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_review.pdf, 「審査の要旨」

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士(農学)　　氏 名　白石 宗

審査担当者	主 査	教 授	横田 篤
	副 査	教 授	森 春英
	副 査	准教授	横田 伸一（札幌医科大学）
	副 査	客員准教授	森田 直樹（産業技術総合研究所）
	副 査	助 教	吹谷 智

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)

本論文は，和文 281 ページ，図 15，表 45，6 章からなり，参考論文 1 編が付されている．

乳酸菌はプロバイオティクスとして利用され，健康に有益な多くの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．乳酸菌と宿主の相互作用においては，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．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，乳酸菌のLTAに関する情報は極めて少ない．本論文では，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の構造，細胞表層における局在および胆汁酸に対する耐性への関与を解析した結果をまとめたものである．

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ソースによって修飾されていることが知られている．しかし，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，NMR，GC，および MALDI-TOF MS によって *Lb. gasseri* JCM 1131^T の LTA の構造解析を行った．

その結果，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．特に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，免疫担当細胞に特異的に認識されるため，LTA の細胞外への露出の有無は，宿主との相互作用を介した免疫誘導において重要であると考えられる．そこで，予め LTA への特異的な結合を確認した抗 LTA モノクローナル抗体による免疫電子顕微鏡法によって *Lb. gasseri* JCM 1131^{T} の LTA の細胞外への露出の有無を透過電子顕微鏡で観察した．

その結果，*Lb gasseri* JCM 1131^{T} の LTA の細胞表層への露出の有無が明らかになった．

3)　リポテイコ酸のコール酸耐性への関与の解析

腸管内では様々な消化液が分泌されており，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，腸内乳酸菌にとって強い生育阻害因子となる．細菌には，このようなストレスに対する機構の一つとして，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．電荷を持つ胆汁酸に対して，表層の電荷調節という役割が報告されている LTA がこの適応現象に関与している可能性が考えられたため，*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 の関与を検証した．

その結果，コール酸適応による耐性獲得への LTA の関与を示唆する結果が得られた．

本論文の結論として，*Lb. gasseri* 種の JCM 1131^{T} において，四糖構造を含む特徴的な LTA 構造を初めて明らかにし，その細胞外への露出の有無についても明らかにした．また，プロバイオティクスの備えるべき性質として胆汁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．これらの成果は，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という点で高く評価できる．

よって審査員一同は，白石宗氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた．