

## 論文の内容の要旨

論文題目: グラム陽性細菌細胞表層のリポタイコ酸の生合成酵素の同定  
氏名: 奥 裕介

### 序

細菌や真菌の細胞壁などの細胞表層の構成成分は、細胞の恒常性の維持や他の細胞との相互作用に関わると考えられている。これらの生理機能の解明は、微生物の増殖システムや、微生物感染症の病態の理解につながる。グラム陽性細菌は、その細胞表層にリポタイコ酸を有する。リポタイコ酸は、ジアシルグリセロールに2分子のグルコースを基部として、約30分子のグリセロールリン酸がポリマーを形成している(図1)。黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸はペプチドグリカンの分解酵素の活性や細胞膜の安定性に影響を与えること、さらに宿主の自然免疫系の活性化を引き起こすことが生化学的解析により指摘されている。しかし、リポタイコ酸のグリセロールリン酸鎖の合成に与る酵素は未同定であり、細菌細胞の増殖や宿主との相互作用におけるリポタイコ酸の役割についての遺伝学的な解析はなされていない。

本研究で私は、黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸のグリセロールリン酸鎖の生合成に与る酵素を初めて同定し、リポタイコ酸の生理機能に関する遺伝学的な解析を行な

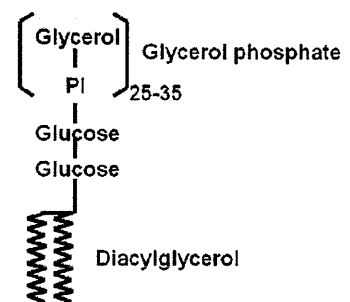


図1. 黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸の構造

った。その結果、リポタイコ酸がペプチドグリカン分解酵素の活性調節、高温での細胞膜への安定性、および宿主との相互作用に寄与する分子であることを示唆する結果を得た。

また、リポタイコ酸とともに、細胞表層に存在するアニオン性のポリマーである細胞壁タイコ酸と、リポタイコ酸が同時欠損できないことを明らかにした。このことは、細胞表層のアニオン性のポリマーであるリポタイコ酸、細胞壁タイコ酸がグラム陽性細菌の増殖に必須の役割を果たすことを示唆している。

## 結果

### 1. 黄色ブドウ球菌 *ltaS* 欠損株は高温感受性を示す

当研究室では黄色ブドウ球菌の高温感受性変異株を多数分離している。この中で、私は、*ltaS* (lipoteichoic acid synthase) と名付けた機能未知遺伝子によって高温感受性が相補される3株に着目した。3株の染色体上の *ltaS* 遺伝子には、アミノ酸置換を導く塩基置換が見出された。1つの株では、染色体上の *ltaS* の読み枠中にストップコドンを生じていることが分かった。*ltaS* 遺伝子欠損株を構築したところ、30℃では増殖可能であったが、37℃以上の高温では増殖ができなくなっていた (図 2)。したがって、機能未知遺伝子 *ltaS* が低温での増殖には不要であるが、高温での増殖に必須であることが示唆された。

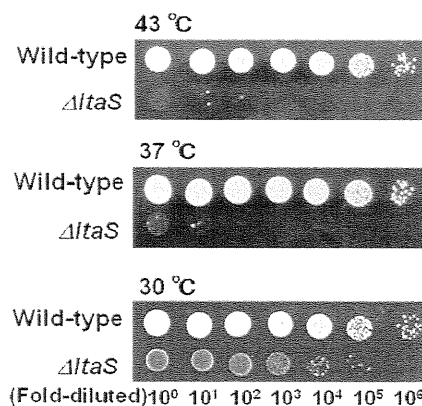
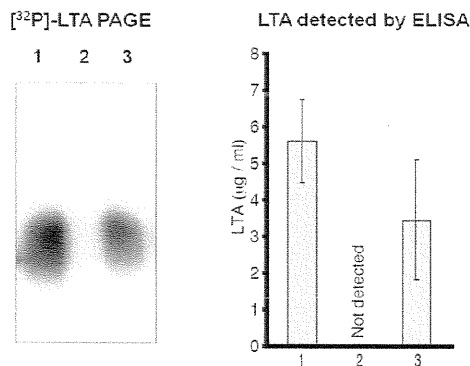


図 2. 黄色ブドウ球菌 *ltaS* 欠損株は高温感受性を示す

### 2. *ltaS* 欠損株におけるリポタイコ酸の欠損

*ltaS* 遺伝子がコードするタンパク質は全長 68kDa であり、N 末端側に膜貫通領域を有している。また C 末端側には alkaline phosphatase 様のドメインが存在する。C 末端にヒスチジンタグを融合した LtaS タンパク質を発現させると、全長のタンパク質は膜面に回収された。また、C 末端側の alkaline phosphatase 様のドメインを含む領域は、培地中に検出さ



1. Wild-type / vector, 2.  $\Delta ltaS$  / vector, 3.  $\Delta ltaS$  / pSltas  
図 3. *ltaS* 欠損株におけるリポタイコ酸の欠損

れることが分かった。このことから、LtaS タンパク質の触媒部位は細胞外に配向しており、リン酸を含む細胞表層の構造物の代謝に与ると予想された。*ltaS* 欠損株の細胞表層構造物に失われているものがあるかを調べたところ、*ltaS* 遺伝子欠損株は、リポタイコ酸を欠損していることが見出された (図 3)。

リポタイコ酸のグリセロールリン酸鎖はフォスファチジルグリセロール (PG) を供与体として合成されると考えられている。そこで *ltaS* 遺伝子欠損株の PG の代謝回転をパルスチェイス法により調べた。その結果、*ltaS* 欠損株の PG の半減期は 120 分以上であり、野生株の 20 分よりも著しく長くなっていた。これらの結果は、*ltaS* 遺伝子が PG を基質としたリポタイコ酸の生合成に必要であること、および細胞膜の PG の大部分はリポタイコ酸の生合成に用いられを示唆している。

### 3. *ltaS* 遺伝子を大腸菌細胞内で異所発現することによりリポタイコ酸が合成される

リポタイコ酸を持たず、リポタイコ酸合成の基質である PG を有する大腸菌の細胞内で LtaS を異所発現させた結果、リポタイコ酸の合成が生じた。大腸菌細胞内でのリポタイコ酸の合成は、PG の量が著しく低下している *pgsA3* 変異株では見られなかった (図 4)。したがって、*ltaS* 遺伝子が PG を基質とするリポタイコ酸の合成酵素をコードすることを示唆された。

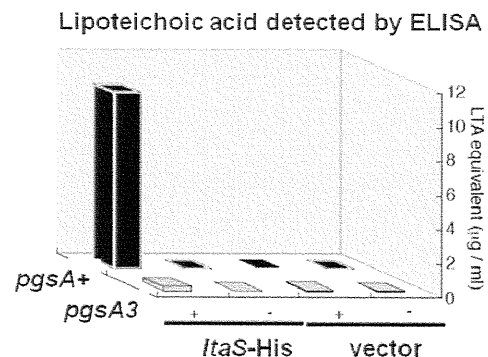


図 4. 大腸菌細胞内で *ltaS* 遺伝子を異所発現することによりリポタイコ酸が合成される

### 4. *ltaS* 欠損株における細胞の分離不全

リポタイコ酸は、ペプチドグリカン分解酵素と結合し、その活性に影響を与えることが報告されている。そこで、リポタイコ酸を欠損する *ltaS* 変異株では、ペプチドグリカン分解活性が野生株と比べて大きく低下していた。さらに細胞を電子顕微鏡下で観察すると、*ltaS* 欠損株は培養温度によらず細胞の不分離を生じており、細胞壁が肥厚していた (図 5)。これらの

菌体の透過型電子顕微鏡像

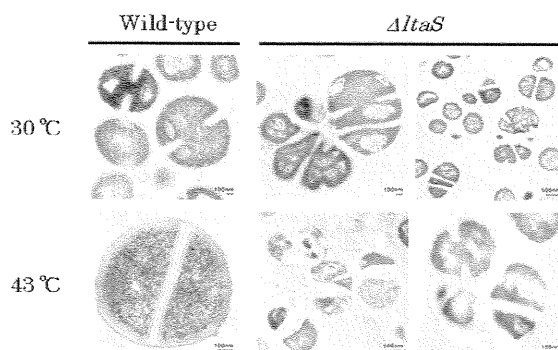


図 5. *ltaS* 欠損株における細胞の分離不全

結果は、リポタイコ酸がペプチドグリカン分解酵素の活性を促進することを介して細胞の分離に働くことを遺伝学的に示したものである。また、細胞の分離不全は 30°C でも生じることから、*ltaS* 欠損株の増殖不全を説明しないと考えられた。

### 5. *ltaS* 欠損株は高温で細胞膜に障害を生じる

合成膜を用いた *in vitro* の研究から、リポタイコ酸は、細胞膜の流動性を低下させる作用を有することが報告されている。私は、リポタイコ酸を欠損する *ltaS* 欠損株では、高温で細胞膜が障害される可能性を考えた。SYTOX Green は核酸に結合して蛍光を生じるが、細胞膜内外の電位差が保たれていれば排出されるため、生細胞はこの色素により染色されない。細胞膜の電位差が失われると、この色素は細胞内に取り込まれ、核酸に結合して蛍光を生じる。*ltaS* 欠損株を高温シフトすると、SYTOX Green で染色される細胞の割合が増大した (図 6)。この結果は、*ltaS* 欠損株は高温で細胞膜内外の電位差を失うことを示唆している。すなわち、リポタイコ酸は細菌細胞膜の障害を防ぐ役割を有し、この機能が黄色ブドウ球菌の高温での増殖に必須であると考えられた。

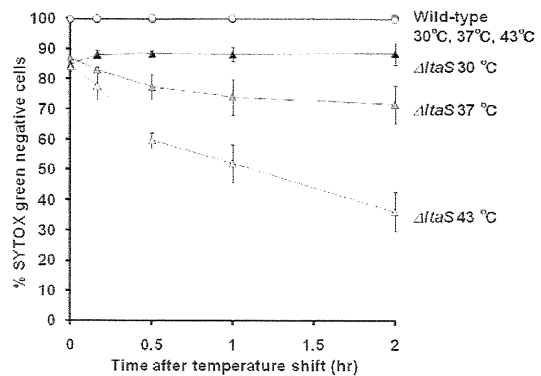


図 6. *ltaS* 欠損株は高温で細胞膜に障害を生じる

この結果は、*ltaS* 欠損株は高温で細胞膜内外の電位差を失うことを示唆している。すなわち、リポタイコ酸は細菌細胞膜の障害を防ぐ役割を有し、この機能が黄色ブドウ球菌の高温での増殖に必須であると考えられた。

### 6. *ltaS* 欠損株は炎症性サイトカイン放出促進能を低下する

リポタイコ酸は感染宿主の微生物認識に与る受容体に認識され、炎症性サイトカインの放出を導くことが報告されている。マウス腹腔マクロファージを熱処理菌体で刺激したところ、リポタイコ酸を欠損する *ltaS* 変異株は野生株と比べて、IL-6 放出量を低下することが分かった (図 7)。これは、リポタイコ酸が炎症性サイトカインの放出促進に寄与することを合成酵素の変異株を用いて示した初めての結果である。

IL-6 release from macrophage detected by ELISA

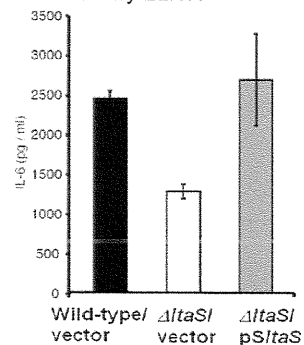


図 7. *ltaS* 欠損株は炎症性サイトカインの放出促進能を低下する

### 7. リポタイコ酸と細胞壁タイコ酸はグラム陽性細菌の増殖に必須である

グラム陽性細菌は、リポタイコ酸と構造的に類似し、細胞壁に共有結合する細胞壁タイコ酸を有する。これらは、細胞表層に負電荷を付与し、細胞表層で

マトリックスを形成する。リポタイコ酸、および細胞壁タイコ酸は、それぞれ単独で欠損することが可能である。リポタイコ酸と細胞壁タイコ酸の両者が増殖に必須な役割を果たすかを検証した。細胞壁タイコ酸の合成に必須な *tagO* 遺伝子と、*ltaS* 遺伝子との2重欠損株を作出した結果、*ltaStagO* 遺伝子欠損株は、いずれの培地においても増殖できなかつた(図8)。このことは、リポタイコ酸及び細胞壁タイコ酸が増殖に必須の役割を果たすことを示す初めての結果である。

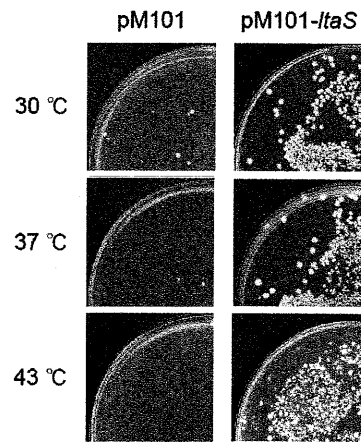


図 8. リポタイコ酸と細胞壁タイコ酸は同時に欠損できない

### 考察

私は黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸のグリセロールリン酸鎖の合成酵素をコードする新規遺伝子 *ltaS* を同定した。*ltaS* 遺伝子は、グリセロールリン酸型のリポタイコ酸を有するグラム陽性細菌に広く保存されていた。したがって、*LtaS* はグラム陽性細菌のグリセロールリン酸型のリポタイコ酸を合成する酵素であると考えられる。

*ltaS* 欠損株の作出により、リポタイコ酸を完全に欠損するグラム陽性細菌変異株を初めて得た。これによりリポタイコ酸が細菌の高温での増殖に必要であることを見出した。リポタイコ酸の細胞膜障害からの防御能が高温での増殖に必要であると考えている。さらにリポタイコ酸は、ペプチドグリカン分解酵素活性を促進する働きや、宿主の免疫担当細胞による炎症性サイトカインの放出促進機能を有することが示唆された。本研究の結果は、リポタイコ酸が、細菌の生理や宿主の相互作用において、多様な機能を有することを示している(図9)。

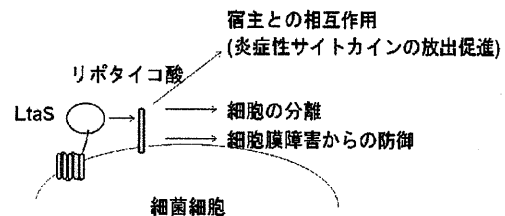


図 9. リポタイコ酸の生理機能

また、本研究では、グラム陽性細菌の細胞表層を構成するアニオン性ポリマーであるリポタイコ酸および細胞壁タイコ酸は増殖に必須の役割を果たすことを明らかにした。これは、アニオン性のポリマーが、グラム陽性細菌の細胞表層において必須の役割を果たすことを示唆する結果である。