

令和元年5月8日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15247

研究課題名(和文) リポテイコ酸の構造多様性と乳酸菌の特異的LTAの免疫誘導能の解明

研究課題名(英文) Structural diversity and specific immunomodulatory potential of lipoteichoic acids in lactic acid bacteria

研究代表者

白石 宗 (Shiraishi, Tsukasa)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70725168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Lactobacillus gasseri を中心に、種および株レベルでのリポテイコ酸(LTA)の構造多様性を調べ、これらの構造と免疫調節能の関わりを解明することを目的とした。7菌株の L. gasseri のLTAの構造解析を行ったところ、本菌種特異的なLTAの構造を明らかにした。ヒト腸管上皮細胞株のIL-8産生誘導能を他菌種のLTAを比較対照として検討したところ、リポ多糖刺激によるIL-8産生誘導に対し、いずれの菌種のLTAも抑制活性を示したが、L. gasseri のLTAは抑制が有意に弱かった。LTAの細胞表面での局在観察では、生育段階におけるLTAの劇的な局在変化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LTAは、細菌にとっての生理学的な役割だけでなく、免疫調節など宿主と相互作用する細胞表面分子である。株レベルで構造に多様性があることが報告されているが、その大部分は病原性細菌のものである。本研究では、有用細菌であるヒト腸管乳酸菌の L. gasseri を中心に、種特異的なLTAの構造を明らかにし、このLTAに特徴的な免疫反応調節活性が示唆されたことは、LTAを介した宿主と細菌との相互作用機序の解明において重大な意義を持つ。さらに、将来的にLTA自体を免疫調節剤としてのバイオジェニクスとして応用することも可能であると考えられ、社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：I investigated structural diversity of lipoteichoic acids (LTA) of lactic acid bacteria, such as Lactobacillus gasseri, and aimed to elucidate relationship between the specific structures and immunomodulatory activity. LTA structural analysis was performed for seven strains of L. gasseri. A structure common to all strains was found, suggesting that the structure is species-specific. L. gasseri LTA showed lesser inhibitory activity of lipopolysaccharide-induced IL-8 production in a human intestinal epithelial cell line than Staphylococcus aureus and Lactococcus lactis ones. Localization of LTA in the bacterial cell surface showed dramatic change at each growth phase.

研究分野：応用微生物学

キーワード：グラム陽性細菌 乳酸菌 Lactobacillus gasseri リポテイコ酸 表面局在

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

グラム陽性細菌の表層分子のリポテイコ酸(LTA)は、糖脂質部位を介して細胞膜にアンカーする糖リン酸ポリマーであり(図1) 宿主の免疫応答に影響を与える。また、免疫調節活性にはLTAの構造が重要であることが示唆されている。一方で、乳酸菌のような有用細菌のLTAの構造情報が少ないという背景から、申請者はヒト腸管乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* の基準株のLTAを解析して、本菌株において新奇のLTAの構造や *Lactobacillus* 属に共通の構造を発見した。しかし、同菌種内において複数株の構造比較が行われた例はほとんど無く、その構造多様性はわかっていない。さらに、これまで53種91株でLTAの全体構造が明らかになっているが、その約80%は病原性細菌であり、有用細菌由来のLTAの構造情報は未だ不十分である。

### 2. 研究の目的

本研究では、有用細菌であるヒト腸内乳酸菌 *L. gasseri* の種および株レベルでのLTAの構造多様性を調べるとともに、本菌株にみられる特異的なLTAの構造と免疫誘導能の関わりを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、LTAの構造多様性および特異的なLTAの構造と免疫調節能の特徴を明らかにするため、以下に示す研究計画を遂行する。

(1) *L. gasseri* を中心に複数株のLTAを取得して、その構造を決定し、過去のLTA構造情報と合わせ比較評価を行う。

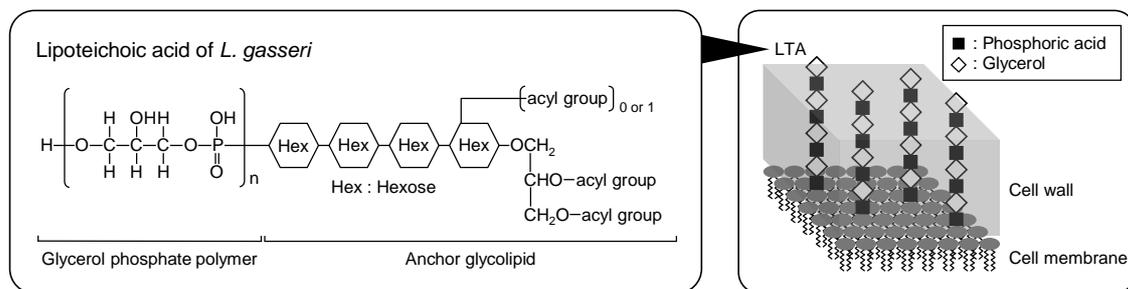
(2) 精製したLTAを用いて、免疫調節能(サイトカイン誘導能)に対する影響の評価を行い、特異的なLTAの構造がもつ免疫調節能の特徴を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) *L. gasseri* を中心としたLTAの構造情報の収集による構造多様性の解明

*L. gasseri* 種のJCM 1131<sup>T</sup>、JCM 1130、JCM 5814、VLG1、VLG2、VLG3、VLG4の計7菌株についてLTAの構造解析を行った。臨床分離株であるVLG1、2、3、4は、random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR法によって同一菌株に由来するものではないことを確認した。ブタノール抽出法によってLTAを抽出・精製して、NMRおよびMALDI-TOF MS、GC-MSによって構造解析を行った。その結果、ポリマー部位は全ての菌株でD-アラニンにより部分的に置換されたグリセロールリン酸ポリマーであり、*L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> で初めて発見された四糖と三残基のアシル基をもつ特異的なアンカー糖脂質が全ての菌株で確認された(図1)。四糖構造は、乳酸菌を含むグラム陽性細菌ではこれまで報告がなく、*L. gasseri* 種のLTAは共通する種特異的な構造であることが示唆された。さらに、LTAの構造と免疫調節能を評価するため、比較対照として *Lactobacillus plantarum* (*L. gasseri* 種以外の *Lactobacillus* 属細菌)、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (*Lactobacillus* 属細菌以外の有用細菌)、*Staphylococcus aureus* (病原性細菌)、*Enterococcus faecium* (日和見細菌) からLTAを抽出・精製して、前述した方法と同様にLTAの構造解析を行った。その結果、*L. plantarum* では三糖と三残基のアシル基をもつLTAが、*L. lactis* では二糖と三残基のアシル基をもつLTAが、*S. aureus* と *E. faecium* では二糖と二残基のアシル基をもつLTAが確認された。

図1



(2) 特異的な構造をもつ *L. gasseri* のLTAの免疫調節能の評価

ヒト腸管上皮細胞株 HT-29 を使用して、上記で構造を明らかにした *L. gasseri*、*L. lactis*、*S. aureus* 由来のLTAの曝露による炎症性サイトカイン IL-8 の産生量を比較することで、*L. gasseri* のLTAの免疫調節能を評価した。その結果、LTA単独刺激の場合、*S. aureus* のLTAにのみ有意なIL-8の産生誘導が認められた(図2)。さらに、リポ多糖(LPS)刺激によるIL-8産生誘導に対しては、3株全てのLTAでLPSによるIL-8産生誘導が有意に抑制された。その抑制活性は *L. gasseri* のLTAが他に比較して有意に弱かった(図2)。各死菌体の刺激では、3株全てでIL-8産生誘導、およびLPSにより誘導されるIL-8産生の変化に対する影響は認められなかった(図3)。以上により、HT-29細胞におけるIL-8産生において、*L. gasseri* の菌体は *L. lactis* や *S. aureus* と同様に変化を与えないことが明らかになった。一方、LTAでは単独刺激で *L. gasseri* と *L. lactis* はIL-8の産生に影響を与えず、LPSによるIL-8の産生

誘導に対しては、*L. gasseri* でのみ抑制活性が弱いという特徴が認められた。これは *L. gasseri* の LTA の特異的な構造と特徴的な生物活性との相関を示唆するものである。今後は LTA の純度の向上や、比較対照をより広げることなどによって、*L. gasseri* の LTA の特徴をより明確なものにしていく必要がある。

図2

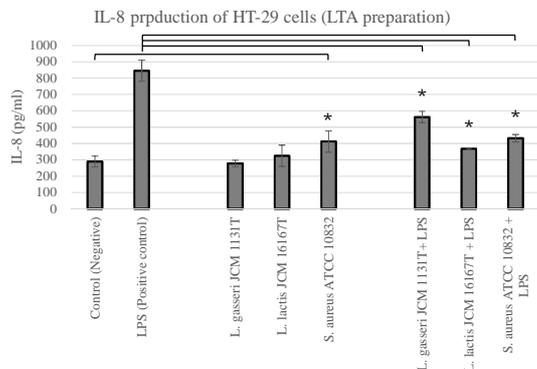
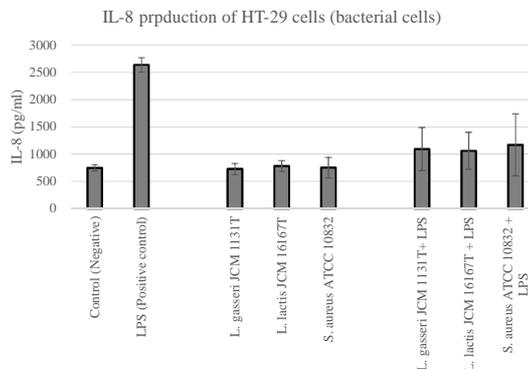


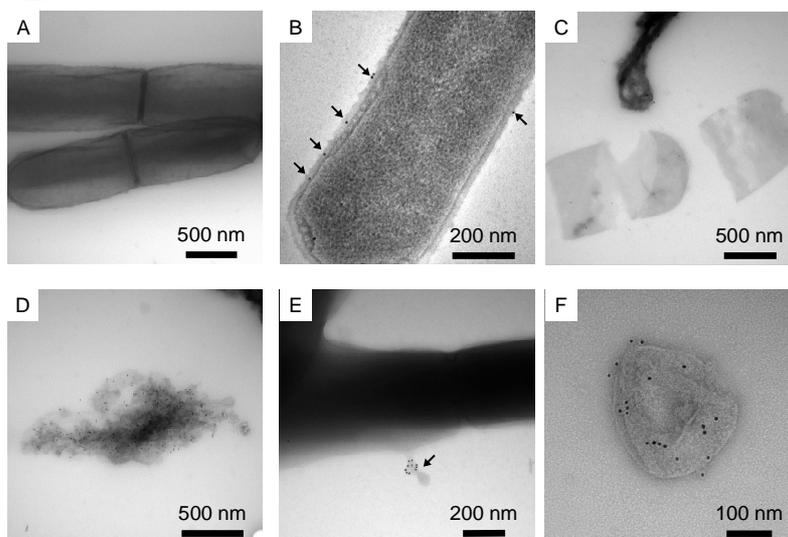
図3



### (3) 細胞表面における LTA の局在観察

LTA は宿主の免疫細胞に認識されて、免疫応答を惹起させる分子であると考えられており、この局在を観察することは、宿主と細菌の相互作用メカニズムを考える上でも重要である。しかしながら、これまで LTA の詳細な局在を視覚的に観察した例はほとんどない。そこで、*L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> を用いて、免疫電子顕微鏡法によって対数期から死滅期にかけての各生育段階での LTA の局在を観察した。その結果、対数期では LTA が細胞膜にアンカーされて細胞壁内部に局在し、細胞外には露出していないことが示唆された (図 4A, B)。しかし、本菌株から取得された膜小胞画分を免疫電顕法で観察したところ膜小胞と考えられる多数の小胞構造が確認され、その表面に LTA が確認された (図 4E, F)。これは、対数期において LTA は菌体表面には露出しておらず、産生された膜小胞の表面で LTA が露出していることを示唆する。一方、定常期では一部の細胞に溶菌が見られ、それに伴って細胞壁片や細胞外に放出された膜成分と考えられる構造体が観察された (図 4C, D)。これらの構造体には LTA の存在が認められた。以上の結果は、細胞壁に埋没していた LTA が、定常期および死滅期に生じる溶菌に伴って、死菌由来の構造物上で露出していることを示唆する。以上の結果は、生育段階における LTA の劇的な局在変化を示しており、細菌と宿主との相互作用を考える上で重要な知見であると考えられる。

図4



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shiraishi T, Yokota S, Sato Y, Ito T, Fukiya S, Yamamoto S, Sato T, Yokota A, Lipoteichoic acids are embedded in cell walls during logarithmic phase, but exposed on membrane vesicles in *Lactobacillus gasseri* JCM 1131<sup>T</sup>, *Benef Microbes*, 査読有, 9, 2018, pp.653-662, DOI: 10.3920/BM2017.0124

白石宗、横田伸一、吹谷智、横田篤、リポテイコ酸の構造多様性から見える乳酸菌の特徴、*JATAFF ジャーナル*、査読無、5 巻、2017、pp.26-32

白石宗、横田伸一、吹谷智、横田篤、構造情報の蓄積から見てきたリポテイコ酸の細菌種による構造多様性、*日本乳酸菌学会誌*、査読無、28 巻、2017、pp.177-177

〔学会発表〕(計 4 件)

白石宗、横田伸一、佐藤耶舞羽、伊藤利章、吹谷智、山本聡、佐藤豊孝、横田篤、乳酸桿菌の対数期に膜小胞上に局在するリポテイコ酸、2018年度日本乳酸菌学会、2018年  
久富亮佑、白石宗、佐藤豊孝、横田伸一、Lipoteichoic acid of *Lactobacillus gasseri* influences IL-8 production in intestinal epithelial cells、第91回日本細菌学会総会、2018年  
白石宗、横田伸一、*Lactobacillus gasseri*に見られる種特異的なリポテイコ酸の化学構造、第23回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2017年  
久富亮佑、白石宗、佐藤耶舞羽、森田直樹、吹谷智、佐藤豊孝、横田篤、横田伸一、*Lactobacillus gasseri*種に共通する種特異的なリポテイコ酸の化学構造、2017年度日本乳酸菌学会、2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。