



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Lactobacillus gasseri JCM 1131T における 宿主との相互作用に寄与するリポテイコ酸の解析：構造，細胞表層における局在および胆汁酸ストレスによる構造変化 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	白石, 宗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11099号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53943
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tsukasa_Shiraishi_abstract.pdf, 「論文内容の要旨」



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学）

氏名 白石 宗

学位論文題名

***Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T における宿主との相互作用に寄与するリポテイコ酸の解析：構造，細胞表層における局在および胆汁酸ストレスによる構造変化
(Characterization of lipoteichoic acid that contributes to host-microbe interactions in *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T: Structure, localization in cell surface and structural alteration caused by bile acid stress)**

乳酸菌はプロバイオティクスとして利用され、多くの健康に有益な効果を宿主に供与する。しかし、乳酸菌と宿主との相互作用に関しては未だ十分に解明されていない。乳酸菌と宿主腸管との相互作用においては、既に菌体の表層構成分子が重要な役割を持つと考えられているが、その中でも特にリポテイコ酸 (Lipoteichoic acid : LTA) が宿主免疫応答に深く関与することが近年明らかになってきた。LTA はグラム陽性細菌の細胞表層を構成する分子として細胞壁に次ぐ重要な分子であり、細胞の生死に関わる重大な生理学的役割も報告されている。しかし、これまでの LTA に関する研究は病原性細菌に関するものが多く、宿主にとって有用な乳酸菌の LTA に関する情報は極めて少ない。そこで本研究では、代表的なプロバイオティクスとして既に利用されている細菌種であるにも関わらず、LTA に関する情報が皆無である腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* の基準株 JCM 1131^T を用いて、本菌の LTA の特徴およびヒトの主要な胆汁酸であるコール酸に対する耐性への関与を明らかにすることを目的とした。

1) *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T のリポテイコ酸の構造解析

LTA は一般的にグリセロールリン酸 (GroP) をモノマーユニットとした繰り返し構造をとるポリマーに糖脂質が結合した構造をもつ分子で、糖脂質部位が細胞膜脂質の一部を構成する形で細胞膜にアンカーされている。モノマーユニットである GroP の 2 位の水酸基は多くの場合 D-アラニン (Ala) 残基やグルコース残基、N-アセチルグルコサミン残基などのヘキサースによって修飾されていることが知られているが、結合する残基の種類や数は菌株レベルで異なっている。そこで、*Lb. gasseri* JCM 1131^T の LTA の構造を明らかにすることを目的として NMR, GC, および MALDI-TOF MS を用いた構造解析を行った。LTA を菌体からブタノール抽出および疎水クロマトグラフィーによって精製し、取得した精製 LTA 画分を使用して各種分析を行った。その結果、*Lb. gasseri* JCM 1131^T の LTA のポリマー部位は GroP と 2-アラニルグリセロールリン酸をモノマーユニット構造として、これらを 69:31 で含む 20~30 ユニットから構成されていた。また、アンカー糖脂質はガラクトースとグルコースを 3:1 で含む四糖構造にジアシルグリセロールが結合したテトラヘキソシルジアシルグリセロールと、四糖構造にアシル基がさらに 1 つ結合したアシルテトラヘキソシルジアシルグリセロールの 2 種類から構成されていると考えられた。本研究で明らかにされた *Lb. gasseri* JCM 1131^T の LTA のポリマー部位の構造は、グラム陽性細菌に一般的に見られる構造であったが、四糖構造を持つアンカー糖脂質はグラム陽性細菌の LTA としてはこれまで報告が無く、特筆すべき点である。また、3 つのアシル基を持つことも特徴であり、これは現在まで確認されている代表的な有用乳酸菌である *Lactobacillus* 属や *Lactococcus* 属細菌に共通して観察される構造である。これらのことから、*Lb. gasseri* JCM 1131^T は極めて特徴的な LTA を有することが明らかになった。

2) *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T のリポテイコ酸の細胞外への露出の検証

LTA は細胞膜にアンカーするポリマーであり、このポリマー部位は細胞壁の隙間を縫うように細胞外へ伸長していると考えられているが、そのポリマーの長さ、および細胞壁の厚さは菌株レベルで異なる。したがって、ポリマー部分が細胞壁を貫通して細胞外に露出するのか、それともしないのかは菌株レベルで異なると報告されている。一方で LTA は、宿主との相互作用を介在する表層分子であり、宿主の免疫担当細胞に特異的に認識される。したがって、LTA の細胞外への露出の有無は、宿主との相互作用において、宿主細胞による LTA の認識に影響する可能性が考えられ、これを観察することは菌株の免疫調節作用の特徴を明らかにすることに繋がるものと考えられる。そこで、*Lb. gasseri* JCM 1131^T の LTA の細胞外への露出の有無を明らかにすることを目的として、市販品の抗 LTA モノクローナル抗体を使用した免疫電子顕微鏡法によって LTA の露出を観察した。始めに抗 LTA モノクローナル抗体の抗原特異性を確認したところ、LTA への特異的な結合が確認された。これは、簡単に入手可能な抗 LTA モノクローナル抗体が LTA の研究において、検出精度の高い非常に有用なツールになることを示した点で重要な意味を持つと考えられる。次に本抗体を用いて LTA の細胞外への露出を観察した。また、本試験では過去に LTA が細胞外に露出すると報告されている 2 菌株の *Lactobacillus* 属細菌も比較のために同時に観察を行い、*Lb. gasseri* JCM 1131^T の LTA の細胞表層への露出の有無を明らかにした。

3) リポテイコ酸のコール酸耐性への関与の解析

腸内乳酸菌が生息する腸管内では様々な消化液が分泌されている。中でも胆汁に含まれる胆汁酸は界面活性作用を持つため、乳酸菌にとって強い生育阻害因子となる。したがって、これらの乳酸菌は胆汁酸に対して何らかの耐性機構を有していると考えられる。その機構の一つとして、非致死濃度の胆汁酸への事前曝露によって、本来致死濃度である胆汁酸に耐性を獲得する、いわゆる適応現象が報告されている。しかしこの耐性機構は十分解明されていない。そこで、*Lb. gasseri* JCM 1131^T を使用して、この胆汁酸適応による耐性の獲得における LTA の関与を明らかにすることを目的とした。LTA は細胞表層の負電荷を担う分子であり、これは LTA を構成する負電荷を持ったリン酸残基が要因となる。LTA には生理学的な役割の一つとして細胞表層の電荷調節による菌体防御作用が知られており、これは負に帯電した LTA 分子に正電荷を持った D-Ala 残基が結合することで電氣的な中和作用を働かせることにより起こることが報告されている。胆汁酸の主成分であるコール酸は電荷を持つ分子であることから、この LTA を介した表層電荷調節作用が胆汁酸適応による耐性獲得に関与している可能性が考えられた。そこで、コール酸に適応して耐性を獲得した菌体を取得して、表層極性および表層電荷の比較評価を行った。さらに、適応菌体と非適応菌体の LTA 構造や細胞当たりの LTA 量に着目して両者の比較を行った。その結果、コール酸適応による耐性の獲得において、LTA の関与を示唆する結果が得られた。

以上のように、本研究では代表的なプロバイオティクス乳酸菌として用いられている *Lb. gasseri* 種において、*Lb. gasseri* JCM 1131^T を用いて LTA の構造的特徴を初めて明らかにした。すなわち、本株の LTA はグラム陽性細菌においてこれまで報告のない四糖構造のアンカー糖脂質を持つことを見出し、その細胞外への露出の有無についても明らかにした。これは、微生物学上重要な発見であるばかりでなく、本菌種と宿主との相互作用を解明する基盤情報になると考えられる。また、プロバイオティクスの備えるべき性質としてコール酸耐性は重要であるが、LTA がコール酸耐性にも関与する可能性を示したことは、LTA の生理機能を考える上で重要な知見である。今後 *Lb. gasseri* JCM 1131^T の LTA の新規な四糖構造や特徴的な 3 つのアシル基が宿主との相互作用においてどのような特徴を発揮するのか、さらに本菌におけるそれらの生理学的な意義についての解明が期待される。