

氏 名 (本籍) わた なべ たけ し
 渡 邊 剛 志

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 3 2 0 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 9 年 2 月 2 7 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 農 学 研 究 科
 (博 士 課 程) 農 芸 化 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 *Selenomonas ruminantium* の 脂 質 に 関
 する 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

 教 授 高 橋 甫 教 授 古 坂 澄 石

 教 授 足 立 達

緒言

嫌気性細菌の脂質に関する研究は、その取扱いの困難さゆえに非常に少なく、最近になって二、三の嫌気性細菌において、主要なジアシル型リン脂質の生合成経路が解明されたにすぎない。しかしながら、当研究室の神尾らによって明らかにされたように、嫌気性細菌の脂質にはプラスマローゲンリン脂質が存在するなど、嫌気性細菌特有の興味ある問題が存在することが予期される。本論文は、緬羊ルーメンより分離されたグラム陰性偏性嫌気性細菌 Selenomonas ruminantium を用いて嫌気性細菌の脂質特有な問題の一端を解明しようと試みたものである。

S. ruminantium はグルコース培地での正常な生育に、炭素数3~10の直鎖飽和の低級脂肪酸を要求し、これらの低級脂肪酸はすみやかに長鎖脂肪酸となって本菌の脂質に取込まれる。この性質のために本菌は脂質の研究に好適である。この性質を利用して本論文に

において、1)本菌における偶数炭素脂肪酸の重要性、2)プラスマローゲンを中心とするリン脂質の代謝、3)グルコサミン、リン酸を主体とし、脂肪酸を含む両親媒性物質について検討した。

第一部 偶数脂肪酸の重要性

当研究室の神尾らは、バレリアン酸を添加したグルコース培地での *S. ruminantium* の生育が、 α -酸化を阻害することによって阻害されることを見い出した。この時のリン脂質構成脂肪酸の99%が奇数炭素であり、また、この生育阻害は少量のカプロン酸の添加によって回復し、リン脂質構成脂肪酸に偶数脂肪酸が有意に増加する。これらのことから神尾らは、本菌の正常な生育には、リン脂質構成脂肪酸の一部に偶数脂肪酸が存在することが必要であると考えた。

この現象の再現性を検討した結果、 α -酸化の阻害による生育の阻害が、神尾らが先に

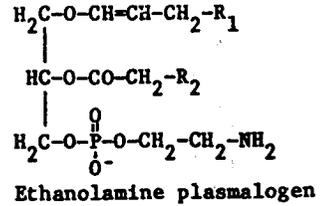
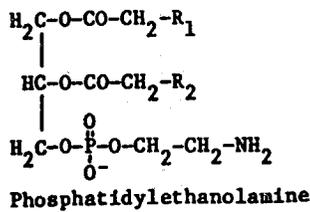
報告したほど明確なものでなかったため、この生育の遅れが本当に異常生育を示すものであるのか、また生育を回復するカプロン酸が本当に脂質の偶数脂肪酸にのみ取込まれるのかを明らかにすることが、偶数脂肪酸の必要性を確実にするために重要であると考えた。

そこで、正常細胞、偶数脂肪酸欠乏細胞、少量のカプロン酸を添加した回復細胞の形態を電顕によって観察した。その結果、正常細胞、回復細胞と異なり、偶数酸欠乏細胞の約半数が異常に長い形態を示し、 α -酸化の阻害が確かに本菌の異常生育をひき起こすことが確認された。

次に、 α -酸化の阻害による生育異常を回復する少量のカプロン酸が、本当に本菌の脂質成分の長鎖偶数脂肪酸にのみ取込まれるのか、そしてもしそうであるならば、偶数脂肪酸が特に必要とされる脂質成分に蓄積することが、期待されると考え、バレリアン酸と、 α -酸化の阻害剤であるイミダゾールを含む

培地に少量の ^{14}C -カプロン酸を添加し、細胞内脂質成分への ^{14}C -放射能の取込みを分析した。その結果、 ^{14}C -放射能は他の脂質区分にも取込まれるが、主としてリン脂質に取込まれた。

その中でも、特にプラスマローゲンリン脂質が、高い比



放射能を示した (Table 1)。このことから、偶数脂肪酸はプラスマローゲンリン

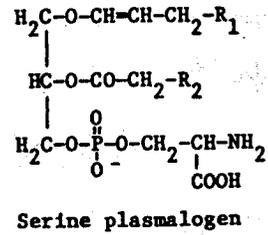
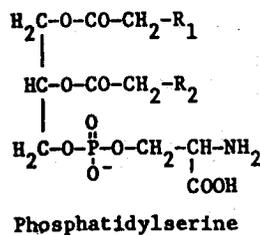


Fig. 1 Principal phospholipids found in *S. ruminantium*.

脂質に特に重要であると推定した。また、各

Table 1. Distribution of radioactivity in phospholipids.

Phospholipid	Radioactivity of ^{32}P ($\times 10^3$ cpm)	Radioactivity of ^{14}C ($\times 10^3$ cpm)	$^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$ ratio
PEP	20.2	313	15.5
PED+PEG	19.6	98	5.0
PSP	2.1	30	14.3
PSD	7.7	25	3.2

Abbreviations: PEP, PE plasmalogen; PED, PE diacyl; PEG, PE glycerylether; PSP, PS plasmalogen; PSD, PS diacyl (this fraction contains PS glycerylether if present).

リン脂質、リピドA、抽出残渣の脂肪酸分析の結果、 ^{14}C -放射能は偶数脂肪酸にのみ取込

Table 2. Fatty acid analysis of diacyl phospholipids.

Carbon number of fatty acid	PED+PEG		PSD	
	Chemical composition (%)	Radio- activity (%)	Chemical composition (%)	Radio- activity (%)
Even-numbered				
12:0	trace	trace	0.8	trace
14:0	0.5	4.5	0.9	8.9
16:0	1.1	83.3 ^a	0.3	80.8 ^a
16:1	9.5		8.3	
18:1	3.0	11.7	ND	ND
Odd-numbered				
11:0	trace	ND	ND	ND
13:0	0.5	ND	4.8	ND
15:0	15.9	ND	21.5	ND
15:1	19.9	ND	26.2	ND
17:0	4.7	ND	0.9	ND
17:1	41.9	ND	33.0	ND
19:1	1.7	ND	ND	ND
Unidentified	ND	ND	2.7	8.9

ND: Not detected.

^a Since there was a dead space between the thermal conductivity detector and the gas flow proportional counter, mainly due to the oxidation furnace, some adjacent peaks could not be separated clearly in the radioassays. Due to this difficulty, the combined radioactivity is shown.

まれることが確認された。(Table 2)
次に、偶数脂肪酸欠乏状態で取込まれた¹⁴C-カプロン酸の放射能の取込みをさらに詳細に検討した。まず、内膜、外膜への取込みを分析し、さらに内膜脂質二重層の内層、外層への取込みを分析した。¹⁴C-放射能の絶対量は、内膜が圧倒的に多く、内膜の内層、外層ではむしろ内層に多く取込まれた。リン脂質の比放射能は、内膜と外膜との間に顕著な差は認められなかった。内膜内層、外層のエタノールアミンプラスマローゲンの比放射能を比

較すると、内層の方が少し高い値を示した。さらに、内膜のデオキシコロール酸による段階的抽出、また、超音波で徹底的に破壊した膜の密度差に基づく分画を試みたが、各画分のリン脂質に有意な比放射能の差は認められなかった。

Table 3. Trinitrophenylation of labeled inner membrane.

Temp.	Phospholipid	^{32}P (cpm)	^{14}C (cpm)	$^{14}\text{C}/^{32}\text{P}$	D/P
37°	PEP	139	2457	17.7	4.6
	PED	644	3951	6.1	
	TNP-PEP	1516	25708	17.0	3.9
	TNP-PED	5931	23992	4.1	
3°	PEP	790	11657	14.8	3.7
	PED	2910	16825	5.8	
	TNP-PEP	810	17210	21.2	3.6
	TNP-PED	2888	16007	5.5	

TNP- : Trinitrophenyl-
D/P : Diacyl type / plasmalogen

以上の結果から、偶数脂肪酸はプラスマローゲンに多く存在することが必要であり、細胞膜系にかなり一様に分布して本菌の正常な生育に寄与しているものと推定した。

第二部 リン脂質の代謝

第一部において、プラスマローゲンの重要性が推定されたが、元来、嫌気性細菌のリン脂質に関する研究は少なく、特にプラスマ

ローゲンは、その機能はもちろん、生合成経路も 1960 年代から解明の努力がなされているにもかかわらず、全く予想もつかないという現状である。そこで第二部では、プラスマローゲンを中心にリン脂質の代謝を検討した。

まず、ジアシル型リン脂質であるホスファチジルセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE) の生合成経路を無細胞反応系で検討した。その結果、セリンと CDP-ジグリセリドから PS が、PS から PE が合成された。従って、本菌のジアシル型リン脂質は、大腸菌の PE 合成経路と同様な反応で合成されることが明らかとなった。次に、PS から PE へのデカルボキシレーションを阻害することが知られているヒドロキシルアミンの影響を調べたところ、PS とセリンプラスマローゲンが蓄積し、PE とエタノールアミンプラスマローゲンの合成が阻害された。このことから、エタノールアミンプラスマローゲンは、 $PS \rightarrow PE$ と同様の反応によって、

セリンプラスマローゲンから合成されると推定される。

次に、 ^{32}P -リン酸、 ^{14}C -カプロン酸を用いて、各リン脂質の代謝回転を調べたところ、エタノールアミンプラスマローゲンが安定であるのに対し、PEの急速な代謝回転が観察された。このPEの代謝的不安定さは特筆すべきことである。 ^{14}C -カプロン酸を用いた代謝回転の実験では、意外なことに、エタノール

アミンプラスマローゲンの ^{14}C -放射能がチエースとともに増加した。この現象は、プラスマローゲン合成の特殊性を予測させるものである。そこで、 ^{32}P -リン酸、

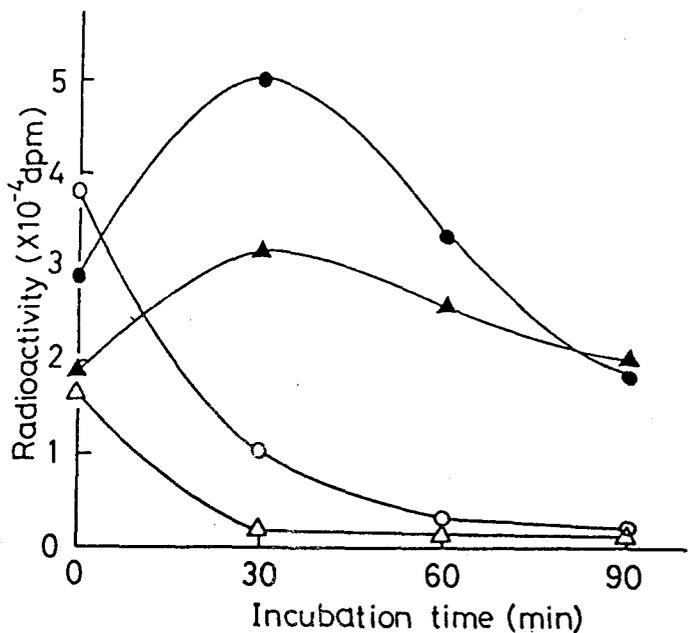


Fig. 2 Chase profile of pulse labeled cells with (^{32}P)-orthophosphate.

▲; Ethanolamine plasmalogen, ●; PE
△; Serine plasmalogen, ○; PS

^{14}C -カプロン酸、 ^3H -グリセロールを用いて、パルスラベル-チェースの実験を行った。 ^{32}P -リン酸を用いた場合、ジアシル型リン脂質とプラスマローゲンは非常によく似たパターンを示したが、

(Fig. 2), ^{14}C -カプロン酸、 ^3H -グリセロールを用いた場合、チェース開始時にはプラスマローゲンには有意な放射能は検出されず、チェースとともにゆる

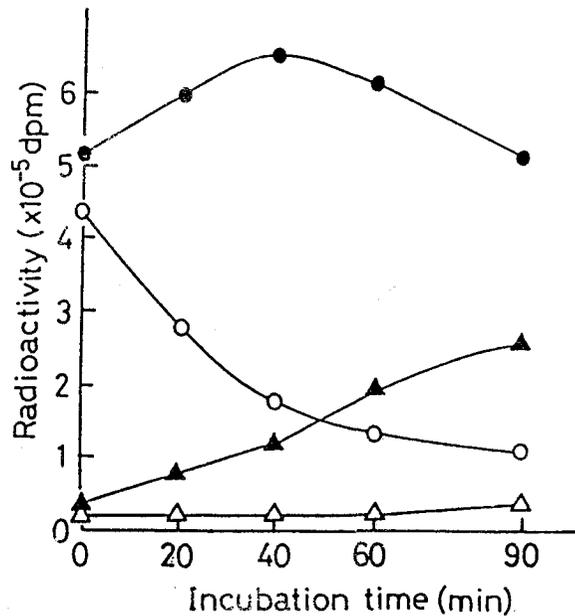


Fig. 3 Chase profile of pulse labeled cells with (1- ^{14}C)-caproate. Symbols were the same as in Fig. 2.

くりと増加した (Fig. 3)。これは、プラスマローゲンの 1-O-alk-1'-enyl-2-acyl-glycerol 部分が、大きな前駆体プールに由来することを示している。この仮説は、セルレニンを用いた実験により、確認された。

このことによつて、嫌気性細菌のプラスマ
ローゲン合成経路が高等動物で知られている
経路と非常に異なることが明らかとなった。
また、PEの急速な代謝回転がおこること、
エタノールアミンプラスマローゲン側鎖の
 ^{14}C -放射能の増加にともない、PE側鎖の
 ^{14}C -放射能の減少がおこること、またジアシ
ル型リン脂質以外に可能な前駆体プールが存
在しないことより、前駆体プールがジアシル
型リン脂質のジグリセリド部分であることが
強く示唆された。

現在のところ、ジアシル型リン脂質のジグ
リセリド \longrightarrow プラスマローゲンの 1-O-alk-
1'-enyl-2-acyl-glycerol という経路の証明に
は成功していないが、本研究で得られた情報
は、嫌気性細菌のプラスマローゲン合成経路
の解明に重要な寄与をしうるものと考えらる。

第三部 グルコサミン、リン酸を主体とし、
脂肪酸を含む新両親媒性物質。

^{14}C -カプロン酸あるいはバシリアン酸を添加した培地で本菌を培養し、リン脂質、LPSのリポドAを抽出した残渣に、約15%の放射能が抽出されずに残ることが知られている。これまでの実験の過程で、この残渣の中に、LPS、リン脂質、リポ蛋白と異なる新たな脂肪酸含有成分を見出したので、その性質について検討した。

^{14}C -カプロン酸を添加した培地で本菌を培養後、リン脂質、LPSを抽出した残渣をSDS-PAGEで分析すると、見かけの分子量2万前後のブロードなバンドが検出された。これはリン脂質、LPSと明らかに異なる位置であった。これをM物質と名付けた。

^3H -グリセロールの取込みを分析したところ、 ^3H -放射能はM物質には全く取込まれなかった。また、プロナーゼ処理によって全く影響を受けなかった。従ってM物質はリポ蛋白ではないと結論した。M物質の局在性を検討したところ、主として内膜に存在するこ

とが明らかとなった。

次に、M物質の精製を試みた。精製のスキームを Fig. 4 に示した。精製標品は 500 l 培養の菌体から約 200 mg 得られた。精製 M 物質は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー、硫酸発色で純度約 95% と推定された。ヘキソサミン、リン酸、脂肪酸が検出され、その量比を Table 4 に示した。

4N·HCl, 100°C,

10時間の加水分解物をセルロース薄層クロマトグラフィーで分析したところ、ニヒドリン発色陽性のスポットが4つ検出され、硝酸銀発色陽性

Fig. 4. Purification procedure

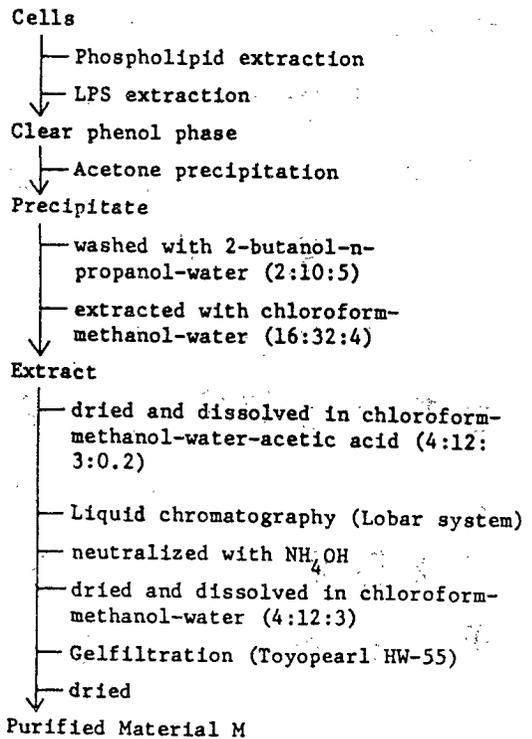


Table 4. Chemical composition of Material M.

Constituent	μmole	μg	%
Hexosamine	4.14	893	43
Phosphate	2.21	359	17
Fatty acid	0.45	115	6
Neutral sugar	0.21	38	2
KDO	n.d.	—	—
Uronic acid	n.d.	—	—

2.09 mg of Material M was used in this assay. n.d.: not detected

のスポットが1つだけ検出された。ニンヒドリンによる最も主要なスポットが硝酸銀によるスポットと一致した。このスポットを水で溶出し、ニンヒドリンによる酸化後、セルロース薄層クロマトグラフィで分析したところアラビノースが検出された。従って、M物質に存在するヘキソサミンはグルコサミンと同定された。インドール・塩酸法によるグルコサミン定量の結果、遊離のアミノ基をもつグルコサミンは、全グルコサミンの約7分の1と推定された。他のグルコサミンは、アセチル化あるいはアシル化されていると考えられる。

次に、脂肪酸成分について検討した。M物質の全脂肪酸組成を分析し、LPS、リン脂質と比較したところ、LPSと全く異なり、むしろリン脂質に近い脂肪酸組成を示した。(Table 5) N-アシル脂肪酸とO-アシル脂肪酸を分別して分析したところ、バレリアン酸供与菌の場合、O-アシル脂肪酸は15:0, 15:1, 17:1

を主体とするのに対し、N-アシル脂肪酸は、19:0を主体とする全く異なった組成を示した。次に、M物

Table 5. Fatty acid analysis of phosphatidylethanolamine, lipopolysaccharide and material M.

Carbon number of fatty acid	Material M (%)	Phosphatidylethanolamine (%)	Lipopolysaccharide (%)
10:0			1.1
11:0	6.5		7.8
12:0	13.0	trace	16.4
13:0	4.9	4.7	4.3
13:1	9.9	trace	4.8
14:0	4.8	10.4	9.1
14:1	2.6		7.0
15:0	2.9	14.0	
15:1	7.7	16.0	
16:0	3.1	7.4	
16:1	30.6	32.5	
17:0	5.5	10.0	
17:1		2.0	
18:0			
18:1	8.6	3.1	
B-OH 13:0			19.8
B-OH 14:0			29.7

質をC-13 NMRで分析したところ、58個のシグナルが観察され、炭素数は少なくとも58個以上、グルコサミンの数は、少なくとも8個以上であると推定された。

バクテリアの、グルコサミンを含む両親媒性物質としては、LPS、Enterobacterial

common antigenが知られているが、以上の結果より、M物質はこれらと異なる新両親媒性物質であると結論した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は緬羊ルーメンより分離されたグラム陰性偏性嫌気性細菌 *Selenomonas ruminantium* を用い、その脂質に関する問題の一端を解明しようとしたものである。

著者はまず、バレリアン酸を添加したグルコース培地における本菌の生育が、脂肪酸の α -酸化を阻害するイミダゾールの添加により阻害され、この阻害は少量のカプロン酸の添加により回復することを再確認した。正常細胞、偶数脂肪酸欠乏細胞および少量のカプロン酸を添加した回復細胞の形態を電顕により観察し、偶数脂肪酸の欠乏が本菌の異常伸長をひきおこすことを認めた。バレリアン酸とイミダゾールを含む培地に少量の ^{14}C -カプロン酸を添加して本菌を培養し、細胞内脂質への ^{14}C の取込みを分析した。その結果、 ^{14}C は主としてりん脂質に取込まれること、その中でもプラズマローゲンりん脂質が高い比放射能を示すことを認め、偶数炭素側鎖はプラズマローゲンりん脂質の成分として特に重要であると推定した。

次に著者はりん脂質の生合成系の検討を行った。その結果、セリンとCDP-ジグリセリドからホスファチジルセリン (PS) が、PSからホスファチジルエタノールアミン (PE) が合成されることを無細胞系で証明し、この経路は大腸菌の系と同様であることを示した。またエタノールアミンプラズマローゲンは、PSよりPEを生成するのと同様の反応により、セリンプラズマローゲンから生成するものと推定した。更に標識した基質を用いて各りん脂質の代謝回転を調べた。その結果、プラズマローゲンの1-0-alk-1'-enyl-2-acyl-glycerol部分は大きな前駆体プールに由来することが示され、本菌におけるプラズマローゲンの合成経路は高等動物における経路と非常に異なり、ジアシル型りん脂質のジグリセリド部分が前駆体となることを強く示唆する結果を得た。

最後に著者は標識脂肪酸を添加して生育した細胞中に、リピッドA、りん脂質、リポたんぱく質と異なる脂肪酸含有成分を見出し、これをM物質と名付けた。M物質はグルコサミン(8残基以上)、りん酸および脂肪酸を含み、その脂肪酸組成などから、これが新しい両親媒性物質であると結論した。

以上のように本論文はいくつかの新知見を含み、微生物学に貢献する所が大きい。よって三論文審査担当者とも著者は農学博士の学位を授与される十分な資格があると判定した。