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［全文の要約］
Author(s)	白石，宗
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/53945
Type	doctoral thesis
File Information	Tsukasa_Shiraishi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文要約

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

北海道大学　大学院農学院　共生基盤学専攻

食品安全･機能性開発学講座　胃腸内圏微生物学分野　微生物生理学研究室

博士後期課程

白石　宗

2013 年（平成 25 年）

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 (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．

本論文は 6 章から成り，*L. gasseri* JCM 1131^{T} において新規の LTA の構造を見出だし，その表層における局在やコール酸耐性への関与を示唆する結果を得た．以下，本研究で得られた結果を要約する．

第 1 章では，序論として本研究の背景を説明するとともに，研究意義を述べた．LTA はグラム陽性細菌が細胞表層に持つ重要な表層構成分子であり，細胞が生育する上

で重要な生理学的役割を持つと考えられている. また, 細菌と宿主との相互作用においても, LTA は仲介分子であると考えられており, LTA の構造や細胞外への露出の有無という特徴を把握することは, 微生物学的な観点のみならず, 宿主との相互作用を理解する上でも不可欠である. LTA の理解が深まることは, 将来どんな細菌が宿主へどのような免疫刺激を与えるか, という重要な問題への大きな貢献が期待される. しかし, LTA の構造や細胞表層における局在 (細胞外への露出の有無) は菌株レベルで異なり, 多くの情報の蓄積が必要であるが, 現在把握されている情報は極めて少ない. 特に現時点で蓄積された情報は病原性細菌のものが多く, 有用細菌として利用されるプロバイオティクスに関する情報は乏しい. したがって, 代表的な有用細菌である乳酸菌の LTA の構造や局在情報を把握することは細菌と宿主との相互作用メカニズムを明らかにする上で重要である. さらに, 当研究室では乳酸菌やビフィズス菌に対する胆汁酸の生育阻害作用について長年研究を続けており, 胆汁酸による細胞膜の損傷が生育阻害メカニズムであることを明らかにしてきた. 一方, いくつかの細菌において胆汁酸の主成分であるコール酸への適応現象が報告されている. 殺菌作用を持つコール酸への適応現象とは, 予め非致死濃度のコール酸に曝露されることで, コール酸耐性を獲得する現象であり, これは腸内乳酸菌全般に備わる腸管内での生き残り戦略ではないかと考えられた. また細菌の生残戦略に関連して, LTA の生理学的な役割の一つに陽イオン抗菌ペプチド耐性 (AMP) への寄与が報告されており, これは, 環

境中に見出される多くの陽イオンを持つ AMP に対して，LTA 分子内に正電荷を持つ D-アラニンを結合させ，静電気的な反発作用を利用して，AMP との接触を回避するという菌体防御機構である．このような LTA を介した表層の電荷調節による菌体防御は，負電荷を持つコール酸に対しても行われている可能性が考えられる．したがって，コール酸耐性に対する LTA の関与を明らかにすることは，コール酸耐性メカニズムを明らかにする上で重要である．

第 2 章では，*L. gasseri* JCM 1131^{T} の LTA の構造を明らかにするために行った LTA の抽出精製に関して述べた．本研究では，*L. gasseri* JCM 1131^{T} の LTA の構造解析を行うため，近年一般的であるブタノール抽出法と疎水性相互作用クロマトグラフィーによる精製によって *L. gasseri* JCM 1131^{T} から LTA の分離・精製を行った．その結果，対数期の *L. gasseri* JCM 1131^{T} の菌体約 25 g (湿重量) から精製 LTA を 38 mg 取得した．

第 3 章では，*L. gasseri* JCM 1131^{T} の LTA の構造解析に関して述べた．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, *L. 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. その結果, *L. 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 4 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, 4 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 *L. 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, 4 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, *L. 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.

第 4 章では, *L. gasseri* JCM 1131^{T} の LTA の細胞表層における局在 (細胞外への

露出の有無) に関して述べた. 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, *L. 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, *L 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.

第 5 章では, *L. gasseri* JCM 1131^{T} のコール酸耐性への LTA の関与について述べた. 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, *L. 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-アラニン残基が結合することで静電気的な反発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.

第 6 章では, これらの研究結果から得られた知見をもとに俯瞰的な考察を行った. 本研究ではこれまで全く情報がなかった *L. gasseri* JCM 1131^{T} の LTA について, その構造, 細胞表層での局在, コール酸耐性への関与を明らかにした. LTA の構造多様性や宿主との相互作用に関しては, 未だ不明な点が多い. したがって, 本研究で得られた結果は応用微生物学や免疫学などの学術分野の発展だけでなく, プロバイオティクスの開発などの応用面においても大いに貢献するものと考えられる.