

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	大腸菌におけるポリプレニルニリン酸の脱リン酸化反応の解析
作成者（著者）	實川, 智貴
公開者	東邦大学
発行日	2024.03.13
掲載情報	東邦大学大学院理学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 岸本利彦
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1117号
学位記番号	甲第177号
学位授与年月日	2024.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225102

論文要旨

氏名 實川 智貴 ⑩

論文題目

大腸菌におけるポリプレニルニリン酸の脱リン酸化反応の解析

論文要旨

大腸菌の主な長鎖ポリプレニルニリン酸は、IspU/Rth の触媒により生成する炭素数 55 のウンデカプレニルニリン酸(C₅₅PP)、および IspB の触媒により生成し、イソプレノイドキノン側鎖になる炭素数 40 のオクタプレニルニリン酸(C₄₀PP)である。リポドホスファターゼ BacA, PgpB, YbjG により C₅₅PP が脱リン酸化されウンデカプレニルリン酸(C₅₅P)が生成する。C₅₅P はペプチドグリカンなどの細胞外多糖の合成の際に、糖のキャリアとして働き、生存に必須であることから、細菌内での C₅₅P 含量は調節されていると考えられる。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた C₅₅P の定量法は報告されている。また事前にアルカリ処理をすることにより、C₅₅PP や C₄₀PP に糖が結合した全ての C₅₅P 誘導体を加水分解して C₅₅P に導き、全 C₅₅P 含量が測定されていた。しかし C₅₅PP のみの定量法の報告はなく、細胞内 C₅₅PP 含量は明らかになっていない。

本研究では HPLC を用いた大腸菌のポリプレニルニリン酸の定量法の開発を行った。まず HPLC 条件を検討するために、黄色ブドウ球菌 RN4220 から抽出および精製したポリプレニールをリン酸化することにより、ポリプレニルニリン酸を合成した。C18 逆相カラムを用いて、溶媒を 25 mM テトラエチルアンモニウムリン酸(pH7.5)-2-プロパノール(40:60 v/v)で分析し、210 nm で検出した。保持時間は C₅₅PP が 21 分、C₄₀PP が 6.6 分であり、定量することが可能になった。次に 6 時間培養した大腸菌 XL-1 Blue/pUC118, pCL1921 から脂質を Bligh-Dyer 法により抽出し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。これを HPLC で分析すると、乾燥菌重量 1 g 当たり C₅₅PP 7.7 nmol、C₅₅P 297.5 nmol、全 C₅₅P 581.1 nmol であった。また C₄₀PP 42.3 nmol、C₄₀P 201.2 nmol、全 C₄₀P は 215.2 nmol であった。C₅₅P と C₅₅PP の合計と全 C₅₅P 含量の差が C₅₅P に糖が結合した C₅₅P 誘導体の総量だと考えられる。C₅₅PP はあまり蓄積されていないことから、菌体内では C₅₅PP は効率よく脱リン酸化されていることが示唆された。C₄₀P は C₅₅P の生成に関わるホスファターゼにより生成すると考えられるが、役割があるのかは不明である。最後にリポドホスファターゼ欠損による C₅₅PP の脱リン酸化への影響を調べた。BacA が全 C₅₅PP 活性の 75% を占める主要なホスファターゼであるとされている。bacA の欠損株では、定常期で C₅₅PP 含量が 9.7 nmol/g であり、親株と比較して 6.5 倍増加したが、C₅₅P 含量は 326.1 nmol/g であり、C₅₅P と比べ C₅₅PP の細胞内含量はわずかであった。他の欠損株でも同様の結果が得られ、C₅₅PP はリポドホスファターゼが 1 つあれば、ほとんど蓄積されずに脱リン酸化されていることが明らかになった。

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2021 年入学	研究分野 分子生物学	氏名 實川 智貴
審査委員	(主査) 理学部 教授 岸本 利彦 (副査) 理学部 教授 佐藤 浩之 (副査) 理学部 教授 渡邊 総一郎 (副査) 理学部 教授 藤崎 真吾	
(論文題目) 大腸菌におけるポリプレニルニリン酸の脱リン酸化反応の解析		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨) ウンデカプレニルリン酸 (UP) は細菌の細胞壁合成に必須の物質である。抗菌薬耐性菌の出現が問題視されるなか UP の生成経路は新規抗菌薬の標的として有望視されている。UP の新規性合成においてはイソプレノイド鎖延長反応により細胞内で合成されたウンデカプレニルニリン酸 (UPP) の脱リン酸化反応により生成する。細胞壁合成経路では、細胞膜内側において UP から生成する糖脂質中間体が特異的なフリッパーゼの作用により細胞膜外側に移動する。細胞膜外側で細胞壁多糖鎖の伸長とともに UPP が遊離し、この UPP の脱リン酸化反応により UP が再生する。UPP の脱リン酸化反応が制御される可能性があるが、細胞内の UPP と UP を分別定量した例がなく、 <i>in vivo</i> における UPP の脱リン酸化反応の変動については明らかではない。 論文提出者は、ポリプレニルニリン酸の定量法を検討し大腸菌の UPP と UP の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分別定量を可能にした。イソプレノイド生合成系遺伝子の多重化によりポリプレニルニリン酸合成が亢進した株に適用して分析法の有効性を確認し、さらに、リピドホスファターゼ遺伝子破壊株に適用して UPP 脱リン酸化への各遺伝子産物の寄与を解明した。 分析条件を検討するために黄色ブドウ球菌からポリプレノールを得て化学的にリン酸化して標準物質を調製した。すなわち、定常期まで培養した黄色ブドウ球菌をアルカリ処理しポリプレノールをヘキサンで抽出して、ヘキサン抽出物をクロマトグラフィーによりヘキサプレノール、オクタプレノール、ノナプレノールを含む all- <i>E</i> -ポリプレノール画分とウンデカプレノールを含む <i>Z,E</i> -ポリプレノール画分に分別した。これらを化学的にリン酸化してイオン交換カラムクロマトグラフィーによりポリプレニルリン酸とポリプレニルニリン酸に分別した。ポリプレニルニリン酸画分をイオンペア試薬としてテトラエチルア		

ンモニウムリン酸を含む溶媒により逆相カラムにより HPLC 分析して炭素数 35 から炭素数 55 までのポリプレニルニリン酸を個別のピークとして検出した。

市販の all-*E*-ノナプレノールから合成した all-*E*-ノナプレニルリン酸、all-*E*-ノナプレニルニリン酸を内部標準物質として加え、大腸菌のオクタプレニルリン酸、オクタプレニルニリン酸、ウンデカプレニルリン酸、ウンデカプレニルニリン酸を定量した。アルカリ加水分解により全てのポリプレニルリン酸誘導体をポリプレニルリン酸に導いてから HPLC により分析する従来の定量法と今回確立したポリプレニルリン酸とポリプレニルニリン酸の分別定量法による結果を比較することにより、UPP は UP の数%以下の量にとどまるのに対し UP に糖が結合した糖脂質中間体の量は UP と同程度であることが判明した。

大腸菌において UPP の脱リン酸化に関わるとされる *bacA*, *pgpB*, *ybjG* それぞれの単独欠損株および二重欠損株の UP および UPP を定量した。野生型株において UPP 含量は UP 含量の 1%以下であるのに対し、*bacA* 欠損株および *bacA* 欠損を含む二重欠損株で UPP の割合が 3%から 9%程度と高くなった。これらの *bacA* 欠損を有する株は、野生型株と比較して、抗生物質バシトラシンに対する感受性がやや高くなっていった。*in vitro* の UPP ホスファターゼ活性の比較では BacA の活性が全体の 75%を占める。*in vivo* においても *bacA* 欠損の影響が他の遺伝子の欠損の影響より大きかったが、他のホスファターゼだけでも UP の量はあまり変わらず UP の供給には十分な活性が残るようであった。

大腸菌の UPP を直接 HPLC により測定したのは本研究が初めての報告である。過去にアルカリ加水分解前後に UP を定量し、アルカリ加水分解後の UP 含量とアルカリ加水分解前の UP 含量の差を UPP 含量と見積もった報告があり UPP 含量は UP 含量と同程度か上回るとされていたが、本研究における測定により UPP 含量は常に低く、むしろ糖脂質中間体含量が高いことが明らかになった。糖中間体生成の制御に関する説明は今後の問題である。

審査会において、審査委員からの UPP および糖脂質中間体蓄積の意味、分析手段採用の理由、今後の展望などの質問に対して論文提出者は的確に解答した。審査委員は、論文提出者が内容を理解して主体的に研究を進めたこと、周辺領域に関しても十分な知識を有することを確認した。本研究の主要部分は日本農芸化学会の英文誌 *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* への掲載が決まっている。また、論文提出者は、日本生物工学会の英文誌 *Journal of Bioscience and Bioengineering* に掲載されたポリプレニルリン酸の分析法に関わる本研究の前段階の研究にも参画して第二著者となっている。

以上の結果より、審査委員は一致して論文提出者が博士（理学）の学位を受けるのに十分な学力と資格を有すると認めた。

最終審査の結果の要旨

2021 年入学	研究分野 分子生物学	氏名 實川 智貴
審査委員	(主査) 理学部 教授 岸本 利彦 (副査) 理学部 教授 佐藤 浩之 (副査) 理学部 教授 渡邊 総一郎 (副査) 理学部 教授 藤崎 真吾	
成績 合格		
<p>(最終試験結果の要旨)</p> <p>審査委員 4 名は、論文提出者に対して 2024 (令和 6) 年 2 月 16 日、博士論文の内容およびその関連項目につき口頭試問を行った結果、全員一致して合格と判定した。</p>		