

リポポリサッカライドの脂肪酸修飾

1. はじめに

グラム陰性菌表層はリポポリサッカライド (LPS) で覆われている。細菌は生育環境の変化に応答して様々な修飾を LPS の膜アンカー部位であるリピド A に対して行う。この修飾はリピド A のエンドトキシン活性、外膜の透過性、そして細菌の抗菌ペプチドに対する抵抗性を変化させるので細菌の病原性に関わると考えられている。これらの修飾のうち脂肪酸修飾を行う酵素に関する知見を中心に紹介する。

2. リピド A

グラム陰性菌の表層は内膜と外膜、およびその間隙に存在するペリプラズムで構成されている。外膜はグラム陰性菌に特有な構造体であり、膜の外側はポーリンなどのタンパク質以外は LPS で占められている。一方、外膜の内側には LPS は存在せず、タンパク質以外は主にリン脂質が占めている。外膜は細菌にとって有害な物質の侵入阻止を行う役割を担っているが、LPS が外側を占める内外の非対称的構造はこのバリアー機能にとって重要である¹⁾。

LPS は糖脂質の一種であり、その構造は外側から多糖の繰り返し構造である O 抗原、コア多糖、そしてリピド A と呼ばれる膜アンカー部分の脂質部位に分類できる。大腸菌では O 抗原欠損は致死ではないがリピド A 欠損は致死であるので、LPS のうちリピド A 部位は生存に必須である。さらに、リピド A は微量で動物に炎症応答を引き起

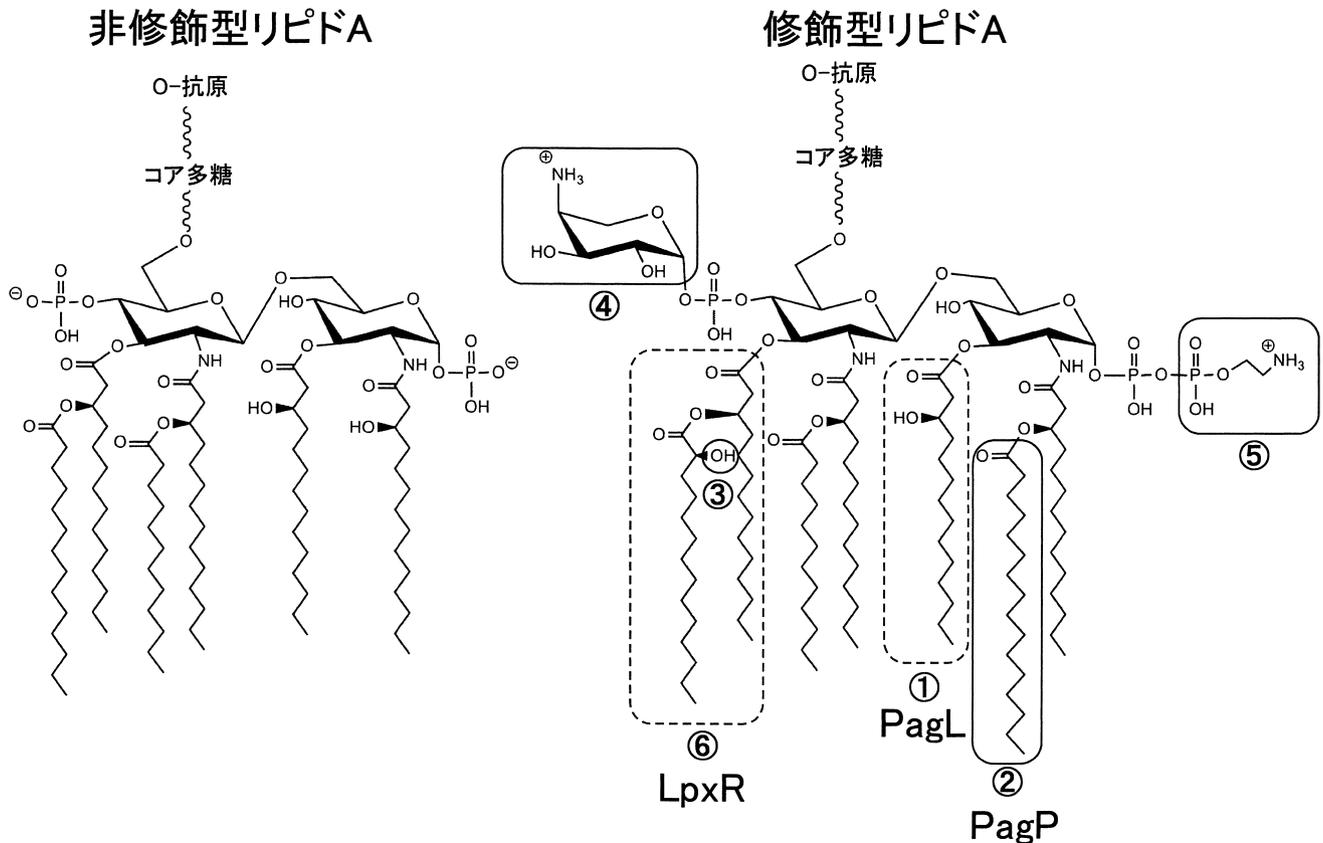


図1 サルモネラのリピド A 修飾

非修飾型リピド A、および様々な修飾をまとめて記した修飾型リピド A を示す。修飾型リピド A 中の番号は本文中に順に解説した番号と一致している。実線で囲んだ部分は付加される修飾基を示し、点線で囲んだ部位はエステル結合部の分解により取り除かれる。このうち脂肪酸修飾を行う酵素 (PagL, PagP, LpxR) を対応する番号の下に示した。

こすエンドトキシンの本体としてよく知られている²⁾。

リピドA 生合成経路はグラム陰性菌独自の代謝系であり、大腸菌では反応経路と触媒する酵素のほぼ全てが明らかにされている²⁾。一方、リピドAの構造は菌種間で若干異なっている。例えば、大腸菌とピロリ菌では異なる。しかし、ピロリ菌ゲノムには大腸菌リピドAの基本骨格を合成するのに必要な酵素は全て保存されている。また、サルモネラは大腸菌と基本構造(図1左)が同一だが、後述する修飾により構造が異なるものが作り出されている。このことから、これら細菌特有のリピドA構造は大腸菌型のリピドAが一旦合成された後に、それぞれの細菌が独自に有する酵素が修飾を行うことによって作り出されると考えられる。ピロリ菌のリピドAはエンドトキシン活性が極めて低いことが知られているが、この低毒性はピロリ菌が宿主免疫監視を逃れて持続的感染を成立させるために必要であると考えられている。このように細菌特有のリピドAが作られることには生物学的意義がある。ところで、生育環境の変化にตอบสนองしてリピドA修飾酵素を発現することによって、リピドAの構造を変える能力を備える細菌が多く知られている。サルモネラは感染環境下でリピドA修飾を行うことが知られており、解析が進んでいる。

3. サルモネラのリピドA修飾

サルモネラのリピドA修飾に深く関わるのが細菌の環境応答システムである二成分制御系の一つ、PhoP-PhoQである。もともとPhoP-PhoQは欠損するとサルモネラのマウスに対する病原性が著しく低下することで注目された。二成分制御系では膜のセンサーキナーゼ(この場合はPhoQ)が刺激により活性化されると転写因子(PhoP)をリン酸化により活性化し、下流遺伝子の転写活性化(あるいは転写抑制)により環境刺激にตอบสนองする。低PH、抗菌ペプチド、低マグネシウムなどの宿主ファゴソーム内を模倣する因子がPhoP-PhoQを活性化するが、LPS修飾にかかわる遺伝子はPhoP-PhoQにより転写活性化を受ける遺伝子群の中で一大グループを形成している^{2,3)}。

PhoP-PhoQ活性化によって調節されるリピドA修飾として、①脱アシル化酵素PagLによる脱アシル化、②PagPによるパルミチル化、③LpxOによる脂肪酸の水酸化があり、以上は修飾酵素遺伝子の発現がPhoPに直接制御されている。PhoP-PhoQはさらに別の二成分制御系PmrA-PmrBを活性化することによりその下流にある④PmrE、PmrFオペロンによるアミノアラビノース修飾、⑤PmrCによるホスホエタノールアミン修飾、に関わる酵素発現を

誘導する。このほかにPhoP-PhoQの関与は弱い、⑥脱アシル化酵素LpxRによる脱アシル化、が知られている。図1右に修飾のまとめを記す。

リピドA修飾にはサルモネラの感染環境下での生存に有利に働く機能が知られている。PagLとPagPによる脂肪酸修飾は宿主LPS受容体であるToll-like receptor 4/MD-2複合体刺激活性を低減するのでサルモネラの宿主認識からの回避に役立つ⁴⁾。その他、アミノアラビノース修飾は細菌表面の電荷を変えることにより抗菌ペプチドに対する細菌の抵抗性を上昇させる。さらに、PhoP-PhoQによるリピドA修飾はその総和として外膜のバリアー機能を強化する働きがある⁵⁾。

ところで、リピドAを含めたLPS生合成の場合は内膜であるが、これら修飾酵素の局在部位は内膜と外膜に分かれる。リピドAの水酸化、アミノアラビノース付加、ホスホエタノールアミン付加を行う酵素は内膜に存在するのに対して、脂肪酸の付加や脂肪酸エステルの加水分解に関わる酵素であるPagP、PagL、LpxRは外膜に存在する。このような局在の違いの意義は不明であるが、一般に外膜に存在する代謝酵素は珍しい。このうち、脱アシル化酵素PagLについては単に発現するだけでは脱アシル化を行わないこと、修飾を行うには外膜の環境が大切であること、などのユニークな性質がある。以下に詳述する。

4. PagLの活性調節機構

サルモネラのリピドA脱アシル化酵素PagLはPhoP-PhoQ活性化により発現誘導されるが、通常はPagLが外膜に発現してもリピドAの脱アシル化は起こらない。一方、リピドAのアミノアラビノース修飾欠損株では同じ条件下でPagLによる脱アシル化が起こることを私達は見いだしている⁶⁾。野生株とアミノアラビノース修飾欠損株とでは発現誘導されるPagLタンパク質量に違いがない。また、この条件では細菌表層にアミノアラビノース修飾型LPSと非修飾型LPSが混在しているので、この現象は単純な基質特異性の問題ではない。従って、アミノアラビノース修飾型のLPSが存在するとPagLによるリピドA脱アシル化が抑制されると解釈される⁶⁾。この性質を潜伏性と呼んでいる(図2)。

外膜酵素PagLはアミノアラビノース修飾型リピドAが存在すると活性抑制されることから、細胞外に存在するアミノアラビノース修飾をPagLの細胞外領域が認識すると予想された。そこで私達はPagL細胞外領域のアミノ酸残基を一つずつアラニンに置換した変異体を作成して、アミ

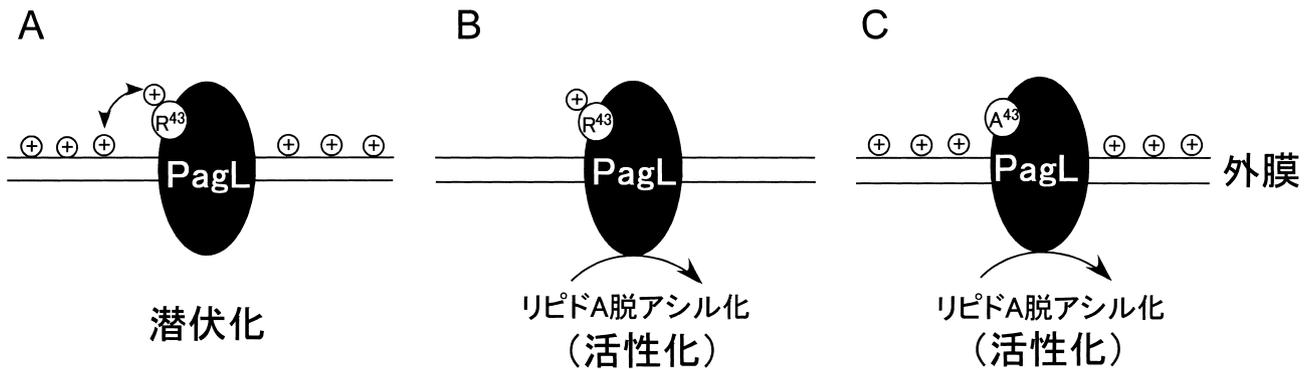


図2 PagLの潜伏性

(A) 外膜にアミノアラビノース修飾型リポドA (アミノアラビノースの陽電荷 \oplus を膜上に示す) が存在する場合 PagL は活性を示さず潜伏化する。(B) 一方、アミノアラビノース修飾型リポドA が存在しないときは PagL の潜伏性は失われて活性化する。(C) PagL は Arg43 を Ala に置換すると潜伏性を失い、アミノアラビノース修飾型リポドA (陽電荷 \oplus を示す) が存在しても活性を示す。図示しないが、Arg¹³⁵ を Ala に置換しても潜伏性を失う。(A) に示すようにアミノアラビノースの陽電荷 \oplus と PagL の Arg 残基の陽電荷 \oplus との電気的な反発 (矢印) が潜伏化に関わる可能性がある。

ノアラビノース型修飾型 LPS が存在していても脱アシル化を行う PagL 変異体が得られるか検討した。ほとんどの PagL 変異体は、野生型 PagL と同様に、アミノアラビノース修飾存在下では活性を示さなかったが、一部の変異体は脱アシル化を行った。特に 43 番目のアルギニンを置換した PagL^{R43A} と 135 番目のアルギニンを置換した PagL^{R135A} はよく脱アシル化を行った⁷⁾。この部位のアミノ酸置換は PagL の脱アシル化活性そのものを増強するわけではないので、リポドA 部位のアミノアラビノース修飾そのもの、あるいはアミノアラビノース修飾に起因する何らかの変化が変異により認識できなくなったと考えられた。PagL には活性抑制に関わる部位が活性中心とは別に存在すると考えられる。アミノアラビノース修飾は細菌表面に陽電荷を付与する働きがあるが、PagL 中の Arg⁴³ および Arg¹³⁵ の陽電荷との電気的な反発が潜伏化に関わっている可能性が考えられる (図 2)。

サルモネラ PagL は外膜上の脂質やタンパク質との相互作用の結果、活性が抑制されているのに対して、変異体ではその相互作用に変化が生じて活性の抑制がされなくなっている可能性が考えられた。そこで私達は変異を導入することにより PagL との相互作用に変化が生じる物質が存在するか免疫沈降法により調べた。潜伏性のある PagL と LPS は共沈するのに対して、潜伏性を失った PagL 変異体と LPS は共沈しなかった。一方、PagL の潜伏性の有無により共沈殿するタンパク質の種類に違いがあるかを調べたが、特に違いのあるものは見当たらなかった。この結果から、LPS との相互作用が PagL の潜伏性に関わることが示

唆された⁸⁾。

5. PagL 活性調節の意義

低マグネシウム培地では PhoP-PhoQ 活性化によりサルモネラのリポドA は様々な修飾を受ける。その際に PagL も発現誘導されるが潜伏化しているために脱アシル化は起こらない。私達はこの潜伏性の生理的意義について検討した。繰り返しになるが、グラム陰性菌の外膜は外側が LPS で占められており、リポドA が密に敷き詰められていることが膜のバリアー機能に重要な役割を果たしている¹⁾。そして、PhoP-PhoQ 活性化によるリポドA 修飾は、脂溶性薬剤の膜透過性を低下させるなど、膜バリアー機能を強化することが知られていた⁵⁾。そこで、潜伏性のある野生型 PagL を発現する株と潜伏性を失った変異型 PagL^{R43A} を発現する株を使って膜バリアー機能に対する潜伏性の意義を解析した。測定にはエチジウムブロマイドを利用した。エチジウムブロマイドは細胞内に入ると核酸と結合して蛍光を発するが、外膜の透過が細胞内浸透の律速段階であるので、外膜透過性の測定によく利用されている。PhoP-PhoQ 活性化によるリポドA 修飾によってエチジウムブロマイドの膜透過性は低下する⁵⁾。PhoP-PhoQ を活性化する低マグネシウム培地で、潜伏化する野生型 PagL を発現する株と潜伏性を失った変異型 PagL^{R43A} を発現する株を培養してその膜透過性を比較すると、変異型 PagL^{R43A} を発現する株は透過性が高いことから、外膜のバリアー機能が低いことがわかった⁹⁾。従って、PhoP-PhoQ 活性化時に発現誘導される PagL が潜伏化して活性発現しないことは膜の透

過性を上昇させない点でサルモネラの膜バリアー機能の強化に役立っていると考えられる。

一方、前述したようにサルモネラ PagL はアミノアラビノース修飾型リピド A 存在下では活性が抑制されて潜伏化するが、非存在化では活性発現してリピド A の脱アシル化が起こる⁶⁾。これは一種の修飾のバランス調節であると考えられる。このバランスの調節の意義の解析を行った。

リピド A のアミノアラビノース修飾は細菌の抗菌ペプチド抵抗性を上昇させる。アミノアラビノース修飾欠損下では別の修飾により抗菌ペプチド抵抗性を上昇させることが菌の生存にとって望ましく、その結果として脱アシル化が起こっている可能性を検討した。アミノアラビノース修飾欠損株にさらに PagL 欠損を導入した二重欠損株とアミノアラビノース修飾欠損株、および親株である野生株のポリミキシンに対する抵抗性を比較した。ポリミキシンは細菌由来の抗菌ペプチドであるが、抗菌ペプチド抵抗性の測定によく用いられている。PhoP-PhoQ を活性化して様々なリピド A 修飾を誘導した条件下では、野生株が最もポリミキシン抵抗性が高く、次いでアミノアラビノース欠損株、そして二重欠損株は最も抵抗性が低かった¹⁰⁾。従って、リピド A のアミノアラビノース修飾が起こらないときに PagL の潜伏性が失われて活性発現するようになることは、アミノアラビノース修飾の機能（抗菌ペプチド抵抗性の上昇）を相補する役割があると考えられる。

6. おわりに

PagL と同様に外膜に存在するリピド A パルミチル化酵素 PagP でも類似の潜伏性が指摘されている。すなわち、大腸菌の PagP は通常発現してもパルミチル化を行わない。しかし、外膜に結合するマグネシウムを EDTA でキレートし除去すると、活性発現してパルミチル化がみられるようになる¹¹⁾。同じく外膜酵素である LpxR もタンパク質の発現と活性の発現が一致せず、潜伏性があると思われる¹²⁾。PagP や LpxR の活性抑制にかかわる分子の同定やその潜伏性の生理的な役割については解析がなされていないが、このような外膜酵素の潜伏性という問題は細菌感染を考える上で重要な課題であると認識されている¹³⁾。感染などにより誘導されるリピド A 修飾のバランスがどのようにとられているのかは未解明の問題であるが、修飾酵素の発現誘導に加えて、このような潜伏性を含めた酵素の性質が関わると考えられる。細菌の病原性とこのような修飾の調節機構のかかわりを明らかにすることは今後の課題であ

ると思う。

- 1) Nikaido, H. (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 593–656.
- 2) Raetz, C.R., Reynolds, C.M., Trent, M.S., & Bishop, R.E. (2007) *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 295–329.
- 3) Miller, S.I., Ernst, R.K., & Bader, M.W. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 36–46.
- 4) Kawasaki, K., Ernst, R.K., & Miller, S.I. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 20044–20048.
- 5) Murata, T., Tseng, W., Guina, T., Miller, S.I., & Nikaido, H. (2007) *J. Bacteriol.*, **189**, 7213–7222.
- 6) Kawasaki, K., Ernst, R.K., & Miller, S.I. (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 2448–2457.
- 7) Manabe, T. & Kawasaki, K. (2008) *J. Bacteriol.*, **190**, 5597–5606.
- 8) Manabe, T., Kawano, M., & Kawasaki, K. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **396**, 812–816.
- 9) Kawasaki, K. & Manabe, T. (2010) *J. Bacteriol.*, **192**, 5837–5840.
- 10) Kawasaki, K., China, K., & Nishijima, M. (2007) *J. Bacteriol.*, **189**, 4911–4919.
- 11) Jia, W., El Zoeiby, A., Petruzzello, T.N., Jayabalasingham, B., Seyedirashti, S., & Bishop, R.E. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 44966–44975.
- 12) Kawano, M., Manabe, T., & Kawasaki, K. (2010) *FEBS Lett.*, **584**, 207–212.
- 13) Bishop, R.E. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1881–1896.

川崎 清史

(同志社女子大学薬学部)

Modifications of fatty acids in lipopolysaccharide
Kiyoshi Kawasaki (Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Doshisha Women's College, Kodo, Kyotanabe 610-0395, Japan)

グリア細胞により指揮・実行される脳神経ネットワークのリモデリング

はじめに

個体制御に適した機能的な神経ネットワークをつくり上げ、これを維持するためには、局所的なネットワークのリモデリングが必要である。しかしながら、その制御メカニズムについてはほとんどわかっていない。幼虫と成虫で全く異なる形態、行動、生活様式を持つ完全変態昆虫では、幼虫脳神経系を構成する神経ネットワークは変態期においてダイナミックに再編成され、成虫専用の神経ネットワー