

# *Klebsiella pneumoniae* のミリスチン酸転移酵素遺伝子を利用した大腸菌リピド A の改変

川原 一芳, 谷口 千穂, 菅原 健広, 尾之上さくら

関東学院大学理工学部理工学科生命学系

## Modification of *Escherichia coli* lipid A by the introduction of myristoyltransferase gene cloned from *Klebsiella pneumoniae*

Kazuyoshi Kawahara, Chiho Taniguchi, Takehiro Sugawara, Sakura Onoue

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

### Abstract

Late stages of lipid A biosynthesis of *Escherichia coli* are transfer reactions of lauric acid (C<sub>12:0</sub>) and myristic acid (C<sub>14:0</sub>) to the hydroxyl group of 3-hydroxy-myristic acid (3-OH-C<sub>14:0</sub>). In the previous study we constructed the mutant strains with disrupted C<sub>12:0</sub>-transferase and C<sub>14:0</sub>-transferase genes, and used those mutant strains for the modification of lipid A by the introduction of foreign acyltransferase genes. In the study reviewed here, C<sub>14:0</sub>-transferase gene (*lpxL2*) of *Klebsiella pneumoniae* was cloned, and introduced to the mutant strains by transformation to modify the lipid A structure. LPS preparations of the transformants were analyzed through chemical modification and MALDI-TOF mass spectrometry, and were proved to have the lipid A with one C<sub>14:0</sub>, or two C<sub>14:0</sub>, one of which replaced C<sub>12:0</sub> bound to 3-OH-C<sub>14:0</sub> at the C2-position of the non-reducing end glucosamine. The IL-6 inducing activity of the LPS with C<sub>14:0</sub> was measured, and compared with that of the original LPS with C<sub>12:0</sub>. The activity of LPS with C<sub>14:0</sub> was found to be comparable with that of LPS with C<sub>12:0</sub>, suggesting that C<sub>14:0</sub> can replace C<sub>12:0</sub> without changing the immunostimulating activity of lipid A.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 49~53, 2019

**Key words :** リピド A, 脂肪酸転移酵素, 質量分析, IL-6, 大腸菌

### はじめに

リポ多糖 (LPS) の構造, とくに脂肪酸の炭素鎖と結合位置が, LPS が示す免疫活性に重要であることは, 1980 年代の芝, 楠本らによるリピド A の化学合成研究<sup>1)</sup>で明らかになっており, 化学合成の手法を用いれば, 多様なリピド A 誘導体の合成が可能となっている。一方, 大腸菌にさまざまな構造のリピド A を合成させることができれば, 免疫刺激物質を作り出すうえで, 化学合成とは異なる有用な手法となると思われる。活性にかかわる構造の改変という観点からは, 大腸菌リピド A 生合成の後半に付加され分岐鎖構造を形成するラウリン酸 (C<sub>12:0</sub>) とミリスチン酸 (C<sub>14:0</sub>) を他の脂肪酸に置き換える, あるいは結合位置を変化させるという方法が最も容易である。われわれは構造を改変する目的で, 他の研究<sup>2)</sup>を参考に, C<sub>12:0</sub>転移酵素遺伝子, あるいは C<sub>14:0</sub>転移

酵素遺伝子の破壊変異株を作製し, この株にサルモネラの C<sub>16:0</sub>転移酵素遺伝子を導入し, 通常大腸菌が持たない構造のリピド A を合成させることに成功した<sup>3,4)</sup>。同様の手法を使って, さまざまなグラム陰性細菌から脂肪酸転移酵素遺伝子を上記変異株に導入することで, 多様な脂肪酸の分岐鎖構造を持つリピド A を作製できると考えられる。脂肪酸転移酵素について調べていく中で, 最近, *Klebsiella pneumoniae* が大腸菌リピド A の C<sub>12:0</sub> の位置に C<sub>14:0</sub> を転移する酵素遺伝子を持つことが報告された<sup>5)</sup>。そこで, われわれもこの研究を参考に, 同遺伝子をクローニングして変異株に導入し, 上記研究の一環として, リピド A の構造と免疫活性の変化について調べた<sup>6)</sup>。ここでは, その研究内容について解説する。

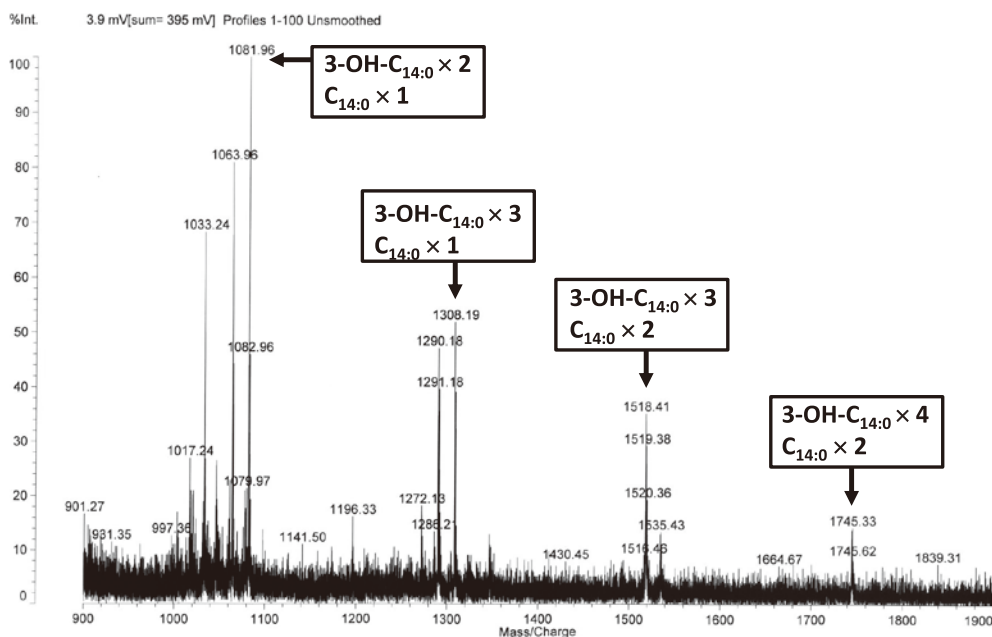


図 1 KGU0485 株 LPS から弱酸加水分解および弱アルカリ加水分解により得られたリピド A 分解物の MALDI-TOF マススペクトル  
Negative mode で陰イオン  $[M-H]^-$  を検出

## 1. ミリスチン酸転移酵素遺伝子の導入によるリピド A 脂肪酸組成の変化

われわれのこれまでの研究で、大腸菌 BL21 由来の野生株 (KGU0107 株),  $C_{14:0}$  転移酵素遺伝子破壊株 (KGU0221 株), および  $C_{12:0}$  転移酵素遺伝子と  $C_{16:0}$  転移酵素遺伝子を破壊した二重変異株 (KGU0377 株) が作製されている<sup>3)</sup>。KGU0221 株は単純に  $C_{14:0}$  を欠く株であるが、KGU0377 株は  $C_{12:0}$  を欠くことにより  $C_{14:0}$  もほとんど持たない株である。 $C_{14:0}$  は  $C_{12:0}$  の後に転移されるため、このような構造のリピド A が得られると考えられている。

*K. pneumoniae* は大腸菌リピド A の  $C_{12:0}$  の位置に、 $C_{12:0}$  あるいは  $C_{14:0}$  を転移するため、 $C_{12:0}$  転移酵素とは別に、 $C_{14:0}$  転移酵素遺伝子 (*lpxL2*) を有していることが報告された<sup>5)</sup>。そこでこの論文に従い、 $C_{14:0}$  転移酵素遺伝子を PCR で増幅し、ベクタープラスミド pUC119 を用いてクローニングした。作製されたプラスミド、pUC119-*lpxL2* を形質転換で上記の変異株 KGU0377 あるいは KGU0221 に導入し、LPS の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーを用いて調べた。その結果、KGU0377 株から得られた形質転換体 KGU0485 株のリピド A、1 分子中の  $C_{14:0}$  量は、約 0.2 分子から 2 分子以上へと増加した。われわれはこの極端な増加は、導入した *lpxL2* の働きだけではなく、 $C_{12:0}$  の位置に  $C_{14:0}$  が転移されることにより、大腸菌本来の  $C_{14:0}$  転移酵素も働いた結果ではないかと推論した。KGU0221 株については、プラスミドの導入によりリピド A の  $C_{12:0}$  がほとんど消失し、その

代わり  $C_{14:0}$  がリピド A あたり約 1 分子に増加した。そこで、この形質転換体を KGU0496 株とした。KGU0496 株において、 $C_{12:0}$  がほとんど  $C_{14:0}$  に置き換わった原因としては、ベクタープラスミドのコピー数 (pUC 系プラスミドは高コピー数)、すなわち遺伝子の量的効果で  $C_{14:0}$  の転移が優先的に起こったと考えられた。

## 2. 質量分析によるリピド A 構造の解析

リピド A 分子中の脂肪酸の数を正確に分析するには、質量分析が適している。われわれの研究室ではこれまでに、LPS を弱酸で加水分解し (0.1 M HCl, 100°C, 30 min), 得られた C1 位脱リン酸化リピド A を MALDI-TOF マススペクトロメトリー (MS) で分析する手法が用いられ、分析データが蓄積されてきた。KGU0496 株および KGU0485 株のリピド A についてもこの方法で分析したところ、最も質量数が高いピークとしては、KGU0485 株では  $m/z$  1745 が検出され、KGU0496 株では  $m/z$  1534 が検出された。これらのピークはそれぞれ、リピド A 中に  $C_{14:0}$  が 2 分子、あるいは 1 分子含まれることを示している。

$C_{14:0}$  の結合位置については、通常の  $C_{12:0}$  の位置に  $C_{14:0}$  が転移されたと考えるのが妥当であるが、これを確かめるため、上記の分析に使用した脱リン酸化リピド A をさらに弱アルカリ条件下 (150 倍希釈トリエチルアミン, 100°C, 2h) で加水分解し、MALDI-TOF MS 分析を行った。その結果、図 1 に示したように、KGU0485 株リピド A については  $C_{14:0}$  を 2 分子持つピークと 1 分子持つピークが検出され、最も強度が強いピークは 3-ヒ

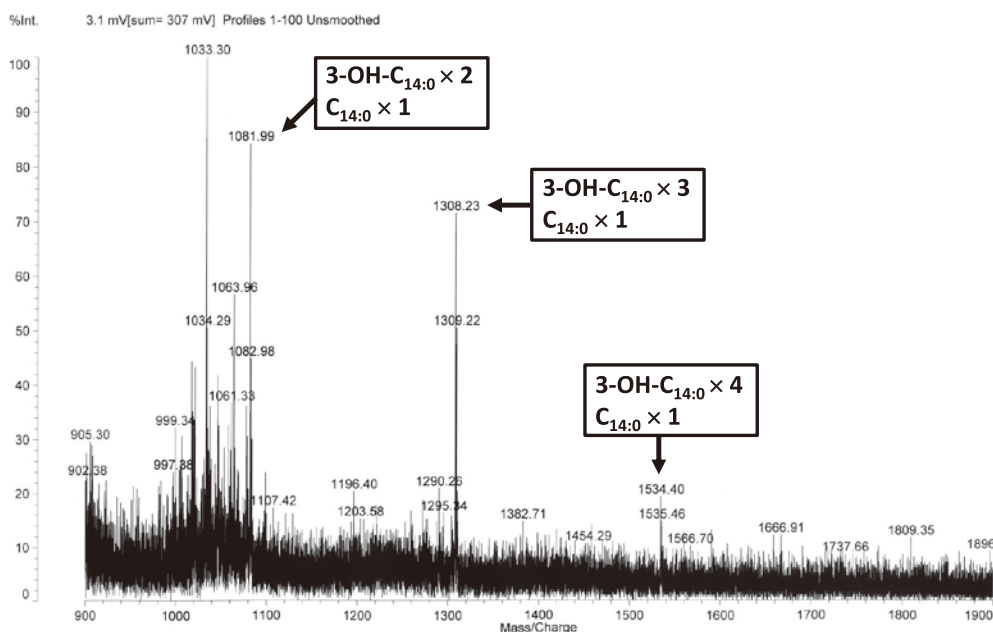


図 2 KGU0496 株 LPS から弱酸加水分解および弱アルカリ加水分解により得られたリポド A 分解物の MALDI-TOF マススペクトル  
Negative mode で陰イオン  $[M-H]^-$  を検出

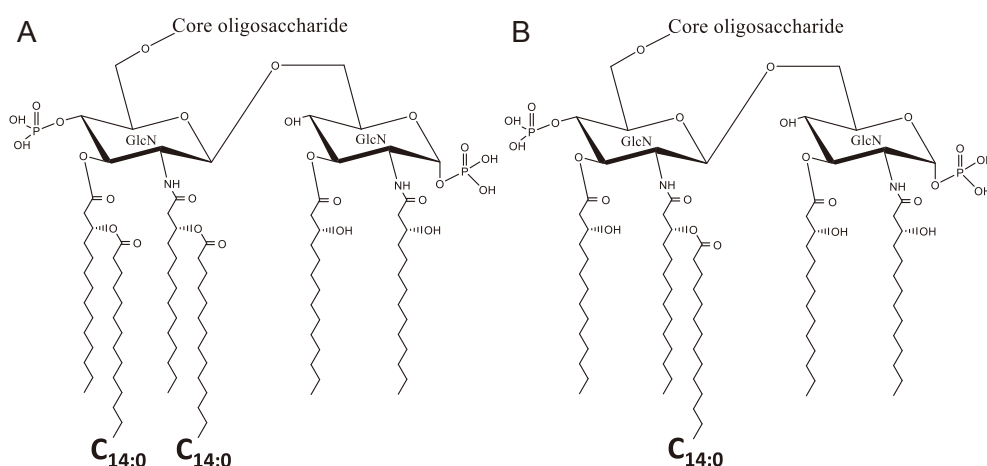


図 3 ミスチン酸転移酵素遺伝子導入株リポド A の推定化学構造  
A : KGU0485 株リポド A の化学構造。B : KGU0496 株リポド A の化学構造

ドロキシミスチン酸 ( $3\text{-OH-C}_{14:0}$ ) を 2 分子,  $C_{14:0}$  を 1 分子含むものであった。すなわち, 1 分子の  $C_{14:0}$  はグルコサミンの C3 位の水酸基に結合した  $3\text{-OH-C}_{14:0}$  に結合しているため弱アルカリ処理で遊離し易く, もう 1 分子は C2 位のアミノ基に結合した  $3\text{-OH-C}_{14:0}$  に結合して比較的安定であることを示す結果が得られた。一方, KGU0496 株リポド A については, 図 2 に示したように, すべてのピークが  $C_{14:0}$  を 1 分子含んでおり,  $C_{14:0}$  はこの弱アルカリ分解により遊離しなかったことがわかった。したがって, この  $C_{14:0}$  はアミノ基に結合した  $3\text{-OH-C}_{14:0}$  に結合していることが示された。なお, これらの  $C_{14:0}$  が還元末端側のグルコサミンに結合した  $3\text{-}$

$\text{OH-C}_{14:0}$  に結合しているのではないことも, 非還元末端グルコサミン由来のオキソニウムイオンの検出と, 他の化学的分解と質量分析の組合せで確認されているが, 詳細については省略する。

以上の情報から, KGU0485 株と KGU0496 株のリポド A を図 3A, 3B のように推定した。いずれの構造も, 本来の  $C_{12:0}$  の位置に  $C_{14:0}$  が置換した構造をとっていると考えられた。

### 3. 改変されたリポド A を持つ LPS の免疫活性

$C_{14:0}$  転移酵素遺伝子の導入により得られた KGU0485 株と KGU0496 株の LPS について, 免疫活性の指標とし

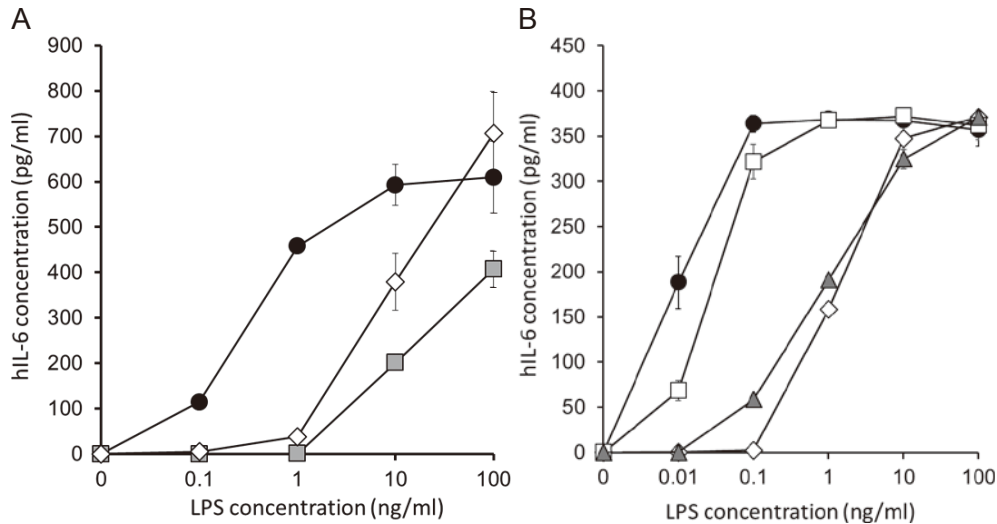


図 4 野生株、脂肪酸転移酵素遺伝子破壊株、およびリポチン酸転移酵素遺伝子導入株由来 LPS の U937 細胞に対する IL-6 産生誘導活性

A : ●, KGU0107 株 (野生株) ; ◇, KGU0221 株 ; ■, KGU0377 株

B : ●, KGU0107 株 (野生株) ; ◇, KGU0221 株 ; □, KGU0485 株 ; ▲, KGU0496 株

て IL-6 産生誘導活性を調べ、元株の活性と比較した。アッセイにはヒト由来単芽球様細胞株 U937 細胞を用い、ホルボールミリスチンアセテート (PMA) を 100 nM になるように加えて 3 日間培養した後、各菌株の LPS で刺激し、6 時間培養した後に培養液中に産生される IL-6 をサンドイッチ ELISA 法を用いて定量した。

図 4A には、野生株 (KGU0107 株) と 2 種類の遺伝子破壊変異株である KGU0377 株と KGU0221 株 LPS の活性を比較した (以前の論文<sup>3)</sup> から抜粋)。KGU0377 株 LPS は  $C_{12:0}$ 、 $C_{14:0}$  いずれも欠いているため、野生株 LPS と比べて活性が極めて弱いことがわかる。これに対して KGU0221 株の LPS の活性は KGU0377 株よりは強く、高濃度では KGU0107 株 LPS と同等の活性を示した。このデータを基に KGU0485 株、KGU0496 株 LPS について測定した結果、KGU0485 株の LPS は野生株である KGU0107 株の LPS と同等の活性を示し、KGU0496 株の LPS は KGU0221 株 LPS と同等の活性を示すという興味ある結果が得られた (図 4B)。前述の通り、KGU0485 株 LPS 中のリピド A は野生株リピド A の  $C_{12:0}$  が  $C_{14:0}$  に置き換わっており、KGU0496 株 LPS 中のリピド A についても KGU0221 株リピド A の  $C_{12:0}$  が  $C_{14:0}$  に置き換わった構造をとっている。したがってこの結果から、 $C_{14:0}$  は免疫活性の面からも  $C_{12:0}$  を代替することができることが明らかになった。これをレセプターの面から考えると、LPS のレセプターである TLR4 は非還元末端グルコサミンの 2 位に結合した 3-OH- $C_{14:0}$  と分岐鎖を形成する脂肪酸の、炭素鎖 2 個の違いを識別しないものと推定された。

## おわりに

リピド A の脂肪酸分岐鎖構造の改変に関して、化学合成の場合は脂肪酸の炭素鎖を変えるのは比較的容易であり、結合位置についても変化させることが可能であると思われる。これに対して、脂肪酸転移酵素の導入によりリピド A 構造を改変する方法は、作製し得る構造が酵素の種類や性質に規定されるという難点がある。しかし、作出できる構造の意外性という面では面白味があるのではないかと思われる。さらに、菌の培養により大量の LPS を容易に得ることができるので、この面では応用の範囲が広がると期待される。今後もさらに他菌種の脂肪酸転移酵素を用いた大腸菌リピド A の改変を行っていく予定である。

## 謝辞

関東学院大学大学院在学中に本研究で用いた変異株の作製を行った伊藤瑞穂氏、大澤絵美里氏、および研究に携わった関東学院大学のすべての学生諸君に感謝致します。また、IL-6 産生誘導活性の測定方法について、有用なアドバイスを頂きました滝本博明博士、松浦基博博士に深謝致します。

## 文献

- 1) Imoto M, Yoshimura H, Kusumoto S, et al. : Total synthesis of lipid A, active principle of bacterial endotoxin. Proc Jpn Acad Ser B 60 : 285-288, 1984
- 2) 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
- 3) Sugawara T, Onoue S, Takimoto H, et al. : Modification

- of lipid A structure and activity by the introduction of palmitoyltransferase gene to the acyltransferase-knockout mutant of *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* 62 : 497-506, 2018
- 4) 川原一芳, 菅原健広, 大澤絵美里, 他 : リポド 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. *エンドトキシン・自然免疫研究* 21 : 51-55, 2018
- 5) Li Y, Yun J, Liu L, et al. : Identification of two genes encoding for the late acyltransferases of lipid A in *Klebsiella pneumoniae*. *Curr Microbiol* 73 : 732-738, 2016
- 6) Taniguchi C, Sugawara T, Onoue S, et al. : Structural modification of *Escherichia coli* lipid A by myristoyltransferase gene from *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Immunol* 63 : 334-337, 2019