

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570141

研究課題名(和文)細菌の感染と共生における消化管の糖脂質受容体と細菌の糖脂質抗原の役割

研究課題名(英文)Role of the glycolipid receptor in the digestive tract and bacterial glycolipid antigen in bacterial infection and symbiosis

研究代表者

岩森 正男 (IWAMORI, Masao)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：90110022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全scidと対照マウスの腸内乳酸菌は全く異なっており、scidは*L. murinus*、対照マウスは*L. johnsonii*であった。対照マウス盲腸、結腸内容物は固形であるのに対し、scidは水分が多く、下痢状であった。抗原糖脂質を解析したところ、LJはGal 1-6結合を持つLacTH-DGとLacTetH-DG、LMはGlc 1-6結合を持つLac TH-DGを含んでいた。LacTH-DGとLacTetH-DGに対する自然抗体の結合活性はABO血液型糖脂質に匹敵していた。一方、LMが優勢菌種となっているscidではGA1のフコシル化が促進しており、LJの結合が妨害されていた。

研究成果の概要(英文)：Intestinal lactobacilli in immune-deficient scid mice were distinct from those in control mice, i.e. *L. murinus* (LM) for scid and *L. johnsonii* (LJ) for control, respectively, which were closely related with the loose and solid properties of the caecal and colonic contents of scid and control mice, respectively. LJ contained LacTH-DG and LacTetH-DG, both of which were modified LacDH-DG with Gal 1-6 linkage, whereas, LM contained Lac TH-DG modified LacDH-DG with Glc 1-6 linkage. Since natural antibodies toward LacTH-DG and LacTetH-DG were frequently detected in human sera, irrespective of ABO-blood groups, in the similar intensities as those toward blood groups- and species-specific glycolipids, immune system is involved in the establishment of symbiotic relationship with bacteria in the intestine. On the other hand, enhanced fucosylation of GA1 as a receptor for LJ occurred in the digestive tracts of scid mice, probably to interfere the formation of bacterial flora of LJ by LM.

研究分野：生物学

キーワード：共生細菌 グリセロ糖脂質 スフィンゴ糖脂質 自然抗体 TLC-免疫染色 細菌受容体糖脂質 GA1のフコシル化 ABO血液型ヒト血清

1. 研究開始当初の背景

マウス消化管における糖脂質発現には大きな特徴があり、間質組織にフォルスマン糖脂質、上皮組織に GA1、GM1、FGA1、FGM1 などのガングリオ系列糖脂質を発現している。上皮 GA1 は乳酸菌 *Lactobacillus johnsonii*、ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum*、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*、放線菌 *Actinomyces maeslundii*、淋菌 *Neisseria gonorrhoeae* の受容体であることが明らかになり、乳酸菌、ビフィズス菌などのヒトの健康に有益な働きを持つ共生菌の生着や、逆に健康を害する緑膿菌、淋菌の感染にも関わっていることが示された。さらに、無菌下で飼育したマウスの小腸 GA1 の発現を比較すると、通常飼育下では GA1 のフコシル化が起こり、GA1 の受容体活性がマスクされていること、また、フコシル化は通常飼育下の腸内細菌によるフコース転移酵素遺伝子の転写誘導によって起こっていることが示された。これらの知見は、食物の消化活動を通じて体内に侵入する雑多な細菌に対し受容体糖脂質を介して有益な細菌を選別し、細菌叢を形成させて食物の消化を助けるのみならず、感染防御や免疫系の活性化を行って生体の恒常性を維持していることを示唆している。同時に、腸内細菌の一部は宿主上皮細胞の遺伝子に働きかけ、糖転移酵素遺伝子の転写誘導を通して受容体の発現量を調節していることを示唆している。糖脂質の発現調節を基盤にした腸内細菌の共生と感染の仕組みを明らかにすることが求められている。

2. 研究の目的

- (1) 細菌受容体糖脂質の消化管における発現：ガングリオ系列糖脂質 GA1、FGA1、SGA1 (硫酸化 GA1)、GM1、FGM1 のマウス消化管各部の分布と代謝的相関を明らかにする。
- (2) ヒト消化管・口腔・皮膚の共生細菌の糖脂質と免疫認識：ヒト体内の共生細菌として、消化管の *Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus reuteri*、皮膚の *Staphylococcus epidermidis*、口腔の *Streptococcus salivarius* について、リン脂質と糖脂質の構造と含有量を分析するとともに、各細菌をウサギに直接免疫して作製した抗血清の認識抗原を明らかにする。
- (3) 免疫不全マウス消化管の共生細菌の解析と消化管糖脂質組成：消化管内には、体内の半数のリンパ球が分布し、強力な免疫認識が行われている。腸内細菌もこの免疫監視下に置かれていることから、免疫不全の場合の乳酸菌の種類の変化を解析することにより、免疫系の関与の実態を明らかにする。同時に、細菌種の変化が消化管の GA1 のフコシル化に及ぼす影響について調べる。

3. 研究の方法

- (1) 細菌：理化学研究所微生物株保存施設 (JCM) より購入した。*Lactobacillus johnsonii* (LJ, JCM 1022), *L. reuteri* (LR, JCM 1112), *Staphylococcus epidermidis* (SE, JCM 2412), *Streptococcus salivarius* (SS, JCM 5707) を用いた。LJ、LR は MRS broth、SE は tryptic soy broth、SS は heart infusion broth で培養した。
- (2) 試薬：各種糖脂質 GalCer, GlcCer, LacCer, Gb₃Cer, Gg₃Cer, Gb₄Cer, Gg₄Cer, Lc₄Cer, nLc₄Cer, IV³GalNAc-Gb₄Cer (Fs), IV³Gal α -nLc₄Cer は当研究室で精製した。LJ、SE、SS に対する抗血清は各菌体 15 mg/mL PBS を Freund の完全アジュバンドと混合後、ウサギ皮下に注入して作製した。GA1 と Fs に対するポリクローナル抗体も同様の方法で作製した。一方、FGA1、FGM1、I³SO₃-GalCer に対するモノクローナル抗体は各精製糖脂質と *Salmonella minnesota* を混合後、マウスに免疫し、リンパ球とミエロームを融合して作製した。
- (3) 細菌の糖脂質：培養後の各細菌は PBS で洗浄後、凍結乾燥した。クロロホルム (C)、メタノール (M) 混合溶媒を用いて脂質抽出を行い、抽出液は混合後、0.5-1.0 mg 乾燥菌体相当の抽出液を取り、Folch 分配後、TLC で分析した。展開溶媒は C/M/W (65:25:4、体積比)、検出はオルシノール硫酸と酢酸銅-リン酸試薬で行った。糖脂質の分離に当っては、まず陰イオン交換 DEAE-Sephadex カラムで中性と酸性脂質に分離した。糖脂質は中性画分に、ホスファチジルグリセロール (PG) とカルジオリピン (CL) は酸性画分に溶出した。続いて、シリカゲル (Iatrobeds) カラムのグラジエント溶出、C/M/W (85:15:0.2, 70:30:4, 10:90:4 体積比) により各成分を分離精製した。
- (4) リン脂質および糖脂質の構造：精製後の脂質は FAB/MS 測定により分子量と分子種を測定した。その際、糖脂質は陽イオン、リン脂質は陰イオンを検出した。次に、各脂質を 5%-メタノール性塩酸中、80℃、16 時間加熱し、加メタノール分解を行った。生成した脂肪酸メチルエステル、1-O-メチル化糖は GC-MS により分析した。また、糖の結合位置は糖脂質を完全メチル化後、部分メチル化アルジトールアセテートに変換し、GC-MS により分析した。アノマー配位については、NMR (JNM-ECP700, JEOL) と糖分解酵素により決定した。
- (5) ヒト血中抗糖脂質抗体の検出：慶応義塾大学医学部附属病院よりヒト血清を入手した。倫理委員会の承認を受け、また、ガイドラインに準じて使用した。まず、ELISA 法により、細菌糖脂質に対する抗体の反応強度を測定した。精製糖脂質 (表 1) (LacDH-DG, LacTH-DG, LacTetH-DG, StrDH-DG, StaDH-DG) をエタノールに溶解し (0.5 μ g/100 μ l) 溶媒を除くことにより各ウエル 0.5 μ g の糖脂質を結合させた。次に、1%

BSA/PBS でブロック後 50~200 倍希釈ヒト血清を室温、2 hr 反応させた。0.1% Tween 20/PBS による洗浄後、プレートに結合した抗体をペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 抗体、およびペルオキシダーゼ基質 *o*-phenylenediamine, H₂O₂ を用いて発色させ、4M 硫酸水溶液で反応停止後、490 nm の吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) 細菌糖脂質: グラム陽性細菌はリン脂質 PG、CL に匹敵する濃度の糖脂質を含むことが明らかになった。しかも、糖脂質の構造は細菌属特異的であり、強い免疫原性を持っていた。今回の研究で明らかになった各細菌の主要糖脂質の構造および略号を表 1 に示す。

表1. 細菌糖脂質の構造と略号

細菌属	略号	構造
Lactobacillus	LacDH-DG	Galα1-2Glcα1-3'DG
	LacTH-DG	Galα1-6Galα1-2Glcα1-3'DG
	LacTetH-DG	Galα1-6Galα1-6Galα1-2Glcα1-3'DG
	LacβTH-DG	Glcβ1-6Galα1-2Glcα1-3'DG
	LacβTH-DG-FA	Glcβ1-6Galα1-2Glc(6-fatty acid)α1-3'DG
Staphylococcus	StADH-DG	Glcβ1-6Glcβ1-3'DG
Streptococcus		
Enterococcus	StrDH-DG	Glcα1-2Glcα1-3'DG
Pediococcus		
Tetragenococcus		

Lactobacillus 属では細菌の種類に応じて、LacDH-DG の構造修飾に違いが見られた。ヒトやマウス消化管に棲息する *L. johnsonii*, *L. intestinalis*, *L. reuteri* は LacTH-DG、LacTetH-DG を含み、発酵食品に用いられる *L. plantarum*, *L. casei*, *L. murinus* は LacβTH-DH, LacβTH-DG-FA を含んでいた。細菌を直接ウサギに免疫して作製した抗血清はいずれの構造に対しても強く結合するが、LacTH-DG と LacTetH-DG に対する結合はとりわけ強いことが明らかになった。TLC 上、LacTH-DG と LacβTH-DG は類似の移動度を持つが、LacTetH-DG と類似の移動度を持つ構造は他の Lactobacillus 属細菌には含まれていないことから、後に述べるように、LacTetH-DG 含有量を指標にして、*L. johnsonii* などの乳酸菌の消化管内の生息数が測定できた。一方、Streptococcus 属細菌を免疫して作製した抗血清は、自身の StrDH-DG のみならず、LacDH-DG、StADH-DG とも交差反応した。StrDH-DG に含まれる Glcα は動物の糖質エネルギーとしてのでんぷんの構成糖であることから、低い特異性を持つことが理解できる。この糖脂質を持つ細菌は皮膚白色ブドウ球菌のみならず、腸内の Enterococcus、発酵食品の Pediococcus、Tetragenococcus であり、これらの細菌に対しては特異的な免疫反応が起こらないと思われる。各細菌のリン脂質と糖脂質の構造は基本的に同じであり、代謝経路は共有されていた。しかし、棲息部位の異なる細菌の脂質部分の構造には大きな特徴があった。皮膚の SE では、C15 と C17 のアン

テイン脂肪酸を含むジアシルグリセロール (DG) が主要分子種であり、末端のメチル分枝を介して脂質 2 分子膜外層と内層がより強固に結びつき、他の菌には見られない程硬い細胞膜を構築していた。おそらく皮膚という乾燥した環境下で水分の漏出を防ぐ役割を担っていると思われる。また、口腔の SS は直鎖飽和と直鎖不飽和脂肪酸を持つ DG であり、ヒト細胞のグリセロ型リン脂質の DG 分子種と良く似ており、口腔内の温和な環境下での生育に適していると思われる。一方、Lactobacillus 属細菌は二重結合をシクロプロパン環に還元した分子種が最大分子種であり、乳酸を多量に生成するホモ発酵細菌が自身の酸により二重結合のラジカル化を起こさないようにしていると思われる。いずれの細菌も PG、CL、DH-DG を主要膜成分としており、各分子の空間充填モデルから脂質 2 分子膜外層に PG、DH-DG、内層に CL を配置した膜構造をとっていると予想した。(図 1)

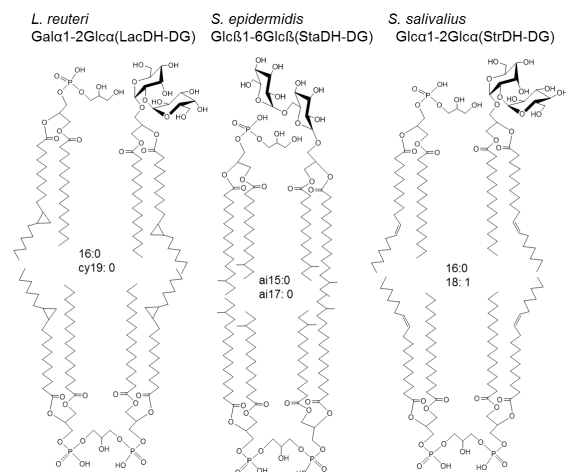


図 1. 細菌の脂質 2 分子膜の構造

(2) 免疫不全マウス消化管の腸内細菌: T. B リンパ球免疫不全 scid、T リンパ球免疫不全 nude、IgA 抗体分泌不全 pIgR(-/-)およびそれぞれの対照マウスの盲腸内容物を MRS 寒天プレート上で培養し、得られたコロニーの菌種を 16S-rRNA 配列を基に決定した。scid と pIgR(-/-)は *L. murinus*、それぞれの対照マウスは *L. johnsonii*、nude は *E. faecalis*、その対照マウスは *Lactococcus garvieae* であった。同じ環境下で飼育しているにも関わらず細菌が異なっていることは乳酸菌の選別に免疫系が関わっていることを示していた。scid の *L. murinus*、対照の *L. johnsonii* の糖脂質抗原が免疫組織に関わっている可能性があるため、両細菌の糖脂質を調べたところ、Lactobacillus 属共通の LacDH-DG に加え、糖鎖修飾を受けた 3 糖、4 糖糖脂質を含んでいた。LJ は LacDH-DG に Galα が結合した LacTH-DG と LacTetH-DG を含み、*L. murinus* は Glcβ が結合した LacβTH-DG と LacβTH-DG-FA を含んでいた。LacTetH-DG の含有量を指標として対照マウス消化管各部の LJ 生息数を調べると、胃に 9.2×10^7 、盲

腸に 1.3×10^7 、結腸に 9.0×10^6 であり、scid 消化管内には検出できなかった。*L. murinus* が優勢菌である scid 盲腸内容物は水分含有量が多く、下痢状であり酸性臭が強かったが、LJ が優勢菌である対照マウス盲腸、結腸内容物は水分が少なく臭気も弱かった。さらに、scid は小腸部位にもガスを伴った内容物が多く、胃にも全内容物の 40% が滞留していた。逆に、対照マウスでは全消化管内容物の 64% が盲腸、結腸に分布していた。従って、*L. murinus* の増殖は健全な消化活動を妨げていると思われる。

(3) 消化管 GA1 のフコシル化：前述のように、消化管 GA1 は *L. johnsonii* をはじめとする細菌の受容体となっている。マウス消化管各部の GA1 および構造関連糖脂質の分布は顕著な特色を持つことが分かった。GA1、FGA1、SGA1 は十二指腸、空腸、回腸にのみ分布していて、通常飼育下では GA1 の 20% が FGA1、SGA1 となり、FGA1 の量、つまり GA1 のフコシル化は細菌感染によって変動することが明らかになった。胃、盲腸、結腸には GA1 は含まれず、すべてが FGA1 となり、GA1 の受容体活性は完全にマスクされていた。さらに、胃、盲腸には FGM1 が含まれていた。従って、糖鎖の代謝経路から判断すると、LacCer にシアル酸を転移し、GM3 を合成する活性は胃、盲腸には含まれるが十二指腸、空腸、回腸には含まれていないと予想した。フコース転移酵素遺伝子の消化管各部における分布にも特徴があった。マウス組織にはヒト H 遺伝子と相同性の高い Fut-1、ヒト Se 遺伝子に相当する Fut-2、ヒト Sec-1 遺伝子に相当する Fut-3 が分布しているが、Fut-3 遺伝子はフレームシフトにより活性を持たない遺伝子であった。Fut-2 遺伝子のノックアウトマウスでは胃、盲腸、結腸の FGA1、FGM1 が欠損していることから、これらの組織においては Fut-2 遺伝子産物が糖脂質のフコシル化酵素となっていることが分かった。しかし、Fut-1 および Fut-2 ノックアウトマウス小腸においては FGA1 が発現しており Fut-1 と Fut-2 がともにフコース転移酵素をコードしていることが明らかになった。Fut-1 と Fut-2 はタンDEM型遺伝子配列であることから、小腸特異的にどちらの遺伝子も転写調節できるような遺伝子構造となっていると予想した。無菌マウスおよびペニシリン、ストレプトマイシン投与マウス小腸では FGA1 含有量が少なく、GA1 の発現量を多くする傾向が見られた。これらのマウスに通常飼育マウス糞便懸濁液を投与すると、Fut-2 遺伝子の転写誘導が起こり投与 96 時間後には FGA1 合成が最高レベルに達した。フコース転移酵素遺伝子の転写誘導が細菌によるものか、あるいは細菌の消化管内進入に应答した免疫系の作用によるものかを明らかにするために免疫不全 scid、nude、pIgR(-/-) マウス消化管の FGA1 を定量した。免疫不全および対照マウスは同じ SPF 下で飼育して

いるにもかかわらず、回腸、盲腸、結腸における FGA1 の含有量は対照マウスよりも免疫不全マウスで高濃度であり、転写誘導には免疫系が関与せず、細菌によって引き起こされていることが明らかになった。scid の場合、*L. murinus* の存在がフコース転移酵素遺伝子 Fut-2 の転写を引き起こし、*L. johnsonii* が細菌叢を形成するのを妨害していると考えられる。

(4) 消化管内容物：消化管のスフィンゴ糖脂質は上皮組織に分布している。上皮細胞は消化管内に脱落し、幹細胞から新たに上皮細胞を分化誘導することで再生を行っている。消化管内に移行した GA1、FGA1 の定量を行ったところ、いずれも内容物中に多量に含有され、消化活動によって分解されることなく排出されていることが分かった。小腸 GA1 に結合した細菌叢は受容体 GA1 に結合したまま体外に排出されていることを示している。受容体 GA1 が分解されないことは細菌が拡散するのを防ぐ上で好都合であると思われる。消化管内容物中に移行した GA1、FGA1 は消化管組織内の含有量を反映しており、scid マウス全内容物中 GA1 は対照マウスの 73% であるのに対し、FGA1 は 2.1 倍になっていた。全内容物中の GA1 は全組織中 GA1 の 0.6 0.8、全内容物中 FGA1 は全組織中 FGA1 の 0.3 0.4 に達しており、上皮細胞 GA1 の代謝回転の速さを示している。

(5) ヒト血清と細菌糖脂質との反応：細菌より精製した糖脂質を抗原とし、ELISA 法によりヒト血清中の自然抗体を検出した。28 例中 18 例が LacTH-DG、LacTetH-DG に対する IgM 抗体を含んでいた。両抗原糖脂質の末端糖鎖は Gal α であり、B 血液型末端糖鎖の一部であることから、A 型、B 型、AB 型、O 型血清について、LacTH-DG、LacTetH-DG に対する抗体価を比較したところ、ABO 血液型に関わりなく検出できた。さらに、ELISA 法で高い抗体価を示した A 型、B 型、AB 型、O 型血清について、A 型、B 型糖脂質と LacTH-DG、LacTetH-DG に対する抗体価を TLC-免疫染色法による染色強度で比較すると、両者はほぼ同じ抗体価であることが分かった。同様に動物種特異的スフィンゴ糖脂質として IV³GalNAc α -Gb₄Cer (フォルスマン糖脂質)、IV³Gal α -nLc₄Cer、Gg₄Cer に対する抗体も検出できたが、これらの糖脂質に対する反応強度も LacTH-DG、LacTetH

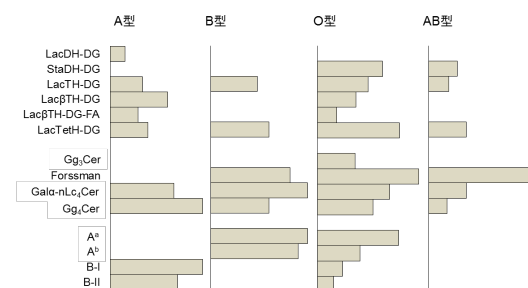


図 2 . ヒト血清と糖脂質との反応

-DG に対する反応強度とほぼ同じであった。
(図 2) 動物種特異的スフィンゴ糖脂質および血液型糖脂質に対する自然抗体はそれぞれの末端糖鎖と類似糖鎖を持つ細菌や食事による抗原との接触によって生成していると考えられており、LJ、LR、LI などの消化管内共生乳酸菌に対しても、糖脂質を介して免疫応答していることが明らかになった。StaDH-DG に対する抗体を持つ O 型と AB 型ヒト血清は過去の *Staphylococcus* 属細菌の感染履歴を反映していると思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Iwamori M, Tanaka K, Adachi S, Aoki D, Nomura T. Absence of lactobacilli containing glycolipids with the α -galactose epitope and the enhanced fucosylation of a receptor glycolipid GA1 in the digestive tracts of immune-deficient scid mice. *J Biochem.* 2015 Mar 9. pii: mvv021. in press. 査読有

Iwamori M, Iwamori Y, Matsumoto S, Adachi S, Nomura T. Enhanced expression of fucosyl GA1 in the digestive tract of immune-21deficient scid, nude and pIgR(-/-) mice. *J Biochem.* 2013; 154(6):541-9. doi: 10.1093/jb/mvt087. 査読有

Iwamori M, Iwamori Y, Adachi S, Nomura T. Changes in bacterial glycolipids as an index of intestinal lactobacilli and epithelial glycolipids in the digestive tracts of mice after administration of penicillin and streptomycin. *Glycoconj J.* 2013;30(9): 889-97. doi: 10.1007/s10719-013-949 4-6. 査読有

Iwamori M, Nakasa M, Yamazaki K, Iwamori Y, Tanaka K, Aoki D, Adachi S, Nomura T. Bacterial species-characteristic profiles of molecular species, and the antigenicity of phospholipids and glycolipids in symbiotic *Lactobacillus*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* species. *Glycoconj J.* 2012;29(4): 199-209. doi: 10.1007/s10719-012-9393-2. 査読有

[学会発表](計 22 件)

岩森正男, 岩森由里子, 足立成基, 野村大成, 田中京子, 青木大輔 免疫不全 scid マウス消化管には -ガラクトースエピソード含有糖脂質を持つ乳酸菌は棲息していない 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 ~ 18 日 京都国際会館(京都府京都市)

岩森正男, 足立成基, 野村大成, 田中京子, 青木大輔 乳酸菌の腸内共生と免疫の役割 第 56 回日本脂質生化学会 2014 年 6 月 6 ~ 7 日 近畿大学(大阪府東大阪市)
南領将, 谷河みなみ, 柘田尚也, 伊東玲芳, 田中京子, 青木大輔, **岩森正男** 各種乳酸菌の糖脂質の構造的特徴と抗原性 第 61 回日本生化学会近畿支部例会 2014 年

5 月 17 日 京都産業大学(京都府京都市)
岩森正男, 岩森由里子, 足立成基, 野村大成 ペニシリン, ストレプトマイシン投与によるマウス消化管上皮および内容物の糖脂質変化 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 ~ 13 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

岩森正男, 岩森由里子, 足立成基, 野村大成 マウス消化管乳酸菌の抗生物質投与下での生息状況 細菌糖脂質抗原を指標とした解析 第 55 回日本脂質生化学会 2013 年 6 月 7 ~ 8 日 松島大観荘(宮城県宮城郡)

岩森正男, 岩森由里子, 足立成基, 野村大成 免疫不全マウス消化管におけるフコシル GA1 の発現増加 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 4 ~ 16 日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

岩森正男, 岩森由里子, 田中京子, 青木大輔, 足立成基, 野村大成 消化管、皮膚および口腔共生細菌脂質の特異的分子種構成と糖脂質の抗原性 第 54 回日本脂質生化学会 2012 年 6 月 7 ~ 8 日 九州大学(福岡県福岡市)

中佐昌紀, 山崎健太郎, 岩森由里子, **岩森正男** 共生細菌 *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* 属脂質の細菌属特異的分子種構成と糖脂質の抗原性 第 59 回日本生化学会近畿支部例会 2012 年 5 月 19 日 京都大学(京都府宇治市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩森 正男 (IWAMORI, Masao)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号: 90110022