

*Ralstonia* sp. NT80 EliA タンパク質の

## 高級アルコール資化への関与に関する研究

A study on involvement of EliA protein in fatty alcohol assimilation  
in *Ralstonia* sp. NT 80応用化学専攻 千濱 良太  
CHIHAMA Ryota

## 1. 緒言

$\beta$ -プロテオバクテリアに属する *Ralstonia* sp. NT-80 は、高級アルコールを誘導剤としてリパーゼを多量に生産する。特に Stearyl alcohol (StOH) を誘導剤として添加すると、一般的な誘導剤である Olive oil を添加した時と比較して、リパーゼの生産量は約 17 倍になることが見出されている<sup>1)</sup>。高級アルコールによるリパーゼ生産誘導時には、界面活性作用を有するタンパク質、EliA が大量に分泌される。EliA は Olive oil 等の油脂や脂肪酸を誘導剤としたときにはほとんど分泌されない。また *eliA* 遺伝子破壊株では培養上清中に StOH が残存し続けることに加え、リパーゼ生産効率が著しく減少することから、EliA が高級アルコールによるリパーゼ生産誘導において重要な役割を果たしていることが分ってきた<sup>2)3)</sup>。しかし、どのようにして EliA がリパーゼ生産誘導に関与するのか、その詳細は明らかになっていない。

そこで本研究では EliA の機能を明らかにすることを目的とした。そのためのアプローチとして StOH の乳化状態に着目し培養上清濁度の経時変化をモニタリングした。一方、高級アルコール添加時には細胞膜の形状が変化することが観察されているが、*eliA* 遺伝子破壊株 ( $\Delta eliA$ ) ではそのような変化は起こらない<sup>4)</sup>。そこで高級アルコール添加時における膜組成変動及び細胞表面特性変動を明らかにすることを試みた。

## 2. 実験

## 2. 1 NT-80 の培養・経時観察

NT-80 wt (野生株) と  $\Delta eliA$  を stearyl alcohol 1% 添加、または添加していないポリペプトン培地で 30°C、最大 72 時間の培養を行った。Rhamnolipid を培養液に加える際には 150  $\mu\text{g/mL}$  を培養開始から 12 時間前に加えた。

## 2. 2 Rhamnolipid 生産量測定

各時間の培養上清からメタノール-クロロホルム系で Rhamnolipid を抽出した。その後中性糖を検出する Orcinol assay に従い A<sub>421</sub> を測定し、検量線より Rhamnolipid 生産量を算出した。

## 2. 3 細胞表面疎水性測定

培養開始から 48、72 時間後の細胞を PUM buffer で洗浄後 BATH-TEST に従い水層からの n-ヘキサデカン層への移動度から細胞表面の疎水性を算出した。

## 2. 4 リパーゼ活性測定

培養開始から 12、24、36、48、72 時間後の培養上清中のリパーゼ活性を PNPL 法に従い *p*-nitrophenyl laurate の加水分解反応による A<sub>405</sub> の吸光度変化から算出した。

## 2. 5 細胞の脂肪酸組成解析

NT-80 wt と  $\Delta eliA$  を stearyl alcohol 1% 添加、または添加していないポリペプトン培地で 30°C、72 時間培養した菌体について、炭素数 12~20 の脂肪酸組成分析を株式会社テクノスルガ・ラボに外注した。

### 3. 結果及び考察

#### 3. 1 培養上清濁度経時変化測定

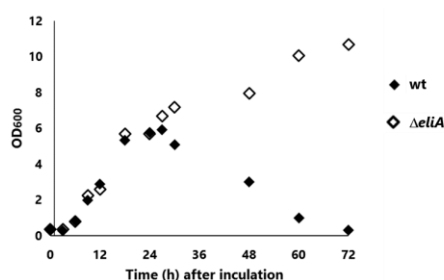


Fig.1 培養上清濁度変化

StOH の乳化により上昇する培養上清の濁度の測定を行った。野生株では StOH の資化によって濁度が低下するが、 $\Delta eliA$  ではそれが見られない。しかし少なくとも、24 時間後までの StOH の乳化には  $EliA$  は関与していないように見える。この結果から、 $EliA$  による StOH 乳化作用は小さいと言える。対数増殖期から濁度が上昇したことから細胞との接触、また定常期に入る 12 時間後から再度濁度上昇していることから、Rhamnolipid のような界面活性糖脂質生産により乳化が進行したのではないかと考えられる<sup>5)</sup>。

#### 3. 2 Rhamnolipid との相互作用

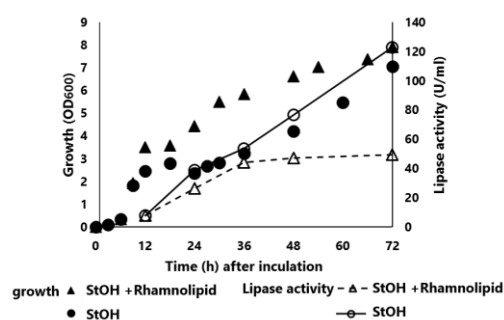


Fig.2 Rhamnolipid 添加による影響

NT-80 は培養開始から 12 時間後から Rhamnolipid の誘導が始まり最大 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に達することを確認した。Rhamnolipid を培養開始時から添加したところ、おそらく StOH の代謝により増加する細胞の増加時刻が早まり、wt では StOH の資化が促進されることが確認できた。しかし、リパーゼ生産に関しては有意な変化を確認することができなかった。このことから StOH の資化のみがリパーゼ生産を誘導するのではないことが明らかになった。

#### 3. 3 細胞表面特性の変動

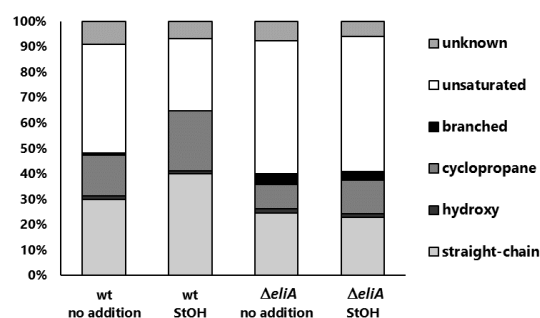


Fig.3 細胞脂肪酸組成解析結果

StOH 添加によるリパーゼ超誘導時には、疎水性分子との接着時に有利とされる細胞表面疎水性の向上は確認できなかったが、長鎖直鎖の飽和脂肪酸の割合が増加することが明らかとなった。これは疎水分子である StOH の膜二重層間隙での蓄積により膜機能不良が引き起こされることを防ぐために、細胞が膜流動性を低下させたのではないかと考えられる。

### 4. 結言

StOH の取り込みとリパーゼ超誘導において重要な役割を果たしていることが示唆されている  $EliA$  は StOH の乳化、細胞表面疎水性への関与がないことが明らかとなった。Rhamnolipid 添加により StOH の資化促進は観察できたがリパーゼの誘導促進は確認できなかった。またリパーゼの超誘導時には細胞脂肪酸組成が変化することを確認した。

### 参考文献

- 1) Ushio, K. *et al.*, *Biotechnol. Tech.* **1996**, *10*, 267–272.
- 2) 石橋隼 修士論文 2010 年度
- 3) Akanuma, G. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *339*, 48–56.
- 4) Akanuma, G. *et al.*, *Microbiol.* **2016**, *162*, 408–419.
- 5) Hisatsuka, K. *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41* (3), 445–450.

### 【対外発表リスト】

第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 (ポスター)