[農化 第 43 卷, 第 5 号, p.273~277, 1969]

Escherichia coli (K-12) のリン脂質に関する研究 (第 4 報)

E. coli (K-12) 無細胞液によるホスファチジン酸の生合成

亀山 春, 東尾侃二*, 後藤 章**

(島根県立島根女子短期大学, *雪印乳業株式会社, **大阪教育大学養護教諭養成所)

昭和 43 年 1 月 12 日 受 理

Studies on Phospholipids of *Escherichia coli* (K-12)

Part IV. Biosynthesis of Phosphatidic Acid in Cell-Free Extract

By Haru KAMEYAMA, Kanzi HIGASHIO* and Akira GOTO**

Shimane Women's Junior College, Matsue-shi, Japan ;

**Snow Brand Milk Products Company, Ltd.;*

***Training Institute for Health-Teachers, Osaka Kyoiku University*

Biosynthesis of phosphatidic acid in cell-free extract of *E. coli* was studied by using ^{32}P -orthophosphate and ^{14}C -glycerol. The cells were sonically disrupted and the sonicate was centrifuged at $20,000\times g$ for 25 min. When ^{32}P -orthophosphate was incubated with the supernatant, ^{32}P -orthophosphate was incorporated into phosphatidic acid. However, when ^{14}C -glycerol was used, almost all of the radioactivity was recovered as glycerophosphate and the evidence for the incorporation of ^{14}C -glycerol into lipids could not be obtained. The incorporation of ^{32}P -orthophosphate into phosphatidic acid was increased by the addition of diglyceride, but not affected by that of glycerophosphate. These results suggest the possibility that phosphatidic acid is formed by the phosphorylation of diglyceride, but not by the acylation of glycerophosphate.

(Received January 12, 1968)

緒 言

E. coli 無細胞抽出液に, ^{32}P -正リン酸を加えると, ホスファチジン酸に ^{32}P -正リン酸が取り込まれることを見だし, その概要について先に報告した⁽¹⁾.

本報告では, 同上無細胞液に ^{32}P -正リン酸および ^{14}C -グリセロールを加え, 脂質への放射活性の取り込みと, ^{14}C -放射活性を有する水溶性物質の検索, および ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸の取り込みに対するジグリセライドとグリセリン酸の添加の影響を検討し, *E. coli* におけるホスファチジン酸の生成の経路の考察を試みたので, その概要を報告する.

実 験 方 法

1. 供試菌株 本実験に使用した菌株は, 前報告⁽¹⁾ どり *E. coli* (K-12) である.

2. 酵素溶液の調製 前報告どおり⁽¹⁾, ブイヨン培養基を用いて培養した菌体を音波処理した後, 超遠心分離により分画したものを酵素液とした.

3. ジグリセライドの調製 ジグリセライドは Rhodes ら⁽²⁾に従って, 卵黄および酵母から分離したホスファチジルコリンにホスホリパーゼCを作用せしめた後⁽³⁾, 珪酸を用いて精製し調製した.

4. その他 反応条件, 反応後の処理, 放射活性の測定, リン脂質の同定等は前報告^(1,4)に従って行なった. ただし, ^{14}C -グリセロールを用いた実験においては ATP を $10\text{ }\mu\text{mole}$ 添加した. したがって, ^{32}P -正リン酸および ^{14}C -グリセロールの脂質への取り込みの相違を検討するために, ^{32}P -正リン酸を用いた場合においても, ^{14}C -グリセロールの場合と同様, $10\text{ }\mu\text{mole}$ の ATP を用いた.

ホスホリパーゼ C は Sigma 社製品を用いた。また合成ジパルミチンはトロント大学 Baer 博士, 合成ジオレインは京都府立大学農学部野田万次郎博士から賜与されたものを, 珪酸を用いて精製し用いた。

結果および考察

1. 各分画における ^{14}C -グリセロールおよび ^{32}P -正リン酸の脂質への取り込み

Table I に示す細胞分画に, ^{14}C -グリセロールあるいは ^{32}P -正リン酸を加え, 1 時間, 38°C に保った後, 反応混合物から脂質を分離し, 放射活性の測定とペーパークロマトグラフィーにより放射性脂質の同定を行なった。

Table I に示すごとく, $140,000\times g$ 以上の分画では, ^{32}P -正リン酸も ^{14}C -グリセロールも, とともに脂質へ取り込まれなかった。 $7000\times g$ 以上の分画では反応の条件により放射活性の脂質への取り込み量と, 放射活性を持つ脂質の組成に差異が認められたが, ^{14}C -グリセロールも ^{32}P -正リン酸とともに, ホスファチジン酸とホスファチジルエタノールアミンに取り込まれた。しかし $20,000\times g$ 以上の分画では $7000\times g$ 以上のものに比較して, 放射活性が脂質へ取り込まれる量はやや少ないが, ^{32}P -正リン酸のみが脂質に取り込まれ, しかもホスファチジン酸にのみ放射活性が認められた。

以上の結果は, *E. coli* の whole homogenate においては, ホスファチジルエタノールアミンの生成経路ならびにホスファチジン酸の生成経路の両方が存在するけ

ども, $20,000\times g$ 以上の分画にはホスファチジン酸の生成経路のみが存在していることを示すものと考察された。そこで, 本分画すなわち $20,000\times g$ 以上の分画におけるホスファチジン酸の生成経路の詳細を検討することを目的として以下の実験を行なった。

2. ^{14}C -放射活性を有する水溶性物質の検索

上述のごとく $20,000\times g$ supernatant あるいは $20,000\sim 140,000\times g$ pellet においては, ^{32}P -正リン酸がホスファチジン酸に取り込まれるのに対し, ^{14}C -グリセロールでは脂質への取り込みが認められなかった。そこで, 本実験条件下で ^{14}C -グリセロールが脂質へ取り込まれない理由を明らかにする目的で, ^{14}C -グリセロールがいかなる物質に変じているかを検討するため, 水溶性物質について ^{14}C -放射活性を有する物質をペーパークロマトグラフィーで分離検討した。

Table II に示すごとく, 大部分の放射活性はグリセロリン酸として検出された。

本分画における ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みが, ^{32}P -グリセロリン酸を経ているものとするれば, ^{14}C -グリセロールの場合においても, ^{32}P -正リン酸と同様に, ^{14}C -グリセロリン酸を経てホスファチジン酸に放射活性が取り込まれなければならないものと考えられる。しかし本実験の結果では, ^{14}C -グリセロールが ^{14}C -グリセロリン酸に変じているにもかかわらず, 脂質中に放射活性が認められなかった。

Table I. Incorporation of $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$ and $^{14}\text{C}\text{-Glycerol}$ into Lipids in Subcellular Fractions

Radioactive substance added into incubation mixture	¹⁴ C-glycerol ¹⁾		³² P-H ₃ PO ₄ ²⁾		¹⁴ C-glycerol ¹⁾		³² P-H ₃ PO ₄ ³⁾		³² P-H ₃ PO ₄ ⁴⁾	
	Radioactivity in lipids (cpm)									
	Experiment-1				Experiment-2				Experiment-3	
	Ph. A.	Ph. E.	Ph. A.	Ph. E.	Ph. A.	Ph. E.	Ph. A.	Ph. E.	Ph. A.	Ph. E.
7000×g for 20 min, supernatant	20,250	24,750	14,070	19,430						
7000~20,000×g for 25 min, pellet					30,140	106,800	6,698	4,654		
7000~140,000×g for 2 hr, pellet	20,570	108,024	28,420	29,580						
20,000×g for 25 min, supernatant					trace	trace	1,700	trace	16,450	trace
20,000~140,000×g for 2 hr, pellet									51,520	trace
140,000×g for 2 hr, supernatant	trace	trace	trace	trace						

1) ^{14}C -glycerol, unlabeled, $0.28\text{ }\mu\text{mole}$, $4\text{ }\mu\text{curie}$, 0.2 ml . 2) $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$, $2.594\times 10^7\text{ cpm}$, $0.9\text{ }\mu\text{mole}$.

3) $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$, $1.11\times 10^7\text{ cpm}$, $0.9\text{ }\mu\text{mole}$. 4) $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$, $4.345\times 10^7\text{ cpm}$, $0.9\text{ }\mu\text{mole}$.

Ph. A., Phosphatidic acid. Ph. E., Phosphatidylethanolamine.

The reaction system contained; ATP ($10\text{ }\mu\text{mole}$, 0.1 ml); MgCl_2 ($60\text{ }\mu\text{mole}$, 0.1 ml); NaF ($120\text{ }\mu\text{mole}$, 0.3 ml); enzyme prepn. (5.0 ml , prepared from 2.5 g of wet cell.). The reaction mixture incubated at 38°C for 60 min.

Table II. Incorporation of ^{14}C -Glycerol into Glycerophosphate in 20,000 $\times g$ Supernatant

Radioactivity in	cpm	%
Glycerol	1.81×10^5	7
Glycerophosphate	2.25×10^5	87
Unidentified comp.	1.55×10^5	6

The reaction mixture contained; ^{14}C -glycerol (unlabelled, 0.28 μmole , 4 μcurie , 0.2 ml); ATP (10 μmole , 0.1 ml); MgCl_2 (60 μmole , 0.1 ml); NaF (120 μmole , 0.3 ml); enzyme prepn. (5.0 ml, 20,000 $\times g$ supernatant, prepared from 2.5 g of wet cell.). The reaction mixture was incubated at 38°C for 1 hr.

この事実は, ^{32}P -正リン酸がグリセロリン酸を経てホスファチジン酸に取り込まれていないことを示すものと考えられる。

^{32}P -正リン酸が ^{32}P -グリセロリン酸を経てホスファチジン酸に取り込まれているとすれば, 放射活性を持たないグリセロリン酸の添加は, ^{32}P -グリセロリン酸の比活性を減じ, したがってホスファチジン酸への取り込みも減少するものと考えられる。そこで, これを確かめるために ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みに対し, グリセロリン酸の添加の影響を検討した。

3. ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みに及ぼすグリセロリン酸の影響

Table III に示すごとく, ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みは, グリセロリン酸を添加しても無添加の場合と変わりなく, グリセロリン酸の影響は認められなかった。

この結果は, ^{32}P -正リン酸がグリセロリン酸を経てホ

Table III. Effect of Glycerophosphate on the Incorporation of ^{32}P - H_3PO_4 into Phosphatidic Acid

Addition	Radioactivity in phosphatidic acid
None	1.4×10^4 cpm
Triton	3.6×10^4
Triton + 10 μmole glycerophosphate	3.6×10^4
Triton + 100 μmole glycerophosphate	3.3×10^4

The reaction system contained; ^{32}P - H_3PO_4 (3.272×10^7 cpm, 0.9 μmole); ATP (10 μmole , 0.1 ml); MgCl_2 (60 μmole , 0.1 ml); NaF (120 μmole , 0.3 ml); Triton X-100 (none ionic detergent, 60 mg); enzyme prepn. (20,000~140,000 $\times g$ pellet, 4 ml, prepared from 2.5 g wet cell). The reaction mixture was incubated at 38°C for 1 hr.

スファチジン酸に取り込まれていないことを示すものと考えられる。Pieringer ら^(5,6)は, *E. coli* におけるホスファチジン酸の生成はグリセロリン酸のアシル化による経路と, ジグリセライドのリン酸化によるものとの2つによって生成されると報告している。また, 最近, 同じく Chang ら⁽⁷⁾ はグリセロリン酸がホスファチジン酸生成の obligate intermediate であること, および *in vitro* において認められるジグリセライドキナーゼの活性が, *in vivo* においてもホスファチジン酸の生成に役立っているかは疑問であると報告している。

しかしながら, 本実験においては Pieringer らの考えに反し, グリセロリン酸のアシル化による経路を支持する結果は得られなかった。そこでジグリセライドキナーゼによってホスファチジン酸が生成されているかを確かめるために, ジグリセライドの添加が ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みに対し, いかなる影響を与えるかを検討した。

4. ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みに対するジグリセライドの影響

Table IV に示した basal incubation system にジグリセライドを加え, 38°C に 1 時間保った後, 反応混合物から脂質を抽出し, 放射活性の測定を行なった。

Table IV に示すごとく, 卵黄のホスファチジルコリンから調製したジグリセライドを添加すると, ^{32}P -正リン酸の取り込みは, 無添加に比べ約 25 倍となった。この結果は ^{32}P -正リン酸とジグリセライドから ^{32}P -ホスファチジン酸が生成されていることを示すものと考えられる。

また, 脂肪酸組成を異にする数種のジグリセライドの

Table IV. Effect of Diglyceride on the Incorporation of ^{32}P - H_3PO_4 into Phosphatidic Acid

Addition	Radioactivity in phosphatidic acid
None	1.4×10^4 cpm
Triton	3.6×10^4
Triton + diglyceride	8.5×10^5

The reaction system contained; ^{32}P - H_3PO_4 (3.272×10^7 cpm, 0.9 μmole); ATP (10 μmole , 0.1 ml); MgCl_2 (60 μmole , 0.1 ml); NaF (120 μmole , 0.3 ml); Triton X-100 (none ionic detergent, 60 mg); enzyme prepn. (20,000~140,000 $\times g$ pellet, 4 ml, prepared from 2.5 g wet cell); diglyceride (5 mg, prepared from egg yolk phosphatidylcholine). The reaction mixture was incubated at 38°C for 1 hr.

Table V. Incorporation of ^{32}P - H_3PO_4 into Phosphatidic Acid on Diglyceride Analogues

	Radioactivity
D. G. prepared from egg yolk Ph. Ch.	4.0×10^5 cpm
D. G. prepared from yeast Ph. Ch.	2.1×10^5
Synthesized diolein	2.4×10^5
Synthesized dipalmitin	1.2×10^5

The reaction system contained; ^{32}P - H_3PO_4 (4.661×10^7 cpm, $0.9 \mu\text{mole}$); ATP ($10 \mu\text{mole}$, 0.1 ml); MgCl_2 ($60 \mu\text{mole}$, 0.1 ml); NaF ($120 \mu\text{mole}$, 0.3 ml); Triton X-100 (60 mg), enzyme prepn. (4.0 ml , $20,000 \sim 140,000 \times g$ pellet, prepared from 2.5 g wet cell). The reaction mixture was incubated 38°C for 1 hr.

D. G., diglyceride; Ph. Ch., phosphatidylcholine.

添加の影響を比較検討したところ, Table V に示すごとく, 卵黄のホスファチジルコリンから調製したジグリセライドの添加がその他のジグリセライドに比較して最高の取り込みを示した.

前報⁽¹⁾において述べたごとく, 熱処理した酵素液では, ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みは認められなかった. この結果から,

の交換反応の可能性はなく, ^{32}P -正リン酸はジグリセライドキナーゼにより, ジグリセライド $\rightarrow$ ホスファチジン酸の経路か, あるいは, グリセロールキナーゼにより, グリセロール $\rightarrow$ グリセリン酸 $\rightarrow$ ホスファチジン酸の経路かのいずれかにより, ホスファチジン酸に取り込まれたものと考えられる. 前者の経路, すなわち ^{32}P -正リン酸がジグリセライドキナーゼによりホスファチジン酸に取り込まれるためには, 一旦, ^{32}P -正リン酸が ATP の γ 位の P に取り込まなければならない. 本実験においては, ^{32}P -ATP の生成について検討していないが, 酵素溶液にコハク酸ソーダを添加すると, 添加しない場合に比較し, ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みが増加し, AMP, ADP の添加では前記取り込みが減少すること⁽¹⁾, および酵素溶液に ATP を加え, 1 時間 38°C に加温することにより ATP から無機リン酸が遊離され⁽⁶⁾, また酵素溶液と ^{32}P -正リン酸との加温では ^{32}P -水溶性有機リン酸が生成されること*などを認め, これらの結果から, ^{32}P -ATP (terminally labeled with ^{32}P) は

* 未発表実験結果.

の交換反応か, あるいは酸化リン酸化の反応により生成されているものと考察した.

以上のごとく, ^{32}P -正リン酸は一旦 ^{32}P -ATP となった後, ジグリセライドキナーゼにより ^{32}P -ホスファチジン酸に取り込まれたものと考察した.

以上, 本実験においては, *in vivo* におけるホスファチジン酸生成についての検討は行なっていないが, *in vitro* においては前記 Pieringer らの報告に反し, グリセリン酸が obligate intermediate であることを示す結果は得られず, ^{32}P -正リン酸とジグリセライドからジグリセライドキナーゼによってホスファチジン酸が生成されているものと考えられる結果が得られた.

要 約

E. coli の無細胞液 $20,000 \times g$ 上清分画に, ^{14}C -グリセロールあるいは ^{32}P -正リン酸を加えたとき, ^{32}P -正リン酸の脂質への取り込みと, この取り込みに及ぼすグリセリン酸とジグリセライドの添加の影響, および ^{14}C -を有する放射活性物質の検索を行なった.

その結果, ^{14}C -グリセロールでは ^{14}C -グリセリン酸が検出されるにもかかわらず, 脂質への取り込みは認められなかった. しかし, ^{32}P -正リン酸を加えると, ^{32}P -正リン酸はホスファチジン酸にのみ取り込まれた. この ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸への取り込みは, グリセリン酸を加えても無添加の場合と変わりなく, グリセリン酸の影響は認められなかったが, ジグリセライドを加えると, 25 倍に増加した.

以上, 本分画における ^{32}P -正リン酸のホスファチジン酸の取り込みの結果から, ホスファチジン酸はグリセリン酸を通ることなく, ジグリセライドキナーゼによって生成されているものと考察した.

本研究は大阪府立大学農学部農芸化学科, 本田研究室で行なった. 実験を遂行するに当り終始御教示, 御指導をいただきました大阪府立大学農学部本田幸一郎先生, 菌体の培養について御便宜をいただきました大阪府立大学農学部大亦正次郎先生に謝意を表します. また, ^{32}P -正リン酸を用いた実験は大阪府立放射線中央研究所で行なった. 実験に際し種々御便宜をいただきました第 3 部小島懋部長に謝意を表します.

本報告の一部は昭和 42 年度農芸化学会大会において講演した.

-
- (1) 亀山 春, 本田幸一郎: 農化, **40**, 146 (1966).
 - (2) D. N. Rhodes and C. H. Lea: *Biochem. J.*, **65**, 526 (1957).
 - (3) D. J. Hanahan and R. Vercamer: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1804 (1953).
 - (4) 亀山 春, 後藤 章, 本田幸一郎: 農化, **40**, 140 (1966).
 - (5) R. A. Pieringer: *Federation Proc.*, **24**, 476 (1965).
 - (6) R. A. Pieringer and R. S. Kunnes: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2833 (1965).
 - (7) Y. Y. Chang and E. P. Kennedy: *ibid.*, **242**, 516 (1967).
 - (8) 亀山 春: 島根女子短期大学紀要, **6**, 1 (1968).
-