

黄色ブドウ球菌細胞膜における ホスファチジルグリセロール： カルジオリピンの転換反応

岡山大学医学部細菌学教室（主任：金政泰弘教授）

木 口 健 一 郎

（昭和57年 9 月 1 日受稿）

Key words : *S. aureus*, Cell membrane,
Cardiolipin synthetase,
Phospholipids

緒 言

黄色ブドウ球菌の細胞膜リン脂質は、Phosphatidylglycerol (PG), Cardiolipin (CL), Lysylphosphatidylglycerol と Phosphatidic acid で構成され各々の相対含量比はそれぞれ50,

20, 20~25および5%程度である¹⁾。これらリン脂質の相対含量比は、細菌の生育状態、培地の塩濃度¹⁾あるいは細胞壁の欠落の度合などにより対応的に変化することが報告されている^{2~4)}。なかでも PG と CL 含量はもっとも変化し易く、例えばブドウ球菌が高塩濃度培地で生育したり、

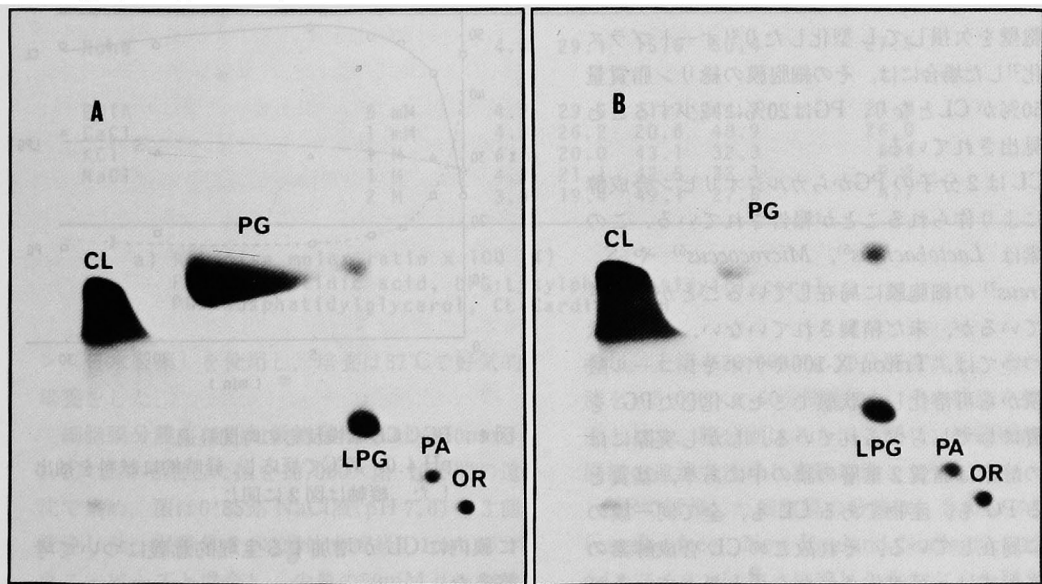


図1. *S. aureus* 細胞膜リン脂質のオートラジオグラフィー

³²P でホモラベルした菌から細胞膜を分離し、リン脂質画分を薄層クロマトグラフィー（二次元）したのち、オートラジオグラフィーをおこなった。

A) 分離した膜, B) 至適条件下で5分間反応した後のもの

PG : Phosphatidylglycerol, CL : Cardiolipin, LPG : Lysylphosphatidylglycerol,
PA : Phosphatidic acid, OR : Origin

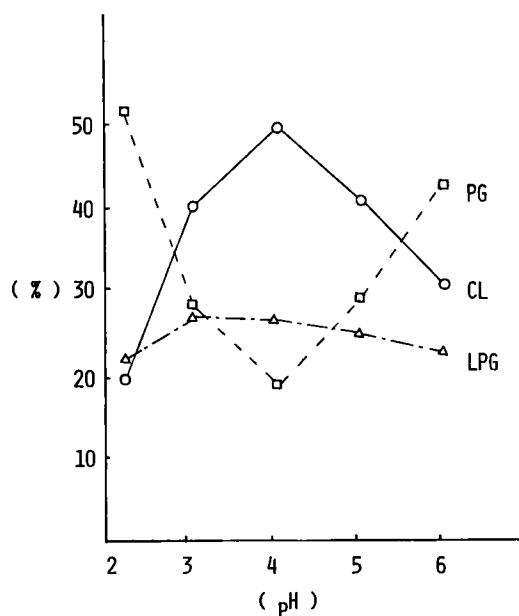


図2. PG:CL転換反応に対するpHの影響
pH 2~4は50mM酢酸緩衝液, pH 5~6は50mMリン酸緩衝液を用い, 37°C 5分間反応後, 膜リン脂質の相対分子比を%で表示した.
PG: Phosphatidylglycerol
CL: Cardiolipin
LPG: Lysylphosphatidylglycerol

細胞壁を欠損してL型化したり²⁾オートプラスト化³⁾した場合には, その細胞膜の総リン脂質量の50%がCLとなり, PGは20%に減少することが見出されている。

CLは2分子のPGからカルジオリピン合成酵素により作られることが報告されている。この酵素は *Lactobacillus*⁵⁾, *Micrococcus*⁶⁾ や *S. aureus*⁷⁾ の細胞膜に局在していることが報告されているが, 未だ精製されていない。その性状については, Triton X-100やデオキシコール酸で膜から可溶化した状態でミセル化したPGを基質にして知られている。しかし実際にはこの酵素は脂質2重層の膜の中にあり, 基質となるPGも, 産物であるCLも, 全て同一膜の中に局在している。それ故このCL合成酵素の反応形式は, 可溶化されたものと異っている可能性がある。

本研究においては, 細胞膜内でのPGからCLへの転換反応についてしらべ, CL合成酵素の反応形式を可溶化したものと比較検討し, 同時

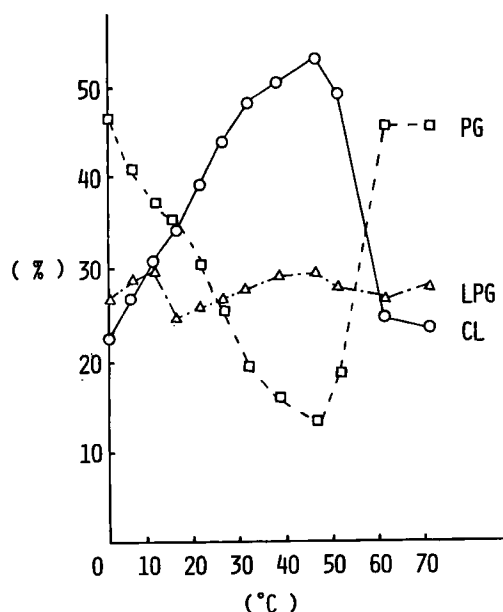


図3. PG:CL転換反応に対する温度の影響
pH4.0, 50mM酢酸緩衝液で, 各温度にあらかじめ反応液を保温し, 膜画分を添加し反応開始。反応時間は5分間, 実験の詳細は方法の項参照。
PG, CL, LPGは図2に同じ。

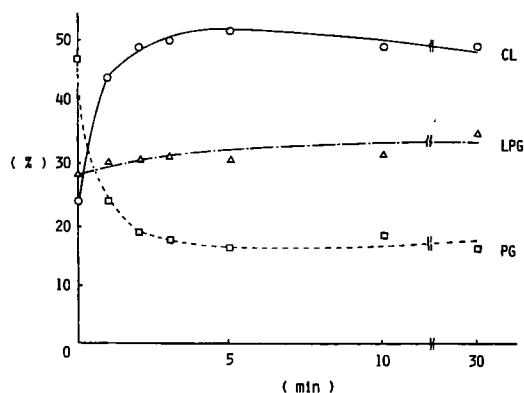


図4. PG:CL転換反応の時間経過
pH 4.0, 37°Cで反応し, 経時的に試料を抽出した。縦軸は図2に同じ。

に膜内にCLが増加する生理的意義について考察した。

材料および方法

供試菌と培養: 教室保存の *Staphylococcus aureus* 209P FDAを供した。培地は液体パイヨ

Table 1. Effect of detergents on the conversion of phosphatidylglycerol to cardiolipin in isolated cell membrane of *S. aureus*.

Additives	Concentration	(%) ^{a)}				Increased % of CL from original
		PA	LPG	PG	CL	
Original membrane		3.4	27.5	46.3	22.9	
None		4.8	29.1	15.6	50.4	27.5
SDS	0.1 %	6.3	22.2	46.6	24.9	2.0
	0.5 %	5.8	22.6	48.5	23.0	0.1
NP-40	0.1 %	7.6	28.1	17.9	46.5	23.6
	0.5 %	5.5	34.6	33.2	26.8	3.9
Triton X-100	0.15 %	6.9	32.3	15.2	45.6	22.7
	0.5 %	6.6	30.4	34.5	28.5	5.6
	1.0 %	3.9	25.1	46.9	24.2	1.3

a) Relative molar ratio x 100 (%)
 PA:Phosphatidic acid, LPG:Lysylphosphatidylglycerol,
 PG:Phosphatidylglycerol, CL:Cardiolipin

Table 2. Effect of salts on phosphatidylglycerol : cardiolipin conversion.

Additives	Concentration	(%) ^{a)}				Increased % of CL from original
		PA	LPG	PG	CL	
Original membrane		3.4	27.5	46.3	22.9	
None		4.8	29.1	15.6	50.4	27.5
EDTA	5 mM	4.2	29.5	21.7	44.7	21.8
CaCl ₂	1 mM	4.3	26.2	20.6	48.9	26.0
KCl	1 M	4.7	20.0	43.1	32.3	9.4
NaCl	1 M	4.2	21.1	42.5	32.1	9.2
	2 M	3.9	19.4	49.1	27.6	4.7

a) Relative molar ratio x 100 (%)
 PA:Phosphatidic acid, LPG:Lysylphosphatidylglycerol,
 PG:Phosphatidylglycerol, CL:Cardiolipin

ン（日水製薬）を使用し、培養は37°Cで好氣的培養をした。

細胞膜分離：後期対数増殖期（O.D.650nm＝1.2）まで増殖した菌を10,000×g、10分間の遠沈で集め、菌は0.85% NaCl液（pH 7.0）で3回洗浄した。湿重量5gの菌体を直径0.1mmのガラス・ビーズと混合し、少量の50mM リン酸緩衝液を加え50mlとし、Bühler Vibrogen Cell Millで氷冷水を循環させながら最高回転数で30分間、細胞を破碎した。ガラス・ビーズと破碎した菌の混合物は、200ml のリン酸緩衝液に懸

濁し、上清を20,000×g 20分間遠沈し、その上清を105,000×g 60分間遠沈し、その沈渣を膜分画とした。膜分画はさらに3回リン酸緩衝液で同様の遠沈で洗浄し実験に供した⁸⁾。

³²Pで標識した細胞膜の分離は、8 mCiの³²P (carrier free, New England Nuclear)を1200 mlのブイオンに加え培養した菌から、上記と同様の方法でおこなった。標識した膜のアイソトープ活性は1mg 蛋白量の膜あたり5.2×10⁵cpmであった。

脂質の抽出と分析：総脂質はBligh and Dyer⁹⁾

Table 3. Effect of SH reagents, phosphatidylglycerol, cardiolipin, glycerophosphate or glycerol on the phosphatidylglycerol: cardiolipin conversion.

Additives	Concentration	(%) ^{a)}				Increased % of CL from original
		PA	LPG	PG	CL	
Original membrane		3.4	27.5	46.3	22.9	
None		4.8	29.1	15.6	50.4	27.5
N-Maleimide	1 mM	4.1	24.7	22.9	48.2	25.3
N-Cyclohexylmaleimide	1 mM	4.9	24.3	20.4	50.4	27.5
Dithiothreitol	1 mM	5.4	24.0	20.7	49.9	27.0
Phosphatidylglycerol	300 nmoles	4.3	23.9	20.3	50.4	27.5
DL- α -Glycerophosphate	20 mM	5.3	24.9	26.1	43.7	20.8
	100 mM	4.7	21.5	41.5	32.4	9.5
Cardiolipin	300 nmoles	3.9	24.8	16.1	55.3	32.4
Glycerol	20 mM	5.0	24.8	20.9	49.4	26.5
	100 mM	5.2	24.6	24.5	45.7	22.8

a) Relative molar ratio x 100 (%)

PA:Phosphatidic acid, LPG:Lysylphosphatidylglycerol,
PG:Phosphatidylglycerol, CL:Cardiolipin

法によって抽出した。リン脂質はシリカゲル G による薄層クロマトプレート上で、溶媒はCH-Cl₃-MeOH-Water (65:25:4, V/V/V) を用いて展開し、二次元展開を必要とする場合は更に CHCl₃-MeOH-7NAm (60:35:4.5) を用いた¹⁾。各スポットは I₂ 蒸気中で発色確認後、かき取り、Kates 法でリンを定量または液体シンチレーションカウンター (Aloka) で定量した。リン脂質の重量は、測定したリン重量に 25 (リン脂質の平均分子量を 750 とするため) を乗じて表わした。

PG:CL 転換反応の測定: 反応系は 62.5mM 酢酸緩衝液 (pH4.0) 0.8ml, 添加物溶液 0.1ml および膜懸濁液 (2.4mg 蛋白/ml) 0.1ml を加え全量 1 ml とした。反応はあらかじめ緩衝液と添加物を 37°C で保温し、膜懸濁液を添加することで開始した。5 分間の反応後、7.5ml の Chloroform-Methanol (1:2, v/v) を加え、強振し、反応停止と同時に脂質の抽出をおこなった。pH の影響を調べるためには pH2.2~4 の緩衝液は酢酸緩衝液、pH5~6 にはリン酸緩衝液を用いた。

蛋白量の測定: Lawry 法¹¹⁾ によった。

結 果

膜内 PG:CL の転換: 図 1 A は ³²P ラベルし

た分離膜のリン脂質のオートラジオグラフィーである。リン脂質は均一に標識され、アイソトープ活性による各脂質の相対比は、発色法によるそれとよく一致していた。分離した膜を pH 4.0, 37°C で 5 分間反応した後のリン脂質は図 1 B に示す如く変化し、肉眼的にも PG が減少し CL が増加していることが明らかである。これを定量したものが表 1 の中、original membrane と additive-none とに示してある。即ち分離した膜を適当な条件で反応させれば PG から CL への転換がおこっている。このときの pH, 温度, 反応時間の影響は下記に示すが、熱変性した膜、0.1% グルタルアルデヒドで固定した膜ではこの反応はおこらず、明らかに酵素による反応であることが確認された。

PG:CL 転換の至適条件: 転換反応の pH, 温度による影響を図 2, 図 3 に示した。至適条件は pH 4.0, 活性を示す pH 範囲は 3~5 で強い酸性下で反応する。温度は 30~50°C の広範囲にわたっている。この至適条件における反応時間を図 4 に示した。反応は比較的早く、3 分以内に反応終点に達し、30 分の後もその量比は一定し、CL は 60% 以上に増加することはなかった。LPG は pH, 温度, 時間に全く影響を受けず一定であった。この反応の間に総リン脂質量は変

化せず、脂質/蛋白の値も一定で、phospholipase様の活性は認められなかった。

至適条件下で K_m は測定不可能であるが、 V_{max} を概算すると 74 nmoles CL 合成/分/mg 蛋白であった。膜を 0.15% Triton で可溶化し、ミセル化した PG を基質にして測定した場合、この膜標品は $K_m = 3.0 \times 10^{-4} M$ を示し V_{max} は 198 nmoles CL 合成/分/mg 蛋白量であった。

界面活性剤、イオン、薬物の影響：それぞれの添加物の作用をしらべたのが表 1, 2, 3 である。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は、0.1%, NP-40 と Triton X-100 は 0.5% で反応を阻害した。

EDTA はこの反応に全く影響を及ぼさず、 Mg^{2+} は必要ではなかった。 Ca^{2+} は 1 mM では影響を与えなかった。 K^+ , Na^+ は 0.2 M 程度では影響はなかったが、1 M K^+ , 2 M Na^+ ではこの反応を強く阻害した。

SH 阻害剤である N-Ethyl maleimide, N-cyclohexyl-maleimide は全く影響を与えず、逆に SH 保護剤である dithiothreitol も影響を与えなかった。

基質となる PG をミセル化し加えても、界面活性剤が存在しなければ CL に転換しなかった。過剰量の PG を添加しても、膜内の PG:CL 転換には全く影響を与えなかった。産物である CL を同様に過剰に添加しても転換反応に変化はなかった。PG や CL の骨格構造物である glycerol を添加しても反応に変化はなかったが、 α -glycerophosphate の場合は、100 mM の高濃度で転換反応を阻害した。

考 案

E. coli^{12,13)}, *Micrococcus lysodeikticus*^{6,14)}, *Lactobacillus plantarum*⁵⁾, *Mycobacterium smegmatis*¹⁵⁾, *Bifidobacterium bifidum*¹⁶⁾, *S. aureus*⁷⁾ などの細胞膜にカルジオリピン合成酵素があることは 1971~1972 年にかけて多く報告されている。Short and White は *S. aureus* の CL 合成酵素活性についてしらべ、それは膜に強く結合した酵素で、至適 pH 4.4, 至適温度 37~45 °C K_m $2.1 \times 10^{-4} M$, V_{max} 200 nmoles CL 合成/分/mg 膜蛋白であり、その活性は対数増殖

期にもっとも強い活性を示すと報告している⁷⁾。しかし、この研究は、外から添加した PG を基質にし、界面活性剤の存在下でしらべられており、膜内での PG:CL 転換との関係は明らかではない。*M. lysodeikticus*⁶⁾ の場合も同様な条件でしらべられている。従って本研究の結果と異なる点があるが、それらの点を列挙してみると次の如くである。 V_{max} については、膜内にある場合は可溶化した場合に比して遅い。界面活性剤は 0.1~0.5% で膜内での転換反応を阻害するが、外から添加した基質に対しては促進的にはたらく。添加した基質・産物は膜内の転換反応には影響を与えないが、可溶化した場合は抑制されている¹⁴⁾。 Mg^{2+} や Ca^{2+} は両者で影響を与えないが、 Na^+ , K^+ は膜内の転換を阻害し、可溶化した場合は阻害を受けない⁷⁾。可溶化した場合は基質の 90% 以上が CL に転換する⁶⁾ が、膜内の場合は、50~60% が限界である。可溶化した系では反応は 30 分以上直線的に進むが、膜内での PG:CL 転換は 1~3 分間でプラトーに達している。

これらの相違点は、CL 合成酵素が脂質 2 重層の中に埋め込められ、その活性中心は脂質 2 重層の内側で恐らく疎水性の部分にあり、その活性は膜脂質の流動性によりコントロールされていると仮定すれば以下に述べるような諸点について矛盾少なく説明できる。

CL が細胞膜に増加するのは、細胞のエネルギー源が減少したときにおこるとい説もあるが^{12,4)}、金政らの一連の研究では、CL の増加は、細胞がストレス下におかれたとき（例えば 2 M の食塩存在下）、細胞壁が欠落したときなど、細胞表層の環境対応反応であるとする考え方が強く打ち出されている¹⁷⁾。PG と CL の物性的研究、即ち NaCl に対する透過性の障壁性、DSC 測定による膜流動性の変化などの研究から¹⁸⁾、CL の増加は生物的環境適応反応と考えるのが妥当かもしれない。その立場をとり、上述の CL 合成酵素の局在形式との関連で CL の増加の機序を考えてみる。

CL の増加は、CL 合成酵素の増加によるのではなく適応的な活性化によることは本研究で明らかになったが、その活性化の重要な鍵を握る

因子は pH 変化であると考えられる。即ちこの CL 合成酵素の至適 pH が 4.0 付近であるので、細胞膜の内側で、微小環境的に pH 4.0 となり活性化される可能性は、細胞膜のプロトン勾配を考えればあり得ることである。S. aureus の細胞膜には cytochrome b_5 と cytochrome O を含む電子伝達系と ATPase が局在している^{8,19)}。又膜輸送系の研究から、いわゆる化学浸透圧 (H^+ 濃度勾配) が重要な役割を果していることが示されている^{20,21)}。即ち正常な発育をしている菌は、細胞外に H^+ を放出し、それにより生ずる膜ポテンシャルで ATP 合成その他のエネルギー源を得ていると考えられる²²⁾。しかし何らかの環境因子で発育が抑制された場合には、 H^+ の放出が抑えられ、細胞内側の微小環境で H^+ が蓄積される結果 pH の低下がおこり得る。このとき膜の透過機能を補修 (または障壁) する対応反応として、PG から CL に転換すると考えれば、CL 増加の生理的役割が明らかになろう。

高 Na^+ 濃度の環境で生育した菌は CL が増加するにもかかわらず、分離膜の CL 合成酵素活性は 2M の Na^+ で阻害される。このことは、高 Na^+ 濃度下であっても菌体内の Na^+ 濃度は恒常性に保たれているので¹⁾、 Na^+ や K^+ の chaotropic 作用が膜の内側からはたらいたと考えれば矛盾しない。

膜内での PG : CL 転換は極めて速い反応であるが、CL の合成が総リン脂質量の 60% を越えない事実は、脂質 2 重層における PG, CL, その他のリン脂質の存在様式と関連すると考えられる。即ち基質である PG は流動性のない、蛋白分子の限界脂質 (boundary lipid) として結合しているものがあつたり、また脂質 2 重層の外側、

内側のいずれに局在するかという問題もあろう。

2 分子の PG から 1 分子の CL が形成されたと生ずる 1 分子のグリセリンのゆくえ、また CL の分解は如何になっているかなどの問題は、興味深くさらに今後の研究にまたねばならない。

結 論

黄色ブドウ球菌の環境適応反応の機構として、細胞膜にカルジオリピンが増加することが認められているが、そのメカニズムと生理的意義について検討した。

分離した細胞膜を至適条件下で保つと、膜内のカルジオリピンは増加し、逆にホスファチジルグリセロールが減少する。その反応の至適 pH 4.0、温度 30~50°C で、反応速度は 74 nmoles CL 合成/分/mg 蛋白であり、この反応は、膜内のホスファチジルグリセロールを基質にして膜内でカルジオリピン合成酵素により遂行されていることが判明した。可溶化されたカルジオリピン合成酵素の諸性状と比較検討したところ、この酵素は膜の脂質二重層に埋没され、活性中心は細胞内側に局在することが推測された。細胞がストレス下におかれたときのエネルギーの代謝との相関性において、カルジオリピンが膜に増加する意義について考察した。

謝 辞

本研究の遂行にあたり御指導賜わった金政泰弘教授並びに林英生教授 (香川医科大学) に謝意を表わします。また研究のために技術指導を賜わった狩山玲子嬢 (細菌学教室助手) に感謝し、多くの討論・御教示を賜わった細菌学教室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

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. 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.
3. Okabe, A., Hirai, Y., Hayashi, H. and Kanemasa, Y.: Alteration in phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* during formation of autoplast. *Biochim. Biophys. Acta* **617**, 28—35, 1979.
4. Short, S.A. and White, D.C.: Metabolism of phosphatidylglycerol, lysylphosphatidylglycerol and cardiolipin of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **108**, 219—226, 1971.
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 Siervo, A.J. and Salton, M.R.J.: Biosynthesis of cardiolipin in the membranes of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **239**, 280—292, 1971.
7. Short, S.A. and White, D.C.: Biosynthesis of cardiolipin from phosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **109**, 820—826, 1972.
8. Hayashi, H., Hamada, H., Hirai, Y., Kariyama, R., Koujima, I. and Kanemasa, Y.: Effects of glucose and oxygen on the structure of the plasma membrane of *Staphylococcus aureus*. *Acta Med. Okayama* **33**, 379 — 387, 1979.
9. Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911—917, 1959.
10. Kate, M., Allison, A.C. and James, A.T.: Phosphatides of human blood cells and their roles in spherocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 571—582, 1961.
11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1941.
12. Tunaitis, E. and Cronan, Jr. J.E.: Characterization of the cardiolipin synthetase activity of *E. coli* envelopes. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 420—427, 1973.
13. Hirschberg, C.B. and Kennedy, E.P.: Mechanism of the enzymatic synthesis of cardiolipin in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 648—651, 1972.
14. De Siervo, A.J.: Inhibition of cardiolipin synthesis by end-products and other complex lipids in membrane preparations of *Micrococcus lysodeikticus*. *Can. J. Biochem.* **53**, 1031—1034, 1975.
15. Mathur, A.K., Suryanarayana Murthy, P., Saharia, G.S. and Venkitasubramanian, T.A.: Studies on cardiolipin biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*. *Can. J. Microbiol.* **22**, 354—358, 1976.
16. Veerkamp, J.H.: Biosynthesis of phosphogalactolipid and diphosphatidylglycerol in a membrane fraction of *Bifidobacterium Bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Biochim. Biophys. Acta* **441**, 403—411, 1976.
17. 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.
18. 狩山玲子, 平井義一, 友近健一, 林 英生, 金政泰弘: 壁欠落にともなう細胞膜リン脂質変動の物性論的検討. *Proc. J. C. B. L.* **23**, 66—69, 1981.
19. Taber, H.W. and Morrison, M.: Electron transport in *Staphylococci*: Properties of a particle preparation from exponential phase *S. aureus*. *Arch. Biochim. Biophys.* **105**, 367—379, 1965.

20. Short, S.A. and Kaback, H.R.: Amino acid transport and *Staphylococcal* membrane vesicles. *Ann. Acad. Sci.* **236**, 124—143, 1974.
21. Kaback, H.R.: Bacterial transport mechanism. In *Bacterial Membranes and Walls*, ed. L. Leive, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 241—292, 1973.
22. Rogers, H.J., Perkins, H.R. and Ward, J.B.: Membrane functions. In *Microbial Cell Walls and Membranes*, Chapman and Hall, London, New York, pp. 105—175, 1980.

**Conversion of phosphatidylglycerol to cardiolipin in the cell
membrane of *Staphylococcus aureus***

Kenichiro KIGUCHI

Department of Microbiology Okayama University Medical School

The conversion of phosphatidylglycerol(PG) to cardiolipin(CL) in isolated *Staphylococcal* cell membrane was studied to clarify the physiological role of the reaction in the membrane. CL content in the isolated membrane was about 20% of the total phospholipids and that of PG was 50%. When the isolated membrane was kept at optimal conditions, the CL content increased to 50% and that of PG decreased to 20%. The optimal pH range of the reaction was between 3.0 and 5.0, and the optimal temperature was between 30 and 50 °C. The reaction appeared to be completed within three minutes with an apparent Vmax of 74 nmoles CL produced/min/mg of membrane protein. The maximum CL content that could be reached in the membrane was no more than 60%. The reaction was mediated by cardiolipin synthetase in the membrane. The mode of the reaction seemed to be different from that of previous reports (Short S.A. and White D.C. J. Bacteriol. 1972, and Burrit M.F. and Henderson T.O. J. Bacteriol. 1975) in which the reaction was examined by solubilized enzyme with exogenous PG as the substrate. In comparing the mode of reaction in the membrane with that in the solubilized system, it is reasonable to conclude that CL synthetase is buried in the lipid bilayer with its active site facing toward the inside of the cell. The activity of CL synthetase probably is regulated by the pH of the microenvironment brought about by the chemiosmotic potential of the membrane together with the fluidity of the lipid bilayer.