

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05405

研究課題名(和文) アンカーレスタンパク質を介した乳酸菌の宿主接着機構の解明

研究課題名(英文) Study on binding mechanism of lactic acid bacteria to the host via anchorless proteins

研究代表者

福田 健二 (Fukuda, Kenji)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：80419217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌が宿主との接着に必要なタンパク質の一つである30Sリボソームタンパク質S19 (RpsS)が、どのようにして乳酸菌の表面に提示されるか、そのメカニズムの一端を明らかにした。すなわち、菌体内で生合成されたRpsSは、対数増殖期の初期に生じる菌体透過性の一過的な上昇に伴い菌体外へと漏出し、菌体表面に存在する酸性の糖と強く結びつくことで定着することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分泌シグナル配列を持たないムーンライティングタンパク質が、メンブレンベシクルではなく菌体透過性の一過の上昇により分泌されることを部分的に明らかにした。また、アンカー領域を持たない同タンパク質が、菌体表層に菌株特異的に存在する糖質と静電相互作用を介し固定化されることを明らかにした。本研究を発展させれば、乳酸菌の宿主接着メカニズムに関する知見が深まる。また、本研究の成果を生かし、乳酸菌あるいはその菌体表層タンパク質を用いて細胞外マトリクスを感染の足場として利用する病原菌の宿主接着を拮抗的に阻害する手法を確立することで、抗生物質使用量低減の実現につながる。

研究成果の概要(英文)：Mechanism how a moonlighting protein, 30S ribosomal protein S19 (RpsS), is immobilized on the bacterial cell surface of *Lactobacillus rhamnosus* strain FSM22 has been partially elucidated in this study. After the synthesis of RpsS in the cytoplasm, it leaks out from the bacterial cells involved with their temporal increase in the cell permeability. Then, the secreted RpsS binds tightly with acidic carbohydrate which exist on the bacterial cell surface via electrostatic interaction.

研究分野：食品微生物学

キーワード：ムーンライティングタンパク質 細胞外マトリクス 病原菌接着阻害 乳酸菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳酸菌には宿主の細胞外マトリクス (extracellular matrix, ECM) 構成タンパク質に対し接着性を示すものが存在し、その接着分子として繊毛タンパク質、細胞壁アンカー型タンパク質である S-レイヤータンパク質、アンカーレスタンパク質である enolase, glutamine synthetase, glucose-6-phosphate isomerase などのムーンライティングタンパク質が見出されていた。ECM 構成タンパク質は緑膿菌をはじめとする複数の病原菌が感染初期に標的とする物質のひとつであり、仮に腸内共生菌である乳酸菌などが ECM に接着することができれば、競合的に病原菌の接着を阻止し、感染を予防できるのではないかと考えられている。

(2) 一方、ムーンライティングタンパク質は菌体外に存在するにもかかわらず、菌体外分泌に関連するコンセンサス配列が見つからず、菌体表層への提示機構は不明であった。仮説として、(i) 菌体表層の透過性が増加し、非特異的に細胞質由来タンパク質が漏出する、(ii) 未知の輸送経路が存在する、(iii) 傷ついた菌体や死菌体から漏出した細胞質由来タンパク質が生菌体の表層へ定着する、などが提唱されていた。

(3) 筆者はインドネシア国スンバワ島で飼育されている馬の乳から製造された発酵馬乳を単離源とし、プロバイオティクス候補乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* を数菌株取得した。そのうち *L. rhamnosus* FSMM22 株は *L. rhamnosus* FSMM15 株と比較し、ECM 構成タンパク質の一つであるラミニンに対して 100 倍程度強く結合し、その菌体表層に局在するタンパク質群のなかにラミニン結合タンパク質として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), lactate dehydrogenase (LDH), DNA-binding protein HU, 30S ribosomal protein S19 (RpsS) を見出した。

### 2. 研究の目的

RpsS の菌体表層提示に係る分子機構を明らかにする。すなわち、分泌シグナル配列やアンカーモチーフを持たないアンカーレスタンパク質である RpsS が、どのようなメカニズムで菌体表層に移行し、固定されるのかを解明する。また RpsS とラミニンの接着に係る分子機構について明らかにし、乳酸菌の宿主接着メカニズムの一端を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) RpsS の遺伝子発現解析

各菌株を接種し MRS 培地中 37 °C で 20 時間嫌氣的に静置培養して得られた培養液から遠心分離により菌体を回収し、PBS で数回洗浄した。定法に従い mRNA を精製後、逆転写し cDNA を調製した。得られた cDNA を鋳型とし、RpsS 特異的プライマーとして RpsS1: TACACCATCGCCGTTTAC および RpsS2: TTCGCCTAACTTGTGACC を用いたリアルタイム PCR により遺伝子発現量を見積もった。なお、対照には 16S rDNA 遺伝子を鋳型とし、特異的プライマーに 16S1: GTAGGGAATCTTCCACAATGGACG および 16S2: GTTCCACTGTCCTCTTCTGCAC を用いたリアルタイム PCR を実施した。

#### (2) RpsS の一次構造比較

上述の方法で調製した菌体に 1 M 塩化リチウム溶液を添加し、緩やかに攪拌しながら 4 °C で 1 時間保持した。同溶液を遠心分離に供し、得られた上清を孔径 0.2 μm のフィルターを用いて濾過し、得られた濾液を SDS-PAGE に供した。泳動後のゲルからタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、抗 RpsS ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析により RpsS を含むタンパク質バンドを特定した。同タンパク質バンドを切り出し、定法に従いゲル内トリプシン消化並びにカルバミドメチル化し、MALDI-TOF MS/MS による一次構造解析を実施した。

#### (3) 菌体表層が示す物理化学的特性の解析

10<sup>8</sup> CFU/mL に調整した培養液に等量のキシレンと混合し、5 分間激しく攪拌した。その後、室温で 1 時間保持し、波長 600 nm における吸光度を測定した。キシレン混合前の培養液濁度と上述の処理後に測定した濁度の比を疎水度とした。

#### (4) 菌体表層構造の観察

上述の方法で得た培養液に対し、溶解後、固化しない程度に冷却した 4% 低融点アガロースを等量添加し軽く攪拌した。得られたゲル片を 2.5% グルタルアルデヒド溶液に浸漬し固定した。同ゲル片をリン酸緩衝液で数回洗浄後、1% 四酸化オスミウム溶液に浸漬し、エタノール溶液を用いて段階的に脱水した。これを LR ホワイト樹脂に包埋し、60 °C で一晩重合した。得られた包埋試料からウルトラミクロトームを用いて 90 nm 厚の超薄切片を作製し、銅グリッド上で乾固後、加速電圧 80 kV の条件で透過型電子顕微鏡観察に供した。

#### (5) 菌体表層構成成分の単離

上述の方法で得た菌体を 1 g/mL となるよう 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、これに対しニトリ卵白由来リゾチーム溶液を終濃度 6 mg/mL となるよう添加後、時々攪拌しながら 37 °C で 1 時間保持した。同菌懸濁液を遠心分離に供し、沈殿を適量の 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) に再懸濁した。あらかじめ 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で洗浄した粒径 0.1 μm のガラスビーズに等量の再懸濁液を添加し、4500 rpm, 4 °C, 3 分間の条件で 2 回ビーズ式細胞



碎残渣を 80% フェノール抽出に供し、得られた水層画分において両菌株間に顕著な相違を見出した(図 3)。すなわち、FSMM22 株においてのみ、約 0.35 M 塩化ナトリウムにより溶出される糖質の存在を確認した。図には示さないが、無細胞抽出液中にも FSMM22 株においてのみ、同様の糖質画分の顕著な存在を認めた。なお、フェノール硫酸法により求めた培養液上清中の糖濃度は FSMM15 株が約 5.3 mg/ml、FSMM22 株が約 8.5 mg/ml であり、有意差は認められなかった。また、各抽出過程におけるタンパク質濃度にも両菌株間で有意差は認められなかった。以上から、透過型電子顕微鏡観察において FSMM22 株に顕著に認められた菌体表層成分は酸性糖質であると強く示唆された。

### (3) 菌体透過性の比較

近年、ピフィズス菌研究などにおいて様々な細胞質成分がメンブレンベシクルに含まれた状態で菌体外へ分泌されることが示されている。そこで、本研究で用いた 2 菌株においてメンブレンベシクルが産生されるのか、またその産生量に違いがあるか確認するために経時的に培養液を回収し透過型電子顕微鏡観察を試みた。その結果、メンブレンベシクル様の膜小胞構造を確認することができたものの(図 4)、培養時間あるいは菌株間において顕著な差異は認められなかった。

次に、細胞質タンパク質の指標として RNA ポリメラーゼを用い、菌体表層並びに培養上清における RpsS と RNA ポリメラーゼの発現量をウエスタンブロット法により経時的に解析し、培養時間の経過に伴う菌体透過性の変化を調べた。その結果、FSMM15 株において、いずれの培養時間においても、菌体表層と培養上清中に RpsS 並びに RNA ポリメラーゼの発現は認められなかったが、細胞質には RpsS および RNA ポリメラーゼいずれの発現も認めた(図 5)。一方、FSMM22 株においては対数増殖期初期(10 h)、対数増殖期後期(20 h)、定常期(30 h)いずれにおいても菌体表層に RpsS の発現を認めた。FSMM22 株培養上清中には RpsS が検出されなかったことから、RpsS の菌体表層への強固な結合が確認できた。また、FSMM15 株同様 FSMM22 株においても細胞質に RpsS および RNA ポリメラーゼいずれの発現も認めた。興味深いことに、FSMM15 株では細胞質に局在していた RNA ポリメラーゼが、FSMM22 株では菌体表層にも確認できた。また、RNA ポリメラーゼの菌体表層における発現は対数増殖期初期で最も強く、対数増殖期後期または定常期ではほぼ検出限界以下であった。以上から、FSMM22 株は対数増殖期初期において一過的に菌体透過性の増加することが示唆された。

### (4) 組換え体 RpsS の作製

上述の方法に従い、組換え体 RpsS 発現用コンストラクトの構築に成功した。

### (5) RpsS の菌体表層提示機構(仮説)

本研究により、*L. rhamnosus* FSMM22 株がどのようにして菌体表層に RpsS を提示することができるのか、その概要を明らかにすることができた。すなわち、菌体内で生合成された RpsS が細胞質内を移動し、菌体表層近くに到達する。菌体の分裂が活発な対数増殖期初期において、菌体の透過性が一過的に上昇し、非特異的に菌体内成分が漏出する。次いで、菌体表層に分泌された酸性糖質に RpsS が静電的に強く結合し、固定される。この仮説には、さらに検証すべき課題が多くある。RpsS は菌体内でどのようなメカニズムで菌体表層近傍へ移動するのか？一過的な菌体透過性上昇のメカニズムは？菌体内成分の漏出は非特異的なのか、あるいは酸性糖質の生産と関連があるのか？酸性糖質の化学構造は？酸性糖質と RpsS はどの部位を認識して結合するのか？本研究において作製に成功した組換え体 RpsS を用い、試験管レベルの実験によりこれらの問いを一部検証することが可能である。また、*L. rhamnosus* FSMM22 株そのもの、あるいは組換え体 RpsS をビーズなどに固定化し、病原菌のラミニンまたは ECM への接着阻止が可能か、今後検証する予定である。

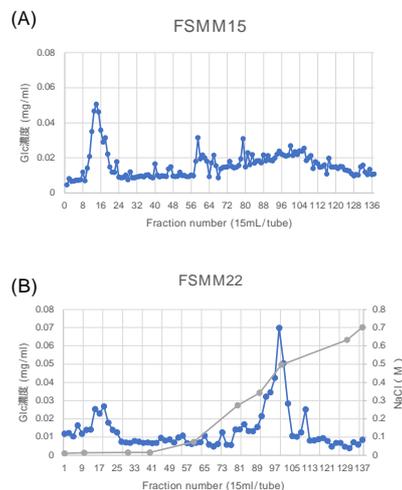


図 3. FSMM15 株 (A) および FSMM22 株 (B) の菌体残渣から得られた酸性糖質の陰イオン交換クロマトグラム

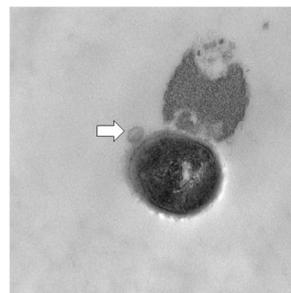


図 4. FSMM22 株に見出されたメンブレンベシクル様構造(矢印)

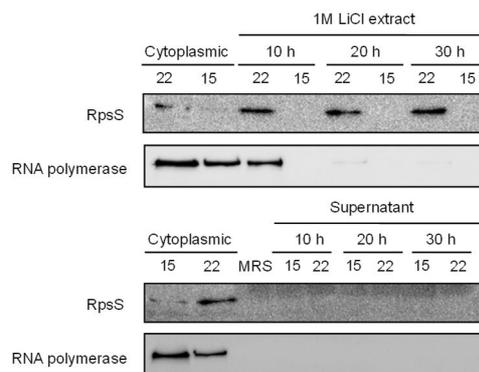


図 5. 培養上清および菌体表層における RpsS と RNA ポリメラーゼの局在性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenji Fukuda
2. 発表標題 Beneficial lactobacillus strains isolated from traditional fermented milks produced in South and South East Asia
3. 学会等名 9th International Conference on Fermented Foods, Health Status and Social Well-being (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------