

Mycoplasma orale の膜脂質について

岡山大学医学部細菌学教室（主任：金政泰弘教授）

茎 田 祥 三

（昭和57年 5 月27日受稿）

Key words : *Mycoplasma orale*
membrane lipid
phospholipid synthesis
Fatty acid synthesis

結 言

Mycoplasma は自己増殖する生物の最小単位であり、細胞壁を有せず細胞膜が直接外界からの浸透圧や刺激に対し反応し、調節している。しかも *Mycoplasma* 細胞は細菌よりも小さいながら、細胞膜は真核細胞の組成に似ていることから、細胞生物学的に極めて興味深く、多くの研究がなされている^{1),2)}。しかし、細胞膜の脂質組成とその代謝特性については、まだ十分に調べられていない。特に、*Mycoplasma* 科 *mycoplasma* 属³⁾はその生育に cholesterol と長鎖脂肪酸を要求するが、その膜における脂質動態と言う観点からの追求は数菌種に及ぶのみで、しかもその結果は統一性に欠けている^{4),5)}。ヒトに常在する *Mycoplasma*⁶⁾についても、その細胞膜組成は生物学的に重要でありながらも、研究・報告されているものが少ない。そこで本報告ではヒト口腔内に常在する *Mycoplasma orale*の膜脂質組成を分析しその特性について調べ、他の *Mycoplasma*と比較検討した。

材料及び方法

菌株と培養方法：供試菌株 *Mycoplasma orale* CH-19299 は尾形 学教授（東京大学農学部）から分与を受け、下記の培地に馴化させた。培地は Chanock and Hayflick⁷⁾の培地に、新鮮に自家調製した馬血清を15%加えた液体培地を用いた。培養は37°Cで2日間静置培養し、菌は12000

×g, 20分間遠沈して回収したのち、生理的食塩水(pH 6.8)で3回の遠心洗浄を行ない、以後の実験に供した。コロニー形成単位(CFU)の測定は Smith の方法⁸⁾により、乾燥重量の測定は100ml の試料を蒸発乾固し(150°C, 2時間)測定した。

脂質の抽出と精製：脂質の抽出はFolch法⁹⁾によった。すなわち湿菌量1gに対し chloro-

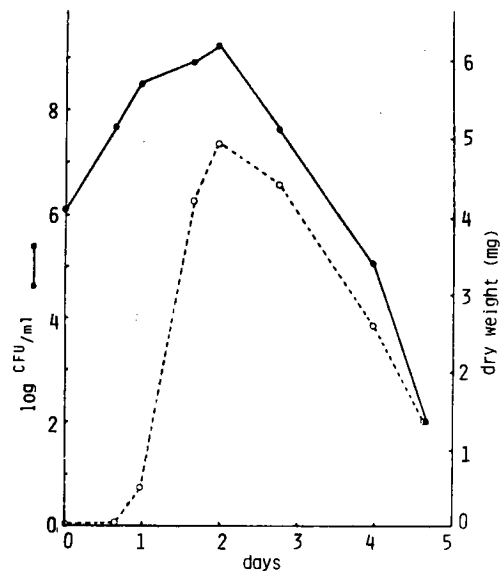


図1 *Mycoplasma orale* CH19299 の増殖曲線
15%新鮮馬血清加Chanock and Hayflick の
培地で37°C, 静置培養
●—● コロニー形成単位(CFU)
○-----○ 乾燥重量(mg)

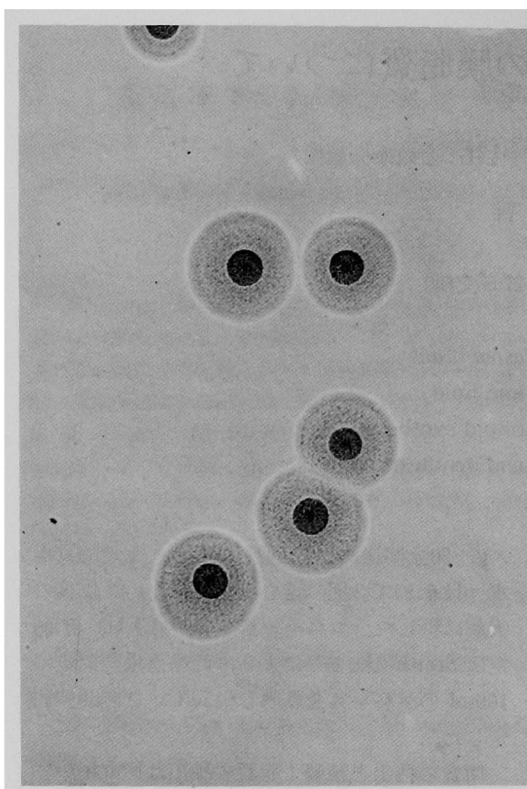


図2 *Mycoplasma orale* CH 19299 のコロニー形態
倒立位相差顕微鏡×40で撮影

form/methanol (2/1, v/v) 混液20ml を加え2時間、室温で攪拌抽出し、その沈渣に上記と同様の混液20mlを加え、一夜攪拌再抽出した。抽出した粗脂質分画は、Folch 静置法¹⁰⁾により純化した。中性脂質とリン脂質はUnisil (100~200メッシュ Clarkson社) のカラムクロマトグラフィー(1×15cm)により、分別抽出した¹¹⁾。

脂質分析：中性脂質分画は、Silica Gel G (Merck 社) 薄層クロマトプレート(以下 TLC と略す) 上で pet. ether/diethylether/acetic acid (82/18/2: v/v/v) により展開し同定した¹²⁾。cholesterol, cholesterol esterはRosental 法¹³⁾により定量した。リン脂質分画は同様の TLC 上で、一次元展開は chloroform/methanol/H₂O (65/25/4: v/v/v)、二次元展開はchloroform/methanol/7N-NH₄OH (60/35/4.5: v/v/v)により行ない同定した¹⁴⁾。リン脂質の定量は各スポットを掻き取り、抽出後、Kates 法¹⁵⁾でリンを定量し、その分子比で表わした。馬血

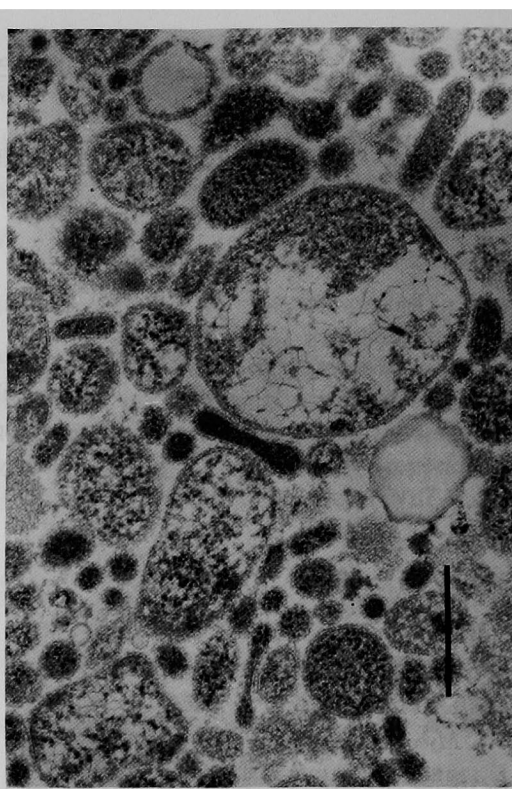


図3 液体培地で48時間培養後の *M. orale*の超薄切片電子顕微鏡像(×20,000で撮影、スケール0.5 μm)

2.5%グルタルール・2% オスミック酸固定
エポン包埋 酢酸ウラニウム、クエン酸鉛による後染色

清の脂質は血清100ml を凍結乾燥した後 *Mycoplasma* と同様の方法によって抽出・分析した。

脂肪酸の分析：総脂質、総リン脂質または分画した各リン脂質を塩酸メタノール法でメチルエステル化後、日立 GCK 53 を用いて同定、相対量を定量した。

³²P-正リン酸による標識：50mlの培地に 2 mCi の³²P-正リン酸 (Amersham 社)を加え、2日間培養した。集菌後、Bligh and Dyer 法¹⁶⁾で脂質分画を抽出し、Silica Gel G TLCで展開し、オートラジオグラフィーを行なった。確認された各スポットを掻き取り Aloka LSC-653 でカウント測定した。

¹⁴C-酢酸の脂質分画への標識：0.38mCiの¹⁴C-酢酸 (1-¹⁴C acetic acid sodium salt, New England Nuclear 社) を100ml の培地に加え、48

時間培養後, ^{32}P の場合と同様に脂質分画を抽出し, スポットについてカウントした。

結 果

M. orale の増殖: *M. orale* の液体培地での増殖曲線を図 1 に示した。接種量は $1/100$ で, コロニー形成単位 (CFU) (図 2) で測定すると培養 48 時間後 $2 \times 10^9/\text{ml}$ にまで増殖し, 以後漸時減少した。これを乾燥重量で測定すると, 24 時間から 48 時間までに約 10 倍量の増加があり, CFU とよく一致した。この時期の *M. orale* の電子顕微鏡下での形態を図 3 に示した。菌は $0.3 \sim 1 \mu\text{m}$ の不定形を呈し, いわゆる多形態性を示し, 菌体

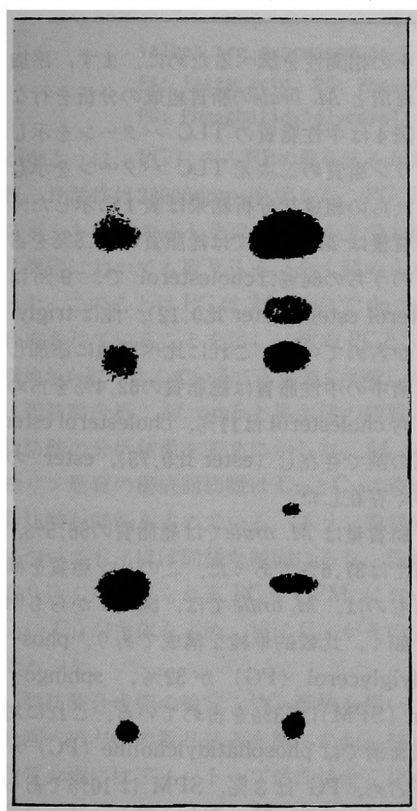


図 4 *M. orale* と馬血清の中性脂質の一次元薄層クロマトグラフィー

ChE: cholesterol ester, TG: triglyceride, FA: 脂肪酸, FA-E: 脂肪酸エステル
Ch: cholesterol, PL: リン脂質
Silica Gel G 薄層プレート,
展開: pet. ether/diethylether/acetic acid:
82/18/2: V/V/V

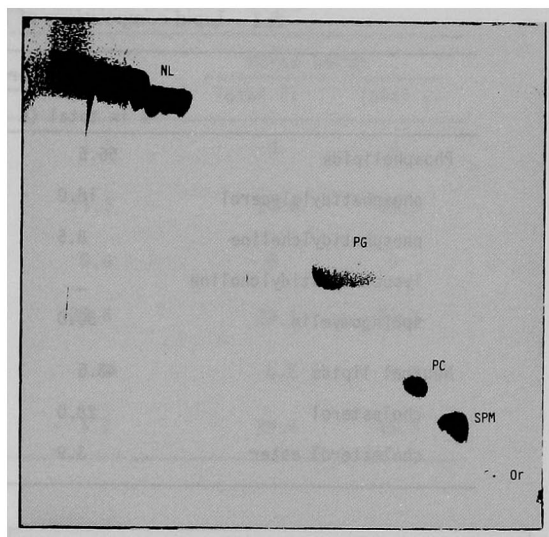


図 5-A

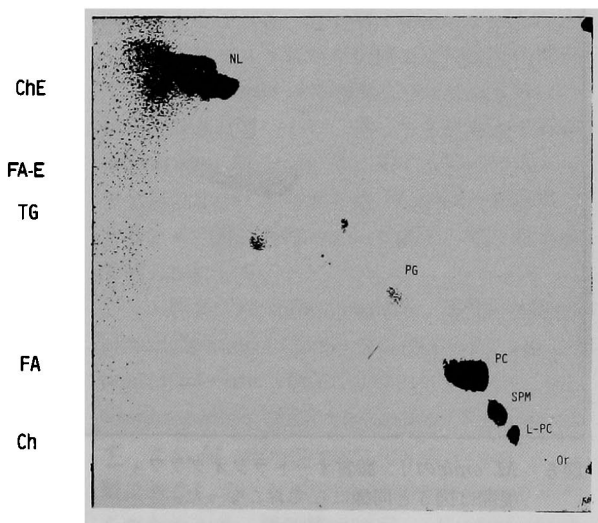


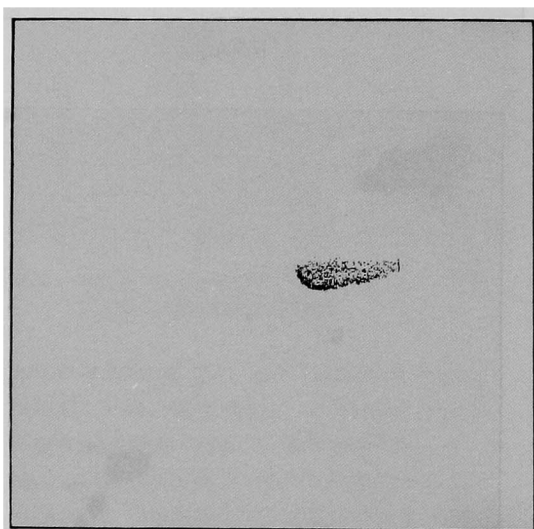
図 5-B

図 5 *M. orale* と馬血清のリン脂質の二次元薄層クロマトグラフィー

A: *M. orale*, B: 馬血清
Or: 原点, SPM: sphingomyelin,
L-PC: lysophosphatidylcholine
PC: phosphatidylcholine,
PG: phosphatidylglycerol,
NL: 中性脂質
Silica Gel G 薄層クロマトプレート
展開: 一次元, chloroform/methanol/
 H_2O : 65/25/4: v/v/v
二次元, chloroform/methanol/7N-
 NH_4OH : 60/35/4.5: v/v/v

表1 Lipid compositions of *M. orale* and horse serum

	<i>M. orale</i>		Horse serum	
	% in total (% in fraction)		% in total (% in fraction)	
Phospholipids	56.5	(100)	37.6	(100)
phosphatidylglycerol	18.0	(32)	1.1	(3)
phosphatidylcholine	8.5	(15)	26.5	(70)
lysophosphatidylcholine	—		6.1	(16)
sphingomyelin	30.0	(53)	3.9	(10)
Neutral lipids	43.5	(100)	62.4	(100)
cholesterol	28.0	(64)	6.6	(11)
cholesterol ester	3.9	(9)	19.3	(31)

図6 *M. orale*のリン脂質オートラジオグラフィー展開は図5と同様にしておこなった。

内のリボソーム・核酸の密度も多様であった。しかし、ゴースト化したものや破壊されたものは見られず、全ての菌は正常な発育形態を示していた。すなわち、培養48時間は後期対数増殖期～静止期にあたり、菌は正常な生育状態にあり、菌量の回収も良好で、実験材料には適正であることを認めた。

脂質分析：*Mycoplasma*は生育に cholesterol と長鎖の脂肪酸を必要とし、そのために培地には高濃度の血清を添加してあり、それが主たる脂質源である。細胞膜の脂質は血清中から取り込んだものと、自力合成したものとがあると予測

され、その相関性を調べるために、まず、添加した馬血清と *M. orale*の脂質組成の分析を行なった。図4は中性脂質のTLCパターンを示し、図5はリン脂質の二次元TLCパターンを示した。これらの組成比分析結果は表1に示した。中性脂質量は *M. orale*では総脂質の43.5%を占め、そのうちの64%はcholesterolで、9%はcholesterol ester (ester比0.12)、他は triglyceride が占めていた。これに比べ培地に添加した馬血清中の中性脂質は総脂質の62.4%を占め、このうち cholesterol は11%、cholesterol ester は31%の割合で存在し (ester比0.75)、esterの方が多く存在した。

リン脂質量は *M. orale*では総脂質の56.5%、馬血清では37.6%であった。このリン脂質を構成するものは、*M. orale*では、図5-Aからも明らかな如く、比較的単純な構成であり、phosphatidylglycerol (PG) が32%、sphingomyelin (SPM)は53%を占めている。これに対し、馬血清では phosphatidylcholine (PC) が70%を占め、PGは3%、SPMは10%であった。これらの分析結果は、*M. orale*は選択的に脂質分子種を取り入れているか、あるいは独自の合成系があることを示唆する。

^{32}P -正リン酸のリン脂質への取り込み： ^{32}P -正リン酸を用いてリン脂質の合成能を調べる目的で、リンのリン脂質分画への取り込みを調べた。抽出した脂質分画の二次元オートラジオグラムを図6に示した。図5-Aと対比すれば明ら

表2 Fatty acid compositions of *M. orale* and horse serum

FA	M. orale				Horse serum	
	PC	SPM	PG	Total PL	Total PL	Total L.
C _{14:0}	1.0	0.8	1.3	1.1	0	0
C _{16:0}	64.8	80.4	69.7	71.3	24.4	25.1
C _{16:1}	0.5	Trace	0.7	0.4	0	0
C _{18:0}	25.3	15.8	27.5	23.6	29.5	20.2
C _{18:1}	2.5	3.0	0.8	1.9	6.6	9.4
C _{18:2}	5.9	Trace	0	1.7	39.4	45.3

Values are expressed as %

FA: Fatty acid, PC: Phosphatidylcholine, SPM: Sphingomyelin,

PG: Phosphatidylglycerol, PL: Phospholipid, L: Lipid

かなように、PG にのみ³²Pの取り込みが認められ、比活性は23000dpmを示した。PG以外のスポットにはオートラジオグラム上でも掻き取り測定においても取り込みは全く認められなかった。このことはPGは*M. orale*でde novoに合成されていることを示し、他のPCとSPMは培地から取り込んでいることを強く示唆している。

脂肪酸分析：*M. orale*と馬血清の脂質の構成脂肪酸の分析結果を表2に示した。*M. orale*の総リン脂質の構成脂肪酸はC₁₆とC₁₈の直鎖飽和脂肪酸が95%を占めている。各リン脂質分子種についても、ほぼ同様な傾向にあり、培地から取り込んだと見られるPCやSPMにおいてもC₁₆・C₁₈が主体を占め、特にC₁₆がその主成分であった。

脂肪酸合成能の検定：¹⁴C-酢酸を用いて脂質分画への¹⁴Cの取り込みを調べたが、抽出した脂質分画にはアイソトープ活性は全く認められなかった。このことは、*M. orale*においては長鎖脂肪酸の合成能は欠如していると推察される。

考 察

Bergey の分類によると *Mycoplasma* 目は sterol 要求性の相違により *Mycoplasma* 科と *Acholeplasma* 科とに区別されている³⁾。*Acholeplasma* の細胞膜については Razinら¹⁷⁾により多く

の研究がなされ統一的理解が得られているが、コレステロールと長鎖脂肪酸をその生育に要求する *Mycoplasma* 科の36種については充分には研究がなされていない。殊にヒトに常在する *M. salivarium*, *M. orale* 等に関するものはほとんど見られない。本研究では *M. orale* の膜脂質の分析とその動的特性について調べ、新たな事実を明らかにした。

リン脂質では sphingomyelin (SPM) と phosphatidylglycerol (PG) が主体を占め、phosphatidylcholine (PC) は比較的少なかった。lysophosphatidic acid や cardiolipin 等は認められず、また *M. gallinarum* や *Acholeplasma*⁴⁾ に一般に存在している glycosyldiglycerides も認められなかった。脂肪酸では C₁₆・C₁₈ 直鎖脂肪酸が主体を占め、リン脂質分子種間に特別な差異は認められず、おそらく培地から取り込んだと見なされる PC や SPM でさえも C₁₆・C₁₈ が主体を占めていた。PC や SPM に認められた C_{18:1}, C_{18:2} は、培地中の成分そのものを取り入れたと推察される。ほとんどの *Mycoplasma* は C₁₄, C₁₆, C_{18:1} を主体としており^{4), 5)}、その組成比は培地の条件、温度等により変化し易いと報告されている。*M. orale* では C₁₄ が少なく C_{18:1} が C₁₈ より少ないのは培地組成によると推察される。

リン脂質の合成能は ³²P-正リン酸を用いて調

べたところ、PG のみが合成されていることが判明した。しかしリン酸がglycerolに直接入ったのか、Sn-glycerol-3-phosphateを介して入ったのかは明らかでないが、*Acholeplasma laidlawii* B でみると、後者の可能性が強い¹⁸⁾。もしそうであった場合に、問題は脂肪酸のacylationがどのようにして起こったかである。¹⁴C-酢酸、を用いた実験では脂肪酸は合成されず、これは他の *Mycoplasma* と一致する。構成脂肪酸はすべて培地中から取り込まれるとすれば、*M. orale* には C₁₆、C₁₈ を選択的に取り込む機構が存在することになる。*Acholeplasma* の例では glycerol の 1 位に飽和型、2 位に不飽和型を取り込み易いことが報告されており、saturase により 2 位の不飽和を飽和後 1 位に transacylation する例も報告されている¹⁹⁾。*M. orale* でもこれらの過程が膜内でおこっている可能性が強く、PC や SPM においても C₁₆ が圧倒的に多いことは deacylation-acylation の転換がおこっていることを示唆する。しかしこの確認のためには更に各種脂肪酸を用いた綿密な実験が必要である。

膜脂質組成の約 43.5% は中性脂質であり、その大部分は cholesterol で ester 比は 0.12 であり、他の *Mycoplasma* に比して ester が少なく、*M. gallisepticum* に類似していた⁵⁾。*M. orale* で cholesterol が圧倒的に多く培地血清のものと全

く逆の組成であることは、選択的取り込みによるものなのか、あるいは取り込み後の修飾機構によるものなのかは現段階では結論出来ず、興味ある問題として残されている。

結 語

Mycoplasma orale CH-19299 の細胞膜の脂質特性について調べた。膜総脂質の 43.5% は中性脂質であり、その 64% は cholesterol、9% は cholesterol ester であった。総脂質の 56.5% はリン脂質で、そのうち sphingomyelin が 53%、phosphatidylglycerol は 32%、phosphatidylcholine は 15% であった。構成脂肪酸は C₁₆ と C₁₈ の直鎖飽和型が 95% を占めていた。リン脂質のうち、phosphatidylglycerol だけは de novo に合成されていたが、他の組成は培地より取り込んでいた。脂肪酸の de novo 合成能は無く、培地中の組成を取り込んでいと推察されたが、培地中の成分と比較し他の *Mycoplasma* との異同を論じながら膜内での脂質合成の機構について言及した。

謝 辞

本研究の遂行にあたり御指導賜った金政泰弘教授及び林 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・討論・多くの御教示を賜った細菌学教室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

（本研究の要旨は第 55 回日本細菌学会で発表した。）

文 献

1. Barile, M.F. and Razin, S.: *The Mycoplasmas I* Academic Press N.Y, S.F, London, 1979.
2. 佐々木正五, 尾形 学, 中村昌弘: 「マイコプラズマ」講談社サイエンティフィック 1974.
3. Freundt, E.A.: The mycoplasmas, In *Bergey's manual of determinative Bacteriology* part 19 ed. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons Williams Wilkins Co., Baltimore, p. 945, 1974.
4. Smith, P.F.: The composition of membrane lipids and lipopolysaccharides In *The Mycoplasmas I*, ed. M.F. Barile and S. Razin, Academic Press N.Y, S.F, London, pp. 231—257, 1979.
5. Rottem, S.: Membrane lipids of mycoplasmas, *Biochim. Biophys. Acta* 604, 65—90, 1980.
6. Somerson, N.L. and Cole, B.C.: The mycoplasma flora of human and non human primates In *The Mycoplasmas II* ed. J. G. Tully and R.F. Whitcomb, Academic Press, N.Y, S.F, London, pp. 191—216, 1979.
7. Chanock, R.M., Hyflick, L. and Barile, M.F.: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 41—49, 1962.

8. Smith, P.F.: Quantitative measurement of the growth of pleuropneumonia like organisms. *Appl. Microbiol.* 4, 254—259, 1956.
9. Folch, J., Ascoli, I., does, M., Meath, J.A. and de Baron, F.N.: Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.* 191, 833—841, 1951.
10. Folch, J., Lee, M., and Stanley, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497—509, 1957.
11. Rouser, G., Kritchevsky, G. and Yamamoto G.: *Lipid Chromatographic Analysis*, Dekker Inc. New York, pp. 99—162, 1967.
12. Skipski, V.P. and Barclay, M.: Thin layer chromatography of lipids, In *Method in Enzymology* Vol. 14, ed. J. M. Lowenstein Academic Press N.Y. pp. 531—598, 1969.
13. Rosenthal, H.L., Pfluke, M.L. and Busgalia, S.: A stable iron reagent for determination of cholesterol. *J. Lab. Clin. Med.* 50, 318—322, 1957.
14. Hayami, M., Okabe, A., Kariyama, R., Abe, A. and Kanemasa, Y.: Lipid composition of *Staphylococcus aureus* and its derived L-forms *Microbiol. Immunol.* 23, 435—442, 1979.
15. Kates, 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.
16. Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911—917, 1959.
17. Razin, S., Kutner, S., Efrati, H. and Rottem, S.: Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 598, 628—640, 1980.
18. Romijin, J.C., Van Golde, L.M.G., Mc Elhaney, R.N. and Van Deenen, L.L.M.: Some studies on the fatty acid composition of total lipids and phosphatidylglycerol from *Acholeplasma laidlawii* B and their relation to the permeability of intact cells of this organism, *Biochim. Biophys. Acta* 280, 22 — 32, 1972.
19. Plachett, P. and Rodwell, A.W.: Glycerolipid biosynthesis by mycoplasma strain, Y. *Biochim. Biophys. Acta* 210, 230—240, 1970.

Membrane lipids of *Mycoplasma orale*

Shozo KUKIDA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

Lipid compositions of cell membrane of *Mycoplasma orale* CH 19299 were examined. The membrane lipids consisted of neutral lipids (43.5%) and phospholipids (56.5%). In the neutral lipid, 64% was cholesterol, 9% was cholesterol ester and the rest mainly consisted of triglycerides. Phospholipids comprize 53% of sphingomyelin, 32% of phosphatidylglycerol and 15% of phosphatidylcholine. There was not any lysophosphatidic acid, cardiolipin or glycosyldiglycerides. The fatty acids were restricted to C₁₆ and C₁₈ regardless of the phospholipid species. Phosphatidylglycerol was the sole phospholipid that was de novo synthesized in the cell. No fatty acid was synthesized when examined by using ¹⁴C-acetate as the substrate. The mode of lipid synthesis in the cell membrane was discussed with reference to other mycoplasma species.