



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	海洋細菌に存在する非天然型リン脂質
Author(s)	蒲野, 淑子; GAMANO, Toshiko; 藤島, 裕典 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 55(1), 17-21
Issue Date	2004-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21990
Type	departmental bulletin paper
File Information	55(1)_P17-21.pdf



海洋細菌に存在する非天然型リン脂質

蒲野 淑子¹⁾・藤島 裕典¹⁾・澤辺 智雄²⁾・板橋 豊¹⁾

(2004年1月20日受付, 2004年5月27日受理)

Occurrence of Unnatural Phospholipid in Marine Bacteria

Toshiko GAMANO¹⁾, Hironori FUJISHIMA¹⁾, Tomoo SAWABE²⁾
and Yutaka ITABASHI¹⁾

Abstract

Using chiral phase high-performance liquid chromatography (HPLC), we have determined the stereochemical configuration of phosphatidylglycerols (PG) from some marine bacteria, *Pseudoalteromonas* sp. (5 strains), *Vibrio* sp. (8 strains), *Deleya aquamarina*, *Alteromonas macleodii* and *Stappia aggregata*. For this purpose, PGs isolated from total lipids by thin-layer chromatography were converted into bis(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives, which were separated on two columns having chiral phases of opposite configuration, (*R*)- and (*S*)-1-(1-naphthyl)ethylamine polymeric phases. The results clearly showed that the PG from all the strains of *Pseudoalteromonas* sp. and *Alteromonas macleodii* consisted of a single *R*, *S* isomer (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol), while PG from three strains of *Vibrio* sp. and *Deleya aquamarina* contained an unnatural *R*, *R* isomer (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol), giving 1.5%~7.1% in total PG. *Stappia aggregata* also contained a small amount of the *R*, *R* isomer (0.3%). The present study demonstrates that chiral phase HPLC provides direct and unambiguous information about the configuration of bacterial PG.

Key words: Marine bacteria, *Pseudoalteromonas* sp., *Vibrio* sp., *Deleya aquamarina*, *Alteromonas macleodii*, *Stappia aggregata*, Phosphatidylglycerol, Stereoisomer, Chiral phase HPLC, 3,5-Dinitrophenylurethane

はじめに

ホスファチジルグリセロール (PG) は細菌の細胞膜を構成するリン脂質の主要成分であり, 細菌中に広く分布する (Shibuya, 1992)。PG は膜成分の一つであるリポプロテインや膜の浸透圧調節に必要な MDO (membrane-derived oligosaccharides) の生合成に関与しており, その欠損は菌の増殖速度や致死性に大きな影響を及ぼすとされている (Kikuchi et al., 2000; Matsumoto, 2001)。

PG は分子中にキラル中心を2つ有するので, 4種の立体異性体が考えられる。従来, 細菌由来 PG の立体構造は, リン脂質分解酵素 (ホスホリパーゼ A₂, C 及び D) を用いる酵素法によって, 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-1'-グリセロール {(*R*, *S*)配置, Fig. 1A} であるとされてきたが (OP den Kamp et al., 1968; Ruettinger and Brewer, 1978; Hosletler, 1982), Itabashi and Kuksis (1997) は, キラル高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて大腸菌 PG を分析した結果, 従来その存在が知られていない 1,

2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-3'-*sn*-グリセロール (*R*, *R* 配置, Fig. 1B) が全 PG 中約 11% 存在することを見出した。最近, 著者らは海洋細菌 30 株の PG をキラル HPLC 法で分析し, そのうちの 16 株に *R*, *R* 体の存在することを明らかにした。特に *Pseudoalteromonas* sp. には全 PG 中 6.2% の *R*, *R* 体が存在した (藤島ら, 2004)。本研究では, 細菌における *R*, *R* 体の分布をより明確にするために, 海洋細菌 16 株 (*Pseudoalteromonas* 5 株, *Vibrio* 8 株, *Deleya aquamarina*, *Alteromonas macleodii* 及び *Stappia aggregata*) を前報 (藤島ら, 2004) と同様の方法で分析した。その結果, 新たに *Vibrio* (3 株) と *D. aquamarina* から比較的高い割合 (全 PG 中 2.4~7.1%) の *R*, *R* 体が検出されたので報告する。

実験方法

試料

Table 1 に, 供試した 16 株の細菌を示す。 *Pseudoalter-*

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科生物資源化学講座
(Laboratory of Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

²⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科応用生物科学講座
(Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

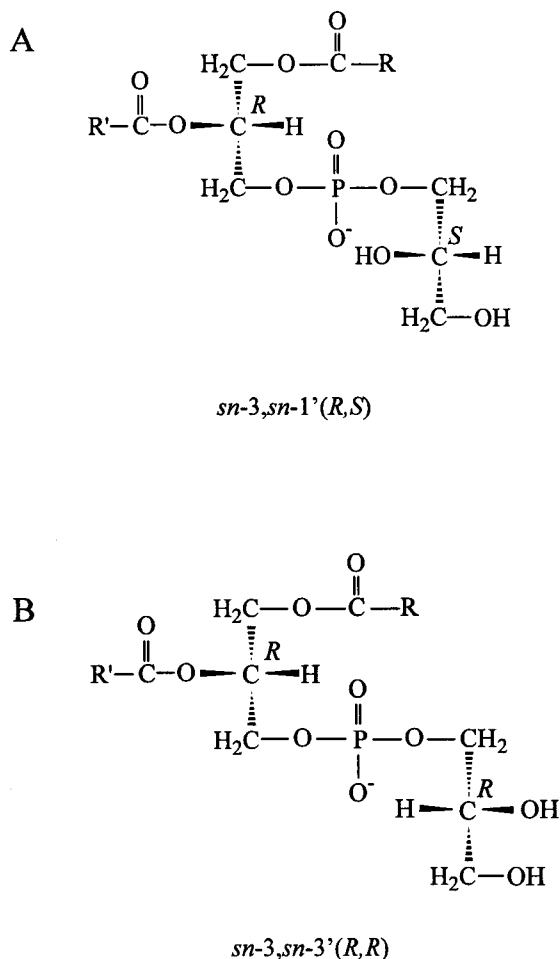


Fig. 1. Structures of diastereomeric phosphatidylglycerols. A, 1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R, S* configuration); B, 1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R, R* configuration).

omonas と *Vibrio* は北海道七重浜の沿岸海水、海藻及びアワビから分離し、定法に基づき、表現形質と 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を調べ、属レベルの同定を行った菌株である。*Deleya aquamarina*, *Ateromonas macleodii* 及び *Stappia aggregata* は IMA から分譲されたものである。*Pseudoalteromonas* と *Vibrio* の培養には、ZoBell 2216E プロス (ポリペプトン 5.0 g, 酵母エキス 1.0 g, 75% 人工海水 1 L, pH 7.8) を用い、*D. aquamarina*, *A. macleodii* 及び *S. aggregata* の培養には B-2 培地 (Marine broth 37.4 g, 蒸留水 1 L, pH 7.6) を使用した。両培地は使用前にあらかじめ滅菌処理した。これらの細菌を 20°C 暗所にて 24 時間振盪培養 (100 rpm) した後、遠心分離 (10,000×g, 20 分) によって菌体を培養液から回収した。

PG の単離

生理食塩水を用いて数回洗浄した菌体から Bligh-Dyer 法 (Bligh and Dyer, 1959) を用いて脂質を抽出した。得られた総脂質から薄層クロマトグラフィー (TLC) により PG を単離した。TLC 板 (Merck 製シリカゲル 60F₂₅₄, 20×

20 cm, 厚さ 0.25 mm) に、少量のクロロホルムに溶解した総脂質 (約 10 mg) をスポットした後、クロロホルム/メタノール/水 (65:25:4, by vol) を用いて展開した。風乾後、2',7'-ジクロロフルオレセイン-エタノール溶液 (0.2%) を噴霧して紫外線下で PG を検出し (*R_f*0.35), クロロホルム/メタノール/酢酸 (20:10:1, by vol) を用いてシリカゲルから抽出した。

ウレタン誘導体の調製とキラル HPLC 分析

PG のビス (3,5-ジニトロフェニルウレタン) 誘導体の調製とキラル HPLC 分析は, Itabashi and Kuksis (1997) の方法で行った。PG (約 0.5 mg) を乾燥トルエン 1 ml に溶解した後, 3,5-ジニトロフェニルイソシアネートを約 5 mg 加えて溶解した。これに乾燥ピリジンを約 30 μl 加えて 30°C で 3 時間攪拌しながら反応させた。生成した PG のビス (3,5-ジニトロフェニルウレタン) 誘導体は, TLC (シリカゲル 60F₂₅₄ プレート, 20×20 cm, 厚さ 0.25 mm; 展開溶剤: クロロホルム/メタノール/水, 80:20:2, by vol) によって精製した。ウレタン誘導体の HPLC 分析には, 日立製の L-6000 ポンプと (*R*)- 及び (*S*)-1-(1-ナフチル) エチルアミンをキラルセクターとする 2 種のカラム (YMC 製 A-K03 及び A-L03, 250×4.6 mm i.d.) を使用した。移動相 (和光純薬工業製 HPLC 溶媒) には, ヘキサン/ジクロロメタン/メタノール/トリフルオロ酢酸 (60:20:20:0.2, by vol; 流量 1 ml/min) を使用し, 10°C のカラム温度で分析した。ジクロロメタンに溶解した試料 (1 mg/ml) の 5 μl を Rheodyne 製インジェクター (Model 7125) を用いてカラムに注入し, 溶出した成分を 254 nm (日立製 L-4000 検出器) でモニターした。クロマトグラムの記録とピーク面積の測定には C-R6A インテグレーター (島津製) を使用した。また, 大腸菌の脂質から分離した PG を標品に用いた (Itabashi and Kuksis, 1997)。

結果と考察

立体異性体組成

分析した 12 株の脂質含量 (湿重量) は 1% 前後であった。総脂質中の PG 含量は 5~40% であり, 菌株によって大きく異なった (Table 1)。Fig. 2 に, *Vibrio ezurae* HDS5-2 由来 PG のキラル HPLC クロマトグラムを示す。A-K03 カラムを用いた場合, PG は大小 2 つのピークに明瞭に分離された (Fig. 2A)。15 分と 20 分付近に溶出した成分の保持時間は大腸菌 PG の *R, R* 体と *R, S* 体のそれらとほぼ一致した。A-K03 と逆の立体配置を有する A-L03 カラムを使用した場合, 2 つのピークの溶出順序は逆転した (Fig. 2B)。これらの結果から, 分離された 2 つのピークを *R, R* 及び *R, S* と同定した。立体配置の異なるカラムでの PG ジアステレオマーの溶出順の逆転現象は Itabashi and Kuksis (1997) 及び板橋ら (1999) によっても報告されている。Table 1 に, 本研究で分析した全 PG のジアステレオマー組

Table 1 Content and diastereomer composition of phosphatidylglycerols of marine bacteria.

Strain ^a	PG content (wt %) ^b	Diastereomer (mol %)	
		(<i>R, S</i>) ^c	(<i>R, R</i>) ^d
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. No. 36	23.1	100	N.D. ^e
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. No. 37	18.5	100	N.D.
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. No. 38	17.4	100	N.D.
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. No. 39	11.9	100	N.D.
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. No. 40	40.8	100	N.D.
<i>Vibrio haliotocoli</i> IAM 14596T	22.5	98.5	1.5
<i>Vibrio ezurae</i> HDV1-1	12.2	98.3	1.7
<i>Vibrio ezurae</i> HDS5-2	6.0	92.9	7.1
<i>Vibrio superstes</i> G3-15	22.4	100	N.D.
<i>Vibrio superstes</i> G3-29	7.2	100	N.D.
<i>Vibrio gallicus</i> HT1-3	5.1	100	N.D.
<i>Vibrio gallicus</i> HT3-2	13.4	100	N.D.
<i>Vibrio</i> sp. UG-1	6.7	100	N.D.
<i>Deleya aquamarina</i> IAM 12645	30.1	97.6	2.4
<i>Alteromonas macleodii</i> IAM 12920	26.4	100	N.D.
<i>Stappia aggregata</i> IAM 12614	13.7	99.7	0.3

^aBacterial strains except for *D. aquamarina*, *A. macleodii* and *S. aggregata* were tentatively identified by phenotypic and phylogenetic characterizations.

^bPhosphatidylglycerol content in total lipids.

^c1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R, S* configuration).

^d1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R, R* configuration).

^enot detected.

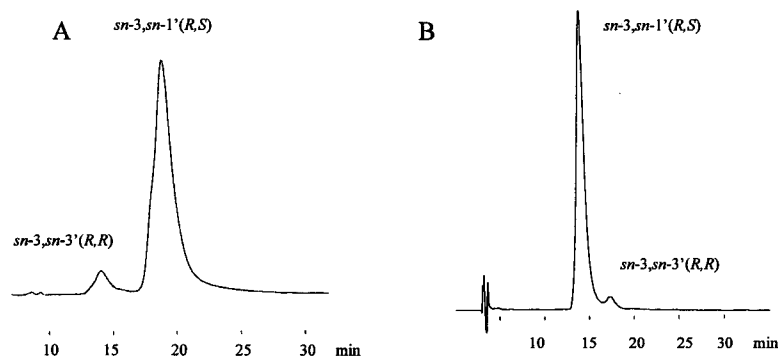


Fig. 2. Chiral phase HPLC profiles of the bis(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from *Vibrio ezurae* HDS5-2 on a column containing (*R*)-1-(1-naphthyl)ethylamine (YMC A-K03) (A) and (*S*)-1-(1-naphthyl)ethylamine (YMC A-L03) (B). *sn*-3, *sn*-1'=1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R, S* configuration); *sn*-3, *sn*-3'=1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R, R* configuration). Column temp., 10°C; Mobile phase, hexane/dichloromethane/methanol/trifluoroacetic acid (60:20:20:0.2, by vol). Detection: 254 nm.

成を示す。*R, R*体と*R, S*体はA-L03よりもA-K03カラムで良好に分離されるため (Fig. 2A), その組成はA-K03カラムで分析した結果から算出した。*Vibrio*では8株中3株から、全PG中1.5%~7.1%の*R, R*体が検出された。特に、*Vibrio* HDS5-2株には7.1%の*R, R*体が存在したが、これは、これまでに著者が分析した海洋細菌 (藤島ら, 2004) の中で最も高含量であった。*D. aquamarina*と*S. aggregata*からは、それぞれ2.4%と0.3%の*R, R*体が検出

されたが、*A. macleodii*からは*R, R*体は検出されなかった。前報 (藤島ら, 2004) では*Pseudoalteromonas*属の1株から全PG中6.2%の*R, R*体が検出されたが、本研究で供試した同属の5株のいずれからも*R, R*体は検出されなかった。これらの結果は、同属の細菌でも*R, R*体の生合成能が異なることを示唆する。

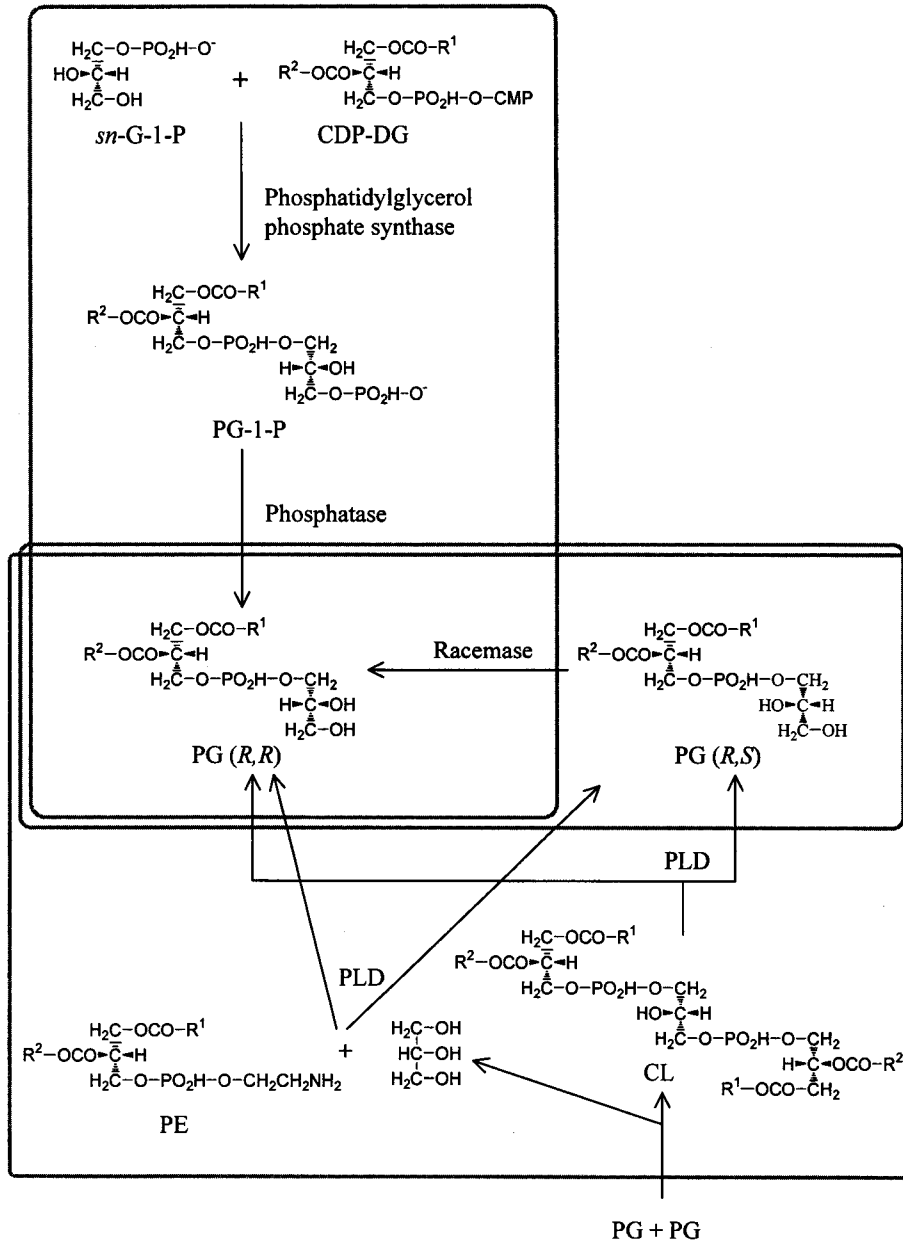


Fig. 3. Possible biosynthetic pathways of 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R,R* configuration). PG, phosphatidylglycerol; (*R,S*), 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol; (*R,R*), 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol; *sn*-G-1-P, *sn*-glycero-1-phosphate; CDP-DG, cytidine 5'-diphosphate-diacylglycerol; PG-1-P, phosphatidylglycero-1-phosphate; PE, phosphatidylethanolamine; PLD, phospholipase D; CL, cardiolipin.

生合成

本研究と前報 (Itabashi and Kuksis, 1997; 藤島ら, 2004) の結果から, 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-3'-*sn*-グリセロール (*R,R* 体) 異性体は, 細菌に比較的広く分布することが明らかになった。従来その存在が知られていなかったこの非天然型 PG の推定される生合成経路を Fig. 3 に示す。生物由来 PG の立体構造としてこれまで明らかにされている 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-1'-*sn*-

グリセロール (*R,S* 体) は, シチジン 5'-二リン酸 (CDP)-ジアシルグリセロール (DG) と *sn*-グリセロール 3-リン酸から生成することが明らかにされている (Shibuya, 1992; 西島, 1997)。*R,S* 体はカルジオリピン (CL) からホスホリパーゼ D (PLD) の加水分解作用によっても生成する (Hostetler, 1982)。一方, 古細菌には, *sn*-グリセロール 3-リン酸ではなく, *sn*-グリセロール 1-リン酸を生成する株が存在する (Kakinuma ら, 1990)。大腸菌や本研究で分析した海洋細菌が, 古細菌と同様に *sn*-グ

リセロール 1-リン酸を生合成するならば、CDP-DG と *sn*-グリセロール 1-リン酸からホスファチジルグリセロール-1-リン酸を経て 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-3'-*sn*-グリセロール (*R, R* 体) が生成すると考えられる (Fig. 3, 上のパネル)。また、原核生物では 2 分子の PG が縮合して CL が合成されるのと同時にグリセロールが生成する (西島, 1997)。このグリセロールと菌体膜脂質の主要成分の一つであるホスファチジルエタノールアミン (PE) を基質として、PLD によるホスファチジル基変換反応 (Yang ら, 1967; Joutti and Renkonen, 1976) が起こるならば、*R, S* 体と *R, R* 体のジアステレオマー混合物が生成すると考えられる (Fig. 3, 下のパネル)。また、CL に特異的に作用する PLD は、CL 分子中 2 つのリン酸基にはさまれた中央のグリセロール骨格の *sn*-3 位の結合を特異的に加水分解し、*R, S* 体のみを生合成すると考えられているが、この酵素が *sn*-1 位も加水分解するならば、CL から *R, R* 体がホスファチジン酸と供に合成される (Fig. 3, 下のパネル)。脂質ラセミ化酵素の存在はこれまで知られていないが、*R, S* 体から *R, R* 体へのラセミ化も考えられる (Fig. 3, 中央のパネル)。本研究では大腸菌の培養上清および菌体ホモジネートを粗酵素として用い、ラセマーゼ活性の測定を試みたが、培養上清からは明瞭な活性は認められなかった。従って、*R, R* 体を含む *Vibrio* でもラセマーゼ活性は検出されないか、検出されたとしても極めて弱いと推測される。このように、*R, R* 体の生合成には複数の経路が考えられるが、いずれの経路によるかは現在のところ不明である。

おわりに

本研究では、キラル HPLC を用いて海洋細菌 16 株の産生する PG の立体異性体組成を調べた。その結果、*Vibrio* 3 株と *D. aquamarina* 及び *S. aggregata* から、これまでその存在が知られていない *R, R* 型配置の PG が検出された。今後、この非天然型 PG の生合成経路と生理機能を明らかにしたいと考えている。

文 献

Shbuya, I. (1992) Metabolic regulation and biological functions of phospholipids in *Escherichia coli*. *Prog.*

- Lipid Res.*, **31**, 245-299.
- 矢野郁也 (1982) 脂質。「微生物の化学分類実験法」(駒形和男編) 学会出版センター, 東京, 87-111.
- Kikuchi, S., Shibuyua, I. and Matsumoto, K. (2000) Viability of an *Escherichia coli* *pgs* null mutant lacking detectable phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J. Bacteriol.*, **182**, 371-376.
- Matsumoto, K. (2001) Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*. dual roles of anionic phospholipids. *Mol. Microbiol.*, **39**, 1427-1433.
- Op den Kamp, J.A.F., Bonsen, P.P.M. and Van Deenen, L.L.M. (1968) Structural investigations on glucosaminyl phosphatidylglycerol from *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Acta*, **176**, 298-305.
- Ruettinger, R.T. and Brewer, G.J. (1978) Stereoconfiguration of phosphatidylglycerol in the membrane of bacteriophage PM2 and in its host, *Pseudomonas* BAL-31. *Biochem. Biophys. Acta*, **529**, 181-185.
- Hostetler, K.Y. (1982) Polyglycerophospholipids: phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and bis(monacylglycero)phosphate. pp. 215-261, Hawthorne, J.N., and Ansell, G.B. (Eds.), *Phospholipids*, Elsevier Biochemical Press, Amsterdam.
- Itabashi, Y. and Kuksis, A. (1997) Reassessment of stereochemical configuration of natural phosphatidylglycerols by chiral-phase high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **254**, 49-56.
- 藤島裕典・蒲野淑子・田岡裕佳子・澤辺智雄・板橋 豊 (2004) 海洋細菌に存在するホスファチジルグリセロールの立体異性体。日本水産学会誌, **70**, 200-202.
- 板橋 豊・A. Kuksis (1998) キラル HPLC/ESI/MS によるホスファチジルグリセロールの立体配置の決定。脂質生化学研究, **40**, 175-177.
- 小幡智美・澤辺智雄・田中礼士・谷内善一・生地 暢・田島研一・絵面良男 (1999) 下北半島沿岸域の細菌相調査。北大水産彙報, **50**, 115-122.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- 西島正弘 (1997) リン脂質の生合成と分解。「細胞機能と代謝マップ」(日本生化学会編) 東京化学同人, 東京, 112-177.
- Astrachan, L. (1973) The bond hydrolyzed by cardiolipin-specific phospholipase D. *Biochem. Biophys. Acta*, **296**, 79-88.
- Kakinuma, K. and Obata, Y. (1990) Biosynthesis of archaeobacterial ether lipids. *J. Cell Sci.*, **6**, 222-224.
- Yang, S.F., Feer, S. and Benson, A.A. (1967) Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, **242**, 477-484.