

大腸菌主要膜酸性リン脂質の生理機能

Physiological role of the major acidic phospholipids in *Escherichia coli*

理工学研究科生命科学部門 松本幸次

はじめに

細胞を外界から仕切っている細胞膜の基本構造は脂質がつくる 2 重層構造である. この 2 重層は簡単に実験室でも再現できることから単純な構造のようにも考えられるが, 実際の細胞膜にはたいへん多くの種類の脂質があり, 植物, 動物, バクテリアはそれぞれ独自の脂質を持っている. 何故多くの種類の脂質があり, それぞれの脂質はどのような役割をもつのかは殆んど分かっていない.

大腸菌などの細菌や高等生物のミトコンドリアの膜を構成する主要なグリセロリン脂質であるホスファチジルグリセロール (PG) とカルジオリピン (CL) は, 極性基部分に含まれるリン酸基により酸性となるために酸性リン脂質と総称される. PG はグリセロール 3 リン酸に脂肪酸が 2 分子結合したホスファチジン酸 (PA) にグリセロールが結合した構造をもつ分子であり, CL は 2 分子の PG が縮合してグリセロールを失った構造をもつ分子である (図 1).

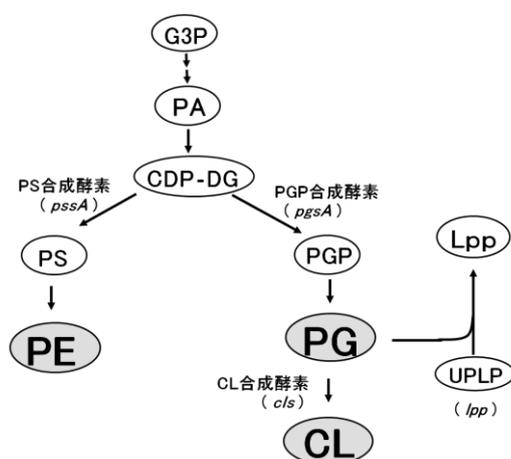


図 1 大腸菌リン脂質生合成経路.

略号: PG, ホスファチジルグリセロール; CL, カルジオリピン; PE, ホスファチジエタノールアミン; PA, ホスファチジン酸; G3P, グリセロール 3 リン酸; CDP-DG, CDP ジアシルグリセロール; PGP, ホスファチジルグリセロリン酸; Lpp, 外膜主要リポタンパク質 (成熟型); UPLP, プロリポタンパク質.

大腸菌においては PG と CL は全リン脂質に対してそれぞれ約 15%と約 5%を占める主要な酸性リン脂質となっており, 残り大部分はエタノールアミンにより両イオン性となるホスファチジエタノールアミン (PE) である. ここで“主要な”ことわる理由は野生型大腸菌の膜中にはリン脂質生合成の中間体として, 酸性を示すリン脂質 PA や CDP ジアシルグリセロール (CDP-DG) が極少量存在しているためである. 主要な酸性リン脂質 (PG と CL) は, *in vitro* の解析やリン脂質合成酵素の欠損変異株等を用い

た分子遺伝学的解析により, DNA 複製開始タンパク質 DnaA の再活性化, Sec 系によるタンパク質の細胞外への分泌および PE 生合成の開始過程を触媒するホスファチジルセリン (PS) 合成酵素の活性制御などの重要な細胞機能に関わることが示された. とりわけ PG は完全欠損突然変異株が容易に得られなかったため, 細胞に必須であると考えられてきた.

筆者らは主要酸性リン脂質を完全に欠損する大腸菌の突然変異株が野生型株とほぼ同様に生育することを見出し, これまで考えられてきた主要酸性リン脂質の役割については大幅に見直す必要があること, 脂質は細胞の表層構造を形成する分子を合成するための基質としての役割と, 膜の表層において適切な負電荷を保つための極性基に非特異的な素材として役割の, 異なる 2 つの側面を担うことを示した. 本稿ではこの発見を中心として, 酸性リン脂質 PG の大腸菌細胞増殖における役割について述べる.

主要酸性リン脂質ホスファチジルグリセロールは大腸菌に必須ではない

PG 生合成の開始過程を触媒するホスファチジルグリセリン酸 (PGP) 合成酵素の構造遺伝子 *pgsA* に変異 (*pgsA3*) をもち PG 含量が著しく減少した突然変異株 (全リン脂質の 0.3% 以下) が埼玉大学理学部の渋谷勲先生によって分離され, 1985 年に報告された. この *pgsA3* 変異は他の大腸菌株には導入することは出来ず, 変異は致命的であった. 遺伝学的解析の結果, Braun のリポプロテインと称される外膜主要リポプロテイン (Lpp) の構造遺伝子の欠損変異 *lpp-2* が共存することにより *pgsA3* 変異の致死性はサプレス(抑圧)されていたことが明らかにされた. Lpp の前駆体 (unmodified prolipoprotein: UPLP) は, PG からジアシルグリセリル基を受け取り修飾され, 1 分子の PG を消費する. UPLP のプロセッシングの過程を図 2 に示す.

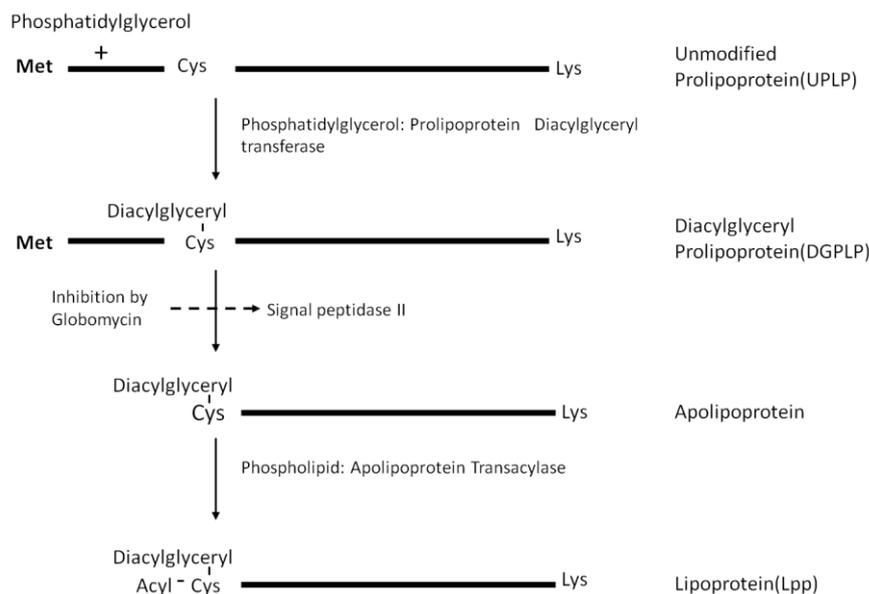


図 2 大腸菌主要リポプロテイン (Lpp) のプロセッシング過程.

Sankaran and Wu (1995) によるものを改変して示す.

ジアシルグリセリル修飾された Lpp 前駆体 (diacylglyceryl prolipoprotein: DGPLP) はシグナルペプチダーゼ II で, 修飾部位の N 末端側 20 残基のシグナルペプチドが切除され, 新たに生じた N 末端が更に脂質を消費するアシル基の修飾を受けて成熟型の Lpp となり, 形成された疎水性領域は外膜に組み込まれる. Lpp 分子の 3 分の 1 は COOH 末端でペプチドグリカンに架橋している結合型であり,

この結合により Lpp は外膜を剛構造体であるペプチドグリカンに繋ぎ留める役割をもつ. Lpp 分子の数は極めて多く細胞あたり 7.2×10^5 分子もあるため, *pgsA3* 変異により激減している PG 分子(野生型の大腸菌では細胞あたり 4.4×10^6 分子であるが,それが 1/50 以下になる)が Lpp 修飾に消費され枯渇するために PG を必要とする他の機能が維持できず大腸菌は死に至るけれども, *lpp* 欠損変異があれば PG の消費が抑えられるので *lpp* 欠損が致死性を回復できるものと解釈することができた. しかしながら,このような解釈では不充分であった. なぜなら,以下に述べるように PG を完全に欠損する変異細胞がよく増殖することができることが判明したからである.

テキサス大学のドーハン(Dowhan, W.)らは, *pgsA* 遺伝子を *lac* プロモーターの制御下に置き,培地に添加する IPTG の濃度で *pgsA* 遺伝子の発現量を制御した菌株を構築して,主要酸性リン脂質(PG と CL)含量の低下とともに増殖速度が低下し,それが 3%より少ない程度まで減少すると増殖は殆ど停止することを 1989 年に示している. 更に 1995 年には *pgsA* 遺伝子を *kan* 遺伝子で挿入破壊した *pgsA30::kan* 変異遺伝子では PG の合成が全くおこらないため致死性を示し, *lpp* 欠損変異によっては回復できないことが同じくドーハンらにより報告された. PG を 0.3%にまで減少させる *pgsA3* 変異が致死性を示すことと, CL 合成酵素の遺伝子 *cls* の破壊による CL の欠損が増殖に殆ど影響を与えないことを考え合わせると,少量の PG が大腸菌の増殖に必須であることをこの結果は示したものであった.

ところが,挿入破壊した *pgsA30::kan* 変異は *lpp* 欠損変異(*lpp-2*)をもつ株に容易に P1 形質導入できること,つまり *pgsA30::kan* 変異の致死性は *lpp* 欠損変異によってサプレスできることを筆者らは明らかにした. すなわち,ドーハンらとは反対の結果を得た. 形質導入により得られた株(*pgsA30::kan lpp-2*)に ^{32}P 標識した無機リン酸を取込ませてリン脂質組成を分析すると, PG と CL はともに検出限界値(0.01%)未満であり,これらの主要酸性リン脂質を完全に欠損していることは明白であった(図 3 および表).

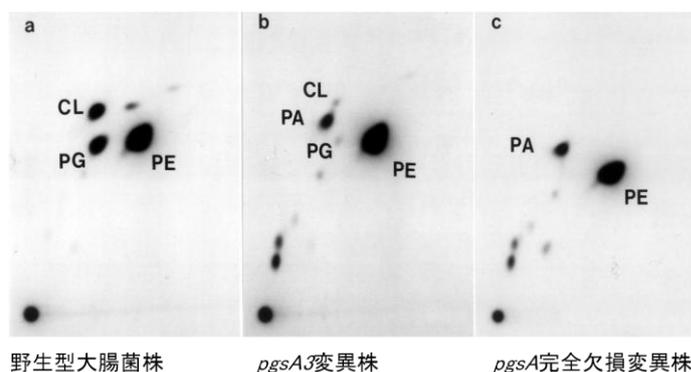


図 3 大腸菌酸性リン脂質欠損株のリン脂質.

各細胞を ^{32}P で標識し,脂質を抽出してシリカゲルプレートを用い 2 次元の TLC で展開した. Kikuchi *et al.*, (2000) による.

表1 大腸菌 *pgsA* 欠損株の脂質組成

菌株	Molar percent					
	PG	CL	PE	PA	CDP-DG	others
<i>pgsA</i> ⁺	11.7	6.5	80.8	<0.01	0.1	0.9
<i>pgsA3</i>	0.3	0.2	92.1	3.8	2.9	0.7
<i>pgsA30::kan</i>	< 0.01	<0.01	90.5	4.0	3.2	2.3

Molar percentage of phospholipids, as calculated from the ³²Pi radioactivities of spots shown in the autoradiograms. Strain S330 was analyzed for two independent transductant clones which gave essentially the same results. Errors in duplicate analyses were less than 3% of each value. Abbreviations: PG, phosphatidylglycerol; CL, cardiolipin; PE, phosphatidylethanolamine; PA, phosphatidic acid; CDP-DG, (d)CDP-diacylglycerol. The detection limit, 0.01%, for the samples of S330 corresponded to 7 cpm.

検出限界値 0.01%に満たないという値は、細胞当たり 1.7×10^7 とされている全脂質分子のうちの、PG は数千分子を超えないことを示している。この完全欠損株は LB 培地などでは野生型株と遜色ない増殖速度で生育したが、低浸透圧培地や最少培地では生育できず、SDS やアンピシリン等に高い感受性を示した。また、この細胞ではリン脂質の生合成中間体である PA と CDP-DG の顕著な蓄積があり、それぞれ 4.0%と 3.2%になっていた。もうひとつの顕著な特性は高温感受性であった。培養を高温 (42°C) に移すと 2 時間後に溶菌が始まった。この高温感受性という思いがけない性質の獲得により、ドーハンらは主要酸性リン脂質は必須であるとした誤った結論に導かれたのであった。彼らは野生型の *pgsA* 遺伝子を高温では複製できない pSC101 プラスミドに載せ、*lpp* 変異をもつ大腸菌に covering plasmid としてもたせたのち、染色体上の *pgsA* 遺伝子を *pgsA30::kan* に置き換えた株を構築した。この菌を 42°C の高温で培養することによりプラスミドを除去 (cure) したのちに寒天平板に蒔くとコロニーが得られないことから、*pgsA* 遺伝子は必須である、すなわち、“主要酸性リン脂質は必須である”と結論したのであった。高温培養により *pgsA* 遺伝子プラスミドを cure してプレートに蒔くとコロニーが得られない理由は、*pgsA* 遺伝子プラスミドを失った細胞が主要酸性リン脂質欠損となり高温感受性を獲得した為であった。

挿入破壊した *pgsA30::kan* 変異を *lpp* 欠損変異 (*lpp-2*) のある受容菌株に P1 フェージにより形質導入する試みは、破壊した *pgsA30::kan* 変異の導入が成立しないと理解されていたので通常は行われないものであった。しかし、そのような試みは修士課程 2 年の学生菊地真が卒業研究に入ってきた新米の学生とともにアラビノースの添加量によって *pgsA* の発現量をより厳密に制御できる系を構築する過程で行われた。すなわち、アラビノースプロモーターの下流に *pgsA* 遺伝子を挿入したプラスミドを持たせておいた細胞の染色体 *pgsA* 遺伝子を P1 形質導入で *pgsA30::kan* と置き換える実験の際に、形質導入が成立せずコロニーが出現しないはずの対照実験として *pgsA* 遺伝子プラスミドをもたない *lpp* 欠損変異細胞に同様に形質導入操作が行われた。コロニーが出現しないはずのプレートには多くのコロニーが出現しており、主実験の状況から見ても *pgsA30::kan* 変異が covering の *pgsA* 遺伝子プラスミドをもたない受容菌に容易に導入されたことは明瞭であった。このようにして、“PG は必須である”としていた当時の常識からはどうしても説明できない現象が見出された。厳密な対照実験と鋭い観察眼、また実験結果を素直に受け入れる心構えがもたらした大発見であった。

主要酸性リン脂質ホスファチジルグリセロール欠損変異による致死性の主原因

PG と CL は大腸菌の生育に必須ではないということならば, *lpp* 遺伝子が野生型の細胞では何故 PG の欠損が致死性を示すのだろうか? 先に示した, 変異により激減している PG の枯渇が *lpp* 欠損変異により抑えられるという説明は成り立たないこととなる. 大腸菌の生育にとって *lpp* 欠損変異は障害にはならないので, PG 欠損により成熟型へのプロセッシングが出来ず, 成熟型の Lpp が得られなくなることも自体は障害とはならないはずである. 分泌タンパク質の内膜から外膜への移送の仕組みの研究を進めている東京大学分子細胞生物学研究所の徳田元らは, Lpp の前駆体が内膜に蓄積されて, それがペプチドグリカンに C 末端のリジンを通して結合すると内膜とペプチドグリカンを架橋することとなり, 細胞の表層構造を破壊することを報告していた. PG 欠損により修飾を受けられないとシグナルペプチダーゼが作用できないため, Lpp 前駆体が内膜に蓄積されることになるはずであり, それがペプチドグリカンに架橋して表層構造を破壊する因子となる可能性が考えられた. 博士課程の鈴木基生がこの課題を検討した.

COOH 末端のリジンを欠失させることで架橋ができない変異 Lpp (Lpp Δ K) を発現するプラスミドを構築し, 主要酸性リン脂質欠損細胞 (*pgsA30::kan lpp-2*) でその発現を誘導すると, 野生型の Lpp を発現したときに見られる顕著な溶菌は予想どおり起こさなくなった(図 4).

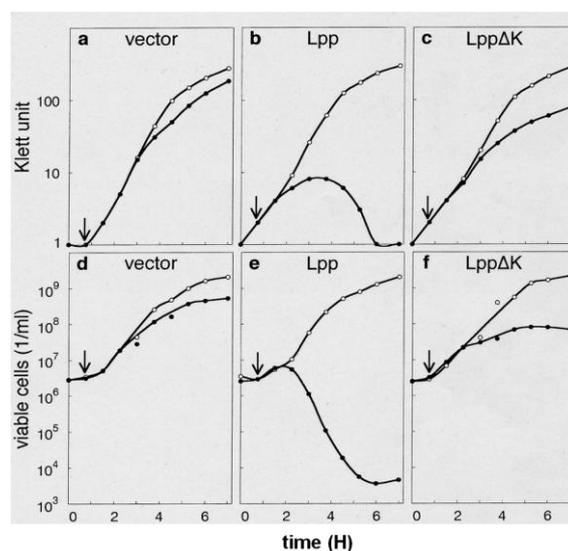


図 4 Lpp 発現による酸性リン脂質完全欠損細胞の溶菌.

矢印の時点で誘導物質 L-アラビノースを添加し *lpp* 遺伝子の発現を誘導し, その後の菌の増殖を Klett 値(上段)と生菌数(下段)で示す.

ただし, 架橋ができない変異により増殖は完全に回復している訳ではなく停滞傾向にあり, 生菌数の増加も停滞しており完全には回復しなかった. 架橋ができない Lpp Δ K でも主要酸性リン脂質欠損細胞で発現させた場合には何らかの不都合が残っていることを示している. 発現した Lpp がどのような状態で存在しているのかを検討するため, ショ糖密度勾配遠心により膜を外膜と内膜とに分け, SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して Lpp の状態を調べた. 主要酸性リン脂質欠損細胞では野生型の Lpp を発現したときに内膜と外膜とが分かれず同じ画分に回収されることから, Lpp 前駆体により内膜とペプチドグリカンが架橋されているものと推定された. Lpp Δ K を発現した細胞では外膜と内膜とは明確に分離され, 内膜とペプチドグリカンの架橋がおこっていないことが確認された. ペプチドグリカンに結合している Lpp はリゾチーム処理してペプチドグリカンを細かく消化しないとポリアクリルアミドゲルに入れないので電気泳動で検出することは出来ないが, Lpp Δ K はリゾチーム処理していない膜画分を

直接電気泳動にかけても検出できたことから、ペプチドグリカンに結合していないことは明らかであった(図 5 i, j).

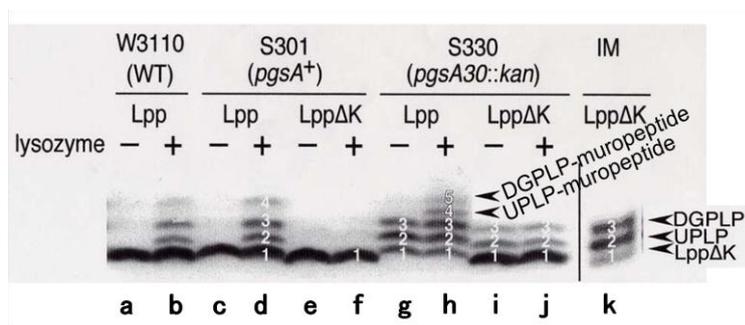


図 5 リゾチーム処理によるペプチドグリカン結合 Lpp の検出.

主要酸性リン脂質欠損細胞の膜画分 (g-j) を調製し、リゾチーム処理 (+) 無処理 (-) のうち、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、抗体により Lpp を検出した。野生型細胞 (WT と *pgsA*⁺) からの対照膜画分 (a-f) を並置した。IM は主要酸性リン脂質欠損細胞の内膜画分である。

外膜には成熟型 LppΔK が少量みられ、内膜には前駆体が多くみられるばかりではなくジアシルグリセロール修飾された前駆体 LppΔK と推定される電気泳動の移動度の遅い分子もみられた。シグナルペプチダーゼ II の阻害剤であるグロボマイシンで処理することにより蓄積する泳動度の遅い分子と、主要酸性リン脂質欠損株の内膜に蓄積する分子とは同じ移動度を示すことから、これらの分子は Lpp 前駆体 (UPLP) とジアシルグリセリル修飾された前駆体 (DGPLP) の LppΔK と考えられた。質量分析の結果は、蓄積している分子がたしかに LppΔK の UPLP と DGPLP であることを示した。

野生型 Lpp を主要酸性リン脂質欠損細胞で発現した膜標品にはリゾチーム処理でペプチドグリカンを消化してはじめて検出できる移動度の遅い分子を含んでいた。図 5 で g と h を比較すると、リゾチーム処理した膜標品 h にバンド 4 と 5 とが見られる。質量分析の結果は、蓄積している Lpp 分子は、バンド 4 と 5 はそれぞれ UPLP と DGPLP に、1 つのムロペプチド単位 (ペプチドグリカンのリゾチーム消化産物の最小単位) が付加されたものであることを示した。バンド 5 のうえにかすかに見えるタンパク質のバンドは、それぞれに 2 つのムロペプチド単位が付加された質量をもつ分子に相当するものと推定された。またさらに、成熟型 Lpp 分子に 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのムロペプチド単位が付加された質量に相当する分子も検出された。これらの事実は、Lpp 前駆体が内膜に蓄積し、それが COOH 末端でペプチドグリカンに結合することにより、内膜、ペプチドグリカンと外膜とが一体となる表層構造の障害がおこっており、これが致死性の主要原因であったことを示している。

この実験で得られたもうひとつの重要な結果は、主要酸性リン脂質 (PG) を完全に欠損している細胞においても、ジアシルグリセリル修飾されている Lpp 分子 (DGPLP)、さらには成熟型となっている Lpp 分子が検出されたことである。LppΔK では過半数の分子が成熟型となっており、これは修飾されたのちにシグナルペプチドが切除されたものである。野生型 Lpp では、DGPLP となっているものと成熟型となっているものは、総 Lpp 量のそれぞれ 1/4 程度存在する。質量分析の結果も DGPLP の質量をもつ分子が存在していることを示している。PG のみがこの修飾のための基質となるとされていたが、PG を完全に欠損する細胞では何を基質としてこの修飾がおこるのだろうか。モデルペプチドを用いた Lpp の修飾過程の *in vitro* 研究により、PA と CDP-DG も低効率ではあるが修飾の基質となり得ること

が示されていたことから、PG の代替となる基質としては、蓄積している生合成中間体の PA と CDP-DG が考えられる。

PA と CDP-DG を基質として代替利用する修飾反応があるとすると、量的に少ない PA を更に減少させると考えられることから、LppΔK を発現させた細胞の脂質組成を ³²P 標識により検討した。培地や標識時間を変えるなど条件の変更によって変動があるものの、LppΔK 発現による PA の減少(約 2%)は常に観察され、CDP-DG の減少(約 0.4%)も観察された(鈴木基生ら 未発表)。これらの酸性を示す生合成中間体の減少は、主要酸性リン脂質欠損細胞では PA が実際に Lpp や LppΔK の修飾に利用されていることを示唆している。細胞には酸性のリン脂質を必須とする何らかの機能があって、この減少(枯渇)のためにその機能が不全となることが LppΔK を発現した細胞で見られた増殖の停滞と関係があるものと考えられる。脂質極性基の化学的構造ではなく酸性リン脂質の負電荷を必要とするものには、内膜の細胞質側表面に結合して働く表在性膜タンパク質がある。酸性リン脂質の負電荷により引き寄せられて膜に付着し、膜内に挿入されて活性化される(もしくは活性発現の場に配置される)ことは、DNA 複製開始タンパク質 DnaA のほかにタンパク質分泌装置の SecA や FtsY、PE 合成の開始過程を触媒する PS 合成酵素においても示されており、PA は PG とほぼ同等に機能し得ることがそれぞれの *in vitro* 系で示されている(図 6)。

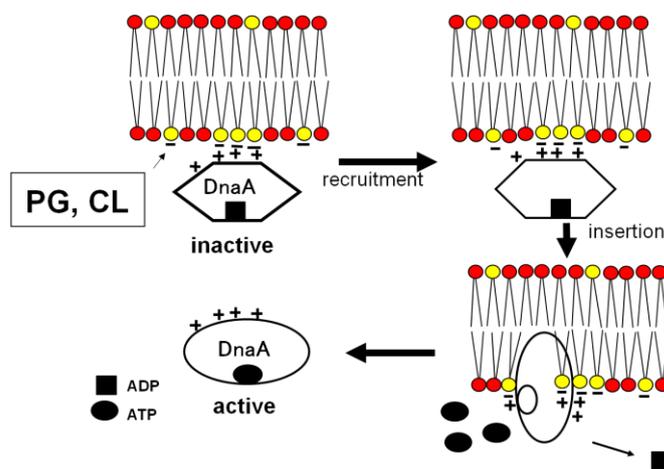


図 6 表在性膜タンパク質の酸性リン脂質の負電荷による膜への結合。
DnaA タンパク質を表在性膜タンパク質の一例として示す。

酸性リン脂質欠損による増殖停滞のサプレッションと DNA 複製開始

ドーハンらは主要酸性リン脂質欠損による増殖停滞が、*rnhA* 欠損変異によってサプレスされることを報告した。*rnhA* 欠損変異は、染色体複製起点 *oriC* からの DNA 複製が DnaA タンパク質の失活などで開始できない場合に、それを回避して他の複製起点(*oriK*)から DNA 複製を開始させるサプレッサー変異である。これまで *in vitro* の *oriC* DNA 複製開始系でのみ示されてきた PG と CL の DnaA タンパク質再活性化への関与は、これによって *in vivo* の実験においても証明できたものとされた。しかし PG と CL が不要であれば、酸性リン脂質の DNA 複製開始への関与はどのように理解すればよいのであろうか？また、筆者らはドーハンらの報告とは異なる以下のような結果を得ていた。即ち、*pgsA* 遺伝子をアラビノースプロモーターの制御下に置き、添加する L-アラビノース濃度を制限して *pgsA* 遺伝子の発現を抑え、PG 含量を低下させてこの細胞(*lpp* は野生型)の増殖を停止させる場合、その停止は *rnhA* 変異の導入によってはサプレスできなかった(菊地真ら、未発表)。また、主要酸性リン脂質を総リン脂質の 0.3%に減少させる *pgsA3* 変異は *rnhA* 変異をもつ菌株(*lpp* は野生型)に導入することはできなかった(西田智ら、未発表)。これらの違いは何に由来するのか、ドーハンらの菌株と埼玉大学

で用いた菌株の遺伝的背景の差により生じたのかなどと、その理由については理解できない状態が長く続いた。

主要酸性リン脂質欠損細胞の酸性リン脂質欠損による致死性の主原因は、細胞表層構造の障害によることが明らかにされたことから、この細胞では PG と CL とを完全に欠損していても DNA 複製の開始は正常に進行しているものと理解すべきであろう。DnaA タンパク質を ATP 型に再活性化するのに必要な膜脂質の特性は負電荷をもつ極性基と適切な流動性とであって、PG と CL ばかりではなく PA など同等の活性をもつことを示したコーンバーグ (Kornberg, A.) らの *in vitro* の結果があること、主要酸性リン脂質欠損変異細胞では生合成中間体の PA と CDP-DG の蓄積がそれぞれ 4.0% と 3.2% あり、酸性のリン脂質としては合計 7.2% にもなることから、これら酸性のリン脂質が DnaA タンパク質の再活性化に利用されているものと推定した。実際、DNA 複製後に娘細胞に分配される DNA の分布は、両娘細胞で正確に一致(同調)しており、複製開始のシステムに異常は見られないと推定された(原弘志ら、未発表)。

この推定が正しいとすれば、LppΔK を発現する細胞で PA と CDP-DG が減少して増殖が停滞すること(図 4 c,f)の原因は、酸性のリン脂質の枯渇により DnaA タンパク質の再活性化ができなくなるためと考えられる。この仮定の正否を明らかにするため、*rnhA* 変異を主要酸性リン脂質欠損変異株に導入した株を構築し、LppΔK を発現させてその増殖の様子を検討した結果、*rnhA* 変異の導入により細胞増殖の停滞がサプレスされることが判明した(鈴木基生ら 未発表)。すなわち、増殖が停滞した理由は、合計 7.2% 程度の酸性のリン脂質 (PA と CDP-DG) から LppΔK の修飾に約 2.4% が失われることにより、酸性を示すリン脂質が枯渇して DnaA の再活性化が不能となり(ただし、DnaA-*oriC* DNA 複製開始系内の他の機能に関わる可能性も否定できないが)、DNA 複製の開始が出来ないためと推定できる。このようにして *rnhA* 変異の導入により酸性のリン脂質が減少する細胞の増殖停滞をサプレスできる系が存在することが確認できた。しかしながら、*lpp* 欠損変異が *dnaA* 温度感受性変異株の高温感受性を顕著に昂進し、リン脂質合成欠損変異の共存によりその感受性が矯正されることや *rnhA* 変異によりリン脂質合成欠損変異の温度感受性が変化する(山下研也ら、未発表)などの、理解が困難な問題もなお残されている。酸性リン脂質の DNA 複製開始における役割を正確に理解するためには、DnaA タンパク質の活性状態と DNA 複製開始システムが酸性リン脂質欠損細胞で実際にどのように機能しているかを分子レベルで明らかにする必要がある。

カルジオリピンとホスファチジン酸ドメインの局在と細胞分裂

酸性リン脂質に結合する蛍光試薬 10-N-nonyl acridine orange (NAO) で大腸菌細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察することにより、細胞の両極と分裂隔壁の膜に CL がドメインを成して局在していることが見出された。NAO は多くの酸性のリン脂質に結合して緑色蛍光を励起するが、CL に結合した際には励起される蛍光のスペクトルは赤色へのシフトが見られ、CL が局在するドメインでは赤色の蛍光も励起される。このようにして赤色蛍光による CL の局在は、大腸菌のみならず、枯草菌や *Pseudomonas putida* でも観察されている。PG を完全に欠損する Δ*pgsA* 細胞(原弘志が構築)では、酸性を示す生合成中間体 PA が細胞両極と分裂隔壁の膜に局在していることが、テキサス大学のミレイコフスカヤ (Mileykovskaya, E.) らにより最近になって示され、この局在により PG および CL を欠損する変異細胞でもほぼ正常な増殖と細胞分裂が維持されていると考えられる。

大腸菌においては、細胞両極に局在する CL は細胞分裂に関与していることが示されている。すなわち、桿菌では細胞分裂がきちんと細胞の中央で起こるように働く MinCDE タンパク質による制御システムが知られるが、大腸菌ではこのシステムが正しく働くために CL が必要とされた。チュブリンのホモログである FtsZ タンパク質は、細胞の側壁中央(赤道)の細胞質膜に集まってリング状に集合し、その

リング(FtsZリング)が収縮することにより細胞質膜の陥入を先導する役割をもつ。MinCDタンパク質は、FtsZタンパク質の重合を阻害する活性をもち、細胞中央以外でのFtsZタンパク質の重合を妨げることにより、細胞中央でのみFtsZリングが形成されるように制御している。MinDタンパク質には細胞質膜に結合する活性があり、それがCLに親和性があるため、細胞の両極にMinCDを引き寄せ、両極でのFtsZリング形成の阻害を強めることとなる。MinDタンパク質のCOOH末端には、両親媒性を示す α ヘリックスをとる短いアミノ酸配列がある。これは α ヘリックスの片側に疎水性のアミノ酸残基が多くあり、反対側に親水性で正電荷のアミノ酸残基を多くもつもので、この両親媒性 α ヘリックスによりMinDタンパク質がCLを多く含む膜に結合するが、CLばかりでなくPGなどの酸性のリン脂質に高い親和性をもつ。PGを欠損する $\Delta pgsA$ 細胞では、CLも欠損しているが、酸性を示すリン脂質であるPAが細胞両極に局在していることで、MinDタンパク質による細胞分裂位置の制御がほぼ正常に行われているものと考えられる。

おわりに

以上述べてきた大腸菌 *pgsA* 完全欠損変異の研究から、大腸菌の主要酸性リン脂質の機能には、2つの側面があるものと筆者らは提案した。ひとつは負電荷を持つ他のリン脂質と置き換え得るものであって極性基の構造に非特異的な機能であり、もうひとつは酵素反応の基質となるために極性基特異的であるが、反応産物が細胞にとって必須ではない機能である。後者には、PGのジアシルグリセリル基で修飾されプロセッシングを受けるLppと、PGのホスホグリセロール基で修飾されるMDOの合成がある。これらはともにその欠損が大腸菌細胞の生育に顕著な影響を与えない。このことが、*pgsA* 完全欠損変異が大腸菌において致死性を示さない理由であった。このような思いもよらない大発見をすることが出来たことを *serendipity* と言うのかもしれない。ただ、厳密な対照実験と鋭い観察眼、実験結果を素直に受け入れる心構えが、この大発見に導いたことを考えれば、これはRoberts, R. M.の提言に従って *pseudoserendipity* と称すべきであろう。

PGの2分子が縮合した構造をもつCLの欠損が大腸菌の生育にほとんど影響を与えないのは、CLの極性基に特異的な反応が大腸菌にはないのか、あるいはその特異的な反応の産物が大腸菌の生育に必須ではないためであろう。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のミトコンドリアにおいてもCL合成酵素遺伝子の欠損によりCLが検出限界以下となるが、ミトコンドリアの機能は損なわれないので、生合成経路の上流にあるために蓄積したPGが代替することによりミトコンドリアの機能は維持できると考えられている。しかし、PGP合成酵素遺伝子の欠損によりPGとCLの両方が欠損するとミトコンドリア機能が著しく損なわれ、CHO細胞でもPGP合成酵素遺伝子がミトコンドリアの構造と機能に必須であることが示されている。また、藍藻(*Schynechocystis* sp. PCC6803)では光化学系の働きにPGが必須とされている。枯草菌では3つのCL合成酵素遺伝子すべてが破壊されても、細胞増殖に影響を与えないことからCLは必須ではないとされるが、*spac* プロモーターの制御下においた *pgsA* 遺伝子をもつ細胞は誘導物質を含まない培地に移すと溶菌することからPGは必須である。これらの例についても、PG欠損による致死性や機能欠損をサプレッサー変異株を取得し、サプレッサー変異遺伝子とサプレッションの仕組みを解析することによって、主要酸性リン脂質の真の機能が明らかになるものと考えている。

謝辞

筆者の研究室でおこなってきた細菌膜脂質の生理機能の研究には、大腸菌、枯草菌突然変異株細胞の脂質組成分析、酵素タンパク質の発現解析、また酵素活性の測定のためにアイソトープ実験が不可欠で、このため科学分析支援センターのアイソトープ実験施設を大いに利用させて頂いた。こ

ここに、科学分析支援センターのスタッフの皆様にもいろいろとお世話になったことを記して、感謝の意を表したい。本稿に述べた仕事は大腸菌膜リン脂質の分子生物学研究の創始者である理学部分子生物学科の渋谷勲教授(現名誉教授)のご指導により開始したこと、また共同研究者の原弘志准教授と松岡聡助教により現在の研究が支えられていることを記して、感謝の意を表したい。最後に、大学院博士・修士課程ならびに学部卒業研究の学生の精進の成果を未発表データとして本稿に述べたことを記して、感謝の意を表したい。