

## 論文の内容の要旨

論文題目 環境変化に対する黄色ブドウ球菌のリン脂質組成変化の役割

氏名 市橋 伯一

### 序

細胞の内外を区別している細胞膜は、外部環境からの刺激に直接さらされる。細胞膜のもつ流動性や、表面の電荷などの物性は、膜と相互作用するタンパク質の活性に影響を及ぼしている。したがって、細胞膜の物性を変化させるような環境変化に対して、適切に対応して細胞膜の恒常性を維持することが細胞の増殖に必要なだと予想される。細胞膜の主要な構成成分であるリン脂質は、親水性の頭部と、疎水性の脂肪酸鎖からなる。その環境適応変化として、低温での脂肪酸鎖の不飽和化が知られている。一方、頭部の親水基の組成変化が環境適応に関わる例は知られていない。

ところが大腸菌、枯草菌、黄色ブドウ球菌、出芽酵母では、環境変化や増殖期に対応して、リン脂質の頭部の組成が変化することが報告されている。特に黄色ブドウ球菌では、その変化が著しい。黄色ブドウ球菌は主要なリン脂質として、負電荷を持つフォスファチジルグリセロール(PG)と PG にリジンがエステル結合した正電荷を持つリジルフォスファチジルグリセロール(LPG)を有するが、LPG 含有率は培地中の塩濃度により大きく異なることが報告されている。しかしながら、環境変化に対するリン脂質組成変化の意義はどの生物種においても明らかになっていない。LPG 合成酵素 MprF を破壊した黄色ブドウ球菌の変異株は、37℃、生理的塩濃度では増殖可能である。したがって、LPG は通常の培養

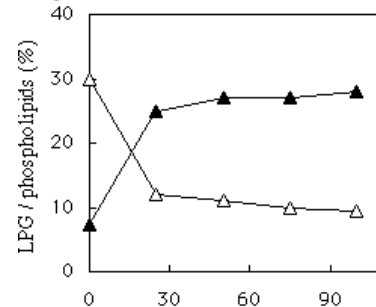
条件下では増殖に必須でないと考えられている。しかしながら私は、LPG はその含有率が上昇する環境に対する適応に必要であると考え、その検証を行った。

## 結果と方法

### 1. 低塩濃度、高温シフトにより、LPG は短時間で誘導される

まず、私は環境変化による LPG 含有率の時間変化を検討した。その結果、培地中の塩濃度を 10% から 1% に減少させると、25 分以内に LPG 含有率は 6% から 25% に大きく上昇した (Fig. 1)。さらに、私は培養温度を上昇させた場合にも LPG 含有率が上昇することを見出した。

Fig. 1 塩濃度変化後のLPG含有率の変化



### 2. LPG が増加する高温かつ低塩濃度で、LPG 欠損株の増殖が阻害された。

次に私は、LPG が増加する高温、低塩濃度における増殖を調べた。コロニー形成数を比較したところ、低塩濃度 (0.1% NaCl) の培地では、野生株に比べ、LPG 欠損株での 30℃ に対する 44℃ でのコロニー数は 100% から 0.03% に低下した。このコロニー数の低下は、培地中の NaCl 濃度を上昇させることにより約 100% まで回復した。したがって、高温かつ低塩濃度の条件では LPG 欠損株の増殖が阻害されることがわかった。

### 3. 高温かつ低塩濃度の LPG 欠損株では細胞壁の分離ができなくなっていた。

次に、44℃ での LPG 欠損株の表現型を詳しく解析した。顕微鏡観察の結果、LPG 欠損株では野生株に比べ、細胞どうしの結合の程度に違いが認められた。すなわち、野生株、および 30℃ の LPG 欠損株では、90% 以上の細胞について、1 つか、2 つの細胞が結合しているのに対し、44℃ シフト後の LPG 欠損株ではこの割合は 28% に低下し、残りの 72% の細胞は 3 つ以上の細胞が結合していた。したがって、高温で LPG 欠損株の細胞分離が阻害されていると考えられた。さらに電子顕微鏡観察の結果、高温の LPG 欠損株では細胞質の分離はできているが、細胞壁の分離ができていないことが判明した。

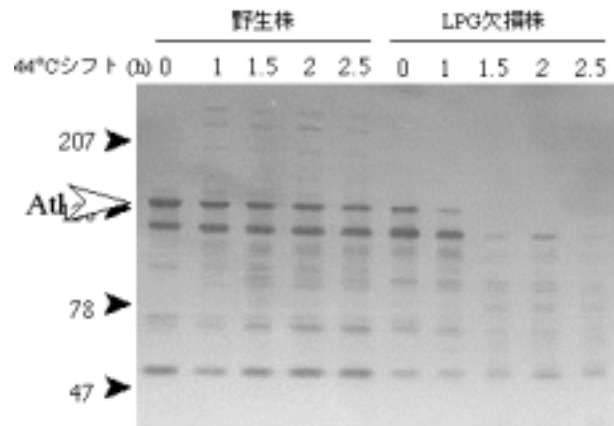
### 4. LPG 欠損株では細胞壁の分離に重要なペプチドグリカン分解酵素活性が低下していた。

細胞壁の分離にはペプチドグリカン分解酵素が必要である。黄色ブドウ球菌には、分泌性のペプチドグリカン分解酵素が複数存在する。私はその中で、細胞壁の分離に重要であることが報告されている Atl タンパクの活性が LPG 欠損株で低下しているかについて検討

した。ペプチドグリカン分解活性の検出には、基質を含んだポリアクリルアミドゲル内で、分解酵素活性をバンドとして検出する系を用いた。野生株では温度シフト後も AtI の活性は大きくは変わらなかったが、LPG 欠損株では、44°C シフト後その活性が著しく低下していた(Fig. 2, 白矢尻で AtI の全長を示す。

その下の複数のバンドは活性を有する AtI の分解産物である)。このとき、総タンパク量は、野生株と LPG 欠損株で変わらなかった。したがって、高温の LPG 欠損株では、ペプチドグリカン分解活性が低下していることが分かった。さらに私は、このとき AtI タンパク質の合成速度が低下していることを見出した。

Fig. 2 高温のLPG欠損株におけるAtI活性の低下



#### 5、ペプチドグリカン分解活性の低下は、LPG 欠損株の細胞壁分離阻害、増殖阻害を引き起こした。

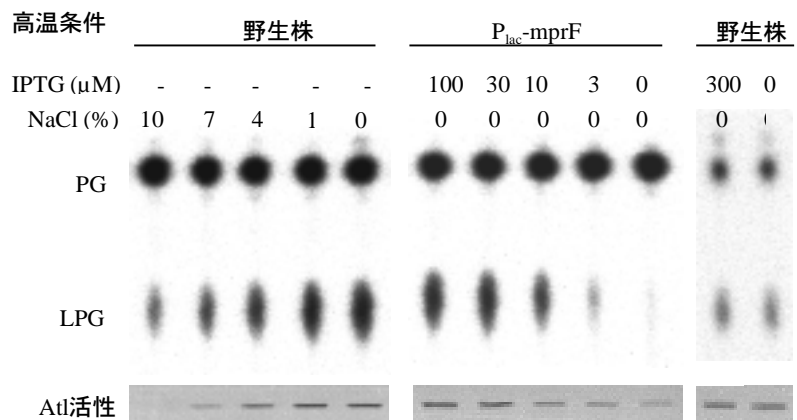
ペプチドグリカン分解酵素活性低下が、高温での LPG 欠損株における細胞壁分離不全、および増殖阻害の原因であるかを検討するため、外からペプチドグリカン分解酵素を加えることにより、LPG 欠損株の細胞が分離するか、あるいは増殖ができるようになるか検討した。その結果、高温での LPG 欠損株は、72%の細胞について 3 つ以上の細胞が結合していたが、ペプチドグリカン分解酵素であるリゾスタフィンで処理することにより、その割合は 8%に低下し、ほとんどの細胞が 1 つか 2 つに分散していた。また、リゾスタフィンを加えた低塩濃度寒天培地上では、44°Cにおいて LPG 欠損株のコロニー形成がみられた。したがって、高温かつ低塩濃度の LPG 欠損株における細胞壁分離不全、増殖阻害は、ペプチドグリカン分解活性の低下によると考えられた。

#### 6、野生株の黄色ブドウ球菌では、低塩濃度で LPG 含有率が上昇するのに伴い、ペプチドグリカン分解酵素の活性が上昇した

LPG 欠損株の解析結果から、LPG がペプチドグリカン分解酵素の発現誘導に必要であることがわかった。野生型の黄色ブドウ球菌では、LPG が欠損することはなく、環境変化に応じて、全リン脂質の 4%~25%程度の範囲で変化する。そこで、この LPG 含有率の変化に伴ってペプチドグリカン分解酵素(AtI)の活性が上昇するかを検討した。その結果、塩濃度の低下により、LPG 含有率が増加すると同時に AtI 活性も増加することを見出された(Fig.

3 左側)。このときの AtI 活性上昇に対する LPG 含有率上昇の寄与を知るため、塩濃度を低く保ったままで、LPG 合成酵素の発現を人為的に抑えることを試みた。IPTG により LPG 合成酵素 MprF を誘導する株(P<sub>lac</sub>-mprF)を構築し、IPTG を減らすことにより低塩濃度のままで MprF 発現量を低下させた。その結果、LPG 含有率低下に応じて AtI 活性も低下した(Fig. 3 右)。したがって、低塩濃度における黄色ブドウ球菌の LPG 含有率の増加、及び減少に伴い、AtI 活性が増加、及び減少することが分かった。

Fig. 3 低塩濃度における LPG 含有率の AtI 活性に対する影響



#### 7. AtI 以外のタンパク質の発現、活性に対する LPG 欠損の影響

さらに私は、LPG 欠損株では、AtI だけではなく、黄色ブドウ球菌の病原性に関与するプロテイン A、腸管毒素 B、溶血毒素 α についても、44℃、並びに 37℃、生理的塩濃度の条件で発現量が低下していることを見出した。

また、私は修士課程において、LPG は *in vitro* で DNA 複製開始タンパク DnaA の再活性化を阻害することを見出していたことから、LPG の DNA 複製に対する影響も調べた。その結果、LPG 欠損株では、染色体の複製開始点をもつプラスミド(oriC プラスミド)のコピー数が上昇していた。この結果は、LPG 欠損株では、DnaA が活性化されていることを示唆する。

#### まとめと考察

本研究で私は、黄色ブドウ球菌の細胞膜における LPG 含有率が高温、低塩濃度の環境条件で増加すること、並びにこの条件で LPG 合成酵素が細胞の増殖、並びに細胞壁の分離に必要なであることを示した。さらに私は、黄色ブドウ球菌で見られる低塩濃度での LPG 含有率の上昇が、ペプチドグリカン分解活性の誘導を引き起こすことを示唆する結果を得た。したがって、塩濃度や温度などの環境条件の変化に伴い細胞膜の LPG 含有率が変化し、その結果、ペプチドグリカン分解酵素の発現が制御されると予想される。また、LPG 欠損株では AtI だけではなく、いくつかの病原性タンパクの発現も低下していたことから、この制御は、黄色ブドウ球菌の病原性発揮機構にも働くと考えられる。このように細胞膜のリ

ン脂質の頭部の組成変化が環境によって変化し、遺伝子発現の制御に重要であることを示唆したのは本研究が初めてである。また、LPG 欠損株では、oriC プラスミドのコピー数が増加しており、複製開始蛋白 DnaA が活性化していることが示唆された。したがって、リン脂質組成変化は、DNA 複製開始にも影響を与えていると予想される。この機構は、環境に応じた増殖速度の制御に寄与していると予想している。

今回の実験は、高温、低塩濃度という特殊な条件で行っているが、LPG 欠損株では、37℃ かつ生理的塩濃度でも、増殖は正常に見えるものの、細胞壁の分離が一部阻害されていることが示唆されている。また、病原性タンパクの発現量は 37℃でも大きく低下していた。したがって、LPG によるペプチドグリカン分解酵素や病原性タンパクの発現誘導は、通常の状態においても制御に働いていると考えている。

枯草菌、大腸菌、酵母でも塩濃度に応じてリン脂質組成が変化することが知られている。これらのリン脂質組成変化の役割も、それぞれの環境条件への適応に働くと予想している。頭部の違いによるリン脂質組成変化は、生命の環境適応のひとつの機構として広く使われていると私は考えている。