

黄色ブドウ球菌リン脂質のミセル構造の特性

岡山大学医学部細菌学教室 (主任: 金政泰弘教授)

奥 欽 也

(昭和55年6月3日受稿)

Key words: *S. aureus*, Ultrastructure of phospholipid micell, Calcium effect on phospholipid.

結 言

黄色ブドウ球菌の細胞膜を構成しているリン脂質はホスファチジルグリセロール(phosphatidylglycerol: PG), リジルホスファチジルグリセロール(Lysylphosphatidylglycerol: L-PG), カルジオリピン(Cardiolipin: CL)及びホスファチジン酸(phosphatidic acid)である¹⁾. それらの構成々分比は生理的条件下ではPG50%, L-PG 25%, CL20%及びPA 5%であるが, その比はブドウ球菌の培養条件, 環境条件により変動する²⁾. 特にブドウ球菌が高塩濃度下で生育したり, 細胞壁を欠落した状態(L-form化)などいわゆるストレスのかかった状態では, CLが50~60%に増加し, PGが比較的減少してくる³⁾. しかし他のL-PGやPAにはほとんど変動は認められない.

ブドウ球菌の細胞膜のCLはPG 2分子より膜に局在するCL合成酵素によって合成されるが⁴⁾ CLの増加の生理的意味は, リポソームを用いてのNaイオンやグルコースの透過実験などから細胞膜の障壁性の増強(barrier能)にあることが示唆されている²⁾. しかし一方においては, CL合成酵素の性状, 特に至適pHが4.0, 反応はCL側に傾いている^{5,6)}ことから推察すると, PGからCLの合成はより終末産物的であるかもしれない.

CLの生物化学的特徴は極性部が2分子のリン酸であり, 強い酸性を示すこと, 4分子の脂肪酸でもって疎水性も強く, 分極性が強いこと, さらに他のリン脂質と異なり免疫原性のあるこ

とである⁷⁻¹⁰⁾. これらの特性から推測すると膜内のカルジオリピンの増加は, 細胞膜の構造に何らか積極的役割を与えているとも考えられる.

そこで本論文ではブドウ球菌から各リン脂質を精製純化し, その各成分のミセル形成の特徴, 電子顕微鏡下における超微形態の特性について調べ, さらに各成分を種々の割合で混合しリポソームを再構成した形態と比較し, 各リン脂質の細胞構造, 特に脂質2重層における特異性について検討した.

材料および方法

菌は *Staphylococcus aureus* 209P FDA株を教室で馴化継代したものを供した. 培養には液体ブイヨン(ニッスイ・東京)を用い逆T字管(200ml)による37℃振とう法(40サイクル/分)によった. 菌は後期対数増殖期に遠沈法により集菌し, 0.85% NaCl液で3回洗浄して脂質の抽出精製に供した. 粗脂質の抽出, リン脂質分画の精製はFolchi法¹¹⁾によった.

各リン脂質の精製は, リン脂質分画を更にユニシルカラム(Clarkson Chemical CO. INC pennsylvania)¹²⁾で分画し, 純リン脂質の分画を分離用シリカゲルG薄層クロマトグラフィー法¹³⁾で分別抽出した. 精製したPG, CL, L-PGは薄層クロマトグラフィー上でワン・スポットであることを確認して実験に供した.

リポドミセルの作成はクロロホルム・メタノール(2/1, V/V)中の脂質0.5~1.0mgをエバポレーターで減圧乾固した後, 室温(20~25℃)に保ちながら1mlの緩衝液(100mM, NaCl, 5mM,

PIPES, pH7.4)を加え径0.5mmのガラス玉を少量共存させ1分間ボルテックスで強振して懸濁液とした。Mg²⁺やCa²⁺の影響をみるときは緩衝液に5mM MgCl₂, および1mM CaCl₂を添加してミセルを作成した。ネガティブ染色には、リンタングステン酸(1%水溶液pH7.0), ウラニル酢酸(1%水溶液pH4.0)およびモリブデン酸アンモニウム(1%水溶液pH7.0)を用いた¹⁴⁾。試料の作成にはコロジオン又はホルムバルの膜にカーボン蒸着した後親水処理(エイコーIB-3)したグリッドを用いた。

フリーズ・フラクチャー法は、リピッドミセルを105.000×g30分間で遠沈した沈渣をフリーズ、フラクチャー用の試料皿にのせ、液体窒素で急冷し、FD-2型(日立)を用いて割断した。シャドウイングにはプラチナカーボン又はプラチナを用いた。超薄切片法は、ミセル懸濁液を105.000×g30分間超遠心して得た沈渣を2%グルタルアルデヒド1%オスミック酸2重固定した後、エタノール脱水、エポン包埋しMT-2型で薄切片し、酢酸ウラン、酢酸鉛の2重染色で鏡検(H-500, 日立)した¹⁵⁾。

結 果

1) ミセル作成の条件とネガティブ染色の条件の検討

ミセル作成の緩衝液pH, 温度, 混合法の条件について検討した。緩衝液のpHは4~8℃の間では大差はみられなかった。しかしpH8.0以上ではネガティブ染色でコントラストが悪くなり観察は困難である。ネガティブ染色液のpHは4.0~7.6に調節してもその構造に影響を与えていなかった。ミセル作成の温度はその構造に微妙な変化を与えている。0~4℃で作成したミセルは親水化したグリッドにも試料が載り難くネガティブ染色でもコントラストが悪かった。室温20~25℃で作成したものはその構造に再現性があり一定性を認めたので、本研究では20~25℃の条件でミセルを作成した。ミセル作成時の懸濁方法は、単なるボルテックスによる強振、0.5mmガラスビーズの共存で強振、バケツ型ソニケーターによる攪拌を試みたが、0.5mmガラスビーズ共存下での強振法がもっとも一定性のあ

る構造を示した。染色剤についてリンタングステン酸(PTA), ウラニル酢酸(UA), モリブデン酸アンモニウム(AM)について調べたところ、図1, 2, 3に示す如くの結果を得た。即ち、PTAではコントラストは良好であるがミセルのラメラ構造に一定性が無く人工的産物が多かった。UAはコントラストは良好であるが、ラメラ構造の微細な点が観察され難く染色剤がミセルの間に浸透せず、バックグラウンドの粒子が荒らく、pH7.0付近での染色にやや難点があった。AMは浸透性が良くバックグラウンドの粒子も均一性があり再現性も良好であった。

以上の検討の結果、ミセル作成は方法の項で述べた如く、又、染色はAMによって主として観察した。

2) カルジオリピン(CL)のミセル構造

CLは緩衝液中では混濁した懸濁液となる。ネガティブ染色ではラメラ構造を示すミセルを作る(図3)。ミセル層間は5.8nmでPGよりは巾が広い。フリーズフラクチャーでは図5の如くラメラ構造を認め層間5.8~6.5nmでその表層は平滑、割断された大きなラメラの面も平滑である。超薄切片像は極めて観察が困難であるが図4に示す如くbilayerの構造がよく保たれているものがあり、構造的にはフリーズ・フラクチャー像とよく一致する。5mM Mg²⁺の存在では懸濁液は更に濁度が増して図6のごとくラメラの層間が拡がりラメラの走行が乱れて方向性が交叉している構造を呈する。フリーズフラクチャー像では図7の様にラメラの層が無添加のものほど密ではなく波状を呈するもの、一部では陥凹、凸出を示す面があるものなど、多形性を示す。ネガティブ染色像で観察されるラメラの不整走行は、立体的には波紋状ないし凹凸状の面をミセル層が形成しているものである。Mg²⁺はカルジオリピンのミセルにより流動性を与えているようである。1mM Ca²⁺の存在の微細構造は図8, 9, 10に示す。ネガティブ像ではミセル層間が無添加のものよりやや広くその構造はMg²⁺に比して硬く密で、球状ミセルである。フリーズフラクチャー像では多様の構造を呈する。図9に示す如くラメラの層に小円形の“紋様”がおり、一部では凸又は凹に変形する。小さな

小胞ミセルが融合して大きなミセルに移行している像も認められる。また図10に示す如くの柱状結晶構造が観察される。これらの多様構造は同じ程度の頻度で認められる。Ca²⁺がカルジオリピンのミセル構造を変化させていることは明らかであり、ミセルの融合、結晶化の過程は、Ca²⁺がカルジオリピンの流動性を制限していることを示している。

3) ホスファチジルグリセロール (PG) のミセル構造

PGは緩衝液中では透明な懸濁液となる。ネガティブ染色法では小さな vesicle (径100nm) や連続した板状構造を示し表面無構造的でミセルのラメラ構造は観察され難い。しかし強拡大で観察すると染色剤の濃い部分に層状構造が認められる(図11)。その層間は4.0—4.5nmと計測される。フリーズフラクチャーでは図12の如く、密に配列したミセルが認められ、層間は4.5—5.0nmである。ネガティブ染色像では観察されなかった層状ラメラはフリーズフラクチャーではよく認められる。即ちネガティブ染色ではPGにおいては染色剤の浸透が悪いのであり、ラメラの形成は実在する。5 mM Mg²⁺ の存在下(図13, 14)のミセルは無添加のものとはほとんど変わらないが層間がやや広がりラメラがよく観察されるようになる。一部においては、表面に浅い陥凹や凸出があり、波紋状を呈する。1 mM Ca²⁺ の存在ではほとんど構造的に影響を受けなかった。

4) リジルホスファチジルグリセロール(L-PG)

L-PGのネガティブ染色像は図15、フリーズフラクチャー像は図16に示す。PGやCLとは異なり形成されるミセルは多層小胞を作り易く、そのラメラ層間は広く(6.5nm)その走行も整然としている。

L-PGのミセル懸濁液はた易く均一に混濁し、放置すると凝集・沈澱物を生じてくる。これは図16のフリーズフラクチャー像に認められる如く小胞様ミセルが互いに凝集し塊を形成する。5 mM Mg²⁺ や 1 mM Ca²⁺ の存在ではCLやPGに見られた様な変化は認められなかった。

5) PG/CL/L-PGの混合ミセル構造

正常なブドウ球菌膜を構成しているリン脂質

モル比は、PG/CL/L-PG : 5/2/2 である。この比になるよう精製したリン脂質を混合しミセル化したものが図17である。これに反しストレス下に培養された菌はPG/CL/L-PG比が2/5/2でCLが増加する。その比率で混合ミセルを作ったものが図18である。明らかにミセル構造が異なり、後者でのミセル構造はカルジオリピンの特徴を示している。このことは膜内の主要リン脂質が主として膜の形態、構造を支配的にしていることを示している。

考 察

一般の細胞膜はリン脂質の2分子層でその基本構造が保持されている。しかしその脂質組成は細胞により異なり、又細胞の機能状態により変化する。すなわち細胞膜を構成しているリン脂質は構造的にも機能的にも特異性があるはずである。S. aureusの細胞膜リン脂質の組成は比較的単純であるがその組成比が外界の環境変化に明らかに対応的に変化する。この点に着目しリン脂質の細胞膜構造における特異的役割りを調べようと、それぞれ純化したリン脂質のミセル構造について検討した。

ブドウ球菌の膜リン脂質の化学構造は図19に示した如くである。化学構造的にL-PGはもっとも親水性が強く、次いでCL、PGの順である。この性状を電子顕微鏡像と考え合わせれば脂質2重層の層間隔はその極性基の水和力を示していると考えられる。このことはネガティブ染色法でもフリーズフラクチャー像でも同じである。L-PGは水層で小胞ミセル(リポソーム)化しやすく、凝集もおこし易い。それはL-PGが極性部にアミノ基(+)とリン酸基(-)を持つことによる電荷の反映であると考えられる。このL-PGはブ菌の膜脂質の成分のうち塩基性を示す唯一のリン脂質であり、環境に対応する含量変化はほとんどない。L-PGは恐らく膜の水和性と表面荷電の維持重要な役割をしているであろう。ホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトールが膜酵素の活性に関与することが知られているが¹⁶⁾ L-PGがそれと同じように機能に関与しているか否かはまだ明らかにされていない。

PGとCLはその親水性に関してはCLがリン

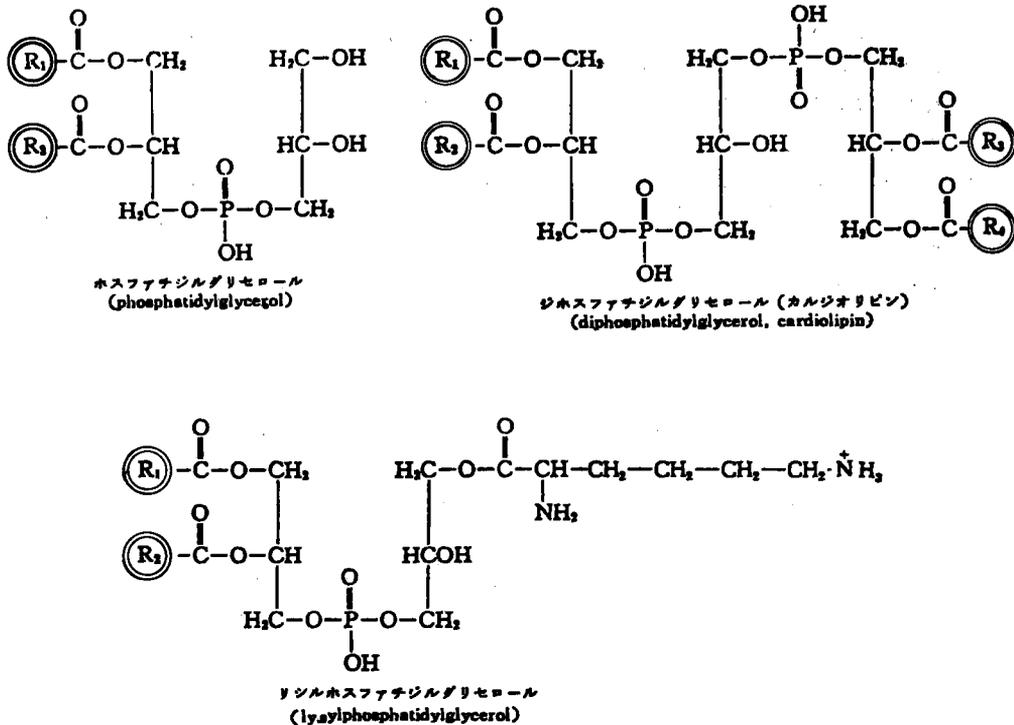


図19. ホスファチジルグリセロール(PG), カルジオリピン(CL)および
ホスファチジルグリセロール(L-PG)の化学構造式

酸基を2分子持つためか電顕下でミセルの層間
が広く観察される。このPGからCLへの親水化
への変化が膜の構造に与える影響についてはい
ますし明確ではない。PGとCLの明確な差異
は二価カチオンに対する反応性である。CLは
Ca²⁺と結合しヘキサゴナルの結晶構造を作る
ことはX線回析で示され、不明確ながらも電子
顕微鏡下でも示されている¹⁷⁻¹⁹⁾。本論文では1
mM Caの存在下ではミセル間の融合、ラメラの
不整化、結晶化の多様性を呈することを明らか
にした。Ca²⁺によるCLのミセル構造変化は、
Ca²⁺の濃度の変化によって移行することが最近
明らかにされている²⁰⁾。CLにCa²⁺が結合する
ことにより膜構造に微少環境の変化を与えてい
ることは明らかである。その物理化学的性状の
差については、さらに示差熱測定・透過性の差
によらねばならないであろうがCL分子にCaが
結合し、CLの2分子配列の配向を変え、親水、
疎水系での分子流動を制限していることは明ら

かである²¹⁾。

Mg²⁺はCLのミセル、ラメラ構造にCa²⁺と
は異なる影響を与えている。即ちネガティブ染
色では層間が広がり水和性を増しているようで
あり、またラメラの層間に流動性(波状ラメラ
の形成)を与えている。おそらくMg²⁺はCLの
極性部の2個のリン酸部分に錯体結合した結果、
脂質2重層の配列に影響し極性部の水和性を増
して波状ないし小胞状の変化を与えたものと考
えられる。Mg²⁺とCa²⁺のラメラ構造に与える
影響の差は、当然Mg²⁺とCa²⁺の化学的性状の
差によるものであろうが、それらのイオンが低
濃度で膜脂質の構造上の反応性を調節してい
るのは興味深い。

PGはCLに比し親水性が弱く、CaやMgの
影響を受けにくい。化学構造的にはリン酸の極
性基が親水性を示すであろうが、グリセリン基
がどのように配向するかによりミセルの構造は
影響されるのであろう。またPGは細胞内の物

質代謝能としてCLより活性のある中間体であるので、膜内での存在様式、代謝速度は興味深い²²⁻²⁷⁾。

CLのもう1つの特性は、Wasslrman抗原として知られるごとく抗原性のあることである²⁸⁾。PGにも抗原性のあることが報告されてはいるが²⁹⁾³⁰⁾、CLほど強い特異性のある抗体はできていない。即ちCLは構造的にPGよりもより剛性があるといえるであろう。ブドウ球菌において、CLは膜内のPGを基質にして、膜内に局在するカルジオリピン合成酵素により合成される⁴⁾。この酵素が何らかの条件で活性化され、膜内のCL量が増加する。CLが増加するのは一般に環境変化により細胞側が対応を強いられている条件下である。これを構造の特性と考え合わせると膜内のCLは膜のbilayerを安定化ないし硬化させCa²⁺やMg²⁺の結合でその構造維持特性をするべく働いているのではないかと考えられる。

CLの膜内の増加が他の菌種でもおこり得るかについてはなお明らかにされていない。しかし多くの菌、大腸菌、枯草菌、乳酸菌、バチルス属などには存在し、哺乳動物ではミトコンドリアに局在していることから³⁰⁾、CLが何か特殊な機能性を発揮していることは確かであると推察される。また、細菌類の細胞膜においても、脂質2分子層の外側・内側側でその分子種の配列が異なることが報告されはじめており、このことはブドウ球菌においても本報告の各リピドの構造特性の上からも今後検討されなければならないだろう。

結 語

細胞膜を構成するリン脂質の化学構造特異性と膜形態形成の特異性との相関性を調べるために、黄色ブドウ球菌細胞膜を構成するホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、リジルホスファチジルグリセロールの各々のミセル構造の特性について電子顕微鏡下で観察した。その結果、各脂質のラメラ形成性、ラメラ巾に相違があることがわかり、これは各々の極性部分の水和性の相違をあらわすものであろうと推察された。またCa²⁺はカルジオリピンに種々のミセル形態変化を与え、分子集合の“硬化”へ働き、Mg²⁺はカルジオリピンの分子集合に“流動性”を与えるようであった。ホスファチジルグリセロールやリジルホスファチジルグリセロールはCa²⁺やMg²⁺にあまり影響されなかった。これらの観察事実に基づいて、黄色ブドウ球菌の細胞膜でカルジオリピンが環境対応的に増加することの生理的意義について考察を加えた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり終始、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った金政泰弘教授に感謝を捧げると共に林英生助教授、平井義一助手その他直接御指導頂いた細菌学教室の皆様方に深く謝意を表します。

本論文の要旨は第32回中国四国細菌学会で発表した。

文 献

1. Kanemasa, Y., Yoshioka, T. and Hayashi, H.: Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochim. Biophys. Acta* **280**, 444—450, 1972.
2. Kanemasa, Y., Katayama, K., Hayashi, H., Takatsu, T., Tomochika, K. and Okabe, A.: The barrier role of cytoplasmic membrane in salt tolerance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt., Suppl.* **5**, 189—201, 1976.
3. Hayami, M., Okabe, A., Kariyama, R., Abe, M. and Kanemasa, Y.: Lipid composition of *Staphylococcus aureus* and its derived L-forms. *Microbiol. Immunol.* **23**, 435—442, 1979.
4. Short, S. A. and White, D. C.: Biosynthesis of cardiolipin from phosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **109**, 820—826, 1972.
5. Burritt, M. F. and Henderson, T. O.: Properties of a Membrane-bound cardiolipin synthetase from

- Lactobacillus plantarum. *J. Bacteriol.* **123**, 972—977, 1975.
6. De Sierro, A. J. and Salton, M. R. J.: Biosynthesis of cardiolipin in the membranes of micrococcus lysodeikticus. *Biochim. Biophys. Acta* **239**, 280—292, 1971.
 7. Pangborn, M. C.: Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *J. Biol. Chem.* **143**, 247—256, 1942.
 8. 野島庄七, 井上圭三, 奥山治美, 小野美恵, 片岡建之, 永井克孝: 複合脂質とその構成々分, リン脂質, ed. 舟橋三郎, 原一郎, 山川民夫, 脂質, 共立出版, pp. 130—210, 1970.
 9. 野島庄七: Cardiolipinの化学 (Chemistry of Cardiolipin), 薬学雑誌 **84**, 1037—1049, 1964.
 10. Kanemasa, Y.: Electro Microscopic Observations of lipid antigens with special reference to the Wassermann antigen. *Jpn. J. Microbiol.* **18**, 193—202, 1974.
 11. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **226**, 497—507, 1957.
 12. Rouser, G., Kritchevsky, G. and Yamamoto, A.: in Lipid chromatographic analysis. Dekker Inc., New York. vol. 1, pp. 99—162, 1967.
 13. Kanemasa, Y., Akamatsu, Y. and Nojima, S.: Composition and turnover of the phospholipids in Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta.* **144**, 382—390, 1967.
 14. 金政泰弘, 林英生: 電子顕微鏡による生体膜の形態研究法, 生化学実験講座東京化学同人. **14**, p 3—24, 1977.
 15. Hirai, Y.: The development of mesosomes of staphylococcus aureus during autolysis. *Acta. Med. Okayama* **33**, 213—238, 1979.
 16. Tien, H. and Mountz, J. D.: Protein-lipid interactions in bilayer lipid membranes. in *The Enzymes of Biological Membranes*, ed. A. Martonosi, Plenum Press, New York and London, vol. 1, pp. 139—170, 1976.
 17. Rand, R. P. and Sengupta, S.: Cardiolipin forms hexagonal structures with divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 484—492, 1972.
 18. Cullis, P. R., Verkley, A. J. and Ververgaert, P. H. J. Th.: Polymorphic phase behaviour of cardiolipin as detected by ³¹P NMR and freeze-fracture techniques. Effects of Calcium, Dibucaine and Chlorpromazine. *Biochim. Biophys. Acta* **513**, 11—20, 1978.
 19. Cullis, P. R. and De Kruljff, B.: Lipid polymorphism and the functional roles of lipid in biological membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 339—420, 1979.
 20. 平井義一, 林英生, 狩山玲子, 友近健一, 奥欽也, 金政泰弘: リン脂質のミセル構造 *Proc. Jpn. Chem. Biol. Lipid.* **22**, 1980.
 21. Saha, J., Papahadjopoulos, D. and Wenner, C. E.: Studies on model membranes I. Effects of Ca²⁺ and antibiotics on permeability of cardiolipin liquid cupralline vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 10—19, 1970.
 22. Polonovski, J., Wald, R., Paysant, M., Ranpini, C. and Barbu, E.: Metabolism du phosphatidylglycérol et du cardiolipide chez staphylococcus aureus. *Ann. Inst. Pasteur* **120**, 589—598, 1971.
 23. Rigomier, D., Lacombe, C. and Lubochinsky, B.: Cardiolipin metabolism in growing and sperulating Bacillus subtilis. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* **89**, 131—135, 1978.
 24. Short, S. A. and White, D. C.: Metabolism of Phosphatidylglycerol, Lysylphosphatidylglycerol and Cardiolipin of Ataphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* **108**, 219—226, 1971.
 25. Randle, C. L., Albro, P. W. and Dittmer, J. C.: The phosphoglyceride composition of gram-Negative bacteria and the changes in composition during growth. *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 214— , 1969.

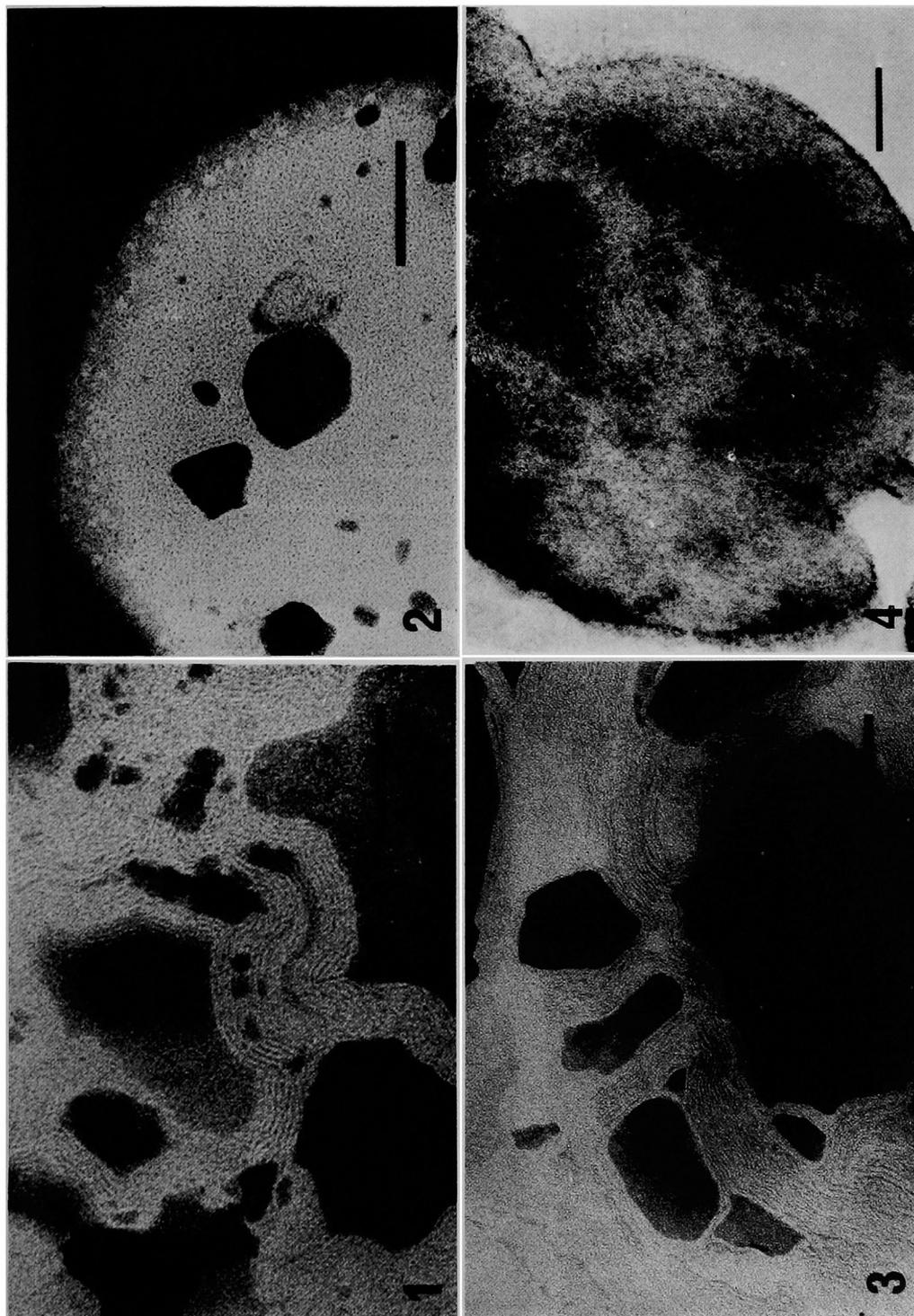
26. Raetz, C. R. H., Kantor, G. D., Nishijima, M. and Newman, K. F.: Cardiolipin accumulation in the inner and outer membranes of *Escherichia coli* mutants defective in phosphatidylserine synthetase. *J. Bacteriol* **139**, 544—551, 1979.
27. Raetz, C. R. H.: Enzymology, genetics and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **42**, 614—659, 1978.
28. Pangborn, M. C.: The composition of cardiolipin. *J. Biol. Chem.* **168**, 351—362, 1974.
29. Schiefer, H. G., Gerhardt, U. and Brunner, H.: Immunological studies on the localization of phosphatidylglycerol in the membranes of *Mycoplasma hominis*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 559—565, 1975.
30. Schiefer, H. G., Schummer, U. Hegner, D., Gerhardt, U. and Schnepel, G. H.: Electron spin resonance studies on the lipid-protein interaction between cardiolipin and anti-cardiolipin antibodies. *Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 293—299, 1975.
31. Laskin, A. L. and Lechevalier, H. A.: *Handbook of Microbiology*, CRC press, Cleveland, pp. 307—317, 1973.

附 図 説 明

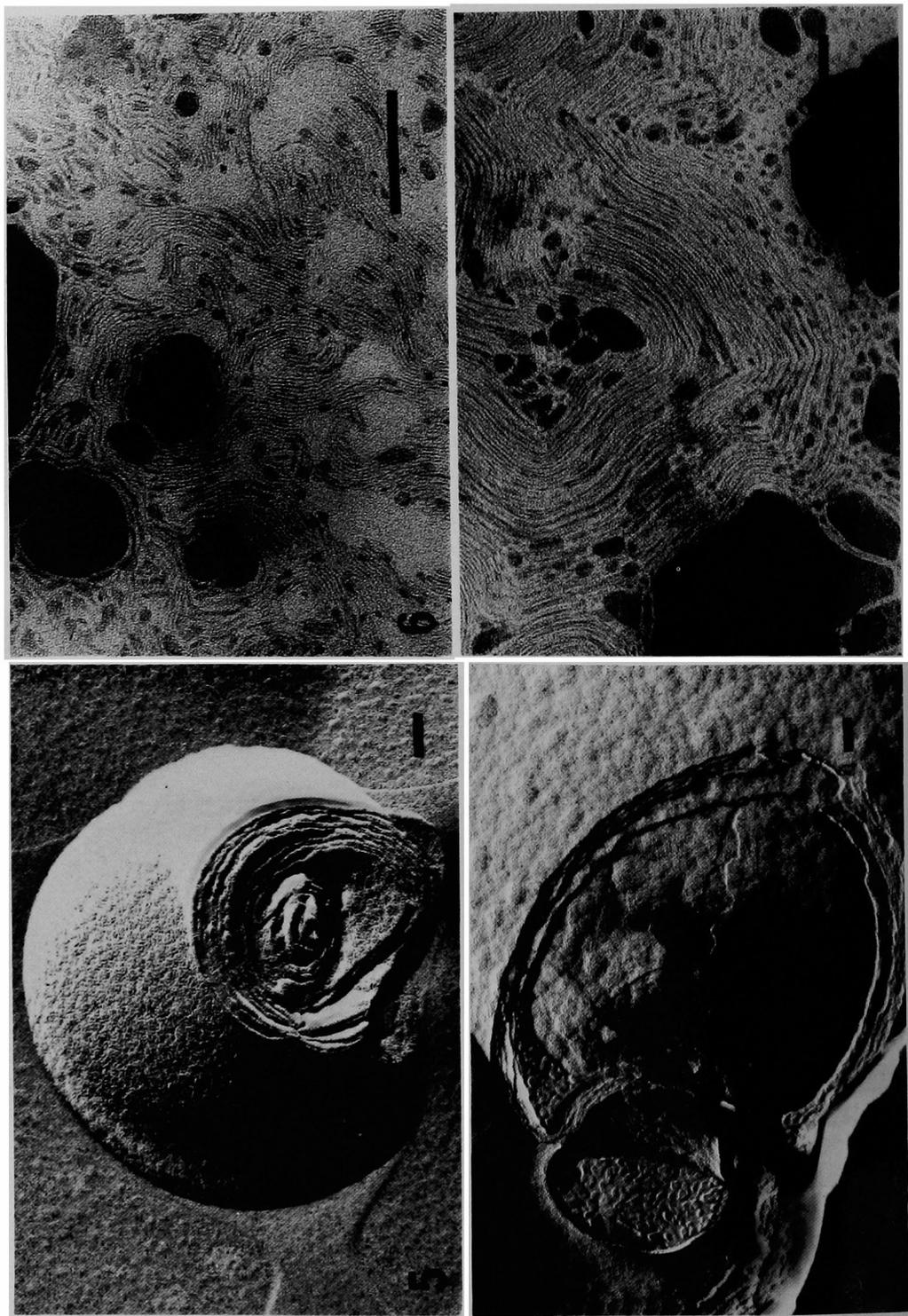
図1～18の電子顕微鏡写真は撮影倍率15,000～60,000倍であり焼付の引伸ばしは2～4倍である。挿入した示標は全て100nmを示す。

- 図1. カルジオリピンの1%リンタンクステン酸によるネガティブ染色像。染色剤による人工的構造変化が多い。
- 図2. カルジオリピンの1%ウラニル酢酸によるネガティブ染色像。染色剤の浸透が悪く内部のラメラが見えない。
- 図3. カルジオリピンの1%モリブデン酸アンモニウムによるネガティブ染色像。ミセルのラメラ構造がよく観察され人工的産物はほとんど見られない。
- 図4. カルジオリピンの超薄切片像。多層のラメラ構造が観察される。
- 図5. カルジオリピンのフリーズフラクチャー像。平滑なラメラの表層と多層性がよく観察される。
- 図6. 5 mM Mg^{2+} 存在下のカルジオリピンのネガティブ染色像。図3に比してラメラの層間が広く、走行も入り乱れている。
- 図7. 5 mM Mg^{2+} 存在下のカルジオリピンのフリーズ・フラクチャー像。ネガティブ染色像でみられるラメラの走行の不整はフラクチャー面では凸凹・波状の形態として認められる。
- 図8. 1 mM Ca^{2+} の存在下のカルジオリピンのネガティブ染色像。図6に比して層間が密なところと小円状にぬけるところがみられる。
- 図9. 1 mM Ca^{2+} の存在下のカルジオリピンのフリーズフラクチャー像。図8に認められた小円状の構造は、ラメラ面で見ると円型の凸凹の構造物として観察される。
- 図10. 1 mM Ca^{2+} の存在におけるカルジオリピンのフリーズ・フラクチャー像。柱状の結晶性構造が認められる。
- 図11. ホスファチジルグリセロールのネガティブ染色像。ラメラの構造は観察され難く、ミセルの辺縁で一部ラメラが認められる。
- 図12. ホスファチジルグリセロールのフリーズフラクチャー像。図11のネガティブ染色では見られなかったラメラ構造は、フリーズフラクチャーでは、はっきりと観察される。
- 図13. 5 mM Mg^{2+} 存在下のホスファチジルグリセロールのネガティブ染色像。図11に比してラメラ間隙が認め易くなっている。
- 図14. 5 mM Mg^{2+} 存在下のホスファチジルグリセロールのフリーズ・フラクチャー像。図12と比してラメラ層に凸凹があり、カルジオリピンに類似するが、 Mg^{2+} の作用がそれほど著明ではない。
- 図15. リジルホスファチジルグリセロールのネガティブ染色像。小ミセルと層間の明らかな多層ラメラが認められる。
- 図16. リジルホスファチジルグリセロールのフリーズ・フラクチャー像。小胞のミセルの凝集が認められ、ミセルは多層のラメラを形成している。
- 図17. カルジオリピン/ホスファチジルグリセロール/リジルホスファチジルグリセロール：2/5/2で混合したミセル。図11のホスファチジルグリセロールによく似た構造を呈する。
- 図18. カルジオリピン/ホスファチジルグリセロール/リジルホスファチジルグリセロール：5/2/2で混合したミセル。図3のカルジオリピンのミセル構造に類似した構造を呈する。

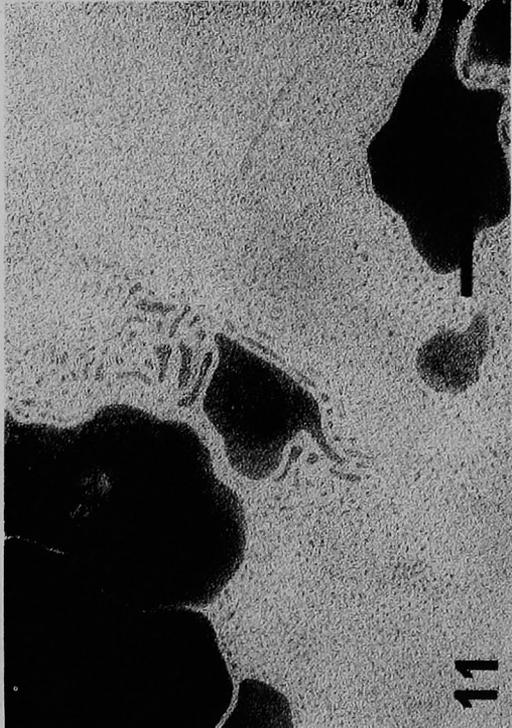
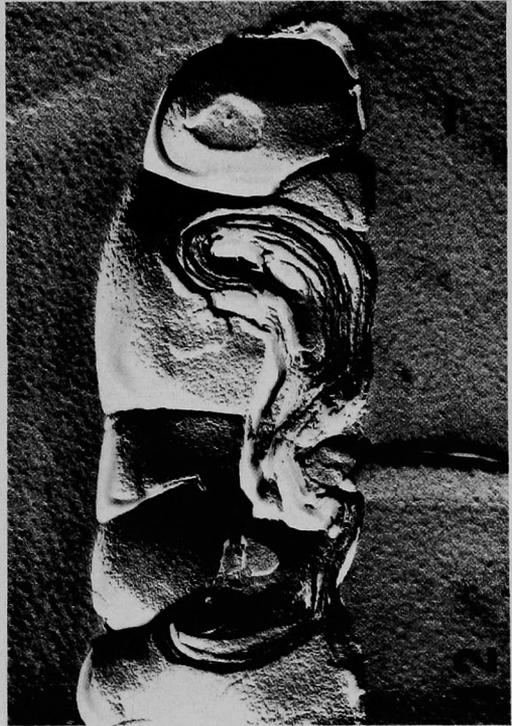
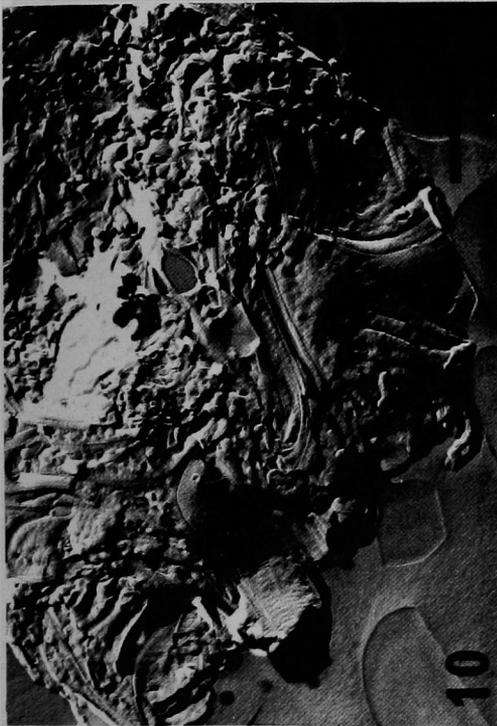
奥 欽 也 論 文 附 図



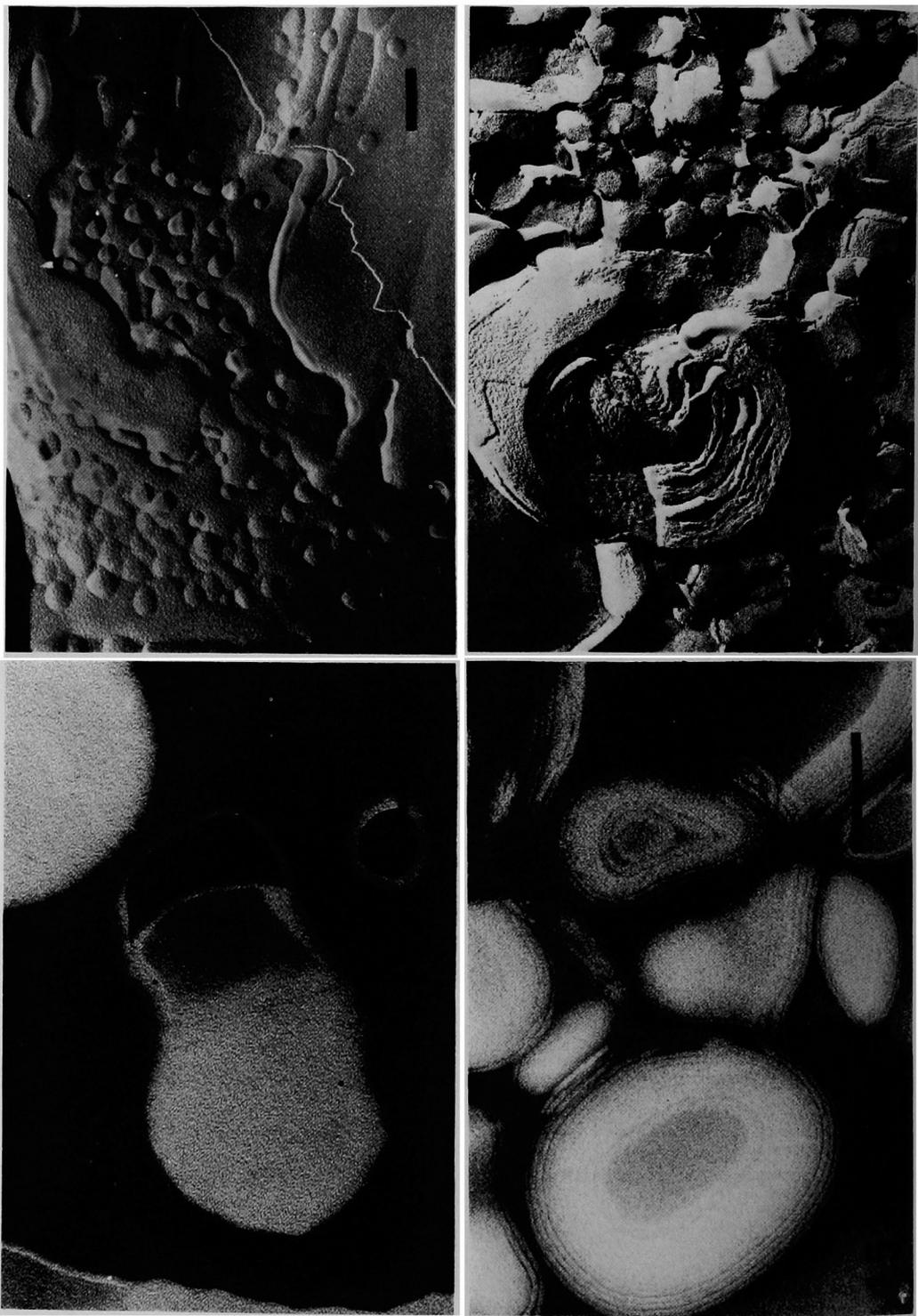
奧 欽 也 論 文 附 圖



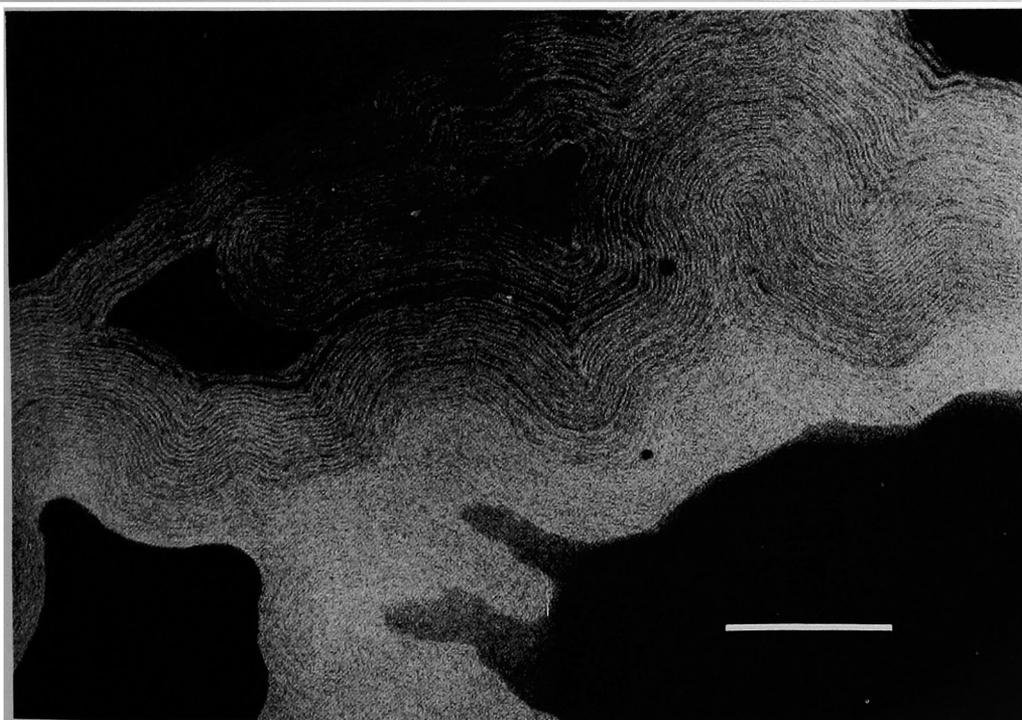
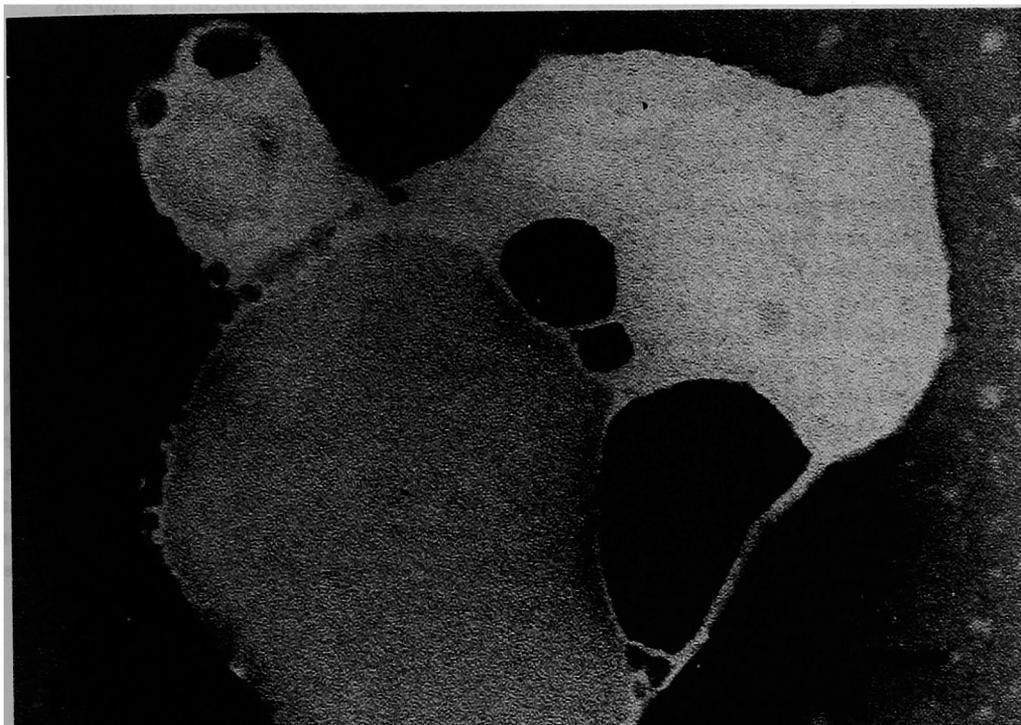
奥 欽 也 論 文 附 図



奧 欽 也 論 文 附 圖



奥 欽也 論文 附 図



Ultrastructure of phospholipid micelles from *Staphylococcus aureus*

Kinya OKU

Department of Microbiology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

The ultrastructure of the phospholipid micells (Phosphatidylglycerol : PG, cardiolipin : CL and lysylphosphatidylglycerol : L-PG) from *S. aureus* were examined by negative staining and freeze-fracture to elucidate the role of each phospholipid in staphylococcal cell membrane. The width of lipid bilayer of each phospholipid was : PG : 40A, CL : 58A and L-PG : 65A, respectively, indicating that the hydration of each lipids was different. Ca^{2+} caused the fusion of cardiolipin micell followed by hexagonal-cylindrical comformation. Ca^{2+} seemed to give "rigidity" to the cardiolipin bilayer. Mg^{2+} modified the cardiolipin lamella causing random-ripple form. Mg^{2+} gave "fluidity" to the micellar structure. PG and L-PG were less affected by Ca^{2+} or Mg^{2+} . Conversion of PG to CL was enhanced when *S. aureus* was exposed to stress condition or when the cell lost the wall. Molar ratio of PG/CL was 5/2 in normal condition, while 2/5 under stress. This adaptational changes of the lipid composition in the membrane may well correlate with the characteristics of cardiolipin micellar structure.