

過ヨウ素酸酸化と質量分析による リピド A 脂肪酸結合位置の解析

川原 一芳, 尾之上さくら

関東学院大学理工学部理工学科生命学系

Determination of fatty acid-localization in lipid A molecules by periodate oxidation and mass spectrometry

Kazuyoshi Kawahara, Sakura Onoue

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

Abstract

The immunological activity of LPS is closely related with the localization of fatty acids and the acyloxyacyl structures formed by them in lipid A molecules. MALDI-TOF mass spectrometry (MS) is commonly used to determine the fatty acid localization by detecting oxonium ions derived from non-reducing end glucosamine by the split of glucosamine disaccharide of lipid A. However, alternative method is required because the sensitivity in MS is reduced when the purity of lipid A preparation is not enough. To solve this problem, we developed the method of periodate oxidation. The glucosamine disaccharide of lipid A was split by sodium periodate after reduction with NaBH_4 and hemiacetal ring of reducing end glucosamine was opened. Through this oxidation, non-reducing end glucosamine with fatty acids bound to it remained, and could be detected by MALDI-TOF MS. This method was applied to the wild-type lipid A, and the modified lipid A of *Escherichia coli* strains KGU0485 and KGU0496 constructed in the previous study by the introduction of *Klebsiella acyltransferase* gene. The results indicated that the method was useful for the determination of fatty acid-localization in lipid A molecules.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 54~58, 2020

Key words : リピド A, 脂肪酸結合位置, 質量分析, 過ヨウ素酸酸化, 大腸菌

はじめに

エンドトキシン (LPS) の活性中心であるリピド A の化学構造, とくに脂肪酸の鎖長, および結合位置が, LPS の免疫活性に重要であることは, 1980 年代の大阪大学のグループによるリピド A の化学合成研究で明らかになった¹⁾。これは, LPS 分子内で脂肪酸が形成する疎水領域の特定の形状がレセプターである TLR4 との特異的な会合に必要とされるからである。したがって, リピド A 分子内の脂肪酸の結合位置を決定することは, LPS の活性を予測するために極めて重要であると考えられる。

免疫活性が最も強いとされる大腸菌リピド A の疎水領域は, 還元末端グルコサミンおよび非還元末端グルコサミンの C2 位 (アミノ基) および C3 位 (水酸基) (それぞれ C2 位, C3 位, C2' 位, C3' 位と表現) に酸アミド結合およびエステル結合した 3-ヒドロキシミリステン

酸 (3-OH-C_{14:0}) と, さらに非還元末端グルコサミンに同様に結合した 3-OH-C_{14:0} の水酸基にエステル結合した 2 種類の非ヒドロキシ脂肪酸, すなわちラウリン酸 (C_{12:0}) とミリステン酸 (C_{14:0}) から形成される。われわれはこのような脂肪酸の分岐鎖構造 (アシロキシアシル構造) を形成する大腸菌の C_{12:0} 転移酵素遺伝子, あるいは C_{14:0} 転移酵素遺伝子の破壊変異株を作製し, これらの変異株に他の菌種の非ヒドロキシ脂肪酸転移酵素遺伝子を導入することで, 人工的な構造をもつリピド A を作出することを試みてきた^{2,3)}。このような研究においては, 得られた変異リピド A 中の非ヒドロキシ脂肪酸の結合位置を正確に決定することが必要とされる。われわれは最近の研究において, 従来用いられてきた方法に加えて, 過ヨウ素酸酸化を利用した結合位置の解析方法を開発したので, その方法と有効性について従来法と比較して解説する。

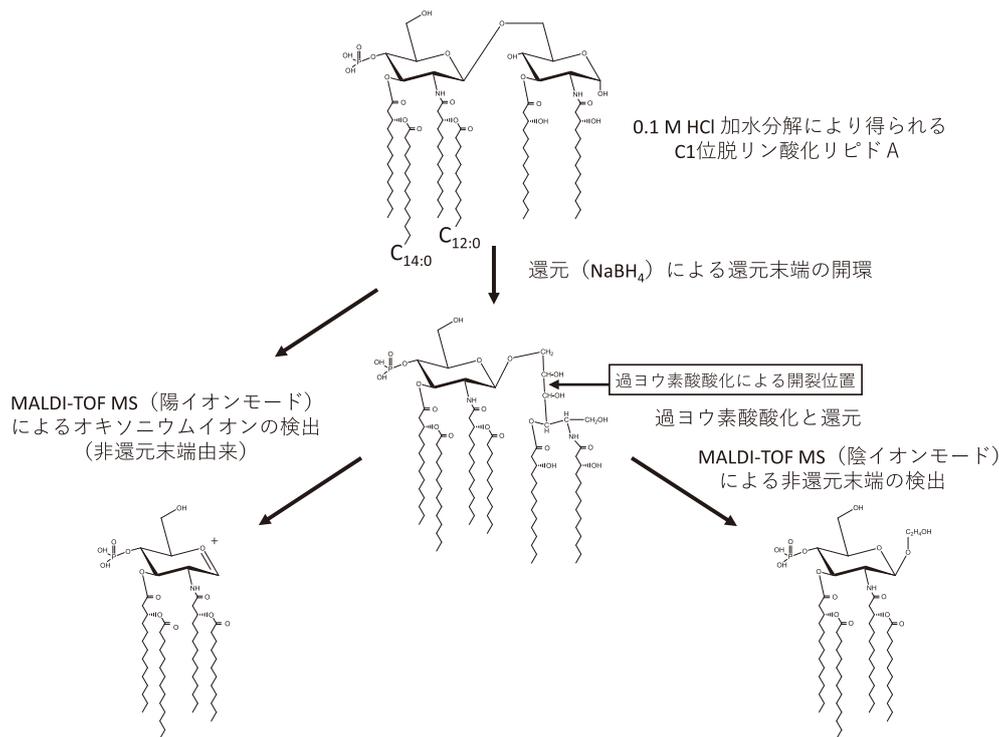


図 1 非還元末端側グルコサミン脂肪酸複合体の検出方法概略

1. 従来法：非還元末端グルコサミン由来オキシニウムイオンの検出

LPS からリポド A を調製するためには、リポド A の糖骨格（グルコサミン二糖）とコア糖鎖間の結合を比較的弱い酸で加水分解する必要がある。この処理で、還元末端側のグルコサミンの C1 位に結合するリン酸の一部は遊離する。われわれは加水分解産物を単純化するために通常、0.1 M HCl, 100°C, 30 min という条件を用いて、上記のリン酸をほぼ完全に遊離させた脱リン酸化リポド A を調製し、分析に用いている。なお、この条件では非還元末端側グルコサミンの C4 位 (C4' 位) に結合するリン酸基は遊離しない。

C1 位のリン酸基の有無にかかわらず、リポド A 分子を Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) で質量分析すると、グルコサミン二糖の間の結合が切れ、陽イオン検出モードで非還元末端側のグルコサミンから生じた陽電荷をもつイオン（オキシニウムイオン）が検出できる。このイオンは非還元末端側グルコサミンに結合した脂肪酸をすべて含んでいるため、この分子量から、結合している脂肪酸の種類が判別できることになる。このような分析の流れを図 1 に示した。なお、非ヒドロキシ脂肪酸が、C2' 位、C3' 位に結合した 3-OH-C_{14:0} のどちらに結合しているか、について、弱いアルカリ条件下の加水分解処理により決定できることは、昨年記述したと

おりである⁴⁾。

2. 過ヨウ素酸化法：還元末端グルコサミンの開裂と得られる産物の検出

前述のように、オキシニウムイオンを検出することによって、非ヒドロキシ脂肪酸のリポド分子内での結合位置を調べることができるが、試料の純度や夾雑物の影響により検出感度が低下し、オキシニウムイオンが明瞭に検出できない場合がある。そこで、われわれは脱リン酸化リポド A の還元末端側グルコサミンの C1 位を水素化ホウ素ナトリウムで還元して開環し、糖アルコールにすることで、グルコサミン二糖の開裂を起りやすくする改良法を考案したが、さらに、より確実に非ヒドロキシ脂肪酸の局在を調べる方法を検討した。

図 1 に示したように、C1 位の還元により得られる糖アルコールには C4 位と C5 位に結合した隣接する水酸基が生じており、このような隣接する水酸基間の炭素結合は過ヨウ素酸による酸化を受けて切断されることが古くから知られている。このような化学反応は予期せぬ非特異的反応を伴うことも多く注意が必要であるが、本研究ではこの酸化法を利用して還元末端側グルコサミンの切断を試みた。最初に野生型リポド A をもつ大腸菌 KGU0107 株の LPS から脱リン酸化リポド A を調製し、C1 位を還元して開環した後、過ヨウ素酸化 (0.025 M NaIO₄, 4°C, 5 日間) を行った。酸化反応の後、常法に従って、生じるアルデヒド基を還元し、得られた産物を

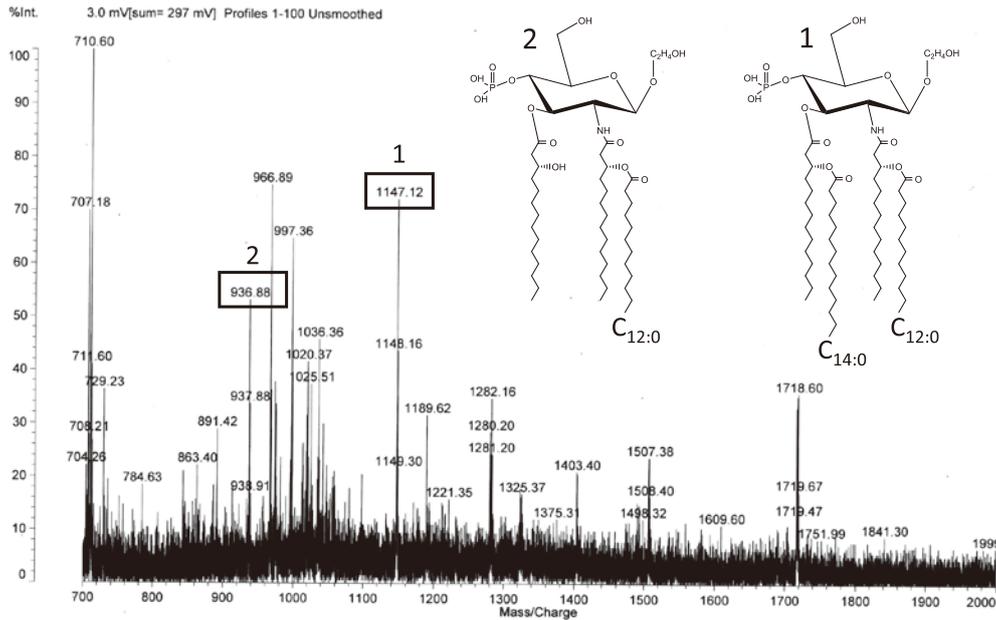


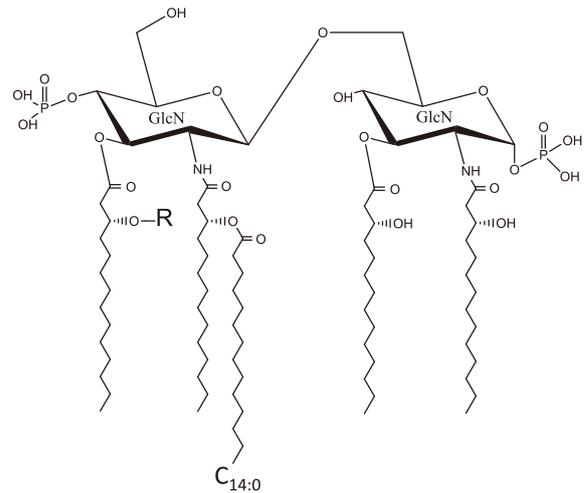
図 2 KGU0107 株 (野生株) リピド A から得られた過ヨウ素酸酸化物の MALDI-TOF マスペクトル

MALDI-TOF MS で分析 (陰イオン検出モードで分析) したところ, 図 2 に示したマスペクトルが得られた。スペクトル中には m/z 1718.60, m/z 1507.38 などの酸化を受けなかった脱リン酸化リピド A 由来のいくつかのピークもみられたが, その中で m/z 1147.12, および m/z 936.88 はそれぞれ図中に示した 1 および 2 の構造をもつ非還元末端グルコサミン由来の陰イオンであると推定された。この結果から, このような過ヨウ素酸酸化法は非ヒドロキシ脂肪酸の局在を調べる方法として使用可能であると考えられた。

3. 脂肪酸転移酵素遺伝子の導入により得られた改変リピド A の構造解析への適用

上記の過ヨウ素酸酸化法を, *Klebsiella pneumoniae* の $C_{14:0}$ 転移酵素遺伝子導入により得られた KGU0485 株および KGU0496 株のリピド A に適用し, その有効性をさらに検証した。これらの株のリピド A は図 3 に示した構造をもっていると推定されている^{4,5)}。

まず, KGU0485 株の脱リン酸化リピド A を還元, および過ヨウ素酸酸化した後, 上記と同様に質量分析したところ, 図 4 に示したスペクトルが得られた。この場合も, 酸化されずに残ったリピド A 由来のピークが多くみられるが, m/z 1175.10 は図 2 の m/z 1147.12 と比較して約 28 mass unit (mu) (CH_2 2 個分) 大きいため, 非ヒドロキシ脂肪酸として $C_{14:0}$ を 2 分子もつイオンであると推定された。すなわち, $C_{14:0}$ は 2 分子とも非還元末端側に存在することがわかった。一方, m/z 964.90 のピークについては, m/z 1175.10 よりも約 210 mu 小さいため, $C_{14:0}$ が 1 分子脱離したピーク ($C_{14:0}$ の分子量 228 から H_2O



KGU0485 株リピド A, R: $C_{14:0}$ ($\text{CO}-C_{13}\text{H}_{27}$)
KGU0496 株リピド A, R: H

図 3 KGU0485 株および KGU0496 株リピド A の推定構造

を差し引いて計算) であると考えられた。

さらに, KGU0496 株由来の脱リン酸化リピド A についても同様の処理をした後に分析したところ, 図 5 に示したように m/z 964.81 の明瞭なピークが主要ピークとして検出された。したがって, この物質はやはり図中に示したような, $C_{14:0}$ を 1 分子もつ構造であると推定された。これにより $C_{14:0}$ が KGU0496 株リピド A の非還元末端側に存在することを証明することができた。

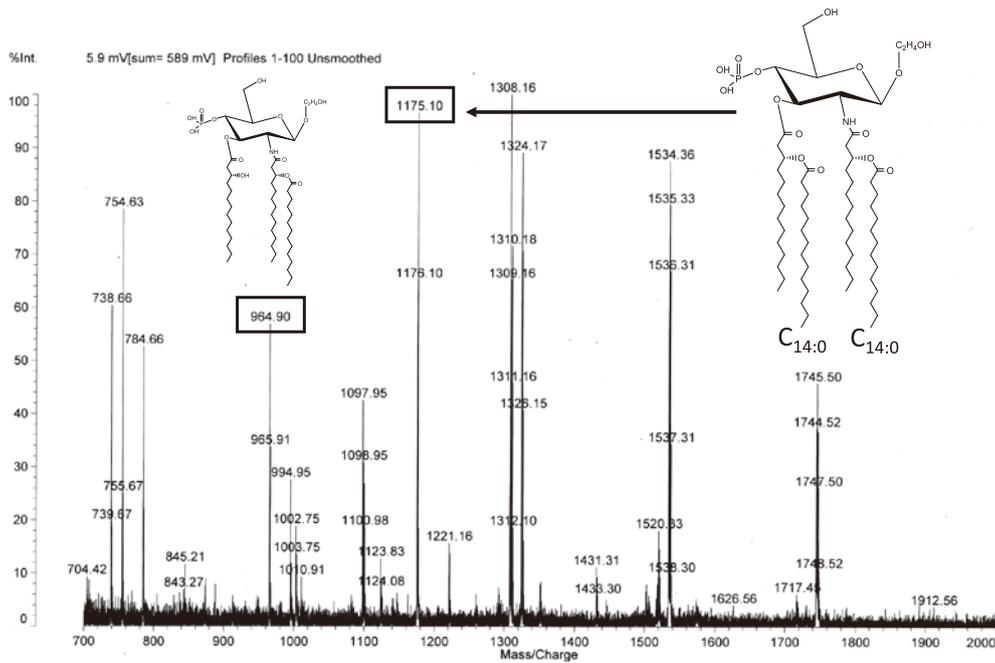


図 4 KGU0485 株リポド A から得られた過ヨウ素酸化物の MALDI-TOF マススペクトル

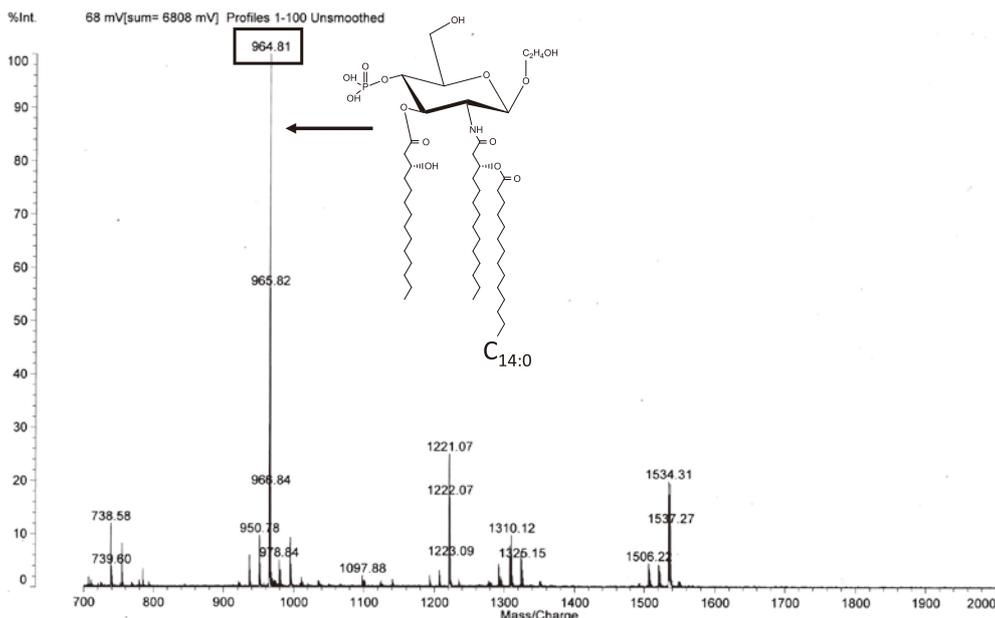


図 5 KGU0496 株リポド A から得られた過ヨウ素酸化物の MALDI-TOF マススペクトル

おわりに

本解説の前半部分で述べた、グルコサミン二糖の開裂により生ずるオキシニウムイオンを検出する方法は有効であるが、試料の純度などにより検出が難しい場合もある。また、研究環境によっては MALDI-TOF MS が使用できないことも考えられる。それに比較して、過ヨウ素酸化により得られるリポド A 非還元末端側由来のグルコサミンと脂肪酸から成る化合物は、より一般的な

分析装置である液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS) でも検出可能であると予想される。したがって、より広く使用することができるのではないと思われる。また、図 5 の図中に示した構造は、以前エンドトキシンの活性の一部を示す化合物として研究された物質⁶⁾と類似している。そこで、この物質が示す免疫活性についても興味を持たれる。図 4 や図 5 でわかる通り、この試料は過ヨウ素酸で酸化、開裂されなかったりリポド A 分子を含んでいるため、このままでは活性測定に用いることが

できないが、精製法の検討と精製物のサイトカイン産生活性測定が今後の研究課題となるだろう。

謝 辞

関東学院大学在学中に本研究で用いた変異株の作製とリピド A の構造解析にかかわった伊藤瑞穂氏、大澤絵美里氏、菅原健広氏、谷口千穂氏をはじめとするすべての学生諸君に深く感謝致します。

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) 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
- 3) 川原一芳, 菅原健広, 大澤絵美里, 他 : 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. エンドトキシン・自然免疫研究 21 : 51-55, 2018
- 4) 川原一芳, 谷口千穂, 菅原健広, 他 : *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. エンドトキシン・自然免疫研究 22 : 49-53, 2019
- 5) 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
- 6) Matsuura M, Yamamoto A, Kojima Y, et al. : Biological activities of chemically synthesized partial structure analogues of lipid A. J Biochem 98 : 1229-1237, 1985