博士（水産科学）　藤　島　裕　典

学 位 論 文 題 名

細菌由来ホスファチジルグリセロールの立体構造に関する研究

学位論文内容の要旨

天然有機化合物には、分子内にキラル中心が存在し光学活性を示すものが多い。タンパク質の構成要素であるアミノ酸（グリシンは不斉炭素原子が存在しないので除く）はL型であり、核酸の構成糖はD型である。脂質においては、グリセロールや通常の脂肪酸は光学不活性だが、これらを構成成分とするグリセロリン脂質はL型 (*R*配置) である。しかし、最近高等植物や海洋生物中の神経系ペプチドからD-アミノ酸、古細菌からD型のリン脂質が見いだされ、これらの非天然型成分の分布、生理機能、分析法に対する関心が高まっている。

酸性リン脂質の一つであるホスファチジルグリセロール（PG）は、生体膜の構成成分として生物界に広く分布している。動物においては肺サーファクタント（肺表面界面活性物質）の主要成分の一つとして肺表層に比較的多く存在し、優れた界面活性作用を示す。植物では葉緑体に多く存在し、その分子種組成を変えることによって低温に適応すると考えられている。細菌においてはホスファチジルエタノールアミン (PE) と並ぶ主要脂質の一つである。PGは分子中にキラルの中心を2個有するためFig.1に示すような4つの立体異性体が存在可能であるが、生物由来PGの立体配置は従来*sn*-3:*sn*-1'(*R,S*)であるとされてきた。しかし、最近板橋らはキラル高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてPGの立体異性体を分析する方法を開発し、数種の生物由来 PG の立体構造を再評価した結果、*Esherichia coli* 脂質中にこれまで知られていない*sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体が全PG中約11 %存在することを明らかにした。このことは*sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体が細菌内で合成されて*sn*-

3:*sn*-1'(*R,S*)異性体とは異なる機能を有していることを示唆する。細菌における PG は、膜成分であるリポプロテインや浸透圧調整に必要とされる MDO (membrane-derived oligosaccharides) の生合成系へ関与しており、その欠損は高温や低浸透圧下に置かれた菌体の増殖速度や致死性に大きな影響を及ぼすことが明らかにされている。また、*E. coli* では膜脂質組成の変化によって定常期における長期間培養時の生存能力に大きな差が現れることが知られており、膜を構成するリン脂質組成の変化により酸への適応性や酸ショックに対する応答性に違いが見られることも知られている。しかし、膜を構成する PG の立体異性体組成と菌体の環境適応の関係については何も明らかにされていない。また、立体異性体間の生理機能の違いについても知られていない。

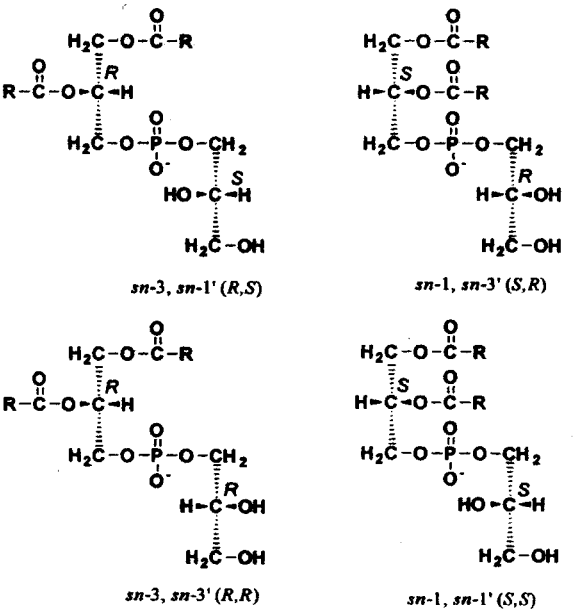

Fig.1 Structures of phosphatidyglycerol stereoisomers

本研究は、細菌における *sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体の分布、生理機能および生合成の解明を目的とし、以下のことについて検討した。(1) PG の立体異性体分析システムの確立、(2) 細菌における *sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)異性体の分布、(3) PG 立体異性体組成におよぼす環境の影響。

(1) PG の立体異性体は、これまで 3,5-ジニトロフェニルウレタン (DNPU) 誘導体を薄層クロマトグラフィー (TLC) により精製した後、キラル HPLC で分析されてきた。この精製は分析の妨げとなる夾雑物を取り除くために必要不可欠の操作である。本研究では TLC での精製過程を省略し、シリカゲルカラムを用いる HPLC での精製とキラル HPLC での立体構造分析を同時に連続的に行うカラムスイッチング法を用いて従来のキラル HPLC のみを用いる分析法よりも簡単で迅速な PG の立体異性体分析システムを確立した。すなわち、反応混合物をシステムに注入後約 40 分で *sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)と *sn*-3, *sn*-1' (*R,S*)のジアステレオマーを明りょうに分離することに成功した。

(2) 47株の細菌由来PGの立体構造を分析した結果、約3分の2にあたる30株に、従来生物由来PGには存在しないと考えられてきた*sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)異性体が全PG中に0.4～9.6 % 存在することが明らかとなった。この結果は*sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)異性体は少量ではあるが広く細菌に分布することを示唆するが、属レベルでの分類学的位置と*sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)異性体の存在の有無に明瞭な相関は認められなかった。この*sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)異性体の生成には*sn*-グリセロ-1-リン酸とCDP-ジアシルグリセロールからホスファチジルグリセロール-1-リン酸を経て合成される「*sn*-グリセロ-1-リン酸経路」、菌体内に豊富に含まれるPEとグリセロールからホスホリパーゼD (PLD) のホスファチジル基転移反応によって合成される「PLDによるホスファチジル基転移反応」およびラセミ化酵素による*sn*-3, *sn*-1' (*R,S*)異性体の*sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)異性体への「ラセミ化」の3つの経路が考えられが、いずれの経路によるかは今後の課題として残された。

(3) 多くの細菌から見いだされた*sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)異性体の菌体内での役割や生理機能を明らかにするため、菌体を取り巻く環境のPG立体異性体組成に及ぼす影響について検討した。培養時間、培地pHおよび培養温度をそれぞれ変化させて細菌を培養した結果、培養時間については、より長時間培養し菌体の生育が進むにつれて全PG中に占める*sn*-3, *sn*-3' (*R,R*)異性体の含量が徐々に増加した。*E. coli*において、飢餓状態の菌体は細胞分裂だけが進行して成長が伴わないために、細胞数は増加するが菌体が小型化していく現象が見られることが知られている。また、増殖期の菌体は桿状をしているが、増殖が停止した菌体は増殖期の菌体のおよそ10 %に大きさが縮小し、この縮小に伴い細胞膜が肥大化することが知られている。本実験においても、長時間培養によるストレスからこのような現象が菌体に起こり、ストレス応答物質として*sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体がより多く生合成されると考えられる。また、PGは菌体膜を構成する主要なリン脂質であるため、菌体の縮小に伴い肥大化した膜を作るために立体異性体組成を変えていることも推察される。培地pHの変化については、通常培養に用いるpH 7では全ての株で他のpH(5,6,8および9)よりも比較的低い値を示した。pH 7よりも高いpHあるいは低いpHに調整した培地を用いると*sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体含量は増加した。このことより、*E. coli*はPGの立体異性体組成を変えること

によって pH ストレスに適応していると考えられる。培養温度の影響については、低温で培養した場合はごく少量の *sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体しか含まなかったが、培養温度の上昇に伴いその含量は徐々に増加し、多いものでは全 PG 中 4 分 1 を占めるまでになった。また、示差走査熱量 (DSC) 分析によって *sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体の方が *sn*-3:*sn*-1'(*R,S*)異性体よりも若干高い融点を持つことが示された。これらのことから菌体は環境の温度変化に適応し膜の流動性を保つために脂肪酸組成ばかりでなく、PG の立体異性体組成を変えることによって膜の流動性を調節していると考えられる。菌体は異常環境において外部からのショックを受けにくくするため分厚い膜を形成すると言われている。この強固な膜を形成するために *sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体の含量が増加すると考えられ、菌体中で *sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体は異常環境によるショックから菌体を守る役割を担っている事が示唆される。

以上、本研究では PG の立体異性体を分析する新しい HPLC システムを開発し、海洋細菌をはじめとする種々の細菌に存在する PG の立体構造を明らかにし、多数の細菌から従来天然には存在しないとされてきた *sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体を見いだした。この異性体は細菌の生育の進行や培養環境の変化にともなって著しく増加したことから、細菌は環境の変化に適応するために膜リン脂質の不飽和度を変化させるばかりでなく PG の立体異性体組成も変えることが明らかとなった。今後 *sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)異性体の生合成経路が明らかにされて、細菌内での役割がより明確になることが期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　板　橋　　豊

副　査　　教　授　　鈴　木　　翼

副　査　　教　授　　宮　下　和　夫

副　査　　助教授　　澤　辺　智　雄

学 位 論 文 題 名

細菌由来ホスファチジルグリセロールの立体構造に関する研究

タンパク質を構成するアミノ酸はL型の立体配置を有し，核酸の構成糖はD型である。生体膜を構成するリン脂質もキラルな分子であり，L型配置（絶対配置R）を有している。これら生体成分のホモキラリティーは地球上の全生物に共通する。しかし，最近D型アミノ酸が種々の生物中に存在することが報告され，また古細菌からはエーテル結合を有する特異なD型リン脂質が見出されたことから，これら"非天然型"成分の由来，分布，機能及び分析法に大きな関心が寄せられている。本研究は，大腸菌脂質の主要成分であるホスファチジルグリセロール（PG）に，従来知られている構造［*sn*-3:*sn*-1'(*R,S*)］とは異なる特異な立体異性体［*sn*-3:*sn*-3'(*R,R*)］の存在することに着目し，海洋細菌を含む種々の細菌における*R,R*異性体の分布と機能を明らかすることを目的に行われたものである。得られた成果は以下のように要約される。

(1) 細菌に存在するPGの立体構造を短時間で正確に決定する方法として，カラムスイッチングキラル高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を確立した。PG異性体は，3,5-ジニトロフェニルウレタン誘導体に変換してはじめて分離可能になるが，その場合，試薬由来の不純物を取り除くため，薄層クロマトグラフィー等による精製が必要不可欠である。本研究では，このような煩雑な前処理操作を省く方法として，順相カラムとキラルカラムをオンラインで連結したカラムスイッチングチング HPLC 法を検討した。すなわち，はじめに順相カラムで試薬由来の不純物を含まないPG誘導体のみを分離してループに留め，次にこれを6方バルブを切り替えることによりキラルカラムに導入して立体異性体を分析する新しいシステムを構築した。このシステムを用いて，*R,R*異性体と*R,S*異性体を明瞭に分離して，それぞれを正確に定量することを可能にした。

(2) 確立したカラムスイッチングチングHPLCを主に用いて，大腸菌と海洋細菌を含む種々の細菌 47 株の PG を分析した結果，大腸菌では全ての株に，また海洋細菌では約半数の株（*Pseudoalteromonas, Psychrobacter, Devosia, Photobacterium, Vibrio* など），De に *R,R* 異性体が全 PG 中 0.1～7％存在することを見出した。ま

た，微細藻2株(*Heterosigma akashiwo*, *Chlorella vulgaris*)，海藻1種(アオノリ，*Enteromorpha* sp.)及び高等植物4種(ホウレンソウ，パセリ，大根及び緑茶)の葉のPGからは*R,R*体は検出されず，*R,S*体のみを含むことを認めた。これらの結果から，*R,R* 体は細菌の細胞膜を構成する成分として細菌に広く分布することが明らかとなった。

(3) 大腸菌(4株)と海洋細菌 *Deleya aquamarina* に存在する*R,R*体の含量は生育が進むにつれて増加し，定常期後期の大腸菌では全 PG 中 10-13%，*D. aquamarina* では5%を占めることを見出した。pH 7の培地では，*R,R*体は全ての株で他の pH よりも比較的低い値を示した。また，低温(15－20℃)で培養した場合は，ごく少量の *R,R* 体しか検出されなかったが，培養温度の上昇に伴いその含量は徐々に増加し，大腸菌の場合，50℃付近では全PG中4分1を占めることを明らかにした。細菌は環境の変化に適用するために菌体膜の脂肪酸組成を変えて膜の流動性を調整することはよく知られているが，本研究では，「細菌は脂肪酸組成ばかりでなく，PG の立体異性体組成をも変えて環境(温度，培地 pH)の変化に適用する」との新しい考えを提唱した。

(4) *R,R* 体の生成について，以下の 3 つの経路を推測した。*sn*-グリセロ-1-リン酸とCDP-ジアシルグリセロールからホスファチジルグリセロール-1-リン酸を経て生成する「*sn*-グリセロ-1-リン酸経路」，菌体内に豊富に含まれるホスファチジルエタノールアミンとグリセロールからホスホリパーゼ D (PLD) のホスファチジル基転移反応によって生成する「PLD によるホスファチジル基転移反応」及びラセマーゼの作用による*R,S*の*R,S*へのラセミ化。いずれの経路によるかは今後の課題として残されたが，この推定は脂質のキラリティーの由来や PG 異性体の機能を明らかにする上で有益な知見を与えるものである。

以上の成果は，PG の立体異性体を高感度で正確に分析するシステムを構築し，種々の細菌の PG から，これまでその存在が知られていなかった“非天年型”配置の *R,R* 体を見出し，その機能に関して新しい考えを提唱したものであり，審査員一同は本研究が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。