

黄色ブドウ球菌の壁欠落にともなう 膜リン脂質組成変動のモデル解析

岡山大学医学部細菌学教室（主任：金政泰弘教授）

狩 山 玲 子

（昭和57年11月25日受稿）

Key words : Differential scanning calorimetry,
Phase transition, *Staphylococcus aureus*,
Phospholipid composition, Cardiolipin

緒 言

細菌細胞膜の主要構成成分である脂質の分子種組成は、環境や細胞構造の変化などにもなつて大きく変動する。例えば細菌の生育状態、培地の塩濃度あるいは細胞壁の欠落の度合などにより、脂質の組成比が適応的に変化することが見出されている¹⁻⁵⁾。特に細菌は単細胞であるだけに、外層にある細胞壁が欠落した状態になった時、膜リン脂質成分は著明に変動する。すなわち黄色ブドウ球菌において、自己融解酵素により一過性に壁喪失を来した autoplast では膜リン脂質中に Cardiolipin が著増し³⁾、さらに壁を有しないで安定に継代できる L 型菌に至っては Cardiolipin の増加に加えて Cholesterol の発現を認めた^{4,5)}。これら細菌の裸膜化にともなう脂質変動は、一つには細胞壁に代わる膜硬化への寄与の可能性を大きく示唆しているものと考えられる。

本研究においては、このような膜構成脂質の適応変化現象の意義について物性論の見地から検討を加え、膜硬化寄与の事実を解明しようと考へた。すなわち膜の流動性を調べる物理学的測定法の一手段として、高感度示差走査熱量計 (DSC) により相転移温度の比較を行うことを計画した^{6,7)}。

相転移温度を知る示差熱解析法は、供試細菌から分離した生体膜について行うのが理想であ

るが、DSC の感度・精度の点から、リン脂質構造の均一性が要求されるのが現状である。従つて本研究においては、構成脂肪酸が一定のリン脂質による人工膜について解析を試みた。すなわち裸膜化にともなつて大きく変動する Phosphatidylglycerol (PG) と Cardiolipin (CL) の色々な組成比からなる人工膜についてのモデル実験にあつて、dipalmitoyl PG もしくは dimyristoyl PG の入手は容易であるが、CL は自製せざるを得ない。そこで単純な生合成系である phospholipase D 画分の transphosphatidyl-ation 反応⁸⁾に注目して PG から CL の生合成を試み、極めて純粋な tetrapalmitoyl CL と tetramyristoyl CL を得ることに成功した。

純粋に得られた同一かつ均一な脂肪酸をもつ PG, CL を供試して、水中分散のリポソーム系における膜流動性への PG, CL 骨格の影響および黄色ブドウ球菌裸膜化における実際の組成変化に見合うリン脂質組成のリポソームを作製して相転移温度測定を行った。さらに 2 価カチオンの効果についても検討し、CL 骨格が膜硬化へ大きく寄与しているという確証を得たので報告する。

材料および方法

I. 基質

Phosphatidylglycerol は Carbiochem-Behr-

ing社から、99%以上の純品を購入した。 β - γ -dipalmitoyl-D,L- α -phosphatidylglycerolは(16:0)PG、 β - γ -dimyristoyl-D,L- α -phosphatidylglycerolは(14:0)PGと表わす。

II. 酵素

Phospholipase D画分はキャベツから調製した⁹⁾。新鮮なキャベツの葉と茎100gに蒸留水100mlを加え、ブレンダーにて5分間ホモジナイズしたあと、さらしを使ってろ過した。ろ液は10,000×g、15分間遠沈し、その上清を55°C、5分間処理したあと、再び13,000×g、10分間遠沈した。その上清に2倍容の冷アセトンを加え、沈殿物を8,000×g、5分間の遠沈で集め、凍結乾燥して0.25gの粗酵素画分が得られた。

III. 脂質の抽出と分析

脂質の抽出・精製はBligh-Dyer法により行った¹⁰⁾。脂質は薄層クロマトプレート(TLC, Kieselgel 60 G)を使って同定あるいは分画を行った。溶媒はCHCl₃-MeOH-H₂O(65/25/4, v/v/v)を用いて展開し、二次元展開を必要とする場合は、さらにCHCl₃-MeOH-7N NH₄OH(60/35/4.5, v/v/v)を用いた⁴⁾。リンの定量はKates法により行った¹¹⁾。構成脂肪酸の確認

は、PGとCLを塩酸メタノール法でエステル化したのち、ガスクロマトグラフィー(Hitachi K53 GLC, FID)を行った¹¹⁾。

IV. リポソームの調製

クロロホルムに溶解した一定量の脂質をパイレットス小試験管に分注し、管壁にフィルム状に付着するようevaporateした。これに蒸留水の一定量を加え、60~65°Cに保温した状態でvortex mixerによる振とうでリポソームを作製した。

V. 示差熱解析

DSCは第2精工社の高感度示差走査熱量計(SSC/560 U)を使用した。試料は調製したリポソームの50 μ lをアルミニウム製密封型試料容器に入れて供試した。Referenceには50 μ lの蒸留水を使った。昇温速度は2.0°C/minで温度上昇法による吸熱のパターンで相転移を知り、相転移温度はピークの先端Tpを読み取り温度比較を行った。

結 果

I. 同一脂肪酸をもつCardiolipinの生合成 市販の(16:0)PG(Fig. 1A)を基質とし

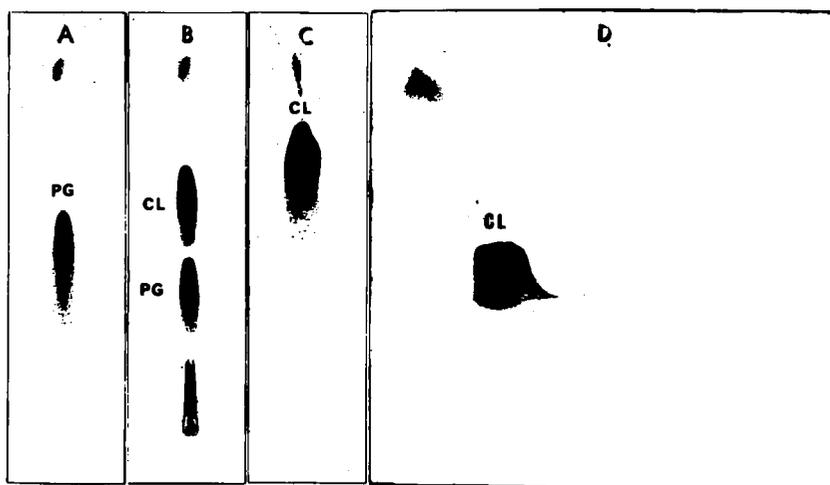


Fig. 1 Thin-layer chromatogram. Solvent system: One-dimensional TLC, CHCl₃-MeOH-H₂O (65/25/4, v/v/v); Two-dimensional TLC, CHCl₃-MeOH-7N Am (60/35/4.5, v/v/v) after one-dimensional development. Spots were revealed by charring after spraying with 40% H₂SO₄. A: Commercial (16:0)PG; B: Enzymatic formation of CL from PG by phospholipase D fraction; C: One-dimensional TLC of synthesized CL; D: Two-dimensional TLC of synthesized CL.

て、酵素はキャベツの phospholipase D 画分を用いて、(16:0) CL の生合成を試みた。Phospholipase D 画分の transphosphatidyltion 反応の至適条件は pH 5.6, 温度 28°~30°C であり、反応は 10~12 時間でプラトーに達した。EGTA 添加で活性は約 4 倍増加した。Fig. 1B は至適条件で反応させたときの TLC パターンを示しているが、PG:CL の重量比は、ほぼ 1:1 であった。大量の Cardiolipin を合成するため

Table 1 Reaction mixture

Acetate buffer (pH 5.6)	: 100mM
EGTA	: 1mM
Phospholipase D fraction from cabbage	: 40mg
Dipalmitoyl PG	: 40mg
Diethyl ether	: 120ml
Total vol.	240ml

に Table 1 に示した反応混液を調製した。使用した phospholipase D 画分にはリン脂質の混入がないことを二次元 TLC により確認した。反応条件は 28°C 恒温槽中で 12 時間、マグネチック・スターラーで攪拌しながら反応を行った。反応後 diethyl ether を evaporate し、Bligh-Dyer 法抽出により、リン脂質を得た。これを調製用 TLC で分画し、PG と CL それぞれを単離し、再度 Bligh-Dyer 法で精製した。得られた CL の収量は、8.9 mg~12.0 mg で収率は 22~30% であった。PG と CL は塩酸により塩の形から遊離型に変え、GLC と DSC 用試料に使用した。Fig. 1 C, 1 D に示したように一次元および二次元 TLC により CL が単一のスポットであることを確認した。GLC での脂肪酸組成は Fig. 2 のようになり、合成した CL の構成脂肪酸は palmitic acid のみの one peak となった。(14:0) CL については、上記と同様の方法で合成し、高純度な CL が得られた。収量は 14.1 mg で収率は 35% であった。

II. PG および CL リポソームの相転移温度

Fig. 3 は市販の (16:0) PG, (14:0) PG, 合成した (16:0) CL, (14:0) CL の DSC での示差熱解析を示している。リポソームは、リン脂質濃度が 50 mM になるよう調製した。

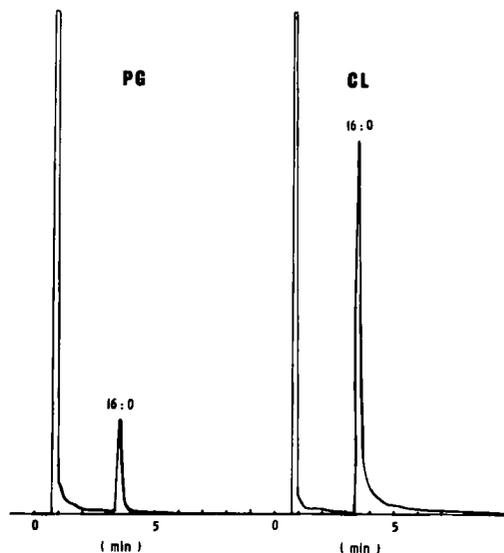


Fig. 2 Gas chromatograms of fatty acid prepared from comm. PG and synthesized CL. Apparatus: Hitachi K53 Gas Chromatograph with FID. Operating conditions: Column; 10% DEGS on Diasolid L, 2m. Temperature; 193°C. N₂ flow rate; 0.6kg/ min.

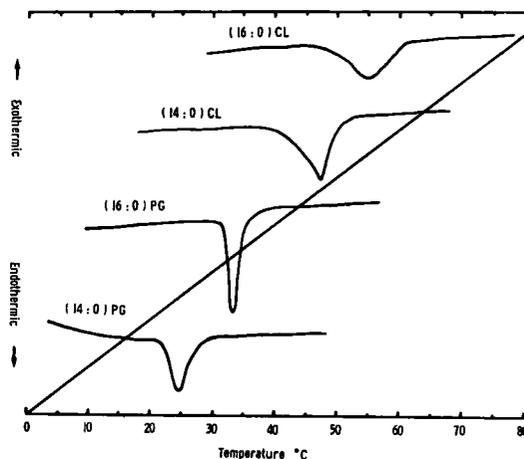


Fig. 3 Differential scanning calorimetric profiles of PG and CL liposomes. Furnace: SSC/560U (Daini Seikosha); Sample: 50mM in H₂O, 50 μl; Reference: H₂O, 50 μl; Heating rate: 2.0°C/min.

Table 2には、それぞれの相転移温度をまとめた。(16:0) PGと(16:0) CL, (14:0) PGと(14:0) CLの温度差は両者とも22°C程度であり、CLは明らかにPGより相転移温度が高かった。

III. PG・CL混合リポソームの相転移温度

黄色ブドウ球菌細胞膜のリン脂質モデルとして、PG:CL=4:1, PG:CL=2:1のモル比で、リン脂質濃度が50mMになるようリポソームを作製した。すなわちPG:CL=4:1は細胞壁を持つnormalな黄色ブドウ球菌のリン脂質組成を反映し、PG:CL=2:1は細胞壁を欠落したL型菌, autoplastのリン脂質組成を反映している。Fig. 4は(16:0) PG, (16:0) CLを混合したリポソームの示差熱解析を示し、Fig. 5は(14:0) PG, (14:0) CLを混合した場合の示差熱解析である。Table 2にはFig. 4, 5の相転移温度をまとめた。PGとCLの混合物では、PGおよびCLのみの相転移温度の中間の値を取り、CL含量の多いリポソームの方が高い値を得た。

IV. 2価カチオンの相転移温度への影響

10mM CaCl₂または10mM MgCl₂を添加してリン脂質濃度が50mMになるようリポソームを作り、Ca²⁺, Mg²⁺がPG, CLの相転移温度に及ぼす影響について調べた。Fig. 6は示差熱解

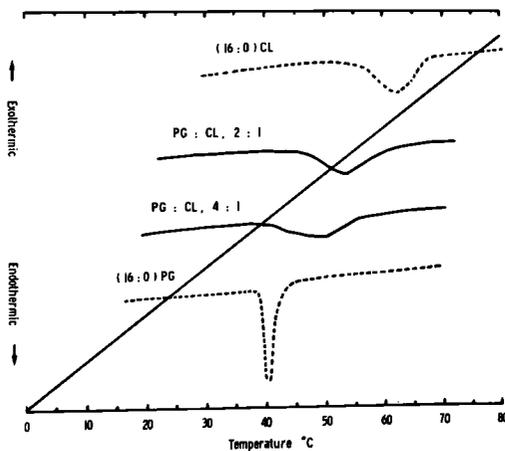


Fig. 4 Differential scanning calorimetric profiles of (16:0) PG, (16:0) CL and mixed PG・CL liposomes.

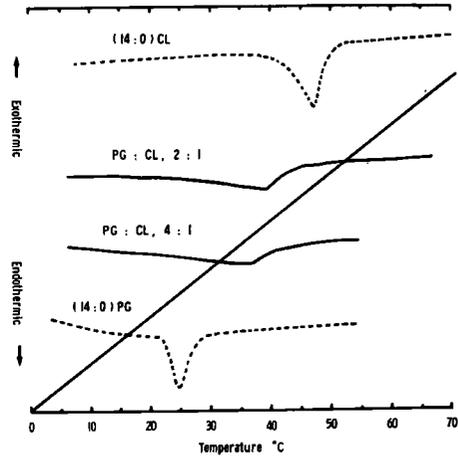


Fig. 5 Differential scanning calorimetric profiles of (14:0) PG, (14:0) CL and mixed PG・CL liposomes.

Table 2 Thermotropic phase transition characteristics of PG, CL and mixed PG・CL liposomes

Sample	Molar ratio	Transition temperature T _p (°C)
(16:0) PG	-	40.5
(16:0) PG : (16:0) CL	4 : 1	50.0
(16:0) PG : (16:0) CL	2 : 1	53.1
(16:0) CL	-	62.2
(14:0) PG	-	25.0
(14:0) PG : (14:0) CL	4 : 1	36.8
(14:0) PG : (14:0) CL	2 : 1	39.6
(14:0) CL	-	47.0

Sample concentration : 50mM in total

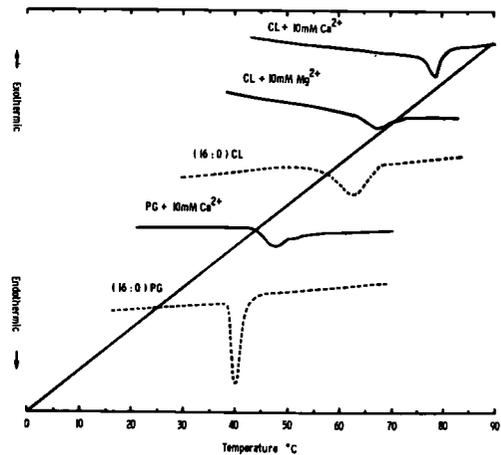


Fig. 6 Effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the DSC profiles of (16:0) PG and (16:0) CL liposomes.

Table 3 Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on thermotropic phase transition characteristics of (16:0)PG and (16:0) CL liposomes

Sample	Addition Ca^{2+} or Mg^{2+} (mM)	Transition temperature
		T_p ($^{\circ}\text{C}$)
(16:0) PG	-	40.5
(16:0) PG	Ca^{2+} (10)	47.5
(16:0) CL	-	62.2
(16:0) CL	Mg^{2+} (10)	67.3
(16:0) CL	Ca^{2+} (10)	78.2

Sample concentration : 50mM

析を示し、Table 3にはその時の相転移温度をまとめた。PGに Ca^{2+} を添加すると7 $^{\circ}\text{C}$ の温度上昇がみられ、CLに Ca^{2+} を添加すると16 $^{\circ}\text{C}$ の上昇、CLに Mg^{2+} を添加すると5 $^{\circ}\text{C}$ の上昇がみとめられた。

考 察

生体膜の流動性を測定する物理学的方法にはX線回折法、磁気共鳴 (ESR, NMR)、分光学的手法 (ORD, CD, レーザラマン、けい光)、示差熱測定などがあり、得られる情報に特徴がある^{6,7,12}。極性脂質は水溶液中で生体膜と同じように2分子膜構造をとり多形現象を示す。すなわち結晶(異方性)、液晶(異方性)、液体(等方性)の状態があり、さらに液晶には多くの配列の可能性がある。生体膜の流動性を想定する上で重要なのは、結晶状態から液晶状態への転移である。液晶状態は生理的な状態における生体膜脂質の基本構造であり、生体膜の流動性や透過性に極めて深い関係をもっている。極性脂質が結晶状態の時は L_{β} 型配向をしており、規則正しく膜面に直角に炭化水素鎖が密着している。結晶状態(低温)から液晶状態(高温)への移行あるいは逆への移行を相転移といい、その時の温度を相転移温度として表わす。液晶状態では L_{α} 型配向となり炭化水素鎖が低距離の秩序を保ちながら液状に自由運動をしている。

本研究では、黄色ブドウ球菌が細胞壁を欠落することにより極性脂質であるCLが著増するというリン脂質種の変化に注目した^{3,4}。黄色ブドウ球菌の膜構成脂肪酸はバラエティーに富んでいて枝鎖飽和脂肪酸が多く、平均鎖長が16.5で

あり¹³、L型化しても脂肪酸にはとり上げるべき変化が認められなかった。そこでリン脂質の主要成分であるPG, CLの骨格構造が膜rigidityに如何に貢献しているかに主眼をおき、物性を追求することにより細胞膜適応現象を解明しようと考えた。示差走査熱量計による相転移の動態解析が、以上の目的を把握するのにもっとも適した手段と考えた⁷。

リン脂質の骨格構造に注目してリポソーム一水系で示差熱解析を行うためには、同一かつ均一な脂肪酸をもつPGとCLで比較すれば、明確な結果が得られると期待された。同一脂肪酸をもつCLは合成せざるを得ないので、黄色ブドウ球菌の構成脂肪酸を考慮に入れて、(16:0)CL, (14:0)CLを合成して、これらPGとCLによる人工膜についてモデル実験を行った。

CLの有機合成法はいくつかの方法が報告されていて、Ramirezらの方法が比較的すぐれていると考えられたが¹⁴、いずれも煩雑である。そこで同一脂肪酸をもつ市販のPGからCLへの一段階生成反応を利用すれば、より簡単にCLが合成できると考えた。まず黄色ブドウ球菌細胞膜に局在しているCL合成酵素に着目した¹⁵。このCL合成酵素は膜に埋め込まれた疎水性の酵素であり、種々の部分精製を試みたが、活性が失活しやすいので精製の段階には至らなかった。そこで膜分画そのものを使用して生合成を試みたが、元来細胞膜内に存在するendogenousなPGからCLへの転換反応が主反応としてあらわれ、外から添加した(16:0)PGのCL転換はむしろ従反応的に行われた。従って反応後分画精製したCLには細胞膜のCLが25%程度も混入し、均一脂肪酸組成のものとしては極めて劣るものであった。合成されたCLで示差熱解析を行ったところ、期待された結果は得られたものの、ブロードなピークであったので、より高純度なCLで相転移温度の比較を行うべきであると考えた¹⁶。

そこで次の可能性としてphospholipase D画分のtransphosphatidylation反応に着目した⁸。Yangらはphospholipase D画分が加水分解と同時にホスファチジル基転移能をもつことを見

い出し、活性発現には Ca^{2+} が必須であると報告した¹⁷⁾。また Stanacev らは PG に phospholipase D 画分を Ca^{2+} 存在下で作用させて transphosphatidylaton 反応により CL が合成されることを報告した⁸⁾。キャベツや人参から簡単に分画しうる phospholipase D 画分には、リン脂質の混入がなかったので高純度な CL が得られると期待できる。著者が transphosphatidylaton の活性発現への Ca^{2+} の依存を調べたところ、CL 合成量は無添加、 Ca^{2+} 添加、EDTA 添加、EGTA 添加で 3:1:10:12 であった。このことから、 Ca^{2+} は phospholipase D 画分の加水分解反応には必須であるが transphosphatidylaton 反応には阻害的に働くと考えられる。結果の項で述べた著者の確立した生合成法は Ramirez らの有機合成法に比して簡便であり不純物の混入はなく、収率は高かった。示差熱解析ではシャープなピークが見られ、信頼しうる結果を得た。

黄色ブドウ球菌の細胞膜の主要リン脂質は PG と CL で、相対含量比はそれぞれ 70~80% と 5~15% である。細胞壁を欠落して autoplast 化したり L 型菌になると、この比率が逆転して 20~30%、50~60% になる^{1,3,13)}。この脂質分子組成を反映させた膜モデル実験により、CL 増加の意義を考察する。(14:0) PG と (16:0) PG の相転移温度はそれぞれ 25.0°C と 40.5°C であったが、これは Papahadjopoulos らの結果と一致している¹⁸⁾。(14:0) CL と (16:0) CL の場合は、それぞれ 47.0°C と 62.2°C であったが、Rainier らの結果とは (16:0) CL についてはほぼ一致したが、(14:0) CL は 40.0°C と報告されており 7°C の差があった¹⁹⁾。本研究において (16:0) と (14:0) の両方で PG と CL の温度差が同程度になったことから、得られた値は合理的であり信頼できる結果と判断した。いずれにしても同一脂肪酸をもつ CL は PG より相転移温度が高く、CL の骨格構造自体が膜の rigidity に直接関与していることが容易に理解できる。また PG と CL の混合リポソームでは、PG、CL のみの相転移温度の中間値をとり、CL 含量の多い混合リポソームの方が高い値を得たことから、細胞壁を欠落した L 型菌、autoplast では CL が増加することにより膜

rigidity を増加していることの確証を得たことになる。これは生物学的現象を物理学的方法で証明したことになり、大きな意味をもつと考えられる。

さらに黄色ブドウ球菌のリン脂質の主成分である PG、CL の相転移温度への 2 価カチオンの効果を調べた。CL は分子相互間に 2 価カチオンの架橋がかかり易い構造であるため、PG に比して特に Ca^{2+} の影響を受けやすいと考えられる。この結果は Rainier らの報告と一致した¹⁹⁾。すなわち細胞壁を欠落した L 型菌、autoplast では PG から CL への転換を起こし、さらに Ca^{2+} が結合すると、おそらく分子の mobility および自由度が制御されて膜 rigidity が著しく増加することが示唆された。

黄色ブドウ球菌のモデル実験で、物性論的に CL 増加の意義が証明できたが、さらに安定 L 型菌で Cholesterol が発現した事実を明らかにしているの、今後この現象についても物性論的見地から検討を進めたい。また色々な動物細胞膜や細菌細胞膜、特に Mycoplasma に関する文献に見られるように⁷⁾、より実際に近い物性変化を把握するために黄色ブドウ球菌からの抽出脂質や分離細胞膜そのものについての相転移温度測定の可能性も検討する予定である。

結 語

1) 同一脂肪酸をもつ CL の生合成法が確立した。基質として市販の同一脂肪酸をもつ PG を用い、酵素としてキャベツの phospholipase D 画分を用いる生合成法は、簡便で高純度な CL を得ることができる。

2) 黄色ブドウ球菌の膜モデル実験を行った。PG、CL および PG・CL 混合リポソームでの相転移温度の動態から、CL の骨格が膜の硬度を増加していることの確証を得た。つまり細胞壁を欠落した菌では CL が増加することにより膜硬化が起こり細胞壁欠落を補償する機能をもつことが裏付けられた。

3) 2 価カチオンが相転移温度に及ぼす影響を調べたところ、CL は PG に比して特に Ca^{2+} の影響を受けやすいことがわかった。つまり細胞壁を欠落した菌で PG から CL への転換がおこ

り、さらに Ca^{2+} が結合すると膜は著しく硬化する可能性がある。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇切なる御指導を賜りました金政泰弘教授に深甚の謝意を表します。さらに多くの討論・教示を頂きました友近健一講師、速水

正明講師ならびに香川医科大学微生物学講座林英生教授、岡部昭延助教授に心から御礼申し上げます。また実験を進めるにあたり種々御協力を頂きました細菌学教室各位に心から感謝いたします。

なお本論文の主旨の一部は、第54回日本細菌学会総会、第23回日本脂質生化学研究会において発表した。

文 献

1. Kanemasa, Y., Yoshioka, T. and Hayashi, H.: Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochem. Biophys. Acta* **280**, 444—450, 1972.
2. Kanemasa, Y., Katayama, T., Hayashi, H., Takatsu, T., Tomochika, K. and Okabe, A.: The barrier role of cytoplasmic membrane in salt tolerance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt., Suppl.* **5**, 189—201, 1976.
3. Okabe, A., Hirai, Y., Hayashi, H. and Kanemasa, Y.: Alteration in phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* during formation of autoplast. *Biochem. Biophys. Acta* **617**, 28—35, 1980.
4. Hayami, M., Okabe, A., Kariyama, R., Abe, M. and Kanemasa, Y.: Lipid composition of *Staphylococcus aureus* and its derived L-forms. *Microbiol. Immunol.* **23**, 435—442, 1979.
5. Hayami, M., Okabe, A., Sasai, K., Hayashi, H. and Kanemasa, Y.: Presence and synthesis of cholesterol in stable *Staphylococcal* L-forms. *J. Bacteriol.* **140**, 859—863, 1979.
6. Chapman, D.: Physical chemistry of phospholipids.
White, D.A.: The phospholipid composition of mammalian tissues. In *Form and Function of Phospholipids*, Second Ed. (B.B.A. Library, Vol.3) ,ed. G.B. Ansell, J.N. Hawthorne and R.M.C. Dawson, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 117—142, pp. 441—482, 1973.
7. McElhaney, R.N.: The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chem. Phys. Lipids* **30**, 229—259, 1982.
8. Stanacev, N.Z., Stuhne-Sekalec, L. and Domazet, Z.: Enzymatic formation of cardiolipin from phosphatidylglycerol by the transphosphatidylation mechanism catalyzed by phospholipase D. *Can. J. Biochem.* **51**, 747—753, 1973.
9. Davidson, F.M. and Long, C.: The structure of the naturally occurring phosphoglycerides. 4. Action of cabbage-leaf phospholipase D on ovoidlecithin and related substances. *Biochem. J.* **69**, 458—466, 1958.
10. Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911—917, 1959.
11. Kates, M., Allison, A.C. and James, A.T.: Phosphatides of human blood cells and their role in spherocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 571—582, 1961.
12. Fox, C.F. and Keith, A.D.: *Membrane Molecular Biology*. Sinauer Associates, Stanford, pp.115—286, 1972.
13. Hayashi, H., Hamada, H., Hirai, Y., Kariyama, R., Koujima, I. and Kanemasa, Y.: Effect of glucose and oxygen on the structure of the plasma membrane of *Staphylococcus aureus*. *Acta Med. Okayama* **33**, 379—387, 1979.

14. Ramirez, F., Ioannou, P.V., Marecek, J.F., Dodd, G.H. and Golding, B.T.: Synthesis of phospholipids by means of cyclic enediol pyrophosphates. Optically active monovalent and divalent cation salts of diphosphatidylglycerol (cardiolipin). *Tetrahedron* **33**, 599—608, 1977.
15. Short, S.A. and White, D.C.: Biosynthesis of cardiolipin from phosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **109**, 820—826, 1972.
16. 狩山玲子, 平井義一, 友近健一, 林英生, 金政泰弘: 壁欠落にともなう細胞膜リン脂質変動の物性論的検討. *Proc. J. C. B. L.* **23**, 66—69, 1981.
17. Yang, S.F., Freer, S. and Benson, A.A.: Transphosphatidylolation by phospholipase D. *J. Biol.Chem.* **242**, 477—484, 1967.
18. Papahadjopoulos, D., Hui, S., Vail, W.J. and Poste, G.: Studies on membrane fusion. 1. Interactions of pure phospholipid membrane and the effect of myristic acid, lysolecithin, proteins and dimethylsulfoxide. *Biochem. Biophys. Acta* **448**, 245—264, 1976.
19. Rainier, S., Jain, M.K., Ramirez, F., Ioannou, P.V., Marecek, J.F. and Wagner, R.: Phase transition characteristics of diphosphatidylglycerol (cardiolipin) and stereoisomeric phosphatidyl-diacylglycerol bilayers. Mono- and divalent metal ion effects. *Biochem. Biophys. Acta* **558**, 187—198, 1979.

**Model studies on the alteration of the phospholipid composition of
Staphylococcus aureus in response to the lack of the cell wall**

Reiko KARIYAMA

Department of Microbiology

Okayama University Medical School

(Director: Prof. Y. Kanemasa)

In order to elucidate why cardiolipin increases markedly in *Staphylococcus aureus* cells which lack cell walls, the phase transition temperature of cardiolipin (CL) was determined and compared with that of a major phospholipid, phosphatidylglycerol (PG). CL composed of a fatty acid with a given length was synthesized from dimyristoyl PG and dipalmitoyl PG with the aid of phospholipase D prepared from cabbages and was purified by chromatography. Analysis by differential scanning calorimetry showed that the phase transition temperatures of dimyristoyl PG, tetramyristoyl CL, dipalmitoyl PG and tetrapalmitoyl CL were 25.0, 47.0, 40.5 and 62.2°C, respectively. A mixture of the two phospholipids showed a higher phase transition temperature than PG alone, but lower than CL alone. In the presence of divalent cations, especially Ca²⁺, the phase transition temperature of CL increased more than that of PG. These results clearly indicate that cardiolipin can increase the membrane rigidity and suggest that *S. aureus* may increase cardiolipin content of the membrane to compensate for the loss of mechanical protection due to the lack of the cell wall.