の菌体と 0.1 MPa におけるそれとの間で、 D_w 値に統計的に有意な差は見られなかった。

HP-TRFAM を用いて、各菌株の膜物性が加圧に応答してどのように変化するのかを調べた。ところが、TMA-DPH で標識した菌体の蛍光強度が低く、高圧光学窓付きセルに入れると測定に十分な強度が得られないことがわかった。TMA-DPH の濃度を上げると蛍光強度は増大するが、同時に偏光解消にアーティファクトを生むことを既に私たちは報告している。よって、今後は各菌株から膜画分を調製し、相対的な膜量を増やして測定を行う予定である。そこで本研究では、TMA-DPH で標識した大腸菌を用いて HP-TRFAM を行った。37°C で培養した大腸菌を 0.5 μM TMA-DPH で標識し、100 MPa までの圧力条件下、15°C と 37°C の温度条件で測定を行った。その結果、大腸菌の細胞膜の S 値は 37°C で 0.78 であるのに対し、15°C では 0.88 に上昇した。また、 D_w は 20.9 μs^{-1} か

ら $8.1 \mu\text{s}^{-1}$ に低下した。このことは温度低下により膜が剛直化することを示している。TMA-DPH の蛍光寿命 $\langle\tau\rangle$ 値は 37°C で 5.1 ns であるのに対し、 15°C では 6.3 ns に増大した。 $\langle\tau\rangle$ 値は TMA-DPH 分子周辺の誘電率を反映するので、温度低下に伴い、わずかながら膜の脱水が進むものと考えられる。いずれの温度条件でも、 100 MPa までの加圧によって S 値は上昇し、 D_w 値は低下した。ただし、 S と D_w の変化量は 37°C で非常に顕著だったのに対し、 15°C では比較的小さなものであった。従って、中温菌である大腸菌の細胞膜は、至適増殖温度である 37°C で加圧すると著しく圧縮され、膜タンパク質機能が損傷されるものと考えられる。 $\langle\tau\rangle$ 値は 37°C で 100 MPa まで加圧しても大きな変化が見られないのに対し、 15°C では低下が見られた

膜の動的構造は膜タンパク質の機能に大きな影響を及ぼす。とりわけアミノ酸等の輸送体は栄養源摂取に不可欠であり、細菌から高等動植物まで広く保存されたタンパク質である。細胞膜の動的構造との関連で、深海微生物のアミノ酸やペプチドの輸送体は今後重要な研究対象となる。そこで、今後の展開を見据えた基礎的知見を蓄積するため、当初計画にはなかったが出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルとした解析も行った。酵母のアミノ酸やペプチドの輸送体は、細胞膜に局在する 12 回膜貫通型タンパク質である。しかしながら、基質の選択性や輸送のメカニズムの詳細は明らかになっていない。本研究ではエラーブローン PCR を用いたランダム変異導入法により、トリプトファン輸送体 Tat2 の膜貫通領域に 15 個の重要なアミノ酸残基を同定した。大腸菌のアルギニン・アグマチンアンチポーター AdiC の立体構造を鋳型とした構造モデリングにより、これら 15 個のアミノ酸残基の多くは基質の透過経路と考えられる領域や、細胞膜中での構造転移に重要な部位に見いだされた。また

ロイシン輸送体 Bap2 では、基質認識において個々の遊離アミノ酸の構造的特徴はあまり重要ではなく、それらの $\text{Log}P$ (水-オクタノール分配係数) が重要であることを明らかにした。すなわち、ロイシン、イソロイシンあるいはフェニルアラニンのような $\text{Log}P$ がゼロに近い疎水性アミノ酸は Bap2 の疎水性基質ポケットに分配されやすく、高親和性基質となることを示した。トリプトファン輸送体 Tat1 とペプチド輸送体 Ptr2 については、それぞれの細胞質末端におけるユビキチン化部位を同定し、いずれも Rsp5 ユビキチンリガーゼ依存的な分解制御を受けることを明らかにした。

HP-TRFAM を用いて膜の動的構造を調べたところ、酵母細胞膜は極めて剛直であり、秩序因子 S 値は 100 MPa まで加圧して大きく変化することはなかった。アシル鎖の回転拡散係数 D_w は加圧とともにやや低下することがわかった。酵母細胞膜の剛直性は多量に存在するエルゴステロールによって支えられており、その合成系変異株が多数知られている。さらに酵母では、グリセロリン脂質やスフィンゴ脂質の合成系変異株も数多く報告されている。よって、細胞膜の動的構造の観点から高圧適応機構を理解する上で、酵母は優れたモデル生物と言える。

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 8 件)

1. Abe, F. (2015) Effects of high hydrostatic pressure on microbial cell membranes: Structural and functional perspectives, In: *High Pressure Bioscience -Basic Concepts, Applications and Frontiers*, Springer Subcellular Biochemistry (SBM), *in press*. (査読有)
2. Abe, F. (2015) Stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under high

- hydrostatic pressure, In: *Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation*, Springer, 77-92. (査読有)
3. Kawai, K., Moriya, A., Uemura, S. and Abe, F. (2014) Functional implications and ubiquitin-dependent degradation of the peptide transporter Ptr2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 13, 1380-1392. (査読有)
 4. Usami, Y., Uemura, S., Mochizuki, T., Morita, A., Shishido, F., Inokuchi, J. and Abe, F. (2014) Functional mapping and implications of substrate specificity of the yeast high-affinity leucine permease Bap2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1838, 1719-1729. (査読有)
 5. Kanda, N. and Abe, F. (2013) Structural and functional implications of the yeast high-affinity tryptophan permease Tat2. *Biochemistry* 52, 4296-4307. (査読有)
 6. Suzuki, A., Mochizuki, T., Uemura, S., Hiraki, T. and Abe, F. (2013) Pressure-induced endocytic degradation of the yeast low-affinity tryptophan permease Tat1 is mediated by Rsp5 ubiquitin ligase and functionally redundant PPxY-motif proteins. *Eukaryotic Cell* 12, 990-997. (査読有)
 7. Abe, F. and Usui, K. (2013) Effects of high hydrostatic pressure on the dynamic structure of living *Escherichia coli* membrane: a study using high-pressure time-resolved fluorescence anisotropy measurement. *High Pressure Research* 33, 278-284. (査読有)
 8. Abe, F. (2013) Dynamic structural changes in microbial membranes in response to high hydrostatic pressure analyzed using time-resolved fluorescence anisotropy measurement. *Biophys. Chem.* 183, 3-8. (査読有)

{学会発表}(計 4 件 招待講演のみ記載)

1. Abe, F. (2014) Keynote Talk: Effects of growth-permissive pressures on the physiology of yeast, 8th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology 2014 (HPBB2014) Nantes, France (July 17, 2014)
2. 阿部文快 (2012) 高水圧への微生物適応とその分子生物学的理解、第 35 回溶液化学シンポジウム プレシンポジウム、早稲田大学(東京)11月11日
3. 阿部文快 (2012) 高圧下の微生物生理と生体膜の動態、日本乳酸菌学会、エポカルつくば(つくば)7月12日
4. 阿部文快 (2012) 高圧下の微生物生理、極限環境生物学会第 13 回シンポジウム、東洋大学(東京)6月23日

{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} ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 文快 (ABE, Fumiyoshi)
青山学院大学・理工学部・教授
研究者番号: 30360746

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし