

学 位 論 文 題 名

Molecular biological studies on the hexadecenoic acid
 $\Delta 9$ -*cis-trans* isomerase of the psychrotrophic bacterium
Pseudomonas sp.strain E-3: Its possible involvement
in the bacterial urgent response.

（耐冷細菌 *Pseudomonas* E-3 株のヘキサデセン酸 $\Delta 9$ -シス-トランス
異性化酵素の分子生物学的研究：その細菌の緊急応答における関与）

学位論文内容の要旨

ある種の細菌は生体膜脂質のアシル成分として飽和脂肪酸やシス型モノ不飽和脂肪酸（cMUFA）に加えてトランス型モノ不飽和脂肪酸（tMUFA）を持つことが知られているが、その生理的役割は十分に解明されていない。耐冷細菌 *Pseudomonas* sp. strain E-3（以下 E-3 株）は、環境温度の急激な変化に曝露されたとき、tMUFA である 9-トランス-ヘキサデセン酸「16:1(9t)」の割合を顕著に増加させる。この応答の生理的役割を明らかにすることは、細菌の多様な環境適応機構を解明するうえで意義のあることである。

申請者は、まず、E-3 株における tMUFA 合成の特性を調べた。E-3 株は一定温度で培養する限り、培養温度に関わらず tMUFA の割合は全脂肪酸の 2-3% であった。しかし、4°C で培養した細胞の培養温度を 20°C/min の割合で 4°C から 30°C に急激に上昇（シフトアップ）させた場合、16:1(9t) の割合は最大で 12% に達した。この反応はシフトアップ後、約 40 分で最大に達し、その後、飽和脂肪酸であるヘキサデカン酸の割合が増大するとともに、16:1(9t) の割合は減少することから、16:1(9t) の増加は急激な温度上昇で引き起こされる過剰な膜流動性を補償するための緊急応答であると予想された。16:1(9t) の増加が 9-シス-ヘキサデセン酸「16:1(9c)」の減少に伴うこと、E-3 株の無細胞抽出液を用いた *in vitro* 反応により 16:1(9c) が 16:1(9t) へと異性化されることなどから、16:1(9t) の合成は 16:1(9c) のシス-トランス異性化反応によって起こることが明らかとなった。

次に申請者は、E-3 株からこのシス-トランス異性化反応を触媒する $\Delta 9$ -ヘキサデセン酸シス-トランス異性化酵素（9-異性化酵素）を精製した。無細胞抽出液の硫酸アンモニウムによる沈殿分画、ハイドロキシアパタイト、DEAE-Toyopearl、Ether-Toyopearl、SP-Toyopearl、G-Butyl、Sephadex 充填カラムによるクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE 上で約 80 kDa の分子量を持つ 9-異性化酵素の完全精製標品を得た。この酵素は二重結合の位置の移動を伴わない遊離不飽和脂肪酸のシス-トランス反応を触媒する新規な酵素であることが判明した。この精製標品及びそのリシルエンドペプチダーゼ消化によって生成した約 28 kDa のペプチド断片の N-末端アミノ酸配列を分析したところ、それぞれ Q-A-P-L-V-S-P-A-I-S-Y-T-R-D と L-I-E-R-T-G-T-L-N-A であった。これらのアミノ酸配列は、有機溶媒耐性細菌 *Pseudomonas putida* P8 からクローニングされた不飽和脂肪酸シス-トラン

ス異性化酵素遺伝子 (*cti*) の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と高い相同性を示したので、9-異性化酵素は *cti* 産物と相同な酵素であることが示唆された。

9-異性化酵素のアミノ酸配列の情報と *cti* 遺伝子の塩基配列の情報を基に、9-異性化酵素遺伝子のクローニングを試みた。クローニングされた DNA 断片はモノシストロニックに制御された 2,298 塩基対の単一のオープンリーディングフレーム (ORF) を含み、*Pseudomonas putida* P8 の *cti* の塩基配列と 79% の相同性を示した。さらに、両者の予想されるアミノ酸配列は 78.6% の相同性を示した。また、この ORF の推定アミノ酸配列から予想される分子量の理論値が 86,138 Da であり、精製 9-異性化酵素から見積もった分子量 (約 80 kDa) と近いこと、精製酵素の解析で得られたアミノ酸配列が ORF の塩基配列から予想されるアミノ酸配列中に確認できることから、この ORF が 9-異性化酵素をコードしている遺伝子 (*him*) であると結論した。*him* と *cti* の遺伝子産物である、Him と Cti の推定アミノ酸配列を詳細に比較したところ、両者は高い相同性をもつものの、Him (9-異性化酵素) が Cti に比べて疎水性のアミノ酸に富んでいることが判明した。このことは、9-異性化酵素が Cti に比べてより低温に適応した酵素であることを示唆するものである。

次に、9-異性化酵素及び iMUFA の役割を特定する目的で、iMUFA を持たない大腸菌内で *him* を発現させた。しかし、形質転換した大腸菌タンパク質で抗 9-異性化酵素抗血清と交叉反応をしたのは 65 kDa のポリペプチドであった。精製したこのポリペプチドの N-末端アミノ酸配列が 9-異性化酵素の内部アミノ酸配列の一部であったことから、このポリペプチドが *him* 産物の部分分解物であると判明した。また、大腸菌での 9-異性化酵素活性は観察できなかった。

抗 9-異性化酵素抗血清を用いたイムノプロットの解析から、E-3 株において 9-異性化酵素はペリプラズムに局在し、かつ構成的に発現していることが判明した。一方、*him* により形質転換した大腸菌では *him* 産物 (65 kDa ポリペプチド) は細胞質にのみ分布していることがわかった。即ち、大腸菌では *him* 生産物 (Him、9-異性化酵素) のペリプラズムへの移行は見られなかった。Him の N-末端 20 アミノ酸はタンパク質をペリプラズムへ導くシグナルペプチドであると考えられるが、Him のペリプラズム移行シグナルペプチドは、大腸菌で機能しないものと考えられる。

これまで、*cti* のほとんどは有機溶媒耐性 *P. putida* とその近縁種からクローニングされてきていることから、E-3 株の正確な分類学的な位置の決定を試みた。E-3 株を含む 30 種の *Pseudomonas* 属細菌について、16S-rDNA の塩基配列を基に系統解析したところ、E-3 株は *P. putida* とは近縁ではないことが示された。また 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. aeruginosa*、*P. fluorescens*、*P. syringae*) が iMUFA とともに、抗 9-異性化酵素抗血清により認識される約 80 kDa のタンパク質を持つことから、9-異性化酵素の *Pseudomonas* 属内における広い分布が推定された。さらに、iMUFA と 9-異性化酵素は、*Colwellia maris* や *Moritella marina* などの好冷性細菌においても、その存在が確認された。これらの好冷細菌は E-3 株と同様に有機溶媒には非耐性であることから、iMUFA も 9-異性化酵素も有機溶媒耐性には関わっていないと考えられる。

以上の結果より耐冷細菌 *Pseudomonas* sp. E-3 は急激な温度上昇によって引き起こされる過剰な細胞膜の流動性を一時的に補償するため、構成的にペリプラズムに存在する 9-異性化酵素により 16:1(9c) のシス-トランス異性化反応により 16:1(9t) を生成するものであり、9-異性化酵素の活性化は急激な温度上昇による過剰な膜流動性そのものによってもたらされることが考えられる。不飽和脂肪酸のシス-トランス異性化反応は細菌の新たな緊急応答様式であると結論される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 木 義 雄

副 査 教 授 山 本 興 太 朗

副 査 助 教 授 奥 山 英 登 志

副 査 助 教 授 山 崎 健 一

学 位 論 文 題 名

Molecular biological studies on the hexadecenoic acid
 $\Delta 9$ -*cis-trans* isomerase of the psychrotrophic bacterium
Pseudomonas sp.strain E-3: Its possible involvement
in the bacterial urgent response.

(耐冷細菌 *Pseudomonas* E-3 株のヘキサデセン酸 $\Delta 9$ -シス-トランス
異性化酵素の分子生物学的研究：その細菌の緊急応答における関与)

細菌は地球上で最も多様で広範な環境に適応している生物群ということができる。例えば温度をとってみても、氷点下の低温から水の沸点を超える高温までその分布域を持っているのは細菌だけである。細胞膜などの生体膜を構成する脂質の物理的性質は、膜機能を維持するために、生理的条件では液晶状態にあって、生体膜に適度な流動性を与えていると考えられている。従って細菌などの変温生物は温度環境が変わっても、生体膜の流動性を維持するための様々な適応手段をもっている。その主なものは、生体膜脂質を構成する脂肪酸の不飽和度や、炭素鎖長を変えることなどである。一般的に細菌の不飽和脂肪酸の二重結合はシス型であるが、ある種の細菌はシス型不飽和脂肪酸に加えて、トランス型不飽和脂肪酸 (tMUFA) を持っている。本研究は、細菌の tMUFA に注目し、その温度適応における役割に焦点を当てて行ったものである。

最高生育温度が約 30°Cにある耐冷菌 *Pseudomonas* E-3 株 (以下 E-3 株) は主要脂肪酸として、ヘキサデカン酸、9-シス-ヘキサデセン酸「16:1(9c)」、11-シス-バクセン酸を持っている。申請者はまず E-3 株における tMUFA である 9-トランス-ヘキサデセン酸「16:1(9t)」の生成に関して詳細に検討した。E-3 株は一定温度で培養する限り、培養温度に関わらず tMUFA の割合は全脂肪酸の 2-3% であった。しかし、4°C で培養した細胞の培養温度を 20°C/min の割合で 4°C から 30°C に急激に上昇させた場合、16:1(9t) の割合は最大で 12% に達した。16:1(9t) の増加が 16:1(9c) の減少に伴うこと、E-3 株の無細胞抽出液を用いた *in vitro* 反応により 16:1(9c) が 16:1(9t) へと異性化されることから、16:1(9t) の合成は 16:1(9c) のシス-トランス異性化反応によって起こることが明らかとなった。この不飽和脂肪酸異性化反応は、E-3 株をトルエンで処理した時にも認められ、その際の tMUFA の割合は急激な温度変化による場合よりも顕著に増加した。

申請者は E-3 株におけるシス-トランス異性化反応の特徴を明らかにするため、この反応を触媒する Δ^9 -ヘキサデセン酸シス-トランス異性化酵素 (9-異性化酵素) の精製を試みた。E-3 株の無細胞抽出液から数種類のカラムクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE 上で約 80 kDa の質量を持つ 9-異性化酵素の完全精製標品を得た。この酵素は遊離不飽和脂肪酸を基質とし、二重結合の位置の移動を伴わないシス-トランス異性化反応を触媒する全く新規な酵素であることがわかった。この精製標品そのものと、ペプチダーゼによって生成したペプチド断片の N-末端アミノ酸配列を分析したところ、それぞれ Q-A-P-L-V-S-P-A-I-S-Y-T-R-D と L-I-E-R-T-G-T-L-N-A であった。これらのアミノ酸配列は、有機溶媒耐性細菌 *Pseudomonas putida* P8 からクローニングされた不飽和脂肪酸シス-トランス異性化酵素遺伝子 (*cti*) の推定アミノ酸配列と高い相同性を示したので、9-異性化酵素は *cti* 産物と相同な酵素であることが示唆された。

そこで、申請者は 9-異性化酵素のアミノ酸配列と *cti* 遺伝子の塩基配列の情報を基に、9-異性化酵素遺伝子のクローニングを試みた。その結果、*P. putida* P8 の *cti* の塩基配列と 79% の相同性を示すモノシストロニックに制御された 2,298 塩基対のオープンリーディングフレーム (ORF) を得た。この ORF の推定アミノ酸配列から予想される分子量の理論値は 86,138 であり、精製 9-異性化酵素から見積もった分子量と近く、またその予想配列中に精製酵素の解析で得られたアミノ酸配列が確認できた。この ORF を tMUFA を持たない大腸菌内で発現させたが、大腸菌での tMUFA の生成は観察できなかった。しかし、9-異性化酵素血清と交叉反応をした形質転換大腸菌の 65 kDa のポリペプチドは、その N-末端アミノ酸配列から、この ORF 産物の分解物であることが明らかとなった。以上の結果より、この ORF が 9-異性化酵素をコードしている遺伝子 (*him*) であると結論した。また *him* 産物 (Him) の推定アミノ酸配列と、抗 9-異性化酵素血清を用いたイムノプロットの解析から、大腸菌における Him の分解を考察した。E-3 株において 9-異性化酵素 (Him) はペリプラズムに局在し、かつ構成的に発現しているが、*him* により形質転換した大腸菌では Him (65 kDa ポリペプチド) は細胞質にのみ分布していることがわかった。即ち、大腸菌では Him のペリプラズムへの移行は見られなかった。Him の N-末端 20 アミノ酸はタンパク質をペリプラズムへ導くシグナルペプチドであると考えられるが、Him のペリプラズム移行シグナルペプチドは大腸菌では機能せず、細胞質での Him の 65 kDa への分解が起こったと推測している。

申請者は以上の結果から本研究を次のようにまとめている。E-3 株は、環境温度の急激な上昇にさらされた時、tMUFA である 16:1(9t) の割合を顕著に増加させる。これは E-3 株が急激な温度上昇によって引き起こされた細胞膜の過剰な流動性を一時的に補償するため、構成的にペリプラズムに存在する 9-異性化酵素により 16:1(9c) のシス-トランス異性化反応により 16:1(9t) を生成するものである。異性化反応の活性化は急激な温度上昇だけでなく、有機溶媒によっても引き起こされたことから、過剰な膜流動性そのものによってもたらされるものである。また、この応答様式は、必要な酵素 (9-異性化酵素) と細胞膜要因が構成的に存在し、更に反応そのものが飽和脂肪酸の *de novo* 合成と異なりエネルギーや水素供与体を必要としないことから、合理的な緊急応答様式であると述べている。9-異性化酵素と膜面分を用いる再構成実験などにより、生体の異性化反応に必須な膜因子の同定とその機能の解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (地球環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。