

- C.J. (2008) *Curr. Biol.*, 18, 1456–1465.
- 12) Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., & Marshall, C.J. (2008) *Cell*, 135, 510–523.
- 13) Ueda, S., Fujimoto, S., Hiramoto, K., Negishi, M., & Katoh, H. (2008) *J. Neurosci. Res.*, 86, 3052–3061.
- 14) Kuramoto, K., Negishi, M., & Katoh, H. (2009) *J. Neurosci. Res.*, 87, 1794–1805.
- 15) Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E., & Van Aelst, L. (2006) *Neuron*, 51, 727–739.
- 16) Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J., & Rao, Y. (2008) *Nat. Neurosci.*, 11, 28–35.

加藤 裕教

(京都大学大学院生命科学研究科)

Regulation of cell morphology and motility by Dock family proteins

Hironori Katoh (Laboratory of Molecular Neurobiology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

低温細菌における高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の機能

1. はじめに

高度不飽和脂肪酸 (PUFA) のエイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) は近年、健康食品として注目されている。これらを含む魚の摂取が推奨され、種々のサプリメントが開発されている。これらの脂肪酸はメチル末端から3番目の炭素とその次の炭素の間に二重結合をもつことから ω 3系あるいはn3系脂肪酸と総称されるが、ヒトはこれらを *de novo* 合成できず、EPA や DHA そのもの、あるいはそれらの合成前駆体となる α -リノレン酸を魚や植物から摂取する必要がある。これらの脂肪酸には抗炎症作用があるほか、心疾患発症リスクを抑える効果や脳の正常な発達を助ける効果があると言われている^{1,2)}。脂質メディエーター前駆体となるほか、リン脂質のアシル鎖として生体膜の物理化学的性質に影響を及ぼすが、分子レベルでの詳細な機能発現メカニズムは未だ不明な状態におかれている。

EPA や DHA は一部の細菌においても重要な役割を果たす。細菌は1970年代までPUFAをもたないと考えられていたが、その後、 γ プロテオバクテリアに属する種々の海洋性細菌がEPAやDHAを生産することが明らかにされ、

これらの細菌におけるPUFAの生理機能が注目されるようになった^{3–6)}。1990年代から2000年代にかけて、これらの細菌におけるPUFA生合成遺伝子が明らかにされ、その生理機能を分子遺伝学的手法などで解析することが可能になった^{3,5)}。そのような手法によって、ここ数年、筆者らのグループを含め、いくつかの研究グループによってPUFAの機能解析が進められている。本稿では細菌におけるPUFAの生合成機構と生理機能に関する最近の知見と今後の課題について述べる。

2. PUFAの生合成

ヒトが α -リノレン酸からEPAやDHAを生合成する反応には脂肪酸の伸長反応を触媒する酵素や分子状酸素依存的に二重結合を導入する脂肪酸不飽和化酵素が関与する⁶⁾。ヒトはn3不飽和化酵素をもたないため、n3系PUFAである α -リノレン酸を合成前駆体として摂取する必要があるが、線虫 *Caenorhabditis elegans* やある種のカビはn3不飽和化酵素を含む一連の酵素群を有しており、n3系PUFAの *de novo* 合成を行うことができる⁶⁾。

一方、細菌は、ヒト、線虫、カビなどとは全く異なる経路でn3系PUFAを生合成する^{5,6)}。この反応はポリケチド合成系酵素群と類似した酵素群によって触媒される (図1A)。炭化水素鎖の二重結合は脱水反応によって導入され、脂肪酸不飽和化酵素はこのプロセスに関与しない。したがって分子状酸素は要求されず、嫌気的条件下でもPUFAの合成が可能である。このような生合成経路は γ プロテオバクテリアに属する *Shewanella* 属、*Photobacterium* 属、*Moritella* 属、*Colwellia* 属、*Psychromonas* 属の海洋性細菌のほか、海洋性真核微生物であるラビリンチュラ類でも見いだされている⁵⁾。進化的にかけ離れた生物間に共通した代謝経路が存在することから、n3系PUFA生合成系遺伝子群はこれらの生物間で水平伝播したものと考えられている。これらの微生物は海洋環境における主要なn3系PUFAの一次生産者と考えられており、魚類におけるEPAやDHAの蓄積に大きく寄与していると考えられている。

3. 海洋性低温細菌におけるEPA含有リン脂質の機能

これまでにn3系PUFA生産能が示された細菌のほとんどは海洋性の低温菌である。低温菌は極地や深海など地球上の生命圏のおよそ8割を占める低温環境に生息する⁷⁾。近年、低温菌が生産する低温活性酵素を低温反応プロセスに利用する試みや⁸⁾、低温菌を低温での物質生産の宿主として開発する取り組みがなされており⁹⁾、産業的に注目を

A. EPA の推定生合成経路

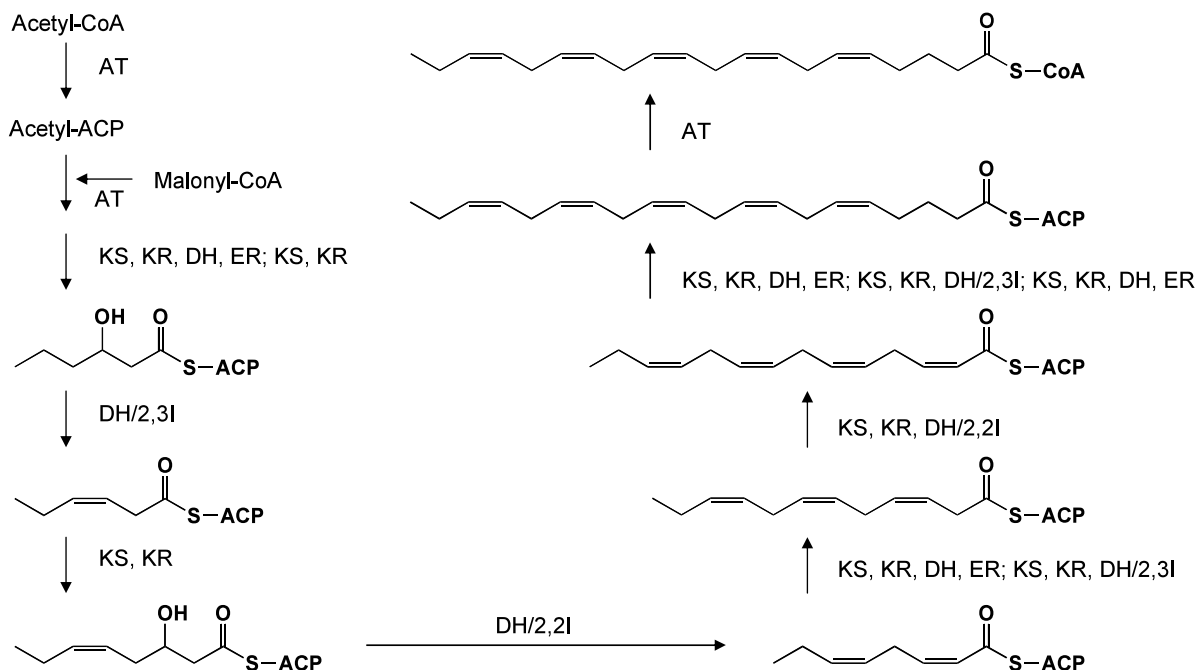
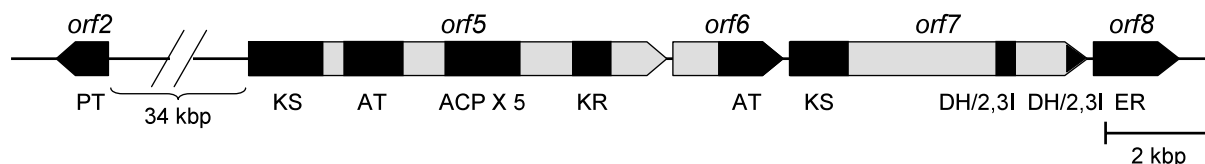
B. EPA 生合成遺伝子クラスター (*S. livingstonensis* Ac10)

図1 細菌における EPA の生合成

(A) EPA 推定生合成経路の概略. (B) *S. livingstonensis* Ac10 の EPA 生合成遺伝子クラスター. 各遺伝子 (*orf2*, *orf5*, *orf6*, *orf7*, *orf8*) がコードするタンパク質の部分配列と相同性を示すタンパク質を下部に示している. ACP, acyl carrier protein; AT, acyl transferase; DH, dehydratase; ER, enoyl reductase; 2,2I, 2-*trans*, 2-*cis* isomerase; 2,3I, 2-*trans*, 3-*cis* isomerase; KR, 3-ketoacyl reductase; KS, 3-ketoacyl synthase; PT, 4'-phosphopantetheinyl transferase (ACP のホスホパンテテイル化を触媒). スラッシュは同一ドメイン上に存在するもの, コマは同一ポリペプチド鎖上に存在するもの, セミコロンは異なるポリペプチド鎖上に存在するものを区切っている.

集めている. 一方, 低温菌がどのような仕組みで低温環境に適応しているのか, 種々の生化学的研究やオミックス研究などで解析が進められている^{10,11)}. 筆者らは, 低温菌の環境適応機構を解析する中で, 低温菌に特徴的に見られる n3 系 PUFA に着目し, これが低温適応に関与する可能性を検討した^{12,13)}.

南極海水由来 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は 4~25°C で良好に生育する低温菌である. 本菌は 4°C 付近で生育する際に EPA を生産する. EPA は全脂肪酸の約 5% を占め, リン脂質 (ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルグリセロール) のアシル鎖として存在する.

一方, 18°C 付近で生育した菌体には EPA は検出されない. このような低温誘導性から, EPA は本菌の低温適応に重要な役割を担うものと推定された.

細菌の n3 系 PUFA 生合成遺伝子群は, *Shewanella pneumatophori* SCRC-2738 において初めて同定されたが³⁾, *S. livingstonensis* Ac10 の全ゲノム解析の結果, それらと相同性の高い遺伝子群が見いだされた (図 1B). その遺伝子群を構成する五つの遺伝子をそれぞれ相同組換えで破壊したところ, いずれの破壊株でも EPA 生合成能が完全に消失することが示された¹²⁾.

得られた EPA 欠損株は本菌にとって比較的高い温度で

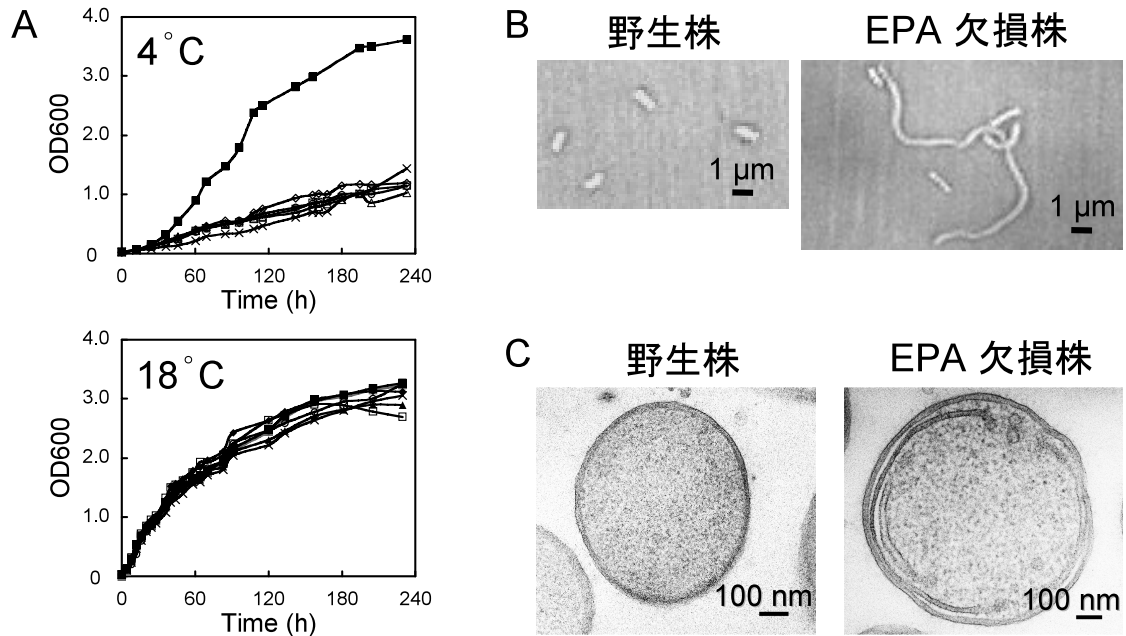


図2 EPA欠損 *S. livingstonensis* Ac10 の生育特性と形態

A. 4°Cと18°Cにおける生育曲線. ■, 野生株; □, $\Delta orf2$; △, $\Delta orf5$; ×, $\Delta orf6$; ◇, $\Delta orf7$; ○, $\Delta orf8$.

B. 4°Cで生育した野生株とEPA欠損株の細胞形態. EPA欠損株では細胞分裂不全による菌体の伸長が見られる.

C. 4°Cで生育した野生株とEPA欠損株の電子顕微鏡写真.

ある18°Cでは野生株と同様に生育したが、4°Cでは著しい生育阻害が見られた(図2A)¹²⁾。一方、EPA含有リン脂質を化学合成し、これをEPA欠損株に添加したところ、4°Cにおける生育の回復が見られた。これにより、EPAが本菌の低温での生育に重要な役割を担うことが示された。さらに詳しく調べた結果、EPA欠損株で細胞分裂が阻害されることや(図2B)、細胞の中に異常な膜系が形成されることが明らかになった(図2C)。

EPAのようなPUFAを含有するリン脂質は一般に生体膜の流動性保持に重要と考えられている。そこで疎水性蛍光プローブであるピレンを用いてEPA欠損株と野生株の流動性を比較した¹²⁾。ピレンは細胞膜内を拡散するが、その際、励起状態にあるピレンが基底状態にあるピレンと励起二量体(エキシマー)を形成すると蛍光が長波長側にずれる。エキシマー形成の頻度は細胞膜内におけるピレンの拡散速度に依存するため、ピレンの蛍光スペクトルを観察することで、膜流動性の指標となるピレンの拡散速度がわかる。この手法により、37°Cで生育した大腸菌と4°Cで生育した *S. livingstonensis* Ac10の膜流動性を同じ測定温度で比較したところ、後者でより高い流動性が見いだされた。この結果は、低温環境で生育する生物は膜の流動性を

高く保つ脂質組成をもつ、という考えを支持するものといえる。一方、4°Cで生育した *S. livingstonensis* Ac10の野生株とEPA欠損株を比較した場合、両者の間で顕著な流動性の違いは見いだされなかった。本菌ではパルミトレイン酸とイソペンタデカン酸がそれぞれ全脂肪酸の43%と27%を占める主要な脂肪酸であり、これらの不飽和脂肪酸と比較的鎖長の短い脂肪酸によって大腸菌よりも高い膜の流動性が確保されているものと考えられた。

ピレンの拡散速度を指標とした解析ではEPA欠損による顕著な流動性変化は見られなかったが、この方法では、疎水性低分子化合物の膜内での拡散という一つの指標で流動性を評価しており、また、この方法で検出できないわずかな、あるいは局所的な流動性変化が原因となって細胞分裂阻害などのフェノタイプが現れた可能性も否定できない。EPAのどのような特性が *in vivo* での機能に重要なか探るため、二重結合の数や位置が異なる種々のEPAアナログを含むリン脂質を化学合成し、それらをEPA欠損株に添加したときのフェノタイプを調べた。その結果、 T_m 値(液晶状態からゲル状態への転移温度)が高い脂肪酸を含むリン脂質で、 T_m 値が低い脂肪酸を含むリン脂質よりも、高い生育回復が見られるケースがあった。ゲル化しや

すく流動性保持効果が小さいと考えられる脂肪酸でより顕著に EPA の代替効果が見られることがあるという結果は、EPA 含有リン脂質が膜流動性保持以外の機能を担っている可能性を示唆するものといえる。

海洋性細菌 *Shewanella marinintestina* IK-1 では、EPA 含有リン脂質が抗酸化能を担うことが示されている¹⁴⁾。本菌の EPA 欠損株は野生株に比べて高い過酸化水素感受性を示す。一方、*S. livingstonensis* Ac10 に関しては EPA 欠損による過酸化水素感受性の増大は認められなかった。このような違いが生じる理由については推測の域を出ないが、EPA 含量の違いが一因である可能性は考えられる。前者の EPA 含量は 20°C で全脂肪酸の 17.5% と報告されており、後者の EPA 含量 (4°C で 5%) よりも多い。抗酸化能を示すには高濃度の EPA 含有リン脂質が必要なのかもしれない。

EPA 含有リン脂質の抗酸化能以外の機能として、特定の膜タンパク質と特異的に相互作用することでそれらの機能や安定性に影響を及ぼす可能性が考えられる。最近、計算機科学的な手法によって、DHA の C-C 結合回転のエネルギー障壁が、飽和脂肪酸のそれよりも小さいことが示された¹⁵⁾。この結果によれば、DHA などの PUFA の C-C 結合回転を伴うコンフォメーション変化は飽和脂肪酸のコンフォメーション変化よりも起こりやすいことになる。膜タンパク質とリン脂質が相互作用する際には膜タンパク質表面の凹凸にリン脂質が結合するものと考えられるが、少ないエネルギーで膜タンパク質の表面にフィットするリン脂質コンフォメーションを生み出す上で PUFA 含有リン脂質の存在は好都合なのかもしれない。少ないエネルギー投資で良いということは温度の低い環境でより重要な意味をもってくと考えられ、PUFA 含有リン脂質の低温での要求性を説明する仮説となりうる。一方、PUFA 含有リン脂質が細菌の膜でマイクロドメインを形成し、特定の膜タンパク質の機能発現に関わっている可能性についても今後検討を加えるべきと考えられる。

筆者らは、*S. livingstonensis* Ac10 の野生株と EPA 欠損株で膜タンパク質のプロテオーム解析を行うことにより、ポーリンタンパク質など、数種の膜タンパク質の含量が EPA の有無に応答して変化することを見いだしている¹²⁾。これらの膜タンパク質やそれらの生合成に関与するタンパク質と EPA 含有リン脂質の間に特異的な相互作用があるのか、それによってこれらの機能や安定性が制御されるのか、今後の検討課題であり、そのような解析を通して PUFA のさらに詳細な生理機能発現の機構が明らかになる

ことが期待される。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は主に京都大学化学研究所で行われたものです。京都大学化学研究所の江崎信芳教授、三原久明助教 (現・立命館大学准教授)、川本純助教、佐藤翔君、京都大学低温物質科学研究センターの佐藤智准教授、茨城県立医療大学の馬場健教授、北海道大学大学院水産科学研究院の細川雅史准教授をはじめとする共同研究者の方々に感謝いたします。

- 1) Lee, J.H., O'Keefe, J.H., Lavie, C.J., Marchioli, R., & Harris, W.S. (2008) *Mayo Clin. Proc.*, **83**, 324–332.
- 2) Innis, S.M. (2008) *Brain Res.*, **1237**, 35–43.
- 3) Yazawa, K. (1996) *Lipids*, **31**, S297–300.
- 4) Satomi, M., Oikawa, H., & Yano, Y. (2003) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 491–499.
- 5) Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V., & Browse, J. (2001) *Science*, **293**, 290–293.
- 6) Wallis, J.G., Watts, J.L., & Browse, J. (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 467–473.
- 7) Russell, N.J. (1990) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **326**, 595–611.
- 8) 栗原達夫, 江崎信芳 (2006) 酵素開発・利用の最新技術 (今中忠行監修), pp. 24–31, シーエムシー出版, 東京.
- 9) Miyake, R., Kawamoto, J., Wei, Y.-L., Kitagawa, M., Kato, I., Kurihara, T., & Esaki, N. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4849–4856.
- 10) Kawamoto, J., Kurihara, T., Kitagawa, M., Kato, I., & Esaki, N. (2007) *Extremophiles*, **11**, 819–826.
- 11) Kurihara, T. & Esaki, N. (2008) in *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* (Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.-C., & Gerday, C. eds.), pp. 333–344, Springer.
- 12) Kawamoto, J., Kurihara, T., Yamamoto, K., Nagayasu, M., Tani, Y., Mihara, H., Hosokawa, M., Baba, T., Sato, S.B., & Esaki, N. (2009) *J. Bacteriol.*, **191**, 632–640.
- 13) Sato, S., Kurihara, T., Kawamoto, J., Hosokawa, M., Sato, S. B., & Esaki, N. (2008) *Extremophiles*, **12**, 753–761.
- 14) Okuyama, H., Orikasa, Y., & Nishida, T. (2008) *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 570–574.
- 15) Feller, S.E. (2008) *Chem. Phys. Lipids*, **153**, 76–80.

栗原 達夫

(京都大学化学研究所)

Function of phospholipids containing polyunsaturated fatty acids in cold-adapted bacteria

Tatsuo Kurihara (Institute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan)