生体膜の構造と機能における脂質の役割†

(昭和 55 年度農芸化学奨励賞受賞)

塚 越 規 弘

(名古屋大学農学部)

生物はすべて生体膜に覆われ、外界とは全く異なった環境中で生命を営んでおり、生体膜は単に物理的に外と内を分け隔てているだけの壁ではなく、生命活動を行ううえに重要な機能を種々有している。たとえば生命維持に必須な栄養物を細胞内へ取り込んだり、細胞内の老廃物を排泄したり、細胞分裂により細胞が増殖することなどすべて生体膜が関与しており、生体膜は生命維持に必須な基本的構造体の一つである。生体膜は電子顕微鏡的にいわゆる“unit membrane”構造を示し、主として蛋白質と脂質より構成され動的平衡状態を保っている。模式的に生体膜の一般構造を示すと Fig. 1 のようになると考えられる⁽¹⁾。生体膜の構成成分の特徴を主として原核細胞において、簡単に述べると以下のようなになる。

脂質成分の特徴：1) 脂質は主としてリン脂質から構成され、ほとんどすべての脂質は膜構造体に極性する。2) 脂質は Fig. 1 より明らかなように bilayer 構造を示すが厳密には discontinuous bilayer 構造で、bilayer 中に蛋白質粒子が存在する。3) Inner lamella と outer lamella における脂質の分布は多くの場合非対称的である。4) 脂質分子は膜構造中水平方向(lateral diffusion)あるいは垂直方向(flip-flop)に運動し動的平衡状態にある。5) 脂質は遷移温度(phase transition temperature)を境にして遷移温度以上では液晶構造(liquid crystalline)を、遷移温度以下では固晶構造(solid crystalline)となり、脂質の物理的状态が膜蛋白質の活性に大きな影響を及ぼす。

蛋白質成分の特徴：1) 原核細胞などの未分化の細胞では多様な機能が生体膜に存在し、膜蛋白質の種類が多く構造蛋白質が存在しない。2) 蛋白質の分布も非対称的で、Fig. 1 より明らかなように種々の存在形態を示

す。3) 蛋白質も脂質同様に膜構造中を水平方向に運動し動的平衡状態にあるが、蛋白質の運動と脂質の運動との関連についてまだ多くの問題が残っている。

このように複雑な機能と構造を有する生体膜を機能的に維持している因子は、a) 蛋白質間の相互作用、b) 脂質間の相互作用、c) 脂質と蛋白質との間の相互作用などであると考えられる。とくに脂質と蛋白質間の相互作用は生体膜研究上重要な課題で、さらに二つに分けて考えてみるができる。つまり、脂質の極性基の電荷部分と蛋白質の電荷との間の静電的相互作用(electrostatic interaction)と、脂質の非極性基部分(脂肪酸部分)と lipid bilayer 中に埋め込まれた蛋白質の疎水部分との間の疎水的相互作用(hydrophobic interaction)である。

以上、生体膜構成成分の特性を概括したが、本研究では、大腸菌の不飽和脂肪酸要求菌と脂質含有フェージ PM 2 の系で人工的に hydrophobic interaction を変化させると、生体膜の機能がいかに変化するかを主として研究した。

I. 大腸菌の不飽和脂肪酸要求菌の系

生体膜構造中での脂質と蛋白質間の相互作用を研究する一つの方法として、脂質成分を変化させる方法が考えられる。この点に関して、Silbert らにより初めて大腸菌より分離された不飽和脂肪酸要求菌(以下要求菌と略す)はたいへん意義深いものであった⁽²⁾。すなわち、不飽和脂肪酸生合成系の β -hydroxydecanoyl thioester dehydrase を欠くと、不飽和脂肪酸を全く生合成できずに、外部より不飽和脂肪酸を添加しないかぎり生育が不可能となる。また脂質を操作するという面からもこの mutant は一種の pleiotropic mutant の性質を有し、cis 型でも trans 型でも monoenoic から trienoic の脂肪酸まで、C₁₄ から C₂₀ の脂肪酸で生育可能である。

† Role of Lipid in Biological Membranes.

Norihiro TSUKAGOSHI (Faculty of Agriculture, Nagoya University, Aichi 464)

Fig. 1. Anatomy of Biological Membrane is Suggested in This Schematic Diagram. Phospholipid molecules stacked side by side and back to back provide the basic structure. The gray shapes represent protein molecules. In some cases several proteins (for example the five at the left) are bound into a single functional complex. Proteins can occupy all possible positions with respect to the phospholipid bilayer: they can be entirely outside or inside, they can penetrate either surface or they can extend through the membrane.

したがって培地中の脂肪酸の種類を変化させるだけで、容易にリン脂質の脂肪酸部分を操作することが可能となり、結果的には膜構造中の脂質-蛋白質間の hydrophobic interaction を変化させることができる。

I-1. 糖輸送に及ぼす膜脂質の影響⁽³⁻⁵⁾

各種脂肪酸存在下に生育させた要求菌で、すなわち種類異なった脂肪酸組成を有する細胞において、糖輸送速度に対する温度の影響に関する一例を Fig. 2 に示した。要求菌を 37°C で elaidate あるいは linoleate 培地に生育させる際に、 β -glucoside transport 系を誘導し、種々の温度で β -glucoside transport 活性を測定し Arrhenius plot すると両者とも biphasic curve となり、前者は 30°C に、後者は 7°C に break point が現われ、これが膜脂質の遷移温度である。種々の脂肪酸培地に生育させるときに β -glucoside transport 系または β -galactoside transport 系を誘導して Fig. 2 と同じ実験より求められた遷移温度を Table I に示した。 β -Glucoside transport 系でも β -galactoside transport 系でもその遷移温度は一つの脂肪酸では一定であり、遷移温度は蛋白質の性質の変化を反映しているのではなく、脂質の性質の変化を反映していると考えられる。また培地に添加した脂肪酸の融点が低ければ低いほど遷移温度が低いということも、遷移温度は脂質の性質を表わ

Fig. 2. Arrhenius Plots Describing β -Glucoside Transport in Cells of an Unsaturated Fatty Acid Auxotroph Grown at 37°C in Medium Supplemented with Elaidic (○) or Linoleic (●) Acid.

Table I. Transition Temperatures for β -Galactoside and β -Glucoside Transport

Fatty acid supplement	Transport transition temperatures	
	β -Glucoside	β -Galactoside
Elaidate	30	30
9-(and 10-) Bromostearate	22	22
Oleate	13	13
Dihydrosterculate	11	11
cis-Vaccenate	10	10
Linoleate	7	7

Cells were grown and induced for transport at 37°C in medium supplemented with the stated essential fatty acids.

していると考えられる。後になり electron spin resonance 等の物理的手法によっても、この遷移温度が脂質の性質を反映するものであると確証された。

このようにすでに膜構造中に組み込まれて存在する膜蛋白質の活性に、膜脂質の物理的状態が大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

I-2. 膜蛋白質の膜構造に組み込まれる際の膜脂質の影響^(6,7)

膜蛋白質の一つである lactose operon の y gene 由来の permease 蛋白質が膜構造体に組み込まれる際に、脂質の物理的状態がいかなる影響を及ぼすかを検討した (Fig. 3)。すなわち、37°C で oleate あるいは elaidate

Fig. 3. Efficiency of Lactose Transport Induction at 25°C in Media Supplemented with Elaidic Acid or Oleic Acid. Cells were grown in media supplemented with elaidic acid (○) or oleic acid (●) at 37°C. At a culture density of 5×10^8 cells/ml, the cultures were shifted to 25°C and induced for the proteins of the lactose operon. Units are μmol of *o*-nitrophenol released from NphGal $\text{hr}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein.

培地中で要求菌を生育させ、25°C に温度を低下させてから lactose operon を誘導し、細胞内酵素である β -galactosidase 活性を横軸に、permease 活性を縦軸に plot した。Oleate あるいは elaidate 由来の脂質の遷移温度はそれぞれ 13°C と 30°C であり (Table I), 25°C では oleate 由来の脂質は liquid crystalline の、elaidate 由来の脂質は solid crystalline の状態をしていると考えられる。脂質が liquid crystalline の状態 (oleate の場合) では permease 活性は β -galactosidase と同様に発現するが、solid crystalline の状態 (elaidate の場合) では β -galactosidase 活性は発現されるが permease 活性は全く発現されない。一方、elaidate 培地でも 25°C で *y* gene 由来の permease 蛋白質自体は生合成されている。したがって膜脂質が solid crystalline の状態では、生合成された膜蛋白質は機能的に膜構造中に組み込まれないために、活性が発現しないものと考えられる。

I-1. I-2. より明らかなことは、膜脂質はその遷移温度を境にして遷移温度以上では liquid crystalline、すなわち expanded state を示し flexibility に富むが、遷移温度以下では solid crystalline、すなわち condensed state を示し、flexibility を失うために、膜蛋白質

Fig. 4. Banding of Light and Density-Labeled Membranes in a Linear Sucrose Density Gradient. (A) Intact ^3H -isoleucine-labeled bromostearate membranes. (B) Intact ^3H -isoleucine-labeled bromostearate membranes, and intact ^{14}C -isoleucine-labeled oleate membranes, were mixed together and centrifuged to equilibrium in the same density gradient. (C) Intact ^{14}C -isoleucine-labeled oleate membranes.

の活性にも機能的な膜蛋白質の膜構造への組み込みにも大きな影響を与えると考えられる。

I-3-a) 細胞質膜の密度ラベル (density label) 法と細胞質膜の生長の仕方^(4,8)

膜構成成分がいかなる機構で膜構造中に組み込まれるかを研究するには、新しく生合成される成分と前から存在する成分を別々に識別することが必須である。間接的な方法⁽⁹⁻¹²⁾は種々存在するが、直接、細胞質膜のレベルで研究する方法として密度ラベル法が開発された⁽⁴⁾。

要求菌は monobromostearate を利用して生育することができ、その細胞質膜は他の脂肪酸 (たとえば oleate) 生育菌の膜より約 0.06 g/cm^3 重く、両者を一つの sucrose gradient 中で分離できる (Fig. 4 B)。したがって、培地中の脂肪酸組成を変化させることだけで重い膜と軽い膜を一つの細胞より調製できるので、細胞質膜の生長の仕方に関する研究に応用した。

細胞質膜の生長の仕方には二つの作業仮説が存在する。ある特定の細胞質膜部位より生長が起る局所生長 (localized membrane growth) 説^(9,13,14)と、無数の部位より生長が起る無局所生長 (nonlocalized membrane

Fig. 5. Model I. Unidirectional growth of membrane from a single pole of a newly divided daughter cell with conservation of preformed and newly formed membrane, detectable after one generation of growth following a density shift.

growth) 説^(11,15) とである。前者は、細胞の一端または両端から生長する説と、細胞の中心部位から生長する説とに分けられる (Fig. 5, 6)。これらの仮説について次のように検討を加えた⁽¹⁶⁾。要求菌を ^3H -Ileu を含む oleate 培地中で 37°C で対数増殖期まで生育させ、 ^{14}C Ileu を含む monobromostearate 培地に移し、同調培養を 37°C で行う。第1世代あるいは第2世代の終りに生育を止め、細胞質膜区分を調製し、monobromostearate 由来の重い膜と oleate 由来の軽い膜が遠心分離により区別できるかを検討した (Fig. 7, 8)。もし Fig. 5 のように細胞の一端から細胞質膜が生長するとすれば、第1世代の終りには全く新しい細胞ができ、monobromostearate 由来の重い膜が現われ、oleate 由来の軽い膜と分離されるはずである。Fig. 7 から明らかなよう

Fig. 6. Model II. Bidirectional growth of membrane from the equatorial perimeter or growth at both poles of newly divided daughter cells with conservation of preformed and newly formed membrane, detectable after two generations of growth following a density shift.

に、 ^3H -Ileu でラベルした oleate 由来の膜と ^{14}C -Ileu でラベルした monobromostearate 由来の重い膜は、同じ場所に遠心されてしまい、Fig. 5 の可能性はないと考えられる。また第2世代まで同調培養して得られた膜区分についても、重い膜と軽い膜が分離されずに同一の場

Fig. 7. Test of Model I. A synchronized population of newly divided daughter cells labeled with ^3H -isoleucine during growth in oleate medium was suspended in bromostearate medium containing ^{14}C -isoleucine (Fig. 7 A, arrow 1). After the first cell division, but before the second (arrow 2), growth was arrested by the addition of chloramphenicol and the cytoplasmic membranes were prepared. The cytoplasmic membranes were banded by equilibrium centrifugation (Fig. 7 B).

Fig. 8. Test of Model II. The experimental conditions are essentially those of Fig. 7, except that the cells used for the preparation of membranes were processed after two generations of growth (Fig. 8 A, arrow 2) following the shift (Fig. 8 A, arrow 1) from oleate medium containing ^3H -isoleucine to bromostearate medium containing ^{14}C -isoleucine.

所に遠心され (Fig. 8), Fig. 6 の可能性もないと考えられ, ある特定の膜部位より細胞質膜が生長してゆくと考えられない。これらの結果は Lin ら⁽¹¹⁾ や Overath ら⁽¹⁵⁾ の結果からも支持されている。

さて, 1970 年代はじめごろより electron spin resonance の方法論が確立され, 生体膜においても, 脂質分子は lateral diffusion により膜構造中を非常に速い速度で運動することが明らかとなり⁽¹⁷⁾, 上述した実験からは細胞質膜の局所生長説を否定したことになるくなった。

I-3-b) 脂質の lateral diffusion を制限した条件下での細胞質膜の生長の仕方^(8,18)

もし細胞質膜の局所生長が正しいと仮定すれば, 膜構造中には新しく生合成される膜区分と前から存在する膜区分とが独立して, ある大きさを持って存在し, 両者が膜構造中に混在しているはずである。したがって新しく生合成される膜区分を, artifact なしに, かつ小さな膜破片に細分化することを次に検討した。

Monobromostearate 生育菌膜と oleate 生育菌膜を別々に超音波処理し混合したサンプル, あるいは両者の混合物を超音波処理したサンプルを sucrose gradient 中で遠心すると, 細胞質膜は超音波処理により小さな membrane vesicle となるが, 前者は重い膜, 軽い膜由来の小さな膜破片となりそれぞれに分離されるが, 後者

Fig. 9. The Effect of Sonic Treatment of Light and Density-Labeled Membrane Fractions Fragmented Singly or Together. (A) Mixture of intact ^3H -isoleucine-labeled bromostearate membranes, and intact ^{14}C -isoleucine-labeled oleate membranes. (B) Bromostearate and oleate membranes were sonicated individually for 2 min and 0.1 ml of each sonicate was applied to the same gradient. (C) Bromostearate and oleate membranes were mixed before the 2-min sonication, and 0.15 ml of the sonicated mixture was applied to the gradient.

はあたかも1種類の膜のように、両者の中間の密度を有する両者の混合膜 (hybrid membrane) が形成された (Fig. 9). これらの結果は、細胞質膜を調製する際にその過程で artifact が生ずる可能性を示しており、膜調製に際し注意をしなければならぬことを明らかにした。

一方、この種の artifact も、sucrose 存在下で超音波処理することである程度抑えることができる。重い膜と軽い膜の混合物を 20% sucrose 存在下で超音波処理すると、hybrid membrane は一部分しか形成されず、しかも Bio-Gel A-150 m のカラムで取り除ける。Membrane vesicle の大きさが 500 Å 以下の区分が hybrid membrane であり、少なくとも 500 Å のレベルまでは hybrid membrane の形成なしに細胞質膜を細分化できることが示された。

これらの予備実験の後、細胞質膜の局所生長の可能性を脂質の lateral diffusion を制限する条件 (遷移温度以下) で検討した。すなわち、monobromostearate 培地生育菌を elaidate 培地に移し変え、さらに 25°C あるいは 40°C で短時間生育させ、細胞質膜区分を調製し、上述したように membrane vesicle の大きさに従い分画した種々の区分について、sucrose gradient 中で重いあるいは軽い膜区分が現われてくるかを調べたが、両者が別々に遠心される区分は全く存在しなかった。したがって、少なくとも密度ラベル法の限界内では細胞質膜の局所生長を示すことができず、無局所生長が正しいことを明らかにした。

II. 脂質含有ファージ PM 2 の系

脂質を含むウイルスは、有機溶媒や表面活性剤で膜構造が破壊されると同時に感染性を失う特性を備えているが、脂質を含むすべてのウイルスが失活するわけではないので注意を必要とする⁽¹⁹⁾。

1960 年 Spencer は、脂質を含むバクテリオファージの存在する可能性をはじめて示した⁽²⁰⁾。Marine *Pseudomonas* に生育する marine bacteriophages (P/SW 31, P/SW 34) がトルエン、クロロホルムなどの処理で失活するのを観察した。これらのファージがほんとうに脂質を含んでいたのか疑問であるが、その後の脂質含有ファージの検索に大きな貢献をした。1968 年 Espejo らは Spencer の知見に基づき、組織的に脂質含有ファージを検索し、marine *Pseudomonas* BAL-31 と marine

Table II. Chemical Composition of Bacteriophage PM 2

DNA	14.3% by weight MW $6.3 \sim 6.4 \times 10^6$ 42~43% GC content	
Lipid	12.6~14.0% by weight	
Phospholipid	64% phosphatidylglycerol 27% phosphatidylethanolamine 1% compound X (=acylphosphatidylglycerol)	
Neutral lipid	7~8%	
Fatty acids	3.0% C _{14:0} , 12.0% C _{16:0} , 56.6% C _{16:1} , 7.3% C _{17:0} , 13.9% C _{18:0} , 7.2% other.	
Proteins	72% by weight	
	Molecular weight	Moles protein/ mole virion
Protein I	43,000	~80
Protein II	26,000	~820
Protein III	12,500	~500
Protein IV	6,500	~420

bacteriophage PM 2 を太平洋より分離した⁽²¹⁾。

II-1. ファージ PM 2 の化学組成⁽²²⁾

ファージ PM 2 は蛋白質・脂質・DNA より構成されている (Table II)。DNA は closed supertwisted double stranded で、分子量は比較的小さく、90% 以上 closed supertwisted double stranded DNA として容易に抽出できる。最近この DNA が DNA に作用する物質の検索に利用されだし、注目されている。DNA の conformation の変化や DNA 切断などが ethidium bromide の結合量や電気泳動により容易に検出され、PM 2 DNA はそういった DNA 材料として適していることが明らかにされつつある⁽²³⁾。脂質含量は 12.6~14% で、連続した lipid bilayer が存在すると仮定すれば少なくとも 25~26% の脂質が必要であることから、lipid bilayer 中の約 50% は蛋白質で占められていると考えられる。リン脂質の種類は宿主細胞と同一であるがその相対量が非常に異なる。ファージは主として 64% の phosphatidylglycerol (PG) と 27% の phosphatidylethanolamine (PE) から構成され、宿主は 23% の PG と 75% の PE で構成されている。すなわち、ファージと宿主のリン脂質組成は逆転している。脂肪酸組成は宿主と変化がない。ファージの 72.4% は蛋白質で4種の蛋白質で構成され、それぞれの相対量は protein I (10~12%), protein II (59~65%), protein III (15~19%), protein IV (6~14%) で、ファージの純度はこ

これらの蛋白質を基準にして SDS-PAGE により容易に検討できる。また protein III に endolysin 活性⁽²⁴⁾が、protein IV に polynucleotide-dependent polynucleotide pyrophosphorylase 活性⁽²⁵⁾が検出されているが、これらの酵素活性が PM 2 生合成に際しどのように働くのかは不明である。

II-2. ファージ PM 2 の構造⁽²²⁾

PM 2 は正 20 面体構造を示し、spike を有し、直径 600~610 Å で 45.1×10^6 dalton の重さを有する (Fig. 10)。4 種の蛋白質の localization は Fig. 10 に示したように、lipid bilayer は outer shell (protein II) と nucleocore (protein III) の間に存在し、PG が outer lamella に PE が inner lamella に非対称的に分布している。4 種の蛋白質中 3 種の蛋白質は中性付近に等電点を示すが、protein II の pI は 12.1 と非常に高く、塩基性の蛋白質である。Fig. 10 から明らかなように protein II のすぐ下側に酸性の脂質 PG が存在し、両者の間に静電的相互作用が働き PM 2 の膜構造を機能的に維持していると考えられる。一方、lipid bilayer の約 50% は蛋白質で占められていることより、脂質と蛋白質間の疎水的相互作用も膜構造の機能的な維持に働いていると考えられる。

II-3. 宿主細胞のリン脂質代謝に及ぼすファージ PM 2 感染の影響^(26,27)

Pseudomonas BAL-31 のリン脂質生合成経路は *E. coli* や *B. megaterium* と同一であった。PM 2 感染後、

Fig. 10. Model of the Structure of Bacteriophage PM 2.

宿主細胞におけるリン脂質代謝は大きく変化し、ファージ感染前に存在した PE は分解されるが、PG はほとんど分解されない。またファージ複製中に生合成される PE はその生合成を阻害されるが、PG 生合成は増大する。したがってファージ感染後は PG 含量が増加し、PE 含量が低下し、ファージのリン脂質組成に有利な方向へ宿主におけるリン脂質生合成系が制御される。

II-4. ファージ PM 2 の脂質の起源⁽²⁸⁾

PM 2 粒子中に存在する PE も PG もその 2/3 はファージ複製中に生合成される新しい脂質に由来し、1/3 はファージ感染前に存在した古い脂質に由来する。同様な結論は Snipes らによっても得られている⁽²⁸⁾。

II-5. ファージ PM 2 の脂質の manipulation^(29,30)

ファージ粒子中の脂質を操作することにより、脂質の

Table III. Fatty Acid Composition of Phospholipids in *Pseudomonas* BAL-31/UFA and PM 2 Grown in Media Supplemented with Unsaturated Fatty Acids^a

Fatty acids in phospholipid	Unsaturated fatty acid added to growth medium							
	Palmitoleate (cis-16:1)		Palmitelaidate (trans-16:1)		Oleate (cis-18:1)		Bromopalmitate (16:Br)	
	UFA	PM 2	UFA	PM 2	UFA	PM 2	UFA	PM 2
14:0	Trace	Trace	Trace	Trace	0.5	0.4	3.2	4.6
14:1	0.6	2.0	10.7	10.0	1.4	1.9	—	—
16:0	3.0	4.7	0.7	7.6	7.2	4.7	6.7	15.2
16:1	88.8	89.0	86.1	74.2	57.2	58.8	10.1	11.2
18:0	0.6	0.3	0.2	3.4	0.9	0.7	11.1	10.0
18:1	7.0	4.0	2.3	5.0	32.8	33.5	8.9	13.5
12:Br							12.5	9.9
14:Br							25.8	19.1
16:Br							20.8	15.5
Saturated	3.6	5.0	0.9	11.0	8.6	5.8	21.0	29.8
Unsaturated	96.4	95.0	99.1	89.0	91.4	94.2	19.0	24.7
Brominated							59.1	44.5
Unknown	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	—	0.9	1.0

^a Results are expressed as percentage composition. —, not detected; trace, less than 0.1%.

Table IV. Phospholipid Composition in *Pseudomonas* BAL-31/UFA and PM 2 Grown in Media Supplemented with Unsaturated Fatty Acids*

Phospholipid	Unsaturated fatty acid added to growth medium									
	Palmitoleate (<i>cis</i> -16:1)		Palmitelaidate (<i>trans</i> -16:1)		Oleate (<i>cis</i> -18:1)		Bromopalmitate (16:Br)		None	
	UFA	PM 2	UFA	PM 2	UFA	PM 2	UFA	PM 2	BAL	PM 2
X	0.2	1.8	3.8	6.9	0.1	0.8	1.6	0.3	0.1	0.6
	0.1	1.0	2.7	1.2	0.1	1.0			0.4	0.6
PE	78.8	41.7	82.3	49.6	80.8	47.0	90.3	49.6	75.8	39.5
	85.6	43.7	84.8	53.8	89.1	41.2			80.5	38.4
PG	18.9	53.3	12.1	41.1	17.4	50.0	7.5	48.8	22.0	58.2
	13.2	52.5	11.0	42.0	10.2	55.8			17.9	59.4
LysoPE	2.0	1.7	1.7	1.2	1.3	1.4	0.4	0.3	1.6	0.9
	0.4	1.8	1.0	2.1	0.4	1.4			0.6	1.0
Others	0.1	1.6	0.1	1.2	0.4	1.1	0.2	1.0	0.5	0.9
	0.6	1.1	0.6	0.9	0.2	1.0			0.6	0.7
Total	97,019	102,381	83,500	73,473	74,491	65,926	89,798	76,800	65,002	99,916
cpm	82,910	28,604	65,143	28,458	61,135	25,686			59,417	57,324
Ratio	0.24	1.28	0.15	0.83	0.22	1.06	0.08	0.98	0.29	1.47
PG/PE	0.15	1.20	0.13	0.78	0.12	1.36			0.22	1.55

* Results are expressed as percentage composition and data from two separate experiments are presented except in the case of bromopalmitate.

BAL: *Pseudomonas* BAL-31 (wild). X: compound X (acylphosphatidylglycerol). PE: phosphatidylethanolamine. PG: phosphatidylglycerol. lysoPE: lysophosphatidylethanolamine.

生物活性に対する影響や、膜構造中での脂質と蛋白質の相互作用などに関する知見を得ることが、I. で述べたようにできるはずである。ファージ粒子中の脂質はその組込み機構はわかっていないが、すべて宿主細胞に由来する。したがって、宿主の脂質を変化させることでファージ粒子中の脂質を変化させようと想像される。そこで *Pseudomonas* BAL-31 より不飽和脂肪酸要求菌 (UFA 株) を分離した。種々の脂肪酸培地より精製したファージと UFA 株の脂肪酸組成を Table III に示した。cis 16:1 または cis 18:1 培地ではファージと宿主の脂肪酸組成がよく一致している。trans 16:1 または monobromopalmitate 培地では両者に相異が認められるが、全般的にみてファージの脂肪酸組成は宿主の脂肪酸組成を反映しており、宿主の脂肪酸組成を変化させることでファージの脂肪酸組成を変化させることができた。この事実は宿主の脂肪酸合成系はファージ感染の影響を受けないと考えられる。一方、異なった脂肪酸組成を有するファージ粒子の蛋白質組成は、野生株より精製したファージのものと同一であったが、予想に反して pH や熱安定性には変化が認められなかった。

II-2. で述べたように、protein II と PG との間に働く静電的相互作用のみにより膜構造が安定に維持され

ていると仮定すれば、リン脂質の脂肪酸組成を変化させてもファージ粒子中のリン脂質組成は一定のはずである。Table IV に示したように、cis 16:1 または cis 18:1 培地より得たファージはほぼ同じリン脂質組成を示し、野生株より得たファージ同様に PG が主成分であるが、trans 16:1 培地より得たファージは PE が主成分となり、PE/PG の比が急激に低下した。ファージ膜構造中の脂肪酸の configuration を cis 型から trans 型へ変化させることにより、脂質と蛋白質の疎水的相互作用が変化し、その変化を補正するためにリン脂質組成が変化したと解釈できる。

II-6. ファージ PM 2 の再構成における脂質の影響^(31,32)

PM 2 の再構成系を簡単に紹介すると、Fig. 11 に示すようにファージ粒子を 4.5M 尿素で処理すると nucleocore (protein III, IV, DNA を含む構造体) と protein I, II と脂質が分離される。逆に 4.5M 尿素存在下で nucleocore と分離した protein I, II と脂質を混合し、尿素を透析で取り除くと infectious particle を再構成できる。この再構成系に cis 型または trans 型脂肪酸を含むリン脂質を種々の組成に添加し infectious particle が再構成されるかを検討した (Table V)。cis 型

の脂肪酸を含む脂質からは、反応系に含まれる脂質の組成のいかんにかかわらず infectious particle (*cis* particle) を再構成できるが、*trans* 型の脂肪酸を含む脂質からは全く infectious particle (*trans* particle) を再構成できなかった。そこで再構成した粒子を精製し、粒子中の脂質組成を調べると、*cis* 型の脂肪酸を含むリン脂質でも *trans* 型の脂肪酸を含むリン脂質でも、反応液中のリン脂質組成に無関係に一定になり、PG が主成分となった。II-5. で述べたように、*in vivo* では *trans* 型の脂肪酸を用いると PE が主成分となる。したがって、再構成系では塩基性蛋白質の protein II と酸性脂質の PG との間の静電的相互作用が働いて膜構造を再構成するために、*trans* 型の脂肪酸を含むリン脂質からは脂質と蛋白質との正しい configuration を有する膜構造を再構成できずに、infectious particle を再構成できなかったと考えられる。

一方、ファージが infectivity を示す過程を考えると、ファージが宿主細胞に吸着しないかぎり infectivity が現われない。そこで *trans* particle について吸着に關与する spike protein が再構成されているかを調べると正常のファージや *cis* particle と同様に spike protein は再構成されていた。次いで *trans* particle 中の spike が機能を持っているかを、放射性のファージ蛋白質から再構成を行い、宿主細胞に対する吸着能を検討した。*cis* particle, *trans* particle と同じ効率で宿主細胞に吸着するが前者にのみ infectivity が存在する。また bromelain 処理により spike protein のみを特異的に分解すると *cis* particle, *trans* particle とともに宿主への吸着能がほとんど失われると同時に *cis* particle の infectivity もなくなる。したがって *trans* particle でも spike protein は機能的に再構成されていることが

Fig. 11. Dissociation and Association of Bacteriophage PM2 *in vitro*. Intact virus (a), lipid containing nucleocapsid (b), nucleocapsid (c), solubilized protein III, protein IV, and PM2 DNA (d).

明白である。

以上より *trans* particle では膜構造中での膜質と蛋白質との正しい configuration, とくに疎水的相互作用が正しく再構成されなかったために *trans* particle は

Table V. Reconstitution with Lipids Containing *cis* or *trans* Fatty Acids

Fatty acid	Input phospholipid			Phospholipid in particles			Infectivity (p. f. u.)
	PtdEtn	PtdGro	acylPtdGro	PtdEtn	PtdGro	acylPtdGro (%)	
<i>cis</i> -Palmitoleic acid	69.1	29.8	1.1	40.6	57.0	2.4	2500
<i>cis</i> -Palmitoleic acid	50.5	48.5	1.0	40.2	58.3	2.5	2700
<i>cis</i> -Palmitoleic acid	36.7	62.3	1.0	41.5	56.2	2.3	2600
<i>trans</i> -Palmitoleic acid	61.8	30.3	7.9	35.0	55.0	10.0	0
<i>trans</i> -Palmitoleic acid	42.6	49.9	7.5	35.7	52.9	11.4	0
<i>trans</i> -Palmitoleic acid	30.5	61.2	8.3	36.2	52.0	11.8	0

Phospholipids were prepared from strain UFA grown in *cis* or *trans*-palmitoleic acid medium containing 1 μ Ci/ml 32 P. Phospholipid composition is expressed as percentage of the radioactivity. Infectivity is expressed as total plaque forming units (p. f. u.).

宿主に吸着するが、それ以降のたとえば DNA 注入過程が阻止されるために、infectivity が現われなかったと考えられる。

(I), (II) を要約すると、生体膜は主として脂質と蛋白質から構成され、両者の静電氣的相互作用および疎水の相互作用により機能的に維持されている。両者の相互作用を、脂質の脂肪酸部分を人工的に操作することにより、生体膜の構造や機能がいかに変動するかを研究した。

最後に終始ご指導下さいました Prof. C. F. Fox (UCLA) と Prof. R. M. Franklin (Biozentrum, Basel) に深謝いたします。

- (1) C. F. Fox : *Sci. Am.*, **226**, 30 (1972).
- (2) D. F. Silvert and P. R. Vagenos : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **58**, 1579 (1967).
- (3) G. Wilson and C. F. Fox : *J. Mol. Biol.*, **55**, 49 (1971).
- (4) C. F. Fox, J. H. Law, N. Tsukagoshi and G. Wilson : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**, 598 (1970).
- (5) C. P. Linden, K. L. Wright, H. M. McConnell and C. F. Fox : *ibid.*, **70**, 2271 (1973).
- (6) N. Tsukagoshi and C. F. Fox : *Biochemistry*, **12**, 2816 (1973).
- (7) N. Tsukagoshi and C. F. Fox : *ibid.*, **12**, 2822 (1973).
- (8) N. Tsukagoshi and C. F. Fox : *ibid.*, **10**, 3309 (1971).
- (9) W. D. Donachie and K. J. Begg : *Nature*, **227**, 1167 (1970).
- (10) D. C. Morrison and H. J. Horowitz : *J. Mol. Biol.*, **49**, 441 (1970).
- (11) E. C. C. Lin, Y. Hirota and F. Jacob : *J. Bacteriol.*, **108**, 375 (1971).
- (12) G. Wilson and C. F. Fox : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 503 (1971).
- (13) F. Jacob, S. Brenner and F. Cuzin : Cold Spring Harbor Symposium, *Quant. Biol.*, **28**, 239 (1963).
- (14) A. Kepes and F. Autissier : *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 443 (1972).

- (15) P. Overath, F. F. Hill and I. Lamnek-Hirsch : *Nature (London)*, *New Biol.*, **234**, 264 (1971).
- (16) N. Tsukagoshi, P. Fielding and C. F. Fox : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 497 (1971).
- (17) P. Devaux and H. M. McConnell : *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4475 (1972).
- (18) N. Tsukagoshi and C. F. Fox : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1911 (1979).
- (19) R. M. Franklin : "Progress in Medical Virology," Vol. 4, ed. by E. Berger and J. L. Melnick, S. Karger, Basel-New York, 1962, p. 1.
- (20) R. Spencer : *J. Bacteriol.*, **79**, 614 (1960).
- (21) R. T. Espejo and E. S. Canelo : *Virology*, **34**, 738 (1968).
- (22) R. M. Franklin : *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **68**, 107 (1974).
- (23) S. Mong, J. E. Strong, J. A. Bush and S. T. Crooke : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**, 398 (1979).
- (24) N. Tsukagoshi, R. Schaefer and R. M. Franklin : *Eur. J. Biochem.*, **77**, 585 (1977).
- (25) R. Schaefer and R. M. Franklin : *ibid.*, **58**, 81 (1975).
- (26) N. Tsukagoshi and R. M. Franklin : *Virology*, **59**, 408 (1974).
- (27) N. Tsukagoshi, M. H. Petersen and R. M. Franklin : *Eur. J. Biochem.*, **60**, 603 (1975).
- (28) W. Snipes, J. Douthwright, J. Sand and A. Kieth : *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 340 (1974).
- (29) N. Tsukagoshi, M. H. Petersen and R. M. Franklin : *Nature*, **253**, 125 (1975).
- (30) N. Tsukagoshi, M. H. Petersen and R. M. Franklin : *Virology*, **66**, 206 (1975).
- (31) R. Schaefer and R. M. Franklin : *J. Mol. Biol.*, **97**, 21 (1975).
- (32) N. Tsukagoshi, R. Schaefer and R. M. Franklin : *Eur. J. Biochem.*, **73**, 469 (1977).

その他

I. に関する解説

塚越規弘 : 化学増刊, **60**, 107 (1973).

II. に関する解説

塚越規弘 : 蛋白質・核酸・酵素, **20**, 1054 (1975).

塚越規弘 : 代謝, **15**, 173 (1978).