

リピド A 脂肪酸転移酵素遺伝子を利用した 新しい構造を有する LPS の作出

川原 一芳¹⁾, 菅原 健広¹⁾, 大澤絵美里¹⁾, 滝本 博明²⁾, 尾之上さくら¹⁾

¹⁾関東学院大学理工学部理工学科生命学系, ²⁾北里大学理学部生物科学科

Production of LPS with novel structure using fatty acid transferase genes for lipid A biosynthesis

Kazuyoshi Kawahara¹⁾, Takehiro Sugawara¹⁾, Emiri Osawa¹⁾, Hiroaki Takimoto²⁾, Sakura Onoue¹⁾

¹⁾Department of Biosciences, College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University

²⁾Department of Biosciences, School of Science, Kitasato University

Abstract

Lipid A is known to exhibit various immunostimulating activities, and acyloxyacyl structure formed by 3-hydroxy and non-polar fatty acids is important for the activity. Although the relationship between the activity and the acyloxyacyl structure has been precisely investigated using chemically synthesized lipid A, modifications of lipid A by genetic methods have not been much attempted. In the present study, the double-knockout mutant of *Escherichia coli* with disrupted lauroyl- and palmitoyltransferase genes (KGU0377) was constructed, and transformed with palmitoyltransferase gene from *Salmonella* (*pagP*) or from *Campylobacter jejuni* to obtain strains KGU0431 and KGU0441, respectively. The mutant produced the lipid A without acyloxyacyl structure, showed slower growth at 37°C, and was very sensitive to polymyxin B. The transformant KGU0431 could grow as rapid as the wild-type strain and showed the partially restored resistance to polymyxin B. Another transformant KGU0441 also showed the similar recovery of polymyxin B resistance, but its growth was still slower than the wild-type strain. Mass spectrometric analysis revealed that KGU0431 produced considerable amount of penta-acylated lipid A with palmitic acid. On the other hand, KGU0441 produced a small amount of hexa-acylated lipid A with palmitic and myristic acids. The IL-6 inducing activity of KGU0377 LPS was much weaker than that of the wild-type strain, as expected, and the activity of LPS from the transformants was at the same level as that of KGU0377 or only slightly restored. The present study showed the possibility to produce lipid A with novel structures using various acyltransferases from other bacteria.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 51~55, 2018

Key words : リピド A, 脂肪酸転移酵素遺伝子, 質量分析, IL-6 産生誘導活性, 大腸菌

はじめに

リポポリサッカライド (LPS) 分子が示すさまざまな免疫活性は、その脂質部分であるリピド A が担っていることはよく知られている¹⁾。不思議なことに、LPS 研究の初期からよく研究されてきた腸内細菌科、なかでも大腸菌のリピド A が他のグラム陰性細菌と比べて最も高い免疫活性を示すことがわかっている。リピド A の化学構造、とくに脂肪酸の炭素鎖、結合位置と免疫活性の相関については、大阪大学の研究グループが 1980 年代に化学合成の手法を用いて、国内外の研究者との共同研究において明らかにしている²⁻⁴⁾。脂肪酸に関し

ては大腸菌リピド A のリピド A 構造を頂点として、脂肪酸炭素鎖が変化することにより活性は低下すること、および非還元末端側のグルコサミン (GlcN) の 2 位と 3 位に結合した 3-ヒドロキシミリスチン酸 (3-OH-C_{14:0}) の水酸基に結合した飽和脂肪酸が作るアシロキシアシル構造がとくに重要であることが証明された。一方、同時期に米国の Raetz らにより解明された大腸菌リピド A の生合成経路においては、これらのアシロキシアシル構造は生合成後半に、ラウリン酸 (C_{12:0}) 転移酵素、およびミリスチン酸 (C_{14:0}) 転移酵素により、この順番で各脂肪酸が生合成中間体に転移され、完成した 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) とリピド A の

複合体 (LPS の最小単位) が細胞質膜の内側からペリプラズム側に運搬されることが明らかになっている^{5,6)}。またこれらの生合成研究の一環として、上記の脂肪酸転移酵素遺伝子を破壊した変異株が作製可能であることも示された⁷⁾。

リピド A の構造、免疫活性、生合成に関するこれらの知見から、生合成後半にはたらく脂肪酸転移酵素遺伝子の破壊と他菌種の脂肪酸転移酵素遺伝子の導入により、新規のアシロキシアシル構造を有する人工的なリピド A (LPS) が作出できることは容易に想像されるが、これまでそのような方向性の研究は意外に少なかった。そこでわれわれはまず、数種類の脂肪酸転移酵素遺伝子破壊株を作製し、そのうちアシロキシアシル構造をほとんど有しないリピド A を産生する変異株を用いて、外来遺伝子の導入により人工的リピド A を持つ LPS の作出を試み、そのような LPS が示すサイトカイン産生活性を野生型 LPS と比較した。

1. 脂肪酸転移酵素遺伝子破壊株の作製

生合成に必須な遺伝子を欠損した変異株は致死的になるため、作製不可能な場合、あるいは温度感受性変異株として作製する必要がある場合も想定されるが、リピド A 脂肪酸転移酵素に関しては既報^{7,8)}により多重変異株を含むさまざまな変異株の作製が可能であることが示されていたので、われわれも相同組換えの手法を用いて変異株の作製を試みた。大腸菌 BL21 株のリファンピシン耐性株を親株 (KGU0107 株) として、前述の $C_{12:0}$ 転移酵素遺伝子 (*lpxL*)、 $C_{14:0}$ 転移酵素遺伝子 (*lpxM*)、および外膜に存在して、完成後の LPS にパルミチン酸 ($C_{16:0}$) を転移する $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子 (*crcA*) をそれぞれクローニングし、それらの遺伝子の中央にカナマイシンなどの薬剤耐性遺伝子を挿入した。これらの遺伝子を自殺プラスミド (培養条件により容易に脱落可能なプラスミド) に組込んで親株に導入し、正常遺伝子と破壊遺伝子が置き換わった株を選択した。変異株の選択においては、できるだけ正常な生育を示すコロニーを釣菌するよう心掛けた。その結果、良好な生育を示す遺伝子破壊変異株を得ることができた。このうち *lpxL* と *crcA* を破壊した二重変異株を KGU0377 株とした。

2. 二重変異株への $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子の導入と LPS 脂肪酸組成の変化

大腸菌リピド A には本来 $C_{16:0}$ がほとんど存在しないため、変化を検出しやすい。そこで、作製した二重変異株 (KGU0377) に、ベクタープラスミドに連結した他の菌種の $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子を導入し、LPS 中の $C_{16:0}$ 量の変化を分析することにした。 $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子としては、第一にサルモネラの *pagP* 遺伝子が候補にあ

げられた。 $C_{16:0}$ 転移酵素 *pagP* は腸内細菌科を始めとする多くのグラム陰性菌にみられる酵素で、外膜に存在し、 $C_{16:0}$ をリン脂質からリピド A の還元末端側 GlcN の 2 位に結合した 3-OH- $C_{14:0}$ の水酸基に転移する酵素である⁹⁾。サルモネラではリピド A をヘプタアシル型とすることにより、マクロファージ内での殺菌に抵抗性を示す病原因子の一種と考えられているが、おそらく本来の役割は、生育環境に合わせて外膜の疎水性を調節することであると思われる。同様の酵素は大腸菌では *CrcA* と呼ばれており、普段はほとんどはたっていないが、他の脂肪酸転移酵素遺伝子の破壊に伴い機能するため、この遺伝子 (*crcA*) も破壊した株が上記の二重変異株である。

次に候補にあがった転移酵素が、*Campylobacter jejuni* の $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子である。*C. jejuni* のリピド A は糖の基本骨格が GlcN ではなく 2,3-ジアミノグルコース (GlcN3N) から成り立っており、この糖の 2 位、3 位のアミノ基に 3-OH- $C_{14:0}$ が結合し、さらに非還元末端側の糖に結合した 3-OH- $C_{14:0}$ に $C_{16:0}$ が 2 分子結合している。したがって、この菌の *lpxL* (大腸菌の $C_{12:0}$ 転移酵素遺伝子 *lpxL* と相同性を有する遺伝子) を用いて二重変異株リピド A の変化を調べることとした。

おのおのの $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子を通常の pUC 系ベクタープラスミドに連結して KGU0377 株に形質転換法で導入し、LPS の脂肪酸組成変化を調べた。その結果、*pagP* を導入した KGU0431 株、および *C. jejuni* の *lpxL* 相同遺伝子を導入した KGU0441 株ともに、 $C_{16:0}$ の相対量が増加したことがわかった。しかし、KGU0441 株の $C_{16:0}$ 増加量はそれほど顕著なものではなかった。

なお、二重変異株である KGU0377 株 LPS の脂肪酸については、 $C_{12:0}$ 、 $C_{16:0}$ に加えて、 $C_{14:0}$ も減少していることが確認できた。これは、 $C_{14:0}$ 転移酵素 *LpxM* が、 $C_{12:0}$ が所定の位置に存在する分子を特異的に基質として使用するからではないかと考えられる。したがって、KGU0377 株は 3-OH- $C_{14:0}$ のみを含むリピド IV_A 型のリピド A を持っており、外来脂肪酸転移酵素導入の宿主としては理想的なものであることが判明した。

3. 生育速度および薬剤に対する感受性の変化

野生株 (KGU0107)、二重変異株 (KGU0377)、*pagP* 導入株 (KGU0431)、*C. jejuni* の *lpxL* 導入株 (KGU0441) の生育速度を比較したところ、野生株と比べて KGU0377 株では 37°C での振盪培養における生育速度が遅くなり、定常期に達する時間が約 4 時間から約 8 時間に変化した。これに対して、*pagP* を導入した KGU0431 株では親株とほぼ同じ生育を示すことがわかった。一方、KGU0441 株の生育速度は KGU0377 株

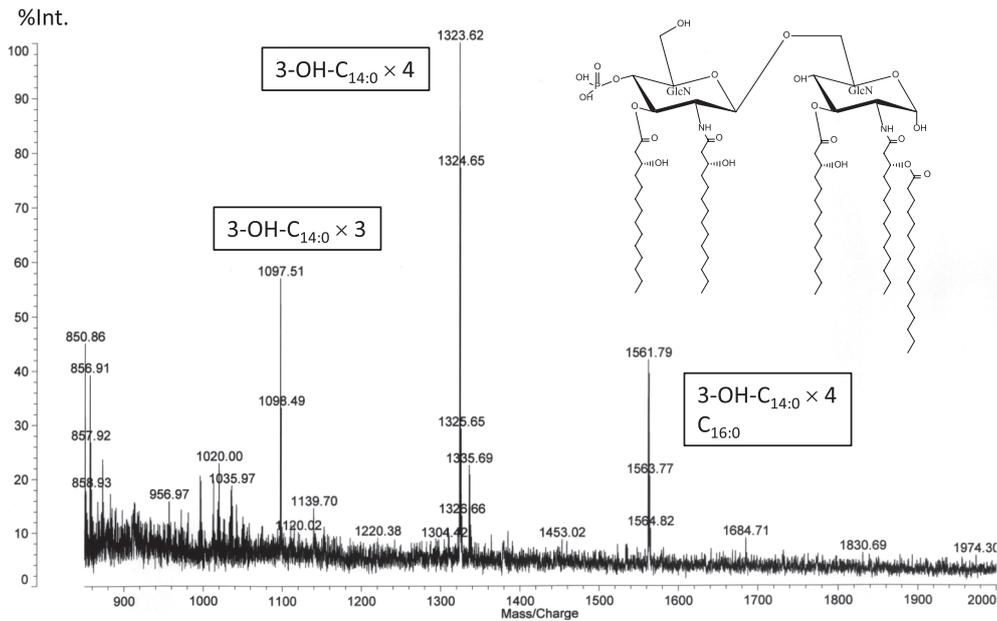


図 1 KGU0431 株由来脱リン酸化リポド A の MALDI-TOF マスペクトル
Negative mode で陰イオン $[M-H]^-$ を検出。

と同様であった。これに対して、30℃では、KGU0377 株と KGU0441 株も野生株および KGU0431 株に匹敵する生育速度を示した。

ポリミキシン B に対する感受性試験においては、KGU0377 株は親株に比べてはるかに感受性であった (MIC 値がそれぞれ 400 ng/mL と 25 ng/mL) が、KGU0431 株と KGU0441 株では MIC 値が 100 ng/mL まで回復した。さらに、腸管にも存在する可能性があるデオキシコール酸についても生育阻害濃度を調べた。その結果、野生株と KGU0431 株では 0.75% で阻害がかけられ始めるのに対して、KGU0377 株と KGU0441 株ではわずか 0.01% で阻害がみられた。

4. $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子導入株リポド A の質量分析

他菌種の $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子を導入した 2 株 (KGU0431, KGU0441) の LPS から 0.1 M 塩酸による加水分解 (100℃, 30 分) で還元末端側 GlcN の 1 位のリン酸基が脱離した脱リン酸化リポド A を調製し、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) により質量分析を行った。その結果、図 1 に示したように、KGU0431 株の脱リン酸化リポド A は m/z 1561.8 に明瞭なピークを示し、3-OH- $C_{14:0}$ 4 分子に加えて $C_{16:0}$ を含むペンタアシル型リポド A が相当量合成されていることが明らかになった。転移された $C_{16:0}$ の結合位置については、詳細な質量分析の結果、予想通り還元末端側の 2 位の 3-OH- $C_{14:0}$ に結合していることが確認された。一方、KGU0441 株の脱リン酸化リポド A では図 2 に

示したように、 $C_{14:0}$ あるいは $C_{16:0}$ を含むペンタアシル型リポド A の小ピーク、および $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ を含むヘキサアシル型リポド A と思われる m/z 1771.9 の小ピークが検出された。*C. jejuni* のリポド A 生合成については、大腸菌とは異なり、これまで知られていなかった転移酵素により非還元末端側の 3' 位に先に $C_{16:0}$ が転移され、その後 LpxL に相同な酵素によって 2' 位にもう 1 分子の $C_{16:0}$ が転移されることが最近報告されている¹⁰⁾。このため現段階では、検出されたヘキサアシル型リポド A がどのような経路で合成されたかを推定するのは難しいが、恐らく 2' 位に $C_{16:0}$ が転移された後、大腸菌本来の LpxM (KGU0377 株では LpxM は正常) により $C_{14:0}$ が 3' 位に転移されたものと推測した。

5. IL-6 産生誘導活性の比較

親株と変異株の LPS による IL-6 産生誘導活性を、ヒト由来 U937 細胞、およびマウス由来 RAW264.7 細胞を用いて測定した。U937 細胞は 100 nM の PMA を加えて培養した後、LPS で刺激した。RAW264.7 細胞は付着細胞を回収し、測定に用いた。LPS 刺激後 6 時間培養し、産生された IL-6 をサンドイッチ ELISA 法で定量した。

その結果、図 3 に示したように、野生株と KGU0377 株の活性には明瞭な差がみられた。これに対して、KGU0431 株の LPS は KGU0377 株 LPS に比べるとわずかに強い活性を示した。とくに、RAW264.7 細胞では有意な差 ($P < 0.05$) がみられた。一方、KGU0441 株 LPS に関しては細胞により異なる結果が得られた。U937 細胞を用いた場合は、KGU0377 株および

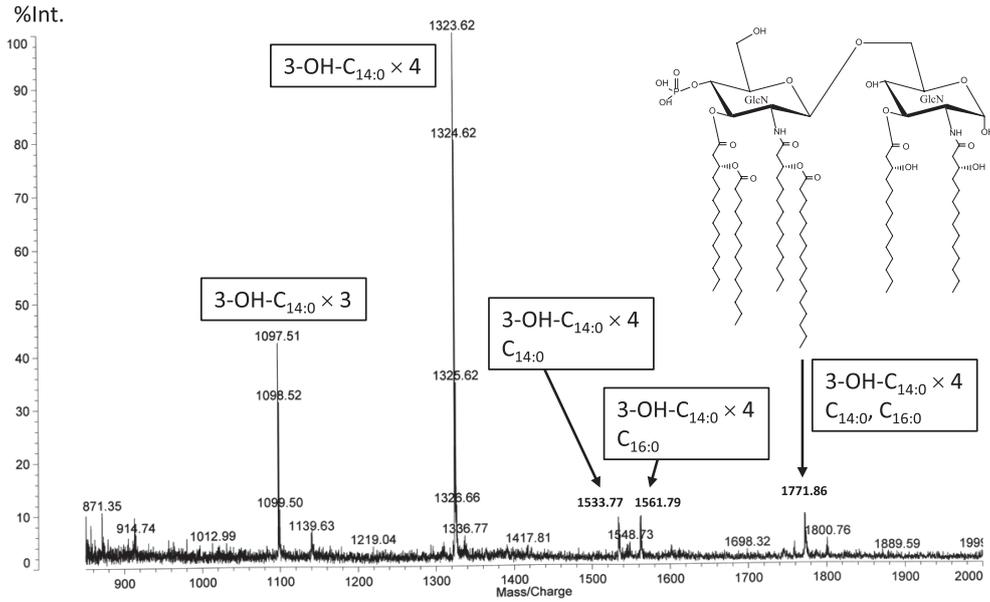


図 2 KGU041 株由来脱リン酸化リポド A の MALDI-TOF マススペクトル
Negative mode で陰イオン $[M-H]^-$ を検出。

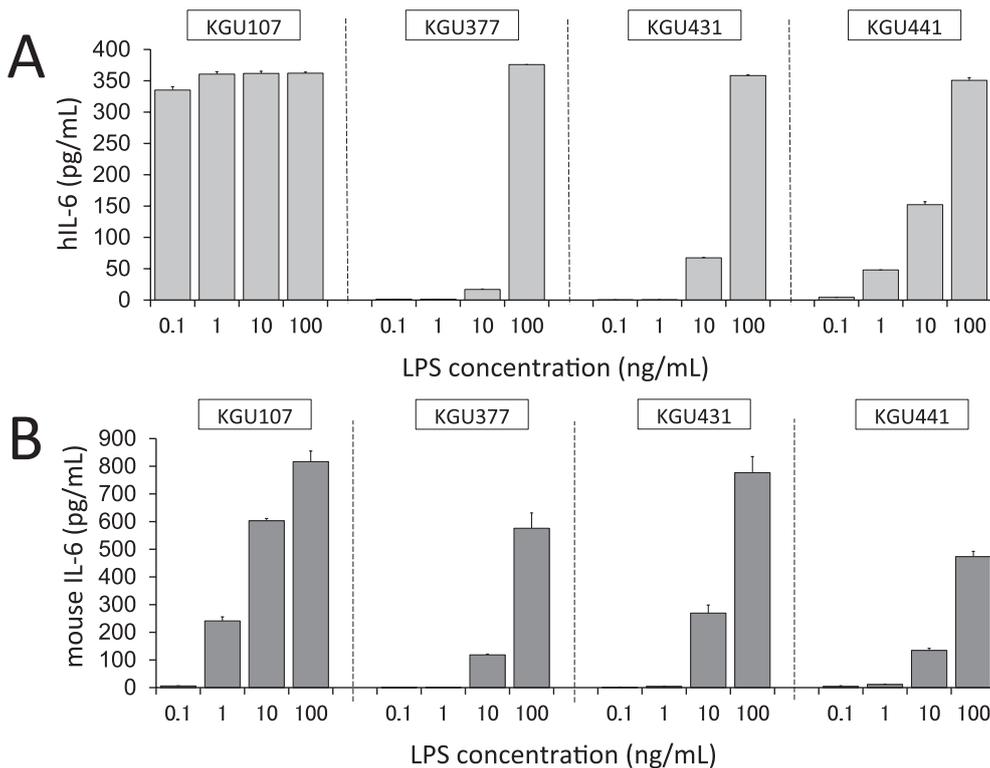


図 3 野生株および変異株由来 LPS による IL-6 産生誘導活性

A : ヒト由来 U937 細胞を使用。B : マウス由来 RAW264.7 細胞を使用。

KGU0431 株 LPS と比べて、明らかに強い活性が得られたが、RAW264.7 細胞に対しては KGU0431 株 LPS よりも活性が弱いことがわかった。野生株 LPS との比較では、KGU0431 株、KGU0441 株ともに明らかに弱く、生育速度や薬剤感受性において $C_{16:0}$ 転移酵素遺伝子の

導入によりかなりの回復がみられたのとは異なる結果となった。すなわち、外膜での機能に比べて、LPS 受容体によるリポド A の構造認識はより厳密であることが示された。

おわりに

これまでリピド A 生合成の後半にはたらく脂肪酸転移酵素の破壊変異株について、いくつかの報告がみられたが、それらの変異株では通常温度 (37°C) における顕著な生育阻害がみられる場合が多かった。しかし、われわれが作製した二重変異株 (KGU0377 株) は 37°C においても野生株の半分程度の生育を示し、30°C では野生株と遜色ない生育を示すことから、有用な変異株ということができる。われわれの結果と同様に、比較的良好な生育を示す変異株も最近報告されている¹¹⁾ ため、リピド A 生合成の不具合を補完する何らかの変異、あるいは適応が起こり、生育良好な株が取得できるものと思われる。現段階では、変異株の種類も少なく、得られた新規リピド A も 2 種類のみであるが、今後、変異株と導入する遺伝子の組合せを検討することにより、さまざまなリピド A が作出できると考えられる。これらの新規 LPS について、アジュバントなどへの有効な利用も期待される。

謝 辞

本研究に携わった多くの関東学院大学工学部、理工学部の学生の皆様に感謝致します。また、IL-6 産生活性測定法に関して、適切なアドバイスを頂いた松浦基博博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Alexander C, Rietschel ET : Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7 : 167-202, 2001
- 2) Imoto M, Yoshimura H, Kusumoto S, et al. : Total synthesis of lipid A, active principle of bacterial endotoxin. *Proc Jpn Acad Sci* 60 : 285-288, 1984
- 3) Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, et al. : Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem* 148 : 1-5, 1985
- 4) Homma JY, Matsuura M, Kanegasaki S, et al. : Structural requirements of lipid A responsible for the functions : a study with chemically synthesized lipid A and its analogues. *J Biochem* 98 : 395-406, 1985
- 5) Raetz CR, Whitfield C : Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71 : 635-700, 2002
- 6) Whitfield C, Trent MS : Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem* 83 : 99-128, 2014
- 7) Clementz T, Bednarski JJ, Raetz CR : Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A : HtrB catalyzed incorporation of laurate. *J Biol Chem* 271 : 12095-12102, 1996
- 8) Vorachek-Warren MK, Ramirez S, Cotter RJ, et al. : A triple mutant of *Escherichia coli* lacking secondary acyl chains on lipid A. *J Biol Chem* 277 : 14194-14205, 2002
- 9) Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, et al. : Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J* 19 : 5071-5080, 2000
- 10) Rubin EJ, O'Brien JP, Ivanov PL, et al. : Identification of a broad family of lipid A late acyltransferases with non-canonical substrate specificity. *Mol Microbiol* 91 : 887-899, 2014
- 11) Schilling B, Hunt J, Gibson BW, et al. : Site-specific acylation changes in the lipid A of *Escherichia coli* *lpxL* mutants grown at high temperatures. *Innate Immun* 20 : 269-282, 2014