

Acholeplasma laidlawii 細胞膜に存在する diglucosyl diacylglyceride の培養細胞への接着

久留米大学医学部細菌学講座

小野左緒里

(平成9年3月12日受付)

(平成9年4月16日受理)

Key words: *Acholeplasma laidlawii*, diglucosyl diacylglyceride, clathrin, adherence

要 旨

Acholeplasma laidlawii の細胞膜から T 細胞樹立株である MOLT-4, Hut-78, Jurkat, MT-4細胞に対する結合活性物質を分離精製した。*A. laidlawii* の細胞膜から Bligh-Dyer 法, シリカゲルカラム, 薄層クロマトグラフィーを用い活性物質を分離精製し, nuclear magnetic resonance (NMR: ^1H , ^{13}C) でその化学構造を決定した。本物質は diglucosyl diacylglyceride と同定された。さらに acyl 基を明らかにするため C_{14} , C_{16} を結合させた合成 DGDG を作製した。合成 DGDG は *A. laidlawii* から分離した DGDG と同様にその活性が認められた。DGDG の細胞に対する結合は clathrin 存在下で阻止されることから DGDG の細胞への結合部位は細胞膜の clathrin であることが明らかになった。今後は DGDG のウイルス感染やリポ蛋白の細胞内移行時での生物学的意義を追求していきたい。

序 文

細菌やマイコプラズマが宿主臓器に定着し増殖し, 感染を惹起するためには, 微生物の細胞壁や, 細胞膜に接着因子が存在し, 微生物の宿主細胞表面への接着の過程が重要である。

ところで, diglucosyl diacylglyceride (DGDG) や monoglucosyl diacylglyceride (MGDG) は, 細菌やマイコプラズマの細胞膜に存在し, 細胞膜の流動性を規制する因子として知られている^{1)~4)}。特に細菌の感染に対する抗生物質の投与により, 細胞膜に存在する本物質が細菌の細胞膜の構成成分として大きな割合を占めるようになると考えられる。しかしながら, DGDG や MGDG の宿主細胞に対する作用については全く不明である。

著者は DGDG や MGDG と宿主細胞との関連

性を研究することを企画し, 種々の実験事実を明らかにしてきた。本稿では, DGDG が動物細胞と親和性を有し, 動物細胞に接着することを見出したので報告する。

材料と方法

1. 細胞: ヒト T 細胞樹立株である MOLT-4, MT-4, Jurkat, Hut-78細胞を用いた。

細胞培養培地として RPMI1640 (GIBCO) に 60°C , 30分加熱処理牛胎児血清 (三菱) を 10% に添加したものをを用いた。マイコプラズマによる培養細胞の汚染を避けるため, 細胞浮遊液を 7 日毎にマイコプラズマ寒天培地に接種し, マイコプラズマの汚染の有無を調べると共に, 隔週毎にニューキノロン系薬剤を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し 3 日間培養し, マイコプラズマの汚染を防止した。

2. DGDG の細胞結合活性の測定: 天然および合成 DGDG はクロロホルムに溶解し, 直径 11mm の円形カバーガラス上に本物質の被膜を形成させた。このカバーガラスを 24 穴プレート (Beckton

別刷請求先: (〒830) 久留米市旭町 67

久留米大学医学部細菌学講座

小野左緒里

Dickenson 社製) に入れ, これに細胞浮遊液を添加し37°C, CO₂孵卵器で培養した。

カバーガラス面への付着細胞数は次の方法で算出した。各ウェル中のカバーガラスをピンセットで取り出し, リン酸緩衝液中で2回静かにゆすぎ, 非付着細胞を除去後, カバーガラス上の付着細胞をポリスマンで剥がし, ヘモサイトメーターでその細胞数を算出した。

3. *Acholeplasma laidlawii* PG8からの細胞結合因子の分離精製: 0.1%牛胎児血清加マイコプラズマ液体培地 (Difco) 100l 中で *A. laidlawii* を37°Cで7日間培養し, 26,000g (KUBOTA KR-2000C: ローター, RC-1A), 60分の遠心で菌体を集め, 最終的に0.8gの乾燥菌体を得た。

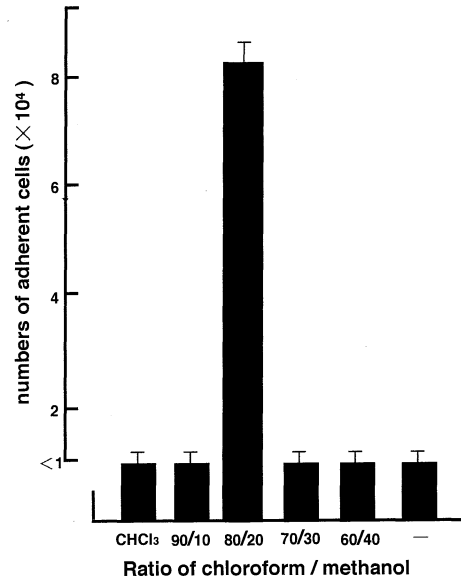
本菌体の0.5gからBligh-Dyer法で糖脂質を抽出した。さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離を進めた。直径15mmのシリカゲルカラムを作製し(シリカゲル60; Merck, Germany, 流速2ml/分), クロロホルム画分を吸着させ, 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40と, 比率を変えたクロロホルム/メタノール混合液で溶出した。更に活性の認められた画分について再度, シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒: クロロホルム/メタノール=200/8, 200/9, 200/10, 200/11, 200/12, 200/13)で分画を行い, 得られた活性画分を薄層クロマトグラフィーにて分離精製した。カラムの画分の活性分画を分取用薄層クロマトグラフィーを用い分離を試みた。展開溶媒として, クロロホルム/メタノール/酢酸: 85/15/0.5を用いた。ヨウ素で呈色反応を示した部位をかき取り, クロロホルム/メタノール: 1/1で溶出し, NMRにてその構造を解析した^{5)~7)}。

4. DGDGの合成: *A. laidlawii*の細胞膜から分離されたDGDGのacyl基を変えて, DGDGがBoom等⁸⁾の方法により合成された。合成は東北大学理学部平間正博教授の研究グループにより行われ, その合成品の分与を受けた。今回の実験に用いた合成品はC₁₄, C₁₆のacyl基を有するDGDGである。

成 績

1. *A. laidlawii* 細胞膜成分の分画と MOLT-4

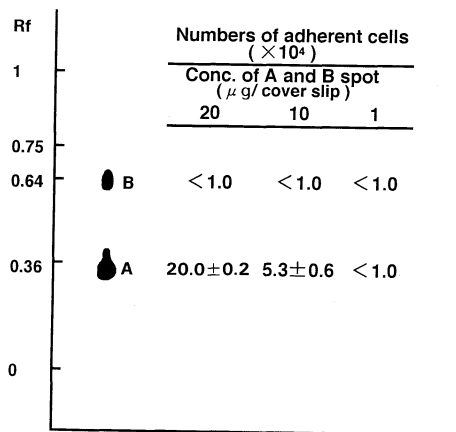
Fig. 1 The binding activity of silica gel column-fractions to MOLT-4 cells. MOLT-4 cells (10×10⁴/well) were cultured in the well of 24 well-plate containing with a round cover slip with each fraction for 48h in CO₂ incubator. Values are the means±standard deviations of five samples.



細胞への吸着: シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび, シリカゲル薄層クロマトグラフィーで分画した各画分の MOLT-4細胞に対する吸着能を検討した。Fig. 1に示す如く, MOLT-4細胞に対する吸着能を有する画分はクロロホルム:メタノール, 80:20で溶出した画分に認められた。さらにこの画分をシリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分画し2つのスポットを得た。Fig. 2に示す如く, 細胞吸着活性はスポット A 画分の10μg存在下で明らかに認められた。これに対し, スポット Bでは20μg存在下でもその吸着能は認められなかった。

2. *A. laidlawii* 細胞膜の MOLT-4吸着活性物質の化学構造の決定: 本物質は東北大学理学部化学第2講座平間正博教授の研究グループで解析され, 3-O-[2'-O-(α-D-glucopyranosyl)-6'-O-acyl-α-D-glucopyranosyl]-1,2-di-O-acyl-sn-glycerolと決定された。さらに, Boom等⁸⁾の方法によりacyl基が明らかな diglucosyl diacylglyceride が合成された。

Fig. 2 The binding activity of fractions separated by silica gel thin layer chromatography. The fraction (chloroform/methanol, 80/20) obtained by column chromatography was applied on thin layer chromatography plate silica gel 60, and separated by chloroform/methanol: acetic acid, 85: 15: 0.5. Spots were scarified and their activities to bind to cells were determined as described in Fig. 1. Values represent the means of five samples from one representative experiment.



3. 合成 DGDG の細胞吸着活性：種々の濃度の DGDG (C_{14}) 存在下での MOLT-4細胞の吸着を検討した。Table 1 に示す如く、ガラス面に吸着する細胞数は DGDG の濃度依存性に増加することが明らかである。Fig. 3 に DGDG (C_{14}) 存在下での培養細胞数と吸着細胞数との経時的变化を示した。60 $\times 10^4$, 30 $\times 10^4$ /well の細胞の接種では、ガラス面に接着する細胞数は培養48時間後に急速に増加することが明らかになった。また比較的高濃度の細胞を接種した条件下では (120 $\times 10^4$ /well) 24時間後から接着細胞数の増加が認められ、48時間以後に急速に接着細胞の増加が認められた。また、DGDG 非存在下のコントロールでは120 $\times 10^4$ の大量の細胞存在下でもガラス面への細胞の接着は認められなかった。

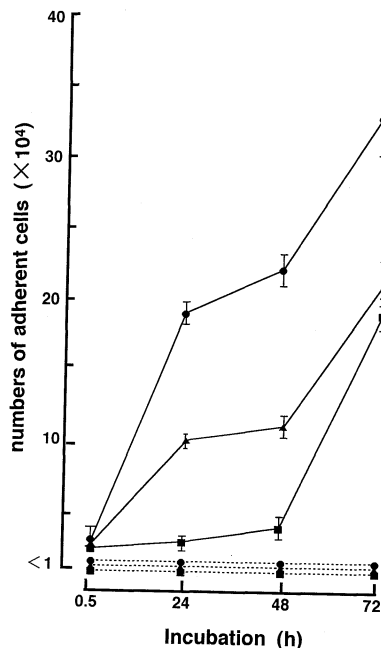
4. DGDG の種々の細胞に対する接着活性：Fig. 4 に T細胞系細胞に対する合成 DGDG (C_{14} , C_{16}) および *A. laidlawii* 細胞膜から精製した DGDG の接着能を示した。DGDG に接着能を有する細胞は MOLT-4, Hut-78細胞であった。し

Table 1 The binding activity of synthesized DGDG (C_{14})

Concentration	No. of adherent cells \pm SD ($\times 10^4$)
20 μg	10.3 ± 0.5
10 μg	8.5 ± 0.2
1 μg	5.2 ± 0.6
0.1 μg	2.8 ± 0.1
—	< 1.0

Values represent the means of five samples from one representative experiment

Fig. 3 Time course of adherent cell numbers of MOLT-4 cells on the cover slip with 10 μg of DGDG (C_{14}). The graded number of cells, 12 $\times 10^5$ /ml (●), 6 $\times 10^5$ /ml (▲), 3 $\times 10^5$ /ml (■), were incubated in the presence (—) or absence (···) of 10 μg of DGDG, at 37°C. Values are the means \pm standard deviations of five samples.

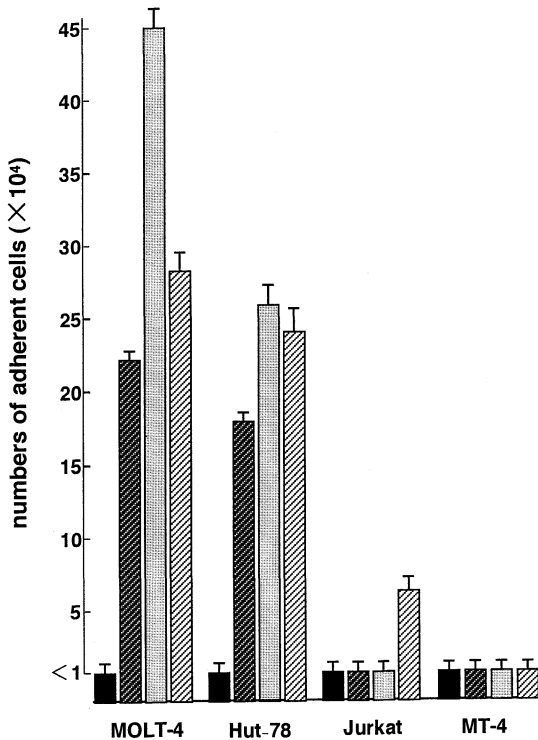


かし、Jurkat, MT-4細胞では、ほとんどその接着は認められなかった。

5. 細胞膜上の clathrin と DGDG の結合：高分子やエンベロープを保有するウイルスの細胞内侵入には細胞膜の内側に存在する clathrin が重要な働きをすることが報告されている。そこで今回の実験では細胞膜の流動性を規制する DGDG

Fig. 4 The binding activities of DGDGs to various cell lines. Each cell line, 20×10^4 of MOLT-4, Hut-78, Jurkat and MT-4 was added to wells of 24well plate containing with a round cover slip with or without $10 \mu\text{g}$ of DGDGs.

Symbols: ■, control; ▨, native DGDG; ▩, synthesized DGDG (C_{14}); ▪, synthesized DGDG (C_{16}). Values are the means \pm standard deviations of five samples.

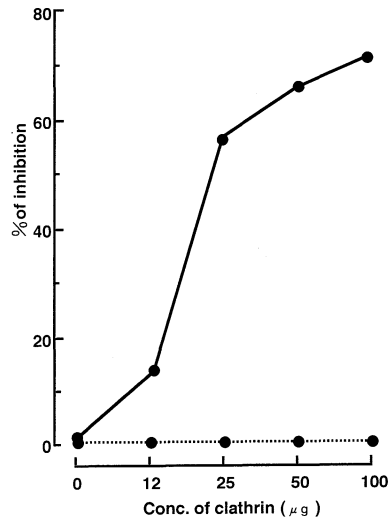


の clathrin への結合性を検討した。Fig. 5 に示す様に DGDG と clathrin (Sigma) をあらかじめ 37°C で培養すると DGDG の細胞との結合性は clathrin の濃度依存性に消失することから、細胞膜に存在する clathrin が DGDG と結合することが強く示唆された。

考 察

glycosyl diglyceride は微生物の細胞膜に広く分布していることが知られている¹⁾。特に mollicutes に属するマイコプラズマやアコレプラズマの細胞膜に存在する glycosyl diglyceride はその細胞壁を保有しないため、物質の生理学的意義についても詳しく調べられている^{10)~13)}。今回我々

Fig. 5 Abilities of clathrin to block binding of MOLT-4 cells to DGDG (C_{14}) on the cover slip. Various concentrations of clathrin were preincubated on the cover slip with $10 \mu\text{g}$ of DGDG for 12h 37°C . After rinsing the cover slip, 60×10^4 of MOLT-4 cells were incubated on the well with the cover slip. After 48h, binding cells were counted. (—) : with DGDG, (---) : without DGDG.



が、*A. laidlawii* から分離した、DGDG は *A. laidlawii* の細胞膜の流動性を規制する物質として、以前より知られていた。一方、glycosyl diglyceride は微生物の細胞膜に広く分布しているにも関わらず¹⁾、細菌感染の場での動物細胞との関わり合いについては全く不明である。特に化学療法により細胞壁を欠落した状態の細菌では細胞膜と宿主細胞との関連性を究明することが重要である。著者は細菌の膜成分とリンパ球との関連性を追求して来たが^{14)~16)}、本研究では DGDG がヒトリンパ球系樹立細胞に結合することを初めて明らかにした。

従来より細菌の細胞壁の構成成分の一つである lipopolysaccharide や teichoic acid はリンパ球を幼若化し、またマクロファージから、種々のサイトカインの産生を誘起するなど、免疫担当細胞に対し、多彩な生物活性を示し、更に動物細胞に対し強い毒性を示すことも知られている。今回著者が研究対象とした DGDG はリンパ球に対し、結

合能を有するにも関わらず、細胞の核酸合成の促進や、マクロファージ系細胞からの腫瘍壊死因子やインターフェロンの産生誘起活性は全く認められなかった(データ未掲載)。このことは本物質が細菌の細胞壁を構成する LPS や teichoic acid と異なる生物活性を有していることを示唆するものである。Christiansson 等¹⁷⁾は *A. laidlawii* の細胞膜の DGDG および、MGDG の構成比は温度により異なることを報告し、細胞膜の flip-flap に関与している因子であることを報告している。本研究では本物質が結合したリンパ球の膜の流動性は検討していないが、DGDG が結合したリンパ球の免疫学的機能や生理学的変化を解明することが今後の課題である。

今回の実験で DGDG は clathrin と結合することを明らかにした。clathrin は、細胞膜の被覆ピットの細胞質側に存在し、糖蛋白⁸⁾や、エンベロープを持つウイルスのエンドサイトーシス⁹⁾に関与する物質である。従って DGDG が clathrin に結合することは糖蛋白の細胞内移行やウイルスの細胞内侵入機構に影響を及ぼしていることが推定される。

著者は今回の実験で 2 種の合成 DGDG を用い、細胞への結合能を測定した。その acyl 基は C₁₆ (パルミチン酸)、C₁₄ (ミリスチン酸) である。2 種の acyl 基の変化で結合能の差異は認められなかった。James 等¹⁹⁾や Ganong 等²⁰⁾は acyl 基の異なる PMA を合成し、その活性の相異を検討しており、acyl 基の炭素鎖の数により生物活性が異なることが報告されている。DGDG の細胞への結合活性は PMA の生物活性とは全く異なるが、今後は更に acyl 基を変えて、結合能の変化を検討することにより本物質と clathrin の結合様式をより明確にしたい。

以上著者は、微生物の細胞膜に存在する DGDG が動物細胞と結合することを明らかにし、その結合部位が clathrin であることから、本物質が動物細胞のウイルス感染やコレステロール代謝に深く関わっていることを示唆した。

謝辞：稿を終えるに際しご懇篤なるご指導、御校閲を賜った久留米大学医学部細菌学講座、荒井澄夫教授に深謝

するとともに、物質の構造解析ならびに、DGDG の化学合成を担当された。東北大学理学部第二化学講座の平間正博教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Shaw N: Bacterial glycolipids and glyco-phospholipids. *Adv Microbiol Physiol* 1975; 12: 141-167.
- 2) Huang Y, Anderson R: Glucosyl diglyceride lipid structures in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 1995; 177: 2567-2571.
- 3) Eriksson P, Rilfors L, Wieslander Å, Lundberg A, Lindblom G: Order and dynamics in mixtures of membrane glucolipids from *Acholeplasma laidlawii* studied by ²H NMR. *Biochemistry* 1991; 30: 4916-4924.
- 4) Dahlqvist A, Nordström S, Karlsson OP, Man-nock DA, McElhaney RN, Wieslander Å: Efficient modulation of glucolipid enzyme activities in membranes of *Acholeplasma laidlawii* by the type of lipids in the bilayer matrix. *Biochemistry* 1995; 34: 13381-13389.
- 5) Müller L: Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence. *J Am Chem Soc* 1979; 101: 4481-4484.
- 6) Bother-by AA, Stephens RL, Lee J, Warren CD, Jeanloz RW: Structure determination of a tetrasaccharide: Transient nuclear overhauser effects in the rotating frame. *J Am Chem Soc* 1984; 106: 811-813.
- 7) Fischer W, Laine RA, Nakano M, Schuster D: The structure of acyl- α -kojibiosyldiacylglycerol from *Streptococcus lactis*. *Chem Phys Lipids* 1978; 21: 103-112.
- 8) Boeckel CAA, Boom JH: Synthesis of streptococci phosphatidyl- α -diglycosyldiglyceride and related glycolipids. Application of the tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl(TIPS) protecting group in sugar chemistry. *Tetrahedron* 1985; 20: 4567-4575.
- 9) Brodsky FM: Living with clathrin: Its role in intracellular membrans traffic. *Science* 1988; 242: 1396-1402.
- 10) Wieslander Å, Nordström S, Dahlqvist A, Rilfors L, Lindblom G: Membrane lipid composition and cell size of *Acholeplasma laidlawii* strain A are strongly influenced by lipid acyl chain length. *Eur J Biochem* 1995; 227: 734-744.
- 11) Christinsson A, Eriksson LEG, Westman J, Demel R, Wieslander A: Involvement of sur-

- face potential in regulation of polar membrane lipids in *Acholeplasma laidlawii*. J Biol Chem 1985; 260: 3984-3990.
- 12) Silvius JR, McElhaney RN: Growth and membrane lipid properties of *Acholeplasma laidlawii* B lacking fatty acid heterogeneity. Nature 1978; 272: 645-647.
 - 13) Lindblom G, Brentel I, Sjolund M, Wikander G, Wieslander G, Wieslander Å: Phase equilibria of membrane lipids from *Acholeplasma laidlawii*: Importance of single lipid forming nonlamellar phases. Biochemistry 1986; 25: 7502-7510.
 - 14) Sugama K, Kuwano K, Furukawa M, Himeno Y, Satoh T, Arai S: Mycoplasmas induce transcription and production of tumor necrosis factor in a monocytic cell line, THP-1, by a protein kinase C-independent pathway. Infect Immun 1990; 58: 3564-3567.
 - 15) Kuwano K, Akashi A, Matsu-ura I, Nishimoto M, Arai S: Induction of macrophage-mediated production of tumor necrosis factor alpha by an L-form derived from *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 1993; 61: 1700-1706.
 - 16) Akashi A, Ono S, Kuwano K, Arai S: Proteins of 30 and 36 kilodaltons, membran constituents of the *Staphylococcus aureus* L form, induce production of tumor necrosis factor alpha and activate the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. Infect Immun 1996; 64: 3267-3272.
 - 17) Christiansson A, Wieslander Å: Membrane lipid metabolism in *Acholeplasma laidlawii* AEF22: Influence of cholesterol and temperature shift-down on incorporation of fatty acids and synthesis of membrane lipid species. Eur J Biochem 1978; 85: 65-75.
 - 18) Lenard J, Rothman JE: Transbilayer distribution and movement of cholesterol and phospholipid in the membrane of influenza virus. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73: 391-395.
 - 19) Ebeling JG, Vandenbark GR, Kuhn LJ, Ganong BR, Bell RM, Nidel JE: Diacylglycerols mimic phorbol diester induction of leukemic cell differentiation. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 815-819.
 - 20) Ganong BR, Loomis CR, Hannun YA, Bell RM: Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 1184-1188.

The Binding Activity of Diglucosyl Diacylglyceride Derived from Membranes of *Acholeplasma laidlawii* PG8 to Lymphoid Cells

Saori ONO

Department of Bacteriology, Kurume University School of Medicine

A chemical component has been purified from *Acholeplasma laidlawii* which binds to tissue culture cells, MOLT-4, Hut-78, but not MT-4 and Jurkat. The glycolipid in the membranes of *A. laidlawii* was extracted by Bligh-Dyer method. Further purification of chloroform phase of Bligh-Dyer method was performed by silicagel column chromatography and thin layer chromatography.

Finally, the active component was assigned to be diglucosyl diacylglyceride by using nuclear magnetic resonance (^1H , ^{13}C). Furthermore, diglucosyl diacylglyceride(s) with C_{14} and C_{16} were synthesized, by the method of Boom.

Both native and synthesized diacylglycerides bind to MOLT-4 and Hut-78 cells. The binding activity of these substances to cells was inhibited by preincubation of diglucosyl diacylglycerides on the cover glass with clathrin.

These results suggest that the binding site of diglucosyl diacylglycerides on cells was clathrin.

It is necessary to clarify the biological activities of diglucosyl diacylglycerides in viral infections and transmission of lipoprotein and the how mechanism of envelopment of the virus into the cell.