

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660085

研究課題名(和文) 安定同位体標識リポ多糖の生化学的調製とファージ宿主認識機構のNMR解析

研究課題名(英文) Biochemical preparation of isotope-labelled lipopolysaccharide and nmr analysis of host recognition mechanism of phage

研究代表者

稲垣 稔 (Inagaki, Minoru)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：20242935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：大腸菌C株のリポ多糖に¹³Cガラクトースで標識するため、UDPガラクトースエピメラーゼ遺伝子galEを欠損させた変異株を作成する目的でgalE遺伝子配列を決定できた。大腸菌F2513株のガラクトース転移酵素waaWとwaaT遺伝子を欠損させた変異株作出に成功した。変異株は生育が悪く、糖鎖構造の確認に至っていない。大腸菌K-12株のHep残基を転移酵素waaUタンパク質を国立遺伝学研究所から得たASKA(-)クローンJW3598-AM株を用いて、サルモネラ菌のR-コアの非還元末端に非天然のHep残基が取り込まれたことをDOC-PAGEや糖鎖部分のLC-ESI-MSにより確認することができた。

研究成果の概要(英文)：For incorporation of ¹³C isotope-labelled galactose into the non-reducing end of lipopolysaccharide core structure, galE gene on E. coli C bacterium was determined on the gene. The mutant of E. coli F2513 were prepared by deletion of Galactosyl transferase genes, waaW and waaT. However, those mutants doesn't propagate in the cultural medium, and not yet certified the altered saccharide structure on R-core lipopolysaccharide. By using the ASKA(-) clone, JW3598AM, the protein fraction of WaaU (hetosyl transferase) was prepared and submitted to treat the Salmonella bacterium. The incorporation of an unnatural Hep residue was confirmed on the lipopolysacchride of Salmonella, using DOC-PAGE and LC-ESI-MS.

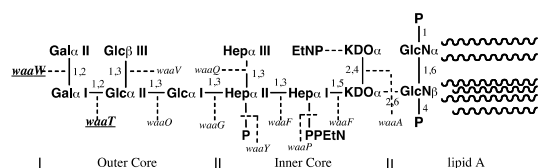
研究分野：生物有機化学

キーワード：リポ多糖 糖転移酵素 相同組み換え 変異株 糖鎖構造解析 電気泳動 質量分析

1. 研究開始当初の背景

リポ多糖(LPS)は、内毒素とも呼ばれ、グラム陰性菌の最表層を取り巻いている外膜の主要成分であり、哺乳動物に対してほんの少量で、発熱性、細胞壊死、シュワルツマン反応、免疫賦活作用などの強い生理活性を示す。体力の衰えた患者では、リポ多糖が血中に侵入することによって敗血症になり、多臓器不全(特に腎不全)によって亡くなる場合が多い。リポ多糖は、また別の面では、グラム陰性菌の表層を特徴付ける“顔”としての機能を持ち、バクテリオファージは、リポ多糖を認識することで、宿主菌を識別しており、ファージ感染の際に T4 ファージの尾繊維の収縮や ϕ X174 ファージのスパイクが開くエクリプスの反応の引き金を引く、レセプター分子として作用する。バクテリオファージは、コア糖鎖の配列を、糖鎖の長さ、糖の種類、結合様式の観点から、細かく区別することが可能で、ファージの感染性を調べて病原菌を分類する、ファージ型別の手法も存在するほど詳細で選択的な認識である。したがって、リポ多糖のコア糖鎖を詳細に識別するファージの認識機構を知ることは大変魅力的であり、医療の面からリポ多糖に対処する重要なヒントを提供してくれると考えられる。

リポ多糖の糖鎖は、グラム陰性菌のゲノム上の *waa* 領域がコードする糖転移酵素群によって生合成される。菌体表面の外膜に根を下ろす糖脂質であるリポド A から、2 残基の 3-デオキシ-D-マンノオクトン酸 (KDO) と 3 残基の L-グリセロ-D-マンノヘプトース (Hep) が連なった内部コア糖鎖が伸び、さらに、5 残基のヘキソースやヘキソサミン (Glc, Gal, GlcNAc) が結合した外部コア糖鎖が順を追って非還元末端側へ転移・延長される。



リポド A 部分や内部コア糖鎖の構造は、種々のグラム陰性菌の間ではほぼ共通であるのに対して、外部コア糖鎖は、菌ごとに大きく異なる。リポ多糖生合成遺伝子の変異株は、失活した酵素活性から先の糖鎖が合成できず不完全になり、より短い糖鎖を持つリポ多糖を有する表現型を示す。

その中であって、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼ(GalE)を欠く変異株は、培養時の餌として与えるグルコースから得た UDP-Glc を UDP-Gal へ変換することができないため、Gal II, III を転移する WaaT や WaaW 酵素が必要とする糖ドナーを供給できず Gal の転移が行われないため、非還元末端の Gal 2 残基を欠く Rb2 型の糖鎖を持つリポ多糖を生合成する。しかし、外部からガラクトースが供給された

場合には、GalE とは別の Gal-1P からの経路で UDP-Gal を生産できるため、リポ多糖の生合成が補完されて Gal を含む全長 Ra 型の糖鎖が生合成されることが予想される。類例として大腸菌 O111:B4 株の *galE* 変異株である大腸菌 J5 株が、ガラクトースの添加によってリポ多糖生合成が補完されることが報告されている(Edstrom RD & Heath EC, *J. Biol. Chem.*, **242**, 3581-3588 (1967))。

2. 研究の目的

大腸菌 C 株のリポ多糖生合成に関与する酵素群の中から、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼ遺伝子を不活化した $\Delta galE$ 変異株を作成し、培養時に外部から ^{13}C ガラクトースを供給することで非還元末端の 2 残基に ^{13}C 標識をとり込ませたりポ多糖を作らせる。また、 $\Delta galE$ 変異と同時に、コア糖鎖の最も外側に結合する Gal II の転移酵素遺伝子 *waaW* や 2 番目に結合する Gal I (*waaT*) を欠失させた変異株も作製する。 $\Delta waaW$ あるいは、 $\Delta waaT$ が得られれば、注目する二つの非還元末端残基を個々に欠いた LPS 糖鎖が得られるはずであり、これらの糖鎖構造を解析して、確かに目的の糖残基が欠けていることを証明する必要がある。また、得られた LPS を機器分析することで、従来の外部コアのガラクトースの信号を網羅的に帰属する。さらに標識を取り込ませたりポ多糖を作らせて、両リポ多糖を比較することで、大腸菌 C 株のリポ多糖を認識して感染する ϕ X174 ファージから得た、スパイクタンパク質 H と G を共存させながら NMR 測定を行う、NMR 滴定実験を行い、非還元末端に位置する宿主認識に重要なガラクトース残基の認識機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)大腸菌 C 株の UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼ遺伝子配列の決定

大腸菌 K-12 株の情報を基にしたプライマーの設計と PCR 反応

バクテリオファージ ϕ X174 の自然宿主の一つである大腸菌 C 株 (*E. coli* C) は、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼ (*galE*) に関して、その遺伝子配列が報告されていない。そこで、培養した大腸菌 C 株から常法のフェノールクロロホルム法でゲノム遺伝子を得た。この際に、群馬大学理工学部の武田茂樹教授からアドバイスを受けた。得られたゲノムを鋳型として、適切なプライマーを加えて増幅することで、*galE* 遺伝子断片を得ようと考え、まず、遺伝子配列が既知の大腸菌 K-12 W3110 の情報を元にプライマーを設計し使用した。しかし、目的の遺伝子断片を増幅することができなかった。

Degenerate Primer を用いる方法

いくつかの細菌の *galE* 遺伝子のアミノ酸配列を調べ、共通に保存されている領域を探した。それらアミノ酸に対応すると考えられ

もとの遺伝子の配列を推定してプライマーを設計する degenerate primer を用いる反応を試した。アミノ酸配列に対応する遺伝子配列は複数考えられるため、その配列の変化に対応できるように、プライマーの合成の際に塩基を混合するようにして調製した。その結果、degenerate primer を用いた PCR 反応で、約 360 および 400bp の断片を得た。それらの塩基配列を解析したところ、前者は、UDP-2,3-ジアシルグルコサミン加水分解酵素、後者は、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸酸化酵素の一部と思われる配列が明らかになった。これらの酵素は補酵素として NADPH を利用する点が *galE* との共通点とみられ、見つかった配列は補酵素との結合や反応を司る部分であるかもしれないが、目的の *galE* 配列を増幅することができなかった。Degenerate プライマーの設計と実験方法について、三重大学生物資源学研究科の苅田修一教授からアドバイスを受けた。

大腸菌 C 株 *galE* 遺伝子配列の決定

ここまで不成功が続いたため、実験の手法を見直した。大腸菌 C 株は遺伝子配列が未知であるため、他の配列がすでに判っている大腸菌の *galE* 配列を増幅する予備実験を行うことにした。大腸菌 ATCC-8739 株は、複数の文献で大腸菌 C 株の一種と記載されていることから、この株を取り寄せゲノムを抽出した。また、大腸菌 K-12 株と ATCC-8739 株のゲノム DNA の標品を NITE の遺伝子バンクから購入した。これらの DNA を鋳型として、PCR 反応を行ったところ、今度は *galE* 断片を増幅することができた。ただし、これまでフォワードプライマーの 3' 末端の前とリバースプライマーの 5' 末端の前に増幅した後に断片をサブクローニングするための制限酵素サイト、つまり、遺伝子ゲノムと非相同の領域を入れていたが、それを除いた場合に上手く増幅できた。この際に PCR の反応条件および、DNA ポリメラーゼの種類の選定に製品評価技術基盤機構の藤田克利氏からアドバイスを受けた。そこで、制限酵素の配列を除いたプライマーを使って K-12 株と大腸菌 C 株の *galE* 遺伝子の PCR 反応を行うと、今度は奇麗に *galE* 断片が増幅された。そして、遺伝子配列を解析した結果、大腸菌 C 株の *galE* 遺伝子は、ほぼ K-12 株の遺伝子配列と同じで、一カ所の塩基が異なるだけであることが判明した。

(2) リポ多糖の外部コアにガラクトース残基を転移する酵素遺伝子 *waaU* と *waaT* を欠損した大腸菌 F2513 株の作製

大腸菌 F2513 株は、大腸菌 R4 タイプのコア糖鎖構造を持つ LPS を発現する菌株であり、ファージ ϕ X174 の宿主の一つである。この R4 タイプのコア糖鎖は非還元末端に大腸菌 C 株と同じく連続する Gal 残基を持つ。非還元末端から 3 残基目の Glc 糖鎖に結合する分岐の糖

が F2513 株では Gal、C 株では、Glc である点だけが異なる。F2513 株の *waaU* および *waaT* 配列は、Heinrichs らの論文により公開されているので、その情報を基にして、当研究室で両遺伝子を増幅することが出来た。遺伝子配列は、先の論文の配列と一致することが判った。つぎに、Datsenko らの方法に従って、*waaU* と *waaT* の配列とクロラムフェニコール耐性遺伝子の配列を連結したプライマーを使って、外側に両転移酵素の配列を持ち、内側に抗生物質耐性遺伝子の配列を持つ断片を PCR によって大量に作製し、その断片を大腸菌 F2513 株にエレクトロポレーションによって導入して相同組み換えを起こさせた。その結果 F2513 Δ *waaU* と F2513 *waaT* 変異株と考えられる組み替え株を取得できた。これらの変異株は、抗生物質クロラムフェニコールを含む寒天培地上で生育することができる。しかし、液体培養によって増菌しようとするとき極めて生育速度が遅く、培養した菌体から LPS を取り出してその糖鎖の配列と構造を確認するまでに至っていない。

(3) サルモネラ菌 (*S. Typhimurium*) リポ多糖の非還元末端への非天然糖残基の導入

大腸菌 K-12 株とサルモネラ菌のリポ多糖の外部コア糖鎖構造は大変似通っていて、K-12 株の非還元末端にヘプトースを転移する *waaU* 遺伝子とサルモネラ菌の非還元末端に GlcNAc を転移する *waaK* 遺伝子は、ゲノム上の遺伝子の位置が同じで相互に入れ替わっている。そこで、それら遺伝子を相互に入れ替えることができれば、非天然の構造を持つ糖鎖を菌体に作らせることができる可能性がある。これを検証する予備の実験として、サルモネラ菌の非還元末端の GlcNAc 残基を欠く *S. Typhimurium* SL733 株(Rb1 株)に K12 株から単離したヘプトース転移酵素 *waaU* 遺伝子およびその産物の酵素タンパク質を用させる実験を行った。

K-12 株由来の *waaU* 遺伝子をプラスミド上に保持している菌株 ASKA(-) クローン JW3598-AM 株を国立遺伝学研究所から分譲を受けて入手した。JW3598AM 株を培養し、IPTG による誘導を掛けて、*WaaU* 酵素を発現させた。酵素を含む画分をアフィニティークロマトグラフィーによって得て、これを *S. Typhimurium* SL733 株の培養液に添加して、10 時間培養を続けた。得られた菌株から LPS を PCP 法で抽出し、LPS や LPS を酸分解して得た糖鎖部分 PS の構造を DOC-ポリアクリルアミド電気泳動や LC/ESI-MS によって分析した。その結果、DOC-PAGE では、泳動度の小さいより分子量の大きな糖鎖が含まれることが分かり、また LC-MS では *S. Typhimurium* SL733 株の非還元末端にヘプトースが導入された非天然の構造と推定できる質量数を持つ分子種を確認することができた。

4. 研究成果

大腸菌 C 株の合成するリポ多糖に外部から ^{13}C の同位体標識を施したガラクトースを取り込ませるため、UDP ガラクトースエピメラーゼ遺伝子 *galE* を欠損させた変異株の作成を検討した。H28 年度は、*galE* 遺伝子をゲノムから PCR で増幅し、ついに配列を決定することができた。これまでにゲノム遺伝子配列が知られている大腸菌 K-12 W3110 株の配列と 1 塩基が異なるが、アミノ酸配列は同じであった。また、大腸菌 F2513 株の LPS 生合成のための糖転移酵素のうち、R-コアの非還元末端の二つのガラクトース残基を転移する *waaW* と *waaT* 遺伝子を特定して、ファージリコンビナーゼ活性を活用する Datsenko の方法を用いて、これらの遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子と相同組み換えを行って欠損させた変異株 F2513 $\Delta waaW$ および F2513 $\Delta waaT$ 株の作出に成功した。ただし、これらの変異株は、抗生物質を含む寒天培地上でゆっくり増殖するものの、液体培地ではきわめて生育が遅く、そこから LPS を取り出すまでに増菌せず、LPS の糖鎖構造の確認に至っていない。

大腸菌 K-12 株の R-コア非還元末端に L-グリセロ-D-マンノヘプトースを転移する *waaU* 遺伝子を保持した ASKA(-) クローン JW3598-AM 株を国立遺伝学研究所から分譲を受け、その WaaU 酵素を含むタンパク質分画を調製し、ネズミチフス菌 (*S. Typhimurium*) の R-コアの非還元末端の糖残基を欠いた LPS を生合成する Rb1 変異株 SL733 に対して作用させた。少量ではあるが、サルモネラ菌の LPS の末端に Hep 残基が取り込まれたことが、単離した LPS の DOC-PAGE によって泳動度が低下したこと、および LPS の酸加水分解物 PS の LC-ESI-IT-MS により目的の糖鎖に一致するイオンを SIM 測定で確認することができたことから明らかにすることができた。

参考文献

Heinrichs DE, Yethon JA, Amor PA, Whitefield, C. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29497-29505 (1998).

Datsenko KA, Wanner BL, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640-6645 (2000).

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Positive correlation between inactivation and DNA release of bacteriophage ϕX174 caused by LPSs of *E. coli* C and *E. coli* K-12, Hayata Yamagata and Minoru Inagaki, 第 6 回ファージ・環境ウイルス研究会合同シンポジウム, 海洋研究開発機構 JAMSTEC 横浜(神奈川県・横須賀市)

平成 28 年 10 月 21 日 ~ 22 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 穰 (INAGAKI, Minoru)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授

研究者番号: 20242935

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

苅田修一 (KARITA, Shuichi)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授

研究者番号: 90233999

武田茂樹 (TAKEDA, Shigeki)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号: 80282854

藤田克利 (FUJITA, Katsutoshi)

独立行政法人・製品評価技術基盤機構

NITE・資源保存課主任