

## Staphylococcus aureus におけるカルジオリピン合成酵素のストレス応答メカニズム

小林 彰 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 斎藤 慎二 (筑波大学 医学医療系)

### 背景・目的

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトの鼻腔内や表皮に常在する日和見感染菌である。本菌のストレス適応において細胞膜成分の変化は重要な役割を果たしており、そのうちカルジオリピン (CL) は高浸透圧下での長期生存や(1)、酸ストレス耐性に必要な主要リン脂質成分の一つである(2)。

黄色ブドウ球菌が持つ2種類のカルジオリピン合成酵素 (Cls) のうち、Cls2 は通常機能するハウスキーピングタイプとして働き、Cls1 は酸や浸透圧といったストレスに応答して CL を合成する。興味深いことに Cls1 によるストレス応答性 CL 合成は転写・翻訳を介さない迅速な応答であることが見出されたが(2)、具体的な応答メカニズムは未解明である。

Cls1 は細胞膜に局在することが予想されており、また高浸透圧に応答することから、Cls1 のストレス応答性に細胞膜機能、例えば細胞膜を隔てた浸透圧差や各種イオン勾配が関わっている可能性があると考えた。そこで本研究では抗菌ペプチド、イオノフォア、脱共役剤等が Cls1 による酸応答性 CL 合成および浸透圧応答性 CL 合成に与える効果を調べることで、未知のストレス応答性メカニズムに関する手がかりを得ることを目的とした。

### 材料・方法

**細菌株** *S. aureus* N315 (野生株)、*cls1* 欠損株 ( $\Delta cls1$ )、*cls2* 欠損株 ( $\Delta cls2$ )、*cls1/cls2* 欠損株 ( $\Delta cls1/2$ )

**培養条件とストレス処理** 細菌株を Luria Bertani (LB) 培地にて 37°C、180rpm で一晚 (12~16 時間) 振とう培養した。nisin、gramicidin は MIC (minimum inhibitory concentration) の 10 倍量、carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) は 25 倍量を培地に添加し、37°C、180rpm で 15 分間振とうした。nisin は細胞膜に細孔を開けてイオンの透過性を増大させる抗菌ペプチド、gramicidin は一価のカチオンを通すチャネルを形成するイオノフォアである。脱共役剤である CCCP はプロトン勾配を解消して ATP 合成の低下を招く。

処理後の細胞を回収して PBS で洗浄した。一部は蛍光色素 propidium iodide (PI) で染色して蛍光顕微鏡観察を行った。

PBS で洗浄した細胞を、クエン酸-リン酸緩衝液 (pH2.6) 及び高浸透圧溶液 (4 M NaCl) に懸濁し、37°C、180rpm で 15 分間振とうした。

**薄層クロマトグラフィー (TLC)** 細胞を回収して PBS で洗浄し、文献(1)の方法に従って脂質の抽出と TLC 解析を行った。硫酸銅 (100 mg/mL)・8%リン酸をスプレーし、180°Cで加熱してリン脂質を検出した。

### 結果・考察

**各処理による PI 透過性に対する影響** nisin、gramicidin、CCCP いずれの物質も MIC の 10 倍または 25 倍量加えると、50%以上の細胞が PI 染色陽性となった。PI は生細胞膜は透過せず損傷した細胞膜を透過して DNA に結合する蛍光色素である。

上記の量の各物質を作用させることで黄色ブドウ球菌の細胞膜が損傷したと考えられ、処理濃度は十分であると判断した。ただし、本菌の PI 染色陽性が具体的に膜のどのような異常を反映しているか(物理的損傷によらず膜ポテンシャルの消失のみでも陽性となるかなど) は不明である。

**酸ストレス下における CL 合成** 各物質による処理後、酸ストレス処理による CL の蓄積量の変化を調べた (図 1)。nisin、gramicidin または CCCP 処理のみによる CL 蓄積量への顕著な影響はいずれの株でも見られなかった。 $\Delta cls2$  では nisin または CCCP 処理の有無に関わらず、酸ストレスに応答して CL 蓄積量が増加した。すなわち、Cls1 の酸応答性は nisin または CCCP 処理によって阻害されないことが明らかとなった。ただし、本実験ではストレス処理時にはすでに nisin 等を除去しているため膜修復の影響を検討する余地が残る。gramicidin 処理では CL 増加量が抑制される傾向が見られたが、これについては今後詳細に検討する必要がある。

浸透圧ストレスに対する Cls1 の応答性については現在検討中である。今後は Cls1 の酸および浸透圧ストレス応答メカニズムを明らかにするために、Cls1 のストレス感知部位や至適 pH などの検討も必要である。

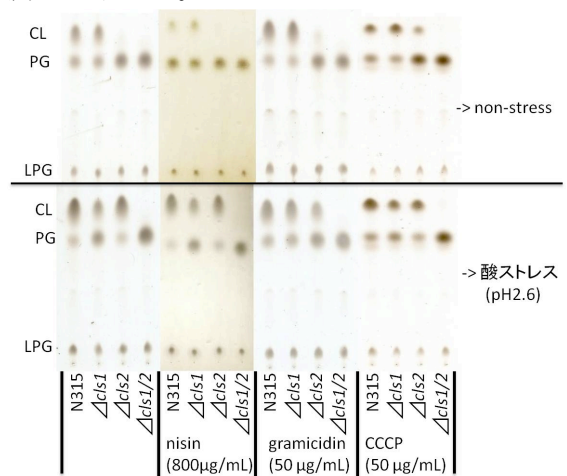


図 1 : 抗生物質存在下におけるリン脂質成分 (TLC)  
CL : カルジオリピン、PG : ホスファチジルグリセロール、LPG : リシルホスファチジルグリセロール 展開液=クロロホルム:メタノール:酢酸 (65:25:10 v/v/v)

### 参考文献

- (1) Tsai M, Ohniwa RL, Kato Y, Takeshita SL, Ohta T, Saito S, Hayashi H, Morikawa K. *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. BMC Microbiol. 11, 13, 2011.
- (2) Ohniwa RL, Kitabayashi K, Morikawa K. Alternative cardiolipin synthase Cls1 compensates for stalled Cls2 function in *Staphylococcus aureus* under conditions of acute acid stress. FEMS Microbiol Lett. 338, 141-146, 2012.