

# プロジェクト名：枯草菌に油脂(トリアシルグリセロール)を産生させる試み

代表者：原 弘 志 (理工学研究科・准教授)

## 1 研究の背景

グラム陽性細菌の細胞表層のポリアニオンであるリポテイコ酸(LTA)は、細胞膜脂質のひとつジグリコシルジアシルグリセロールを膜アンカーとして、ホスファチジルグリセロール(PG)の極性頭部のグリセロールリン酸が多数重合して合成され、その結果、脂質ジアシルグリセロール(DG)が大量に産生される。DGはDGキナーゼ(*dgkB* 遺伝子産物)によってホスファチジン酸(PA)にされ、PGその他の脂質の合成経路にリサイクルされる。枯草菌の *dgkB* 遺伝子の欠損は致死となるが、LTA 合成酵素(*ltaS* 遺伝子産物)を欠失すると致死でなくなった(1)。

*dgkB* 欠損が致死となるのは、LTA 合成に伴って DG が細胞膜に蓄積するためであると推測した。蓄積した DG を消費するひとつの方法として、油脂(トリアシルグリセロール[TG])に変換することを考えた。TG は蓄積すると細胞膜から離れて細胞質中に油脂小滴(オールドロップレット)をつくることが期待される。すると、細胞膜中の DG が減少して、*dgkB* 欠損の致死性がサプレスされると予測した。

## 2 研究の進め方と成果

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)株の *sco0958* 遺伝子は TG 合成酵素をコードしている(2)。この酵素は DG にアシル CoA からアシル基を転移して TG を合成する DG アシルトランスフェラーゼである。*S. coelicolor* の染色体 DNA から PCR 増幅した *sco0958* 遺伝子を、まず大腸菌ベクター pET15b にクローン化し、ヘキサヒスチジンタグを付加した。さらにこれを PCR 増幅して、大腸菌-枯草菌シャトルベクター pDG148-Stu にクローン化し、適切な位置にリボソーム結合部位(RBS)を導入した。いずれもイソプロピルチオガラクトシド(IPTG)で発現誘導できる系である。クローン化した断片に予期しない突然変異がおこっていないことを、DNA シークエンシングで確認した。

宿主菌として、pET シリーズのプラスミドの発現用の大腸菌株 BL21(DE3)に *dgkA* 変異を導入した BLTD(DE3)を用意した。*dgkA* は大腸菌の DG キナーゼをコードする遺伝子であり、欠損は致死的不是な。枯草菌宿主としては、*dgkB* 遺伝子を破壊し、代わりにキシロース誘導プロモーター  $P_{xyI}$  の支配下に緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子と融合した *dgkB* をもつ TMB003 を用意した。

pET15b-*sco0958* と pDG148-Stu-*sco0958* を大腸菌株 BLTD(DE3)に、後者を枯草菌株 TMB003 に形質転換で導入し、IPTG で発現誘導したものを、ヘキサヒスチジンタグに対する抗体を用いたウェスタン解析し、期待どおりの分子量のタンパク質が発現していることを確認した。

まず大腸菌株 BLTD(DE3)における TG 合成を、脂質を抽出して薄層クロマトグラフィーで展開し、プリムリンで蛍光染色することによって調べた。BLTD(DE3)は親株 BL21(DE3)に比べて DG を蓄積し、IPTG で pET15b-*sco0958* や pDG148-Stu-*sco0958* から *sco0958* を発現させると、DG が減少して TG が検出された。pDG148-Stu-*sco0958* の方が多量の TG を蓄積した。

大腸菌では、膜由来オリゴサッカリド(MDO)のグリセロールリン酸修飾に PG が使われて、DG が産生される。*dgkA* 欠損は致死ではないが、MDO のアナログであるアルブチンがあると、修飾反応が進み、DG が蓄積して、増殖が悪くなる。この増殖阻害を、DG を消費して TG を産生することでサプレスできるかどうか、*dgkA* 欠損株 JW4002 に pDG148-Stu-*sco0958* を導入して調べたが、IPTG 誘導をかけても、アルブチンによる増殖阻害はそのままだった。

次に、枯草菌 TMB003 株で、キシロース非存在下で *gfp-dgkB* の発現を抑えたときの致死性を TG 酸性でサプレスできるかどうか調べようとしたが、キシロース非存在下の  $P_{xyI}$  の抑制が弱く、キシロースの有無による増殖レベルの違いが少なかったため、宿主菌を、*dgkB* 遺伝子を IPTG で制御される  $P_{spac}$  プロモーターの支配下においた YERQp 株に替えることにした。これに伴い、*sco0958* を pDG148-Stu-*sco0958* から PCR で増幅し、シャトルベクター pWH1520 のキシロース誘導プロモーター (TMB003 に用いているものとは由来の異なるもの)支配下に再クローン化した。クローン化した断片に予期しない突然変異がおこっていないことを、DNA シークエンシングで確認した。

YERQp 株は IPTG なしでは増殖せず、IPTG 存在下で培養後、IPTG を洗い流してから、IPTG なしで数時間培養して、脂質を分析すると、多量の DG を蓄積していた。pWH1520-*sco0958* をもつ

YERQp 株は、同様に IPTG なしで培養後、DG の蓄積が減って、TG の産生がみられた。キシロースも加えて培養するとかなりの量の TG 産生がみられ、DG 蓄積量は IPTG 存在下で培養した場合と同じくらいのレベルとなった。しかしながら、pWH1520-sco0958 をもつ YERQp はキシロース存在下でも IPTG がないと増殖せず、*dgkB* 発現抑制による致死性を TG 合成による DG 消費がサプレスすることはなかった。

### 3 まとめと考察

*S. coelicolor* の TG 合成酵素の遺伝子をクローン化して、枯草菌のジアシルグリセロールの遺伝子 *dgkB* の欠損株に導入し、蓄積した DG から TG を産生させることには成功した。しかし、そのことによって、*dgkB* 欠損株の致死性がサプレスされることはなかった。大腸菌においても、*dgkA* 欠損株のアルブチン存在下での増殖阻害を、*S. coelicolor* の TG 合成酵素による DG 消費によってサプレスすることはできなかった。

枯草菌の *dgkB* 欠損株の致死性は LTA 合成酵素 (*ltaS* 遺伝子産物) の欠失によってサプレスされるが、4 つある LTA 合成酵素遺伝子のうち主要な働きをしていると考えられる *yflE* 遺伝子の欠失では、*dgkB* 欠損による DG 蓄積のレベルがほとんど減少していない(1)。このことから、DG キナーゼ欠損による致死性は DG の蓄積だけによるのではないとも考えられる。

また、合成された TG は油脂小滴となって細胞膜から離脱すると期待したが、細胞膜にどどまって、生育に悪影響を及ぼした可能性も考えられる。DG も TG も極性頭部が小さく、非二重層構造をとる傾向が強いので、多量に存在すると細胞膜の integrity を乱すと考えられる。

### 4 参考文献

- (1) Matukoka, S. *et al.* (2011) *Genes Genet. Syst.* **86**:365–376.
- (2) Arabolaza, A. *et al.* (2008) *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2573–2582.