



Title	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
Author(s)	藤島, 裕典; Fujishima, Hironori; 蒲野, 淑子 他
Description	短報
Citation	日本水産学会誌, 70(2), 200-202 https://doi.org/10.2331/suisan.70.200
Issue Date	2004-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42514
Rights	本文データは学協会の許諾に基づきCiNiiから複製したものである
Type	journal article
File Information	110003145688.pdf



短 報

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藤島裕典,¹ 蒲野淑子,¹ 田岡裕佳子,¹
澤辺智雄,² 板橋 豊^{1*}

(2003年7月28日受付, 2003年11月17日受理)

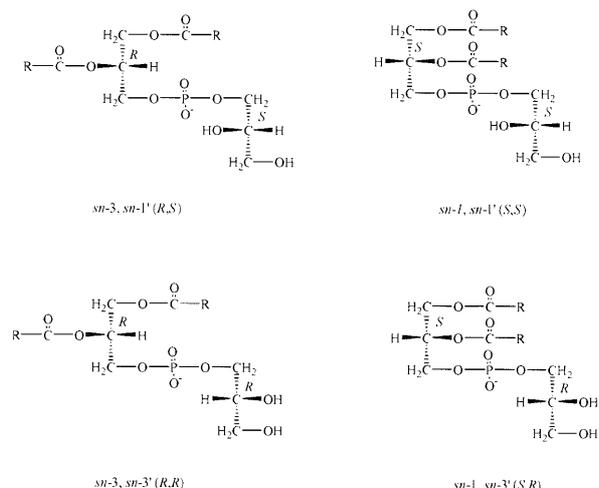
¹北海道大学大学院水産科学研究科生物資源化学講座,²北海道大学大学院水産科学研究科応用生物科学講座Stereoisomers of marine bacterial
phosphatidylglycerolsHIRONORI FUJISHIMA¹, TOSHIKO GAMANO¹,
YUKAKO TAOKA¹, TOMOO SAWABE²
AND YUTAKA ITABASHI^{1*}¹Laboratory of Bioresources Chemistry, ²Laboratory of
Biochemistry and Biotechnology, Graduate School of Fish-
eries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido
041-8611, Japanキーワード: 海洋細菌, ホスファチジルグリセロール,
立体異性体組成, ジアステレオマー, キラル
高速液体クロマトグラフィー, 3,5-ジニ
トロフェニルウレタンホスファチジルグリセロール (PG) はホスファチジ
ルエタノールアミン (PE) と共に細菌の細胞膜を構成
する主要なリン脂質として細菌中に広く分布する。^{1,2)} 細
菌における PG は, 膜成分であるリポプロテインや浸透
圧調整に必要とされる MDO (membrane-derived oligo-
saccharides) の生合成系へ関与しており,¹⁾ その欠損は
高温や低浸透圧下に置かれた菌体の増殖速度や致死性に
大きな影響を及ぼすことが明らかにされている。^{3,4)}PG は分子中にキラル中心を2つ有するため, 理論的
には Fig. 1 に示すような4つの立体異性体が考えられ
るが, 生物由来 PG は従来 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* 配置) であるとさ
れてきた。しかし, Itabashi, Kuksis^{5,6)} はキラル高速液
体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて数種の生物由
来 PG の立体構造を再評価した結果, 大腸菌 (*Es-*
cherichia coli) 脂質中に従来知られていない 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) が全 PG 中約 11% 存在することを見いだした。
本研究では *R, R* 異性体の微生物における分布を明らか
にするため, 海洋細菌 30 株の PG をキラル HPLC を用
いて詳細に分析した。その結果, *R, R* 異性体は 16 株か

Fig. 1 Structures of phosphatidylglycerol stereoisomers. *sn*-3, *sn*-1' (*R, S*): 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol; *sn*-3, *sn*-3' (*R, R*): 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol; *sn*-1, *sn*-1' (*S, S*): 1,2-diacyl-*sn*-glycero-1-phospho-1'-*sn*-glycerol; *sn*-1, *sn*-3' (*S, R*): 1,2-diacyl-*sn*-glycero-1-phospho-3'-*sn*-glycerol.

ら検出され, 海洋細菌に比較的広く分布することが明らかになったので報告する。

本研究で分析した海洋細菌を Table 1 に示す。供試した 30 株の細菌は青森県下北半島の沿岸海水から分離し, 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。⁷⁾ 細菌の培養には, あらかじめ滅菌処理した 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 1L, pH 7.8) を使用した。20°C で暗所にて 24 時間振盪培養 (100 rpm) した後, 遠心分離 (10,000 × *g*, 20 分) により菌体を回収した。生理食塩水を用いて数回洗浄した菌体から Bligh-Dyer 法⁸⁾ を用いて総脂質を抽出した。総脂質からシリカゲル 60F₂₅₄ プレート (Merck, 20 × 20 cm, 厚さ 0.25 mm) とクロロホルム/メタノール/水 (65 : 25 : 4, v/v/v) の展開溶剤を用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) によって PG を分離した後, ビス-3,5-ジニトロフェニルウレタン (DNPU) 誘導体に変換した。誘導体の調製とキラル HPLC 分析は既報⁵⁾ に準じて行った。すなわち, 乾燥トルエン 1 mL に溶解した PG (0.5~1 mg) に, 3,5-ジニトロフェニルイソシアネート (住化分析センター) 5~6 mg と乾燥ピリジン (和光純薬工業) 30 μL を加えた

* Tel : 81-138-40-8802. Fax : 81-138-40-8802. Email : yutaka@fish.hokudai.ac.jp

Table 1 Content and diastereomer composition of phosphatidylglycerols of marine bacteria

No.	Strain Genus ^a	Content (wt%) ^b	Diastereomer (mol%)	
			(<i>R, S</i>) ^c	(<i>R, R</i>) ^d
1	<i>Colwellia</i>	13.7	100	N.D. ^e
2	<i>Alteromonas</i>	23.7	100	N.D.
3	<i>Alteromonas</i>	20.8	100	N.D.
4	<i>Pseudoalteromonas</i>	15.2	93.8	6.2
7	<i>Pseudoalteromonas</i>	44.9	100	N.D.
8	<i>Shewanella</i>	28.4	100	trace ^f
9	<i>Halomonas</i>	3.8	98.0	2.0
11	<i>Psychrobacter</i>	23.2	97.0	3.0
12	<i>Halomonas</i>	18.9	99.2	0.8
13	<i>Psychrobacter</i>	35.1	100	trace
14	<i>Psychrobacter</i>	28.1	97.0	3.0
15	<i>Psychrobacter</i>	31.0	98.1	1.9
17	<i>Sulfitobacter</i>	49.6	99.3	0.7
18	<i>Sulfitobacter</i>	24.0	99.4	0.6
19	unidentified <i>α-proteobacteria</i>	59.1	100	N.D.
20	unidentified <i>α-proteobacteria</i>	18.2	100	N.D.
21	<i>Sulfitobacter</i>	16.8	99.5	0.5
22	<i>Micrococcus</i>	9.5	98.6	1.4
23	<i>Bacillus</i>	83.9	99.5	0.5
24	<i>Devosia</i>	10.9	93.5	6.5
25	<i>Photobacterium</i>	11.1	100	trace
26	<i>Vibrio</i>	12.7	96.1	3.4
27	<i>Photobacterium</i>	17.5	100	trace
28	<i>Photobacterium</i>	9.0	96.8	3.2
29	<i>Photobacterium</i>	8.1	96.0	4.0
30	<i>Shewanella</i>	7.1	100	N.D.
31	<i>Paracoccus</i>	18.2	100	N.D.
32	<i>Roseobacter</i>	15.3	100	N.D.
33	<i>Sulfitobacter</i>	29.4	99.6	0.4
34	<i>Pseudoalteromonas</i>	22.7	100	N.D.

^aBacterial strains 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, ^fless than 0.4%

後、30°Cで3時間攪拌しながら反応させた。生成したDNPU誘導体を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, v/v/v)によって精製した。PGおよびDNPU誘導体は、クロロホルム/メタノール/酢酸(20:10:1, v/v/v)を用いてTLCプレートから回収した。キラルHPLC分析には、島津LC-6Aポンプと(*R*)-および(*S*)-1-(1-ナフチル)エチルアミンカラム(YMC-Pack A-K03およびA-L03, 250×4.6 mm i.d.)を使用した。移動相には*n*-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:

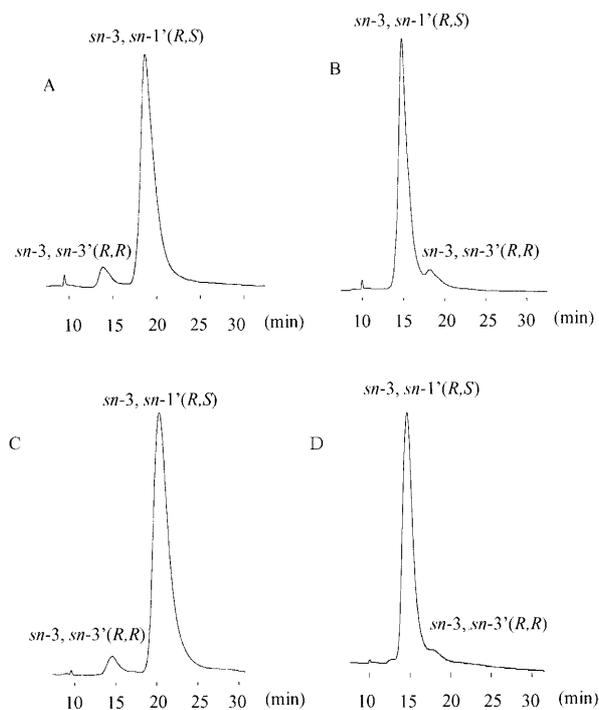


Fig. 2 Chiral-phase HPLC profiles of the bis(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from *Pseudoalteromonas* sp. strain No. 4 (A and B) and of standard phosphatidylglycerols from *Escherichia coli* (C and D), on columns containing (*R*)-1-(1-naphthyl) ethylamine (YMC A-K03) (A and C) and (*S*)-1-(1-naphthyl) ethylamine (YMC A-L03) (B and D). *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). HPLC conditions as given in text.

0.2, v/v/v/v)を用いて、カラム温度を10°Cに設定し、1 mL/minの流量で*R, R*と*R, S*のジアステレオマーを分離した。試料は1 mg/mLとなるようにジクロロメタンに溶解し、その5 μLをインジェクター(Rheodyne Model 7125)を用いてカラムに注入した。溶出した成分を島津SPD-6A検出器を用いて254 nmで検出した。クロマトグラムの記録とピーク面積の測定には島津C-R6Aクロマトパックを使用した。キラルHPLC分析の標品には、*E. coli*のリン脂質(Sigma, Type IX)に含まれるPGを使用した。⁵⁾

分析した海洋細菌30株の脂質含量(湿重量)は1~2%であった。総脂質中のPG含量はほとんどの株で10~30%程度であったが、No. 17(*Sulfitobacter*)、No. 19(未同定*α-proteobacteria*)およびNo. 23(*Bacillus*)株では、それぞれ50%、59%、84%ときわめて高く、膜リン脂質の最多成分であった(Table 1)。Fig. 2に、*Pseudoalteromonas* sp. (No. 4株)のPGと標品として用いた*E. coli* PGのキラルHPLCクロマトグラムを比較して示す。A-K03カラムを使用した場合、*Pseudoaltero-*

monas の PG は 2 つのピークに明瞭に分離された。15 分と 20 分付近に溶出した成分の保持時間は *E. coli* PG の *R, R* 異性体と *R, S* 異性体の保持時間と一致した。A-K03 と逆の立体配置をもつ A-L03 カラムで分析した場合、PG の *R, R* と *R, S* (ジアステレオマー) は A-K03 の場合と溶出順序が逆転することが知られている。^{5,6)} 本研究でも A-L03 カラムで分析した結果、*R, S* 異性体は 14 分付近に、*R, R* 異性体は 18 分付近に溶出し、溶出順序が A-K03 と逆転した。これらの結果から、*Pseudoalteromonas* PG の分離された 2 つのピークをそれぞれ *R, R* および *R, S* と同定した。Table 1 に、本研究で分析した全 PG のジアステレオマー組成を示す。2 つの異性体 (*R, R* と *R, S*) は A-L03 よりも A-K03 カラムで良好に分離されたため、その組成は A-K03 カラムを用いて求めた。分析した 30 株中約半数の 16 株に、全 PG 中 0.4~6.5% の *R, R* 異性体が存在した。また、4 株 (No. 8, 13, 25 および 27) からごく少量 (0.4% 以下) の *R, R* 異性体が検出された。これら *R, R* 異性体の含量は *E. coli* PG の分析結果 (11%)⁶⁾ と比較するとかなり低い。これは細菌の種の違いや培養条件によって *R, R* 異性体の生合成が異なるためと考えられる。PG 含量と異性体組成間に相関は認められなかった。また、*Pseudoalteromonas* sp. の No. 4, 7 および 34 株のように表現形質と系統解析により同一の属に分類される菌株の中でも、No. 4 株は *R, R* 異性体を含有したが、No. 7 と No. 34 株はこれを含まず、属レベルでの分類学的位置と *R, R* 異性体の存在の有無に明瞭な相関は認められなかった。

従来、生物由来 PG の立体構造と考えられてきた 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロール-3-ホスホ-1'-*sn*-グリセロール (*R, S* 配置) は、シチジン-5'-ニリン酸 (CDP)-ジアシルグリセロールと *sn*-グリセロール-3-リン酸から合成されるホスファチジルグリセロール-3-リン酸が脱リン酸されることによって生成する。^{1,9)} また、*R, S* 異性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ホスファチジン酸と共に生成することが報告されている。¹⁰⁾ 一方、好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* は通常の生物と異なり、*sn*-グリセロール 3-リン酸ではなく *sn*-グリセロール-1-リン酸を生成することが知られている。¹¹⁾ *E. coli* 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-ジアシルグリセロールと *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*-グリセロール-3-ホスホ-3'-*sn*-グリセロール (*R, R* 配置) が生成すると考えられる。また、*E. coli* をはじめとする原

核生物では 2 分子の PG が縮合して CL が合成されるが、このときグリセロールが生成する。⁹⁾ このグリセロールと菌体中に豊富に含まれる PE を基質として、PLD によるホスファチジル基転移反応¹²⁾ が起こると、*R, S* と *R, R* のジアステレオマー混合物が生成すると考えられる。*R, S* を *R, R* に変換するラセミ化機構も考えられるが、PG ラセミ化酵素の存在は知られていない。このように *R, R* 異性体の生成には 3 つの経路が考えられるが、いずれの経路によるかは現在検討中である。

本研究ではキラル HPLC を用いて海洋細菌 30 株を分析し、そのうち 16 株から PG の *R, R* 異性体を初めて検出した。生物由来 PG の分子種組成や生理機能に関する研究例は多数存在するが、立体異性体を区別した研究はほとんど実施されていない。今後、微生物における *R, R* 異性体の分布の詳細と立体異性体間での代謝や生理機能の違いが明らかになることが期待される。

文 献

- 1) Shibuya I. Metabolic regulation and biological functions of phospholipids in *Escherichia coli*. *Prog. Lipid Res.* 1992; **31**: 245-299.
- 2) 矢野郁也. 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. 1982; 87-111.
- 3) Kikuchi S, Shibuya I, Matsumoto K. Viability of an *Escherichia coli* *pgsA* null mutant lacking detectable phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J. Bacteriol.* 2000; **182**: 371-376.
- 4) Matsumoto K. Dispensable nature of phosphatidylglycerol in *Escherichia coli*: dual roles of anionic phospholipids. *Mol. Microbiol.* 2001; **39**: 1427-1433.
- 5) Itabashi Y, Kuksis A. Reassessment of stereochemical configuration of natural phosphatidylglycerols by chiral-phase high performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1997; **254**: 49-56.
- 6) 板橋 豊, Kuksis A. 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. 1998; **40**: 175-177.
- 7) 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. 下北半島沿岸域の細菌相調査. 北大水産集報 1999; **50**: 115-122.
- 8) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; **37**: 911-917.
- 9) 西島正弘. 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. 1997; 112-177.
- 10) Astrachan L. The bond hydrolyzed by cardiolipin-specific phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973; **296**: 79-88.
- 11) Kakinuma K, Obata Y. Biosynthesis of archaeobacterial ether lipids. *Cell Science* 1990; **6**: 222-224.
- 12) Yang SF, Freer S, Benson AA. Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 1967; **242**: 477-484.