

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380053

研究課題名（和文） 腸内乳酸菌の消化管内生き残り戦略：胆汁酸適応に関わる細胞表層機能の解析
研究課題名（英文） Survival strategy of intestinal lactic acid bacteria in the gut:
functional analysis of cell surface structure involved in bile acid
adaptation

研究代表者

横田 篤（YOKOTA ATSUSHI）

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50220554

研究成果の概要（和文）：

遊離胆汁酸はその細胞膜損傷作用により腸内細菌にとって最も過酷な環境ストレス因子になっている。これまでの研究で、研究代表者らは*Lactobacillus gasseri* JCM1131^Tにヒトの主要な胆汁酸であるコール酸に対する適応現象を見出している。これは、対数増殖期の細胞を非致死濃度である4mMのコール酸に30分間暴露した後、致死濃度の15mMのコール酸で処理したところ、7時間後でも生残率がほぼ100%であったのに対し、何も処理しない細胞は生残率が千分の一あるいは一万分の一に急速に低下したというものである。この際の適応細胞では、致死濃度のコール酸による細胞膜の損傷が軽減されていて、適応に伴う細胞膜脂質組成の変化が示唆された。

そこで適応細胞と非適応細胞から全脂質を抽出し、それらを中性脂質、糖脂質、リン脂質の3区分に分画した。それぞれの画分の比率は適応前後で変化なく、それぞれの画分の脂肪酸組成についても変化がなかった。しかし、糖脂質とリン脂質の組成に有意な変動があった。糖脂質では糖鎖の鎖長が長くなった。またリン脂質ではカルジオリピンの比率が有意に増大した。

コール酸適応におけるカルジオリピンの役割について調べるため、ベシクル実験を行った。その結果、カルジオリピンはコール酸による攻撃に対してベシクルに抵抗性を付与することが分かり、カルジオリピンが適応機構に深く関わっていることが示唆された。

本菌のゲノム上には、カルジオリピンの合成に作用すると考えられる2つのカルジオリピン合成酵素遺伝子が存在する。この遺伝子を単独又は両方欠損させた変異株を構築し、それらの株のコール酸適応能を調べた。単独欠損株ではいずれの株でもリン脂質画分におけるカルジオリピンの存在比が低下したが、コール酸適応により野生株並みに増大し、野生株と変わらないコール酸適応を示した。二重変異株ではカルジオリピンが殆ど検出されなかったが、それにも拘わらず、コール酸適応を示した。したがって、カルジオリピンはコール酸適応に必須ではないことが分かった。しかしこの二重変異株では、糖脂質含量の有意な減少とリン脂質含量の有意な増大が見られ、その変化は適応後により顕著になった。このことはカルジオリピンが細胞膜の脂質組成を決定する重要な役割を担っていることを示している。

研究成果の概要（英文）：

Free bile acids (FBAs) are considered the most deleterious stress compounds that inhibit the growth of intestinal bacteria by their membrane-damaging effect. Previously, we found adaptation in *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T to cholic acid (CA), one of the major FBAs in human intestine. In this adaptation, exponentially growing cells were first exposed to 4 mM CA, a sub-lethal concentration, for 30 min and then to lethal concentration at 15 mM. The adapted cells did not show any appreciable decrease in viability in the presence of 15 mM CA even after 7 h, while non-adapted cells rapidly lost viability by the factors of 10^{-3-4} . In the adapted cells a significant relief of membrane damage was observed in the presence of CA, suggesting alterations in lipid composition in the cell envelope.

Total lipids extracted from adapted and non-adapted cells were separated into three fractions, neutral lipids, glycolipids and phospholipids. Determination of amount of each fraction revealed no significant changes between adapted and non-adapted cells. Likewise, significant differences were neither found in fatty acids compositions of each fraction. However, significant alterations were detected in glycolipids and phospholipids compositions. In glycolipids, increases in the length of sugar chain were detected during the adaptation. Furthermore, a significant increase in relative amount of cardiolipin (CL) was observed in the phospholipid fraction.

To evaluate physiological importance of CL in CA adaptation, vesicle experiment was conducted. It was found that CL confers resistance to the liposome against CA attack, suggesting a pivotal role of CL in adaptation mechanism.

Mutants having deletion in two putative cardiolipin synthase genes (*cls*) singly or in combination were then derived, and their abilities in CA adaptation were investigated. Although CL levels of the both single-knockout mutants were lower than that of the wild type JCM1131^T, the levels were found to increase after exposure to 4 mM CA, and a comparable CA adaptation to the wild type strain was observed in both the mutants. The double-knockout mutant possessed negligible amount of CL but still showed CA adaptation, suggesting a dispensable role of CL in CA adaptation. However, in this mutant, significant decrease in glycolipid fraction and significant increase in phospholipid fraction were observed as compared to wild-type strain and these shifts were more prominent after CA adaptation. Therefore, CL was found to work as a key determinant for the lipid composition of the bacterial cell membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能，乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

プロバイオティクスによる保健効果が世界的に注目されている。プロバイオティクスとしては腸内乳酸菌，*Lactobacillus*属や*Bifidobacterium*属菌株が多用されており，多面的な有効性とその作用機構が明らかにされつつある。例えば，腸内乳酸菌等が生産する短鎖脂肪酸による「大腸上皮細胞の健全化」と「整腸効果」，短鎖脂肪酸による腸管

内pHの低下による「有害菌の排除効果」，さらに「腸管免疫の賦活効果」による発がんリスクの低減，感染症やアレルギー反応の抑制作用などである。プロバイオティクスは医療現場でも利用されており，「手術後の感染症抑制」などの臨床効果も報告されている。したがって，腸内乳酸菌が腸管内で健全に増殖できることは，これらの保健効果が発揮されるために極めて重要である。

摂取されたプロバイオティクスが遭遇するストレス因子としては、胃酸、消化酵素、胆汁酸、短鎖脂肪酸などが存在する。胆汁酸は界面活性作用を有し、脂質の消化吸収を補助するが、その一方でリン脂質から成る細菌の細胞膜に損傷を与え、致死的に作用する。このため胆汁酸は腸内細菌にとって最大のストレス因子となっている。

胆汁酸が様々な腸内細菌の生育を阻害することは比較的古くから知られていた。また、その作用点は細胞膜に対する「乳化作用」であるとされてきた。しかしながら、腸内乳酸菌における生育阻害機構の詳細は、研究代表者らが *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属菌株を用いて行った一連の研究により初めて解明された [J. *Bacteriol.* **182**, 6525 (2000), *Microbiology* **149**, 2031 (2003), J. *Bacteriol.* **188**, 1979 (2006)]. その要点は、腸管内の生理的濃度の胆汁酸による細胞死の直接の原因は細胞膜をミセル化して「乳化」することではなく、「膜損傷」であることを明らかにした点である：①胆汁酸が細胞膜に損傷を与え膜透過性が上昇する、②このため細胞膜内外の水素イオン濃度勾配（プロトン駆動力）が解消して細胞がエネルギー欠乏になる、③同時にカリウムイオンや代謝中間体が細胞内から漏出する、④細胞の恒常性が破綻し、細胞死に至る。このことは同時に「なぜ腸内乳酸菌は致死濃度の胆汁酸が存在する腸内環境で生存可能なのか」という疑問を提示することとなった。

これに関連して研究代表者らは、腸内乳酸菌の胆汁酸に対する「適応応答」を見いだしている。「適応応答」とは細胞を非致死濃度のストレスに短時間暴露することにより、致死濃度のストレスに対して耐性を獲得する現象のことで、微生物のストレス応答として一般的に知られている。研究代表者らは腸内乳酸菌として *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T を、胆汁酸としてコール酸を用い、本菌を非致死濃度のコール酸に予め短時間暴露すると、本菌が致死濃度のコール酸に対して耐性を獲得することを *Lb. gasseri* において初めて発見した。

胆汁酸に対する適応応答では、細胞膜への損傷が起こらないように胆汁酸を水際で排除する必要がある。したがって、複雑な細胞膜や細胞表層には何らかの胆汁酸特異的な変化が起こっている可能性が高い。これが

「胆汁酸特異的な防御応答」で、その解明が何より重要である。それを裏付けるように、既に研究代表者らはコール酸適応処理が致死濃度のコール酸による細胞膜損傷を軽減することを見出している。また、研究代表者は以前、胆汁酸耐性に関与する胆汁酸排出ポンプを乳酸菌で初めて発見した実績を持つが [J. *Bacteriol.* **182**, 5196 (2000)], 胆汁酸排出ポンプはここで言うところの胆汁酸特異的な防御機構の一つであると考えられる。

胆汁酸適応現象については、他菌種の乳酸菌でも報告がある [例えば *Enterococcus faecalis*, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2416 (1996), *Lactobacillus acidophilus*, *Curr. Microbiol.* **43**, 346 (2001)]. しかしこれらは現象を観察しているのみで、適応機構についての知見は皆無に等しい。「適応応答」の実験系とは異なるが、胆汁酸存在下での長期間培養、あるいは胆汁酸耐性変異株の解析も行われている [J. *Bacteriol.* **187**, 5799 (2005), *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6757 (2007)]. しかしこれらの場合には胆汁酸以外の因子（酸生成による pH 低下、培養フェーズの影響など）が錯綜し、胆汁酸特異的な応答を解析できない。このような実験系では胆汁酸に限らず多くの環境ストレスに防御作用を発揮するいわゆる“general stress protein”の発現上昇が見られている。これは胆汁酸がタンパク質や核酸の変性にも関与するためであると考えられる。

このように、これまでの研究は不十分であり、胆汁酸適応における「胆汁酸特異的な防御応答」の解明は急務と考えられた。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は「プロバイオティクスが消化液に含まれる胆汁酸による致死的な攻撃をどのような戦略で回避して腸管内に生息し、保健効果を発揮しているかを明らかにすること、また、その成果を微生物学の発展と食品産業に役立てること」である。乳酸菌の胆汁酸耐性機構についての知見はきわめて乏しい。そこで本研究では、腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* を用いて、特に細胞表層の構造と機能の変化に着目して「腸内乳酸菌の胆汁酸特異的な防御応答を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

以下I~IVについて、生理学的、遺伝子レベルの両方で解明する。

I. 適応処理が細胞脂質組成に与える影響の解析：*Lb. gasseri* JCM1131^Tの適応処理が細胞膜脂質組成におよぼす影響の詳細を解析する。膜小胞（リポソーム）を調製して胆汁酸による崩壊実験を行い、脂質組成の変化と胆汁酸耐性とを関連づける。

II. 適応処理がテイコ酸の構造と含有量に与える影響の解析：テイコ酸はいまだに機能が不明なグラム陽性菌の細胞壁成分である。適応処理がテイコ酸の構造と含有量に与える影響を調べ、テイコ酸が胆汁酸適応に関連しているかどうかを検討する。

III. 適応処理が遺伝子発現に与える影響の解析：*Lb. gasseri* JCM1131^Tにおいて胆汁酸ストレスがシグナルとなって惹起される遺伝子発現のグローバルな応答をDNAアレイ解析等により調べ、胆汁酸適応機構の解明に役立てる。

IV. 適応に関わる遺伝子の同定：I~IIIで得られた結果に基づき、ノックアウト株を構築して胆汁酸適応能や感受性等の変化を解析し、「胆汁酸特異的な防御応答」に関わる遺伝子を特定する。

4. 研究成果

Lactobacillus gasseri JCM1131^Tのコール酸適応現象の機構について解析し、以下の結果を得た。

I. 適応処理が細胞脂質組成に与える影響：本菌の細胞脂質組成を解析したところ、糖脂質、リン脂質、中性脂質が各々総脂質の75%、15%、10%含まれており、糖脂質の割合が極めて高いことが分かった。この値は細胞膜を分画して調べても同様であった。この脂質組成はコール酸適応後でも変化しなかったが、区分毎に精査すると、糖脂質とリン脂質の組成において変化が見られた。すなわち、本菌の糖脂質はグルコシル-ジアシルグリセロール(Glc-DG, GL1)、これにガラクトースが一つ付加したGal-Glc-DG (GL2)、二つ付加したGal-Gal-Glc-DG (GL3)、三つ付加したGal-Gal-Gal-Glc-DG (GL4)の4種類から成っていた。適応処理によりGL1とGL2の減少（GL1は9%から4%に、GL2は48%から34%にそれぞれ減少）とGL3とGL4の増大（GL3は29%から44%に、GL4は15%から19%に増大）が認められ、適応処理によって糖脂質の糖鎖が伸

長することが示唆された。一方、本菌のリン脂質は主としてホスファチジルグリセロール(PG)とカルジオリピン(CL)から成り、コール酸適応前はPG:CL=65:21(総リン脂質に対する構成%)であるのに対し、適応後はCLの割合が増大し、PG:CL=29:51に逆転した。コール酸適応においてこのリン脂質組成の変動がどのような寄与をしているか知るために、CLとPGを用いて膜小胞を調製してコール酸による崩壊実験を行った。その結果、CL/PG比の増大が細胞膜を強化することを認め、CLが胆汁酸耐性に寄与していることを初めて明らかにした。一方、糖脂質の鎖長伸長がコール酸適応にどのような影響を与えているかについては明らかにできなかった。細胞表層の変化を電顕観察し、コール酸は細胞膜のみならず、細胞壁にも甚大な損傷を与えることを認めた。

II. 適応処理がテイコ酸の構造と含有量に与える影響の解析：ブタノール抽出法により、コール酸適応前後の菌体からリポテイコ酸(LTA)を分離精製し、構造を決定した。NMR解析により本菌のLTAはグリセロールリン酸と2-アラニルグリセロールリン酸の2種類のモノマーユニットをもつこと、GC解析によりLTAのアンカー糖脂質の脂肪酸組成はオレイン酸を主体とすることが明らかになった。これらには適応前後で構造や組成上の差は見出されなかった。

さらに、LTAの量と鎖長について新たに開発したイムノプロット法により解析したところ、量については適応前後で差を認めなかったが、鎖長については、適応後に長鎖長のLTAの減少と短鎖長のLTAの増加が検出された。この変化はLTAの分布をより密にし、コール酸の電気的な排斥力の強化をもたらす可能性があると考えられた。

III. 適応処理が遺伝子発現に与える影響：DNAアレイ解析を行った結果、コール酸適応によって多数の遺伝子の発現に変動が見られたが、表層の変化に関わる発現変動を理解することはできなかった。コール酸適応に伴いリン脂質カルジオリピン(CL)含量の増大が見られたため、その生合成系の発現変動をリアルタイムPCRにより調べた。本菌のゲノム上にはカルジオリピン合成酵素遺伝子(*cls*)と推定される遺伝子が二つあるが、これらの発現には適応前後で有意差は見られなかった。

IV. 適応に関わる遺伝子の同定：CLが本菌の

適応に重要な役割を担っていると考えられたので、ゲノム上の二つの推定*cls*の単独及び二重ノックアウト株を作出したが、いずれの株もコール酸適応を示した。そこでこれらの変異株の脂質解析を行った。その結果、リン脂質に占めるCL含有率はいずれの*cls*欠失によっても野生株に比べて低下し、二重欠失株では殆ど検出されなくなった。このことから両*cls*はカルジオリピン合成酵素遺伝子であると結論した。二重欠失株と異なり、2つの単独欠失株では適応後にCL含有率の有意な上昇が見られた。これは残存する*cls*によりCL合成が促進されるためと考えられ、適応におけるCLの重要性が窺われた。一方、二重欠失株では野生株に比べて全脂質に占める糖脂質含有率の減少とリン脂質含有率の上昇が見られ、この傾向は適応後により強くなった。したがって、CLは細胞膜脂質組成の決定に強く関わるということが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 横田篤, 乳酸菌・ビフィズス菌における胆汁酸ストレス応答, *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, **21**, 87-94 (2010). (査読無)
- ② Islam KBMS, Fukiya S, Hagio M, Fujii N, Ishizuka S, Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Yokota A. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* 2011; 141:1773-81 (査読有) .

[学会発表] (計17件)

*口頭発表 (注:ポスターも含む:ポスター発表は最後にポスターと記載)

- ① 加藤慎二, 澤田真理子, 松原裕樹, 森田直樹, 佐々木泰子, 扇谷悟, 吹谷智, 横田篤 腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* JCM1131^Tにおけるコール酸適応機構と細胞膜脂質組成変化の関連性 日本乳酸菌学会誌, p.70 2009年7月6日, ベルクラシック甲府

- ② 横田篤, *Lactobacillus gasseri* JCM1131^Tの胆汁酸適応に伴う脂質組成の変化:膜リン脂質カルジオリピンの新たな役割, 日本乳酸菌学会秋期セミナー, 2009年11月27日, 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都)
- ③ 加藤慎二, 森田直樹, 佐々木泰子, 扇谷悟, 吹谷智, 横田篤 腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* JCM1131^Tにおけるコール酸適応機構と細胞膜脂質組成変化の関連性, 日本農芸化学会 2010年度大会講演要旨集, p73, 2010年3月28日, 東京大学
- ④ Atsushi Yokota, Impact of cholic acid-supplemented diet on bile acid metabolism and microbiota composition in rat cecum, The 5th Japan-Finland Biotechnology Symposium Programme Abstracts, p.15, 2010年6月9日, Turku, Finland
- ⑤ K.B.M. Saiful Islam, 萩尾真人, 石塚敏, 吹谷智, 横田篤 16SrRNA 遺伝子クローンライブラリー法による胆汁酸添加食摂取ラット腸内菌叢の解析, 腸内細菌学会雑誌 p.91, 2010年6月17日, 京都大学百周年時計台記念館「百周年記念ホール」
- ⑥ 戸部はるひ, 澤田真理子, 加藤慎二, 森田直樹, 佐々木泰子, 扇谷悟, 吹谷智, 横田篤 *Lactobacillus gasseri* JCM1131^Tにおける推定カルジオリピンシンターゼ遺伝子欠失がコール酸適応現象に与える影響, 農芸化学会北海道支部会 平成22年度第1回合同学術講演会 要旨集 p.19, 2010年7月24日, 北海道大学
- ⑦ 横田篤, 腸内細菌・乳酸菌の胆汁酸ストレス研究, 2010年日本乳酸菌学会 設立20周年記念シンポジウム 講演要旨集 p.43-47, 2010年11月20日, 北里大学 薬学部コンベンションホール
- ⑧ slam K.B.M. Saiful, 吹谷智, 萩尾真人, 石塚敏, 横田篤 コール酸添加食摂取がラット盲腸内の細菌叢および胆汁酸代謝に与える影響, 日本農芸化学会 2011大会

講演要旨集, p.260, 2011年3月27日, 京都女子大学

- ⑨ 戸部はるひ, 澤田真理子, 加藤慎二, 森田直樹, 佐々木泰子, 扇谷悟, 横田篤, 吹谷智 *Lactobacillus gasseri* JCM1131^Tにおける推定カルジオリピンシンターゼ遺伝子欠失がコール酸適応現象に与える影響, 日本農芸化学会 2011 大会講演要旨集, p.113, 2011年3月26日, 京都女子大学
- ⑩ 白石宗, 富田理, 田中尚人, 吹谷智, 森田直樹, 横田伸一, 岡田早苗, 横田篤 *Lactobacillus gasseri* JCM1131^Tの胆汁酸適応におけるリポテイコ酸の役割, 平成23年度 日本農芸化学会 北海道支部夏季シンポジウム要旨集, p.21, 2011年8月6日, とちぎプラザ (ポスター発表)
- ⑪ Atsushi Yokota, K.B.M. Saiful Islam, Masahito Hagio, Nobuyuki Fujii, Satoshi Ishizuka, Satoru Fukiya, Bile acid is a host factor that regulates the composition of rat cecal microbiota, 10TH SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA Abstract book, 2010年8月29-30日, Egmond aan Zee, The Netherlands. (ポスター発表)
- ⑫ Tsukasa Shiraishi, Satoru Tomita, Naoto Tanaka, Satoru Fukiya, Naoki Morita, Shin-ichi Yokota, Sanae Okada, Atsushi Yokota Lipoteichoic acid in *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T and its role in bile acid adaptation, 10TH SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA Abstract book, 2010年8月29-30日, Egmond aan Zee, The Netherlands. (ポスター発表)
- ⑬ Haruhi Tobe, Mariko Sawada, Shinji Kato, Naoki Morita, Yasuko Sasaki, Satoru Ogiya, Satoru Fukiya, Atsushi Yokota Role of cardiolipin for acquisition of cholic acid resistance in *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T 10TH SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA Abstract book, 2010年8月29-30日, Egmond aan Zee, The Netherlands. (ポスター発表)
- ⑭ Atsushi Yokota, Haruhi Tobe, Mariko Sawada,

Shinji Kato, Hiroki Matsubara, Naoki Morita, Yasuko Sasaki, Satoru Ogiya, Satoru Fukiya, Role of cardiolipin for acquisition of cholic acid resistance in *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T The 6th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria Program and Abstracts p.87, 2011年9月9日, 札幌市産業振興センター

- ⑮ K.B.M. Saiful Islam, Masahito Hagio, Nobuyuki Fujii, Satoshi Ishizuka, Satoru Fukiya, Atsushi Yokota, Bile Acid is a host factor that regulated the composition of rat cecal microbiota, The 6th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria Program and Abstracts p.10,48, 2011年9月9日, 札幌市産業振興センター (口頭・ポスター発表)
- ⑯ Tsukasa Shiraishi, Satoru Tomita, Naoto Tanaka, Satoru Fukiya, Naoki Morita, Shin-ichi Yokota, Sanae Okada, Atsushi Yokota Lipoteichoic acid in *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T and its role in bile acid adaptation, The 6th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria Program and Abstracts p.87, 2011年9月10日, 札幌市産業振興センター (ポスター発表)
- ⑰ 白石宗, 富田理, 田中尚人, 吹谷智, 森田直樹, 横田伸一, 岡田早苗, 横田篤 *Lactobacillus gasseri* JCM1131^T のリポテイコ酸: 胆汁酸適応への関与 日本農芸化学会 2012 大会講演要旨集, 3C24p07, 2012年3月24日, 京都女子大学

[図書] (計1件)

Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research, K. Sonomoto, A. Yokota (eds), Caister Academic Press, Norfolk, UK, (2011).286

6. 研究組織

(1)研究代表者

- ・横田 篤 (YOKOTA ATSUSHI)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 50220554

(2)研究分担者

- ・吹谷 智 (FUKIYA SATORU)

北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：10371057

・森田 直樹 (MORITA NAOKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長
研究者番号：60371085

・横田 伸一 (YOKOTA SHIN-ICHISHI)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10325863

(3)連携研究者
()

研究者番号：