大腸菌リン脂質の分子生物学†

渋谷 勲

(埼玉大学理学部)

大腸菌 (*Escherichia coli* K-12) は原核単細胞生物であるため、研究材料としての当然の限界があるが、他方、その相対的単純さと知見・技術の蓄積を利用し、分子遺伝学的な手法によって膜・リン脂質にかかわる生物共通の原理をまず大腸菌について理解しようという努力が成果を収めつつある。本稿では、大腸菌の主要リン脂質についての知見を整理し、各リン脂質の生合成制御の機構と生理的役割についての課題と現状を述べたい。詳細な知見は総説⁽¹⁻³⁾に譲って文献の引用は主要なもののみにとどめた。リン脂質や酵素の略号、遺伝子名などは図1にまとめて示したので参照願いたい。

1. 分子遺伝学的アプローチの現状

大腸菌細胞でリン脂質はもっぱら細胞質膜および外膜の基本成分として存在し、生合成の場合は細胞質膜である。生合成および代謝の主要な経路は図1のようにまとめることができる。真核生物に較べて著しく単純であるといえよう。分子遺伝学的アプローチの主要な目的の1つは、各リン脂質の生合成を遺伝学的に改変し、リン脂質組成が野生型と異なる細胞を構築することによって膜機能・細胞機能の変化をリン脂質の変化と対応させて解析することにある。各主要リン脂質の生合成は、それぞれの開始過程の改変によって操作できるので、図1の各反応のなかでも、PS、PGP および CL シンターゼの各酵素とそれらの構造遺伝子 *psaA*、*pgsA* および *cls* にとくに関心が持たれている。図2は、そのような研究結果の象徴として、各開始過程遺伝子と培養条件の操作によるリン脂質組成のさまざまな改変を示したものである。

これまで、生体膜の脂質組成は膜の種類によってほぼ一定で、そのことが膜の正常な機能発現に必要であろうと想定されてきた。しかしながら、大腸菌での遺伝学的

改変の結果は予想を覆すものであり、リン脂質組成、ひいては膜構造に対する細胞の要求は驚くほど柔軟で、野生型とは大幅に異なる組成であっても生存に必須な膜機能が発揮されるようにみえる(図2)。それでは、大腸菌にとってリン脂質は何でもよく、機能のうえで極性基構造の特異性はないのだろうか? その後の詳細な解析は、じつはそうではないことを示しつつある。

リン脂質生合成変異株の生育能、換言すればあるリン脂質の必要合成速度は、細胞の置かれた環境、すなわち培地の組成、培養温度、そして細胞の遺伝背景に依存する部分が大きいがわかってきた。たとえば、*pgsA* 遺伝子の完全欠損変異株は生存できないが⁽¹⁰⁾、酸性リン脂質 PG および CL をわずかに生成する *pgsA3* 変異株の生育は、成熟に PG 1 分子を消費する外膜の主要リン蛋白の合成量⁽¹¹⁾、培地の栄養度、および培養温度に依存する。主要リポ蛋白の合成が野生型であると、基質 PG の不足のため前駆体の修飾速度が低下し、膜電位が消失して細胞は死滅する。これは、分泌経路の停滞によって分泌蛋白前駆体のシグナル領域が膜へ非特異的に挿入することによるものと想像される。ここでの PG の役割は、同じ酸性リン脂質でも PA や PI で代替できない。しかし、栄養的に貧困な培地で生育速度が著しく低いと死滅することはなく、また、37°C で生育できなくとも 42°C では生育する。高温の抑制効果は、PG より約 30°C 相転移温度が高い PE を主成分とする *pgsA3* 変異株では、適切な膜の流動性の確保に高温が必要だからであろう。

CL シンターゼの構造遺伝子 *cls* の完全欠損変異株でも、CL は微量ながら合成され、生育はほぼ正常である。PS シンターゼの温度感受性変異 *psaA1* を導入してこの酵素の活性を低下させると、PS 合成にはあまり影響しない条件で CL 含量はさらに低下し生育が困難になる⁽⁹⁾。このことは、PS シンターゼが副反応として CL も生成し、CL に特異的に依存する必須の膜機能が存在するこ

† Molecular Biology of Phospholipids in *Escherichia coli*.

Isao SHIBUYA (Department of Biochemistry, Saitama University, Urawa 338)

図 1 大腸菌におけるリン脂質合成と消費の主要経路 (黒矢印)

白抜きが主要リン脂質. PI はパン酵母の PI シンターゼ構造遺伝子 *PIS* を *myo*-イノシトール存在下で発現させた場合に生成. 括弧内は各酵素の構造遺伝子名. 略号: GP, *sn*-glycerol 3-phosphate; PA, phosphatidic acid; CDP-DG, CDP-diacylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine; PGP, phosphatidylglycerophosphate; PG, phosphatidylglycerol; CL, cardiolipin; MDO, membrane-derived oligosaccharides.

とを示唆するもので, このような二重変異株は CL の特異的機能の検索にきわめて有用である.

一方, *pssA1* 変異株の高温での生育は培地の浸透圧と Mg^{2+} 濃度に依存する⁽⁶⁾. Mg^{2+} 20 mM を含む LB 培地では, PE をまったく生成しない *pssA* 完全欠損株も生育できる⁽⁵⁾. したがって, PE の役割が酸性リン脂質と異なり, 主としてマトリックスレベルのものであることが推定され, 同時に酸性リン脂質では Mg^{2+} を必要とする非二重層構造の重要性が示唆される.

このような遺伝学的改変株の解析によって, それぞれのリン脂質の細胞機能における役割の理解が蓄積しつつある. そのなかでの 1 つの単純な結論は, 野生型株より生育をよくする, すなわち細胞にとってより好都合な改変はない, ということである. 過酷な自然界でも最も生存に適するように進化してきたのが, 現在の野生型リン脂質組成なのであろう.

分子遺伝学的アプローチの有用性のもう 1 つの柱は, 遺伝子のクローニングによる産物の増幅生産の道が開けることである. リン脂質合成酵素は, 構成的で細胞内濃

図 2 大腸菌リン脂質組成の遺伝学的改変

代表的な欠損変異保持株の対数増殖期または静止期 (S) におけるリン脂質組成を脂質リンモル%で示す. 総リン脂質含量はこれらの株で顕著な差はない. +Mannitol は培地に 20mM $MgCl_2$ と 600mM D-mannitol を加えた場合で, PM は phosphatidylmannitol, DPM は diphosphatidylmannitol でそれぞれ PG および CL のアナログである. pUC-PIS はパン酵母の *PIS* 遺伝子を *lacP* 下流に持つ pUC 誘導体⁽⁴⁾.

度が低く, 疎水性のため精製が困難なものが多く, 加えて脂質を基質とする反応の宿命である動力学的解析の困難さのため, リン脂質合成の酵素学的研究は著しく遅れていたが, 構造遺伝子の発現増幅によって精製, 解析が可能になりつつある.

2. リン脂質の生合成と代謝の制御

大腸菌細胞にとって野生型のリン脂質組成が最も都合がいいとすれば, 細胞はそれを実現, 保持するための仕組みを備えているであろう. そのような仕組みの解明にも, 分子遺伝学的アプローチは不可欠である. 大腸菌には, 山下らがパン酵母で明らかにしつつあるような生合成酵素遺伝子の転写制御機構 (本シリーズ参照) はまだ見出されていない. 欠損によって PS シンターゼとジアシルグリセロールキナーゼの活性を 5 倍程度に上昇させる遺伝子 *pssR* および *dggR* が Raetz らによって発見されているが, それらの生物学的意義は現時点では不明で

ある。

大腸菌で3つの主要リン脂質がそれぞれ適切な速度で合成されるには、少なくとも次の3点を調節する機構が備わっていると予測される：(i) 膜中蛋白との割合を調節するための総リン脂質合成速度；(ii) 生合成分岐点 CDP-DG からの両方向の反応速度の割合；および (iii) PG および CL の量比が定まる CL 合成反応。通常、主要3リン脂質以外の生合成中間体脂質の膜中レベルは著しく低く、これらを基質とする酵素の活性は過剰に存在することが認められている。

(i) の調節では GP アシルトランスフェラーゼの反応が第一候補であるが、*plsB* 遺伝子発現を増幅してもリン脂質合成にほとんど影響せず、酵素活性が律速因子ではない。この反応の基質 GP の細胞内プールは、その合成のフィードバック阻害によって調節されており、GP とアシル ACP 両基質の供給速度が制御因子であろう。ただし、細胞内 GP レベルの上昇のみではリン脂質合成は昂進せず、アシル ACP 生成速度の操作にはまだ成功していないので、この点はまだ推定の域を出ない。

(ii) の分配の調節も、関与する PS シンターゼおよび PGP シンターゼの活性レベルによるものでないことは、これらの遺伝子工学的増幅がリン脂質組成にほとんど影響を与えないことから明らかである。CDP-DG からの両方向への分配は、*plsB* および *gpsA* 欠損株での異なる濃度のグリセロール添加実験の結果から、両シンターゼの特性に基づき CDP-DG 生成速度により決定されることが考えられる。最適条件以下の基質供給では酸性リン脂質が優先的に合成されるが、これは脂質関連酵素のなかで PS シンターゼのみが細胞質に存在し、反応の際だけ膜と結合することにより可能となるもので、酸性リン脂質が極性基種特異的な役割を持つことから、細胞にとって合目的性を持つ調節機構であると推定される。

(iii) PG と CL の分配も興味深い。そもそも CL というリン脂質がどのような特異的な役割を持つかという点が理解できていないが、その合成は制御されているらしい。野生型細胞の対数増殖期では大量の PG が存在するにもかかわらず CL 含量は全リン脂質の約 5% にとどまる (図 2)。CL 合成は他のリン脂質合成と異なり、CL シンターゼの活性にも部分的に依存するが、酵素活性の増幅に比例して増大することはない⁽¹²⁾。CL 合成は、細胞の生育静止期や呼吸機能が低下するような諸条件下、PE 合成欠損条件 (*ppsA 1* や *ppsA* 完全欠損株)、

あるいは CDP-DG の添加によって著しく増大することが知られており、また緊縮制御の対象となるという報告もある。これらの現象を分子レベルで理解するには、CL シンターゼの精製と解析が必須であるが、これまでの生物からも精製されていなかった。最近、大腸菌の酵素の高度増幅による精製と有用な活性測定法の開発が行われたので⁽¹²⁾、上記諸現象の分子機序の解析が可能となった。

3. 膜リン脂質の生理的役割

この数年、*in vitro* 系で次のようないくつかの重要な生理活性へのリン脂質のかかわりを示唆する観察が報告され、これまで膜脂質の研究で最も遅れていた機能面への関心が急速に高まりつつある。

① DNA 複製：複製の開始および終始領域と外膜との結合は、娘 DNA の分配との関連で以前から注目されていたが、最近、複製開始にかかわる DnaA 蛋白の再活性化に酸性リン脂質が必要であること⁽¹³⁾や、複製直後の半メチル化型開始領域と細胞質膜の特異的結合⁽¹⁴⁾などが見出され、リン脂質が複製反応自体の制御にかかわる可能性が指摘されている。Norris は DNA 複製開始をはじめとする細胞の周期がすべて酸性リン脂質の所在部位の急変に基づくという大胆なモデルを提唱した⁽¹⁵⁾。現存の知見と矛盾する面もあるが、発想はユニークで実験的吟味に値すると考えられる。

② ストレス応答：DNA の損傷などを誘因として発動される SOS 応答の主役 RecA 蛋白は、発動時に膜と結合するが、これは RecA が酸性リン脂質と特異的な結合能を有し機能が変化するためと考えられる⁽¹⁶⁾。一方、多くの状況証拠から、リン脂質欠損の表現型が熱ショックや SOS など、細胞のストレス応答機能と密接にかかわっている可能性が高い。

③ 蛋白質分泌：膜がかかわる現象として、蛋白質の分泌機構についての研究が現在精力的に行われている。そのなかで、酸性リン脂質欠損株からの反転小胞では外膜蛋白 PhoE の前駆体の膜内移動が低下し、酸性リン脂質の添加によってこれが回復すること⁽¹⁷⁾、分泌にかかわる蛋白質のうち SecA の膜内移動に伴う ATP アーゼ活性に酸性リン脂質が必要であること⁽¹⁸⁾などが観察されている。また、蛋白質分泌などの膜のダイナミックな機能に、膜脂質の非二重層化 (局所的、一次的なヘキサゴナル H_{II} 相の生成) の重要性が指摘され、分泌蛋白のシグナル領域によるこの相変化がモデル実験で観察さ

れている⁽¹⁹⁾。

膜リン脂質が、膜輸送や呼吸能のような典型的な膜の機能だけでなく、これまで膜とは無縁のものと考えられてきた細胞の中核機能にもかかわっていることを示唆するデータが蓄積されつつある。しかしながら、そのような観察はまだ主として *in vitro* のモデル系によるもので、真の生物学的意義は明らかでないものが多い。この時点で有効かつ必要なアプローチが分子遺伝学的手法であり、上述の遺伝学的改変株などを活用した *in vivo* の解析が急がれる。複雑な系で真の解を得るには、*in vivo* と *in vitro* 両面からの総合的な研究が不可欠であることは、これまでの生物科学の歴史も明白に教えているからである。

- (1) J. E. Cronan, Jr. and C. O. Rock : "Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology," Vol. 1, ed. by F. C. Neidhardt, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1987, p. 474.
- (2) T. Vanden Boom and J. E. Cronan, Jr. : *Annu. Rev. Microbiol.*, **43**, 317 (1989).
- (3) I. Shibuya : *Prog. Lipid Res.*, in press.
- (4) J. Nikawa, T. Kodaki and S. Yamashita : *J. Bacteriol.*, **170**, 4727 (1988).
- (5) A. DeChavigny, P. N. Heacock and W. Dowhan : *J. Biol. Chem.*, **266**, 5323 (1991).
- (6) I. Shibuya, C. Miyazaki and A. Ohta : *J. Bacteriol.*, **161**, 106 (1985).
- (7) I. Shibuya, S. Yamagoe, C. Miyazaki, H. Matsuzaki and A. Ohta : *J. Bacteriol.*, **161**, 473 (1985).
- (8) C. Miyazaki, M. Kuroda, A. Ohta and I. Shibuya : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 7530 (1985).
- (9) S. Nishijima, Y. Asami, N. Uetake, S. Yamagoe, A. Ohta and I. Shibuya : *J. Bacteriol.*, **170**, 775 (1988).
- (10) P. N. Heacock and W. Dowhan : *J. Biol. Chem.*, **262**, 13044 (1987).
- (11) Y. Asai, Y. Katayose, C. Hikita, A. Ohta and I. Shibuya : *J. Bacteriol.*, **171**, 6867 (1989).
- (12) S. Hiraoka, K. Nukui, N. Uetake, A. Ohta and I. Shibuya : *J. Biochem.*, **110**, 443 (1991).
- (13) B. Y.-M. Yung and A. Kornberg : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 7202 (1988).
- (14) A. Landoulsi, A. Malki, R. Kern, M. Kohiyama and P. Hughes : *Cell*, **63**, 1053 (1990).
- (15) V. Norris : *J. Theor. Biol.*, **139**, 117 (1989) ; *J. Mol. Biol.*, **214**, 1 (1990).
- (16) P. Krishna and J. H. van de Sande : *J. Bacteriol.*, **172**, 6452 (1990).
- (17) R. Kusters, W. Dowhan and B. de Kruijff : *J. Biol. Chem.*, **266**, 8659 (1991).
- (18) R. Lill, W. Dowhan and W. Wickner : *Cell*, **60**, 271 (1990).
- (19) G. J. de Vrije, A. M. Batenburg, J. A. Killan and B. de Kruijff : *Mol. Microbiol.*, **4**, 143 (1990).