

# バクテリアからの動物細胞まで保持されている脂質、カルジオリピンの高次構造、細胞内分布、動態と生理機能

Higher structure, intracellular localization, movement and physiological role of cardiolipin

プロジェクト研究代表者：松本幸次（理工学研究科・教授）  
Graduate School of Science and Engineering, Kouji Matsumoto

## 研究目的

細胞膜の基本構造である脂質二重層はたった1種類の脂質によって再現することができる。それにもかかわらず細胞には数千種の脂質が存在する。このような脂質の多様性の生理的意義はほとんどわかっていないが、ひとつの説明は細胞膜には特定の脂質がつくるドメインが存在し、そのようなドメインの高次構造が生理的に重要な役割を担っている、というものである。しかし、こうした脂質のドメインがどのように形成され、維持されているのか、どのような機能を持っているかについてはほとんど分かっていない。このため、本研究は小林俊秀客員教授（理化学研究所・主任研究員）と共同で、新しいカルジオリピンプローブを開発し、顕微鏡により脂質分布を詳細に解析し、また遺伝的手法により脂質ドメインの形成と機能の解析をおこなうことを目的とする。

## 研究の経過及び成果の概要

### 1. フェージディスプレイ法による新しいカルジオリピンプローブの開発

カルジオリピンは動物細胞のミトコンドリアや細菌細胞膜の主要成分である。カルジオリピンはホスファチジルグリセロールと構造が類似しており、両者を見分けるプローブは報告されていない。本研究ではカルジオリピンに結合し、ホスファチジルグリセロールに結合しないプローブの開発を目指してフェージディスプレイによるスクリーニングを行った。ペプチドとして7アミノ酸、12アミノ酸およびサイクリックペプチドを提示するM13フェージを用い、カルジオリピン固定化プレートへの結合により、カルジオリピンに結合するフェージを取得した。さらにフェージを単クローン化した後、ホスファチジルグリセロールを固定化したプレートに結合しないフェージを選択した。その結果12アミノ酸およびサイクリックペプチドを提示したフェージでは選択性を持つクローンは得られなかったが、7アミノ酸を提示したフェージのうち5つのクローンがカルジオリピンへの選択的結合性を示した。これらのクローンより提示アミノ酸配列を決定し、現在合成ペプチドの脂質結合性測定の準備を進めている。

### 2. 遺伝学的手法によるカルジオリピンドメインの構造と動態の解析

#### 1) リン脂質合成酵素間の相互作用と高次酵素複合体の形成

カルジオリピン合成酵素の細胞分裂隔壁への局在がFtsZや細胞分裂タンパク質などに依存するか、また相互作用があるか否かを明らかにすること、またこれらリン脂質合成酵素群がタンパク質間の相互作用により高次の複合酵素システムを形成している可能性を検討することが本研究の目的である。しかしながら、最近、リン脂質合成の初期過程（リゾホスファチジン酸合成）

において、アシル ACP からアシルリン酸を合成し、これを基質としてアシル基をグリセロール-3-リン酸に転移する、新たな酵素系 (PlsX-PlsY) が肺炎双球菌で報告された (Lu *et al.*, 2006)。同様の PlsX-PlsY 酵素系が、枯草菌にも存在することを、我々は分子遺伝学的、酵素学的な手法により示した (Paoletti *et al.*, 2007; 原ら 2007)。即ち、枯草菌では YneS がアシルリン酸を基質とするアシル転移酵素の機能をもつ PlsY であること、それが、これまで大腸菌で知られてきたアシル ACP を基質とする PlsB 酵素とはまったく異なるものであることを明らかにした。また、これに加えて PlsX は PlsY にアシルリン酸基質を供給する以外に、何らかの必須機能をもつことを示した。このため本年度は、これらリン脂質合成初期過程の酵素 PlsX、PlsY (YneS)、PlsC (Yhd0) およびアシルキャリアータンパク (ACP) の相互作用を中心に検討した。大腸菌 two-hybrid (BATCH) 法による解析は、PlsX は PlsY と相互作用すること、PlsX、PlsY はそれぞれ自己相互作用により多量体となること、また PlsY と ACP との間では相互作用は検出されないことを見出した。すなわち、リン脂質合成の最初の反応を触媒する酵素である PlsY は、自らが用いる基質アシルリン酸を合成する酵素 PlsX と複合体を形成して機能している可能性が示された。

## 2) カルジオリピン合成酵素を隔壁部位に局在させる酵素内の機能領域の解明

リン脂質合成酵素が細胞分裂隔壁部位への特異的局在を実現するには、このために働く特定の領域が酵素タンパク質内に存在することが期待され、このような領域を特定するための解析を進めた。本研究計画ではカルジオリピン合成酵素に注目し、COOH 末端の両親媒性ヘリックス領域を欠失させた一連の変異タンパク質-GFP 融合体を構築し、Western 法による融合タンパクの size と量の確認をも加え、局在の変化を丁寧に解析した。その結果、COOH 末端にある 2 つの両親媒性ヘリックス領域が局在に関与していることを見出し、更に末端側の 1 つのヘリックス領域 (24 アミノ酸残基) のみの GFP 融合体でも十分隔壁に局在できることを明らかにした。現在、このヘリックス領域に注目し、局在に必須な最小領域とそのアミノ酸配列の役割を解明することを目指して、部位特異的な変異導入実験を進めている。

## 発表論文

- Matsuura, T., Matsuura, T., Usami, R., Yoshida, H., Hara, H., and Matsumoto, K. (2007) Characterization of a novel esterase YkoN from *Bacillus subtilis* Marburg. *J. Jpn. Soc. Extrimophiles* **6**, 32-37.
- Matsuura, T., Terayama, T., Usami, R., Yoshida, H., Hara, H., and Matsumoto, K. (2007) Involvement of YkoN in production of a new phospholipid in *Bacillus subtilis* Marburg. *J. Jpn. Soc. Extrimophiles* **6**, 38-44.
- Nagahama, H., Oshima, T., Mori, H., Matsumoto, K., and Hara, H. (2007) Hyperexpression of the *osmB* gene in an acidic phospholipid-deficient *Escherichia coli* mutant. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **53**, 143-151.
- 原 義令, 原 弘志, 松浦孝枝, 宇佐美 諭, 山下 純, 松本幸次 (2007) 枯草菌の脂質合成初期過程の分子遺伝学的研究. *脂質生化学研究* **49**, 298-301.