Lactobacillus gasseri に共通する種特異的なリポテイコ酸の化学構造

白石　　宗[1)]，久富　亮佑[1)]，佐藤耶舞羽[2)]，森田　直樹[3)]，吹谷　　智[2)]，
佐藤　豊孝[1)]，横田　　篤[2)]，横田　伸一[1)]

[1)]札幌医科大学医学部微生物学講座
[2)]北海道大学大学院農学研究院応用生命科学部門微生物生理学研究室
[3)]産業技術総合研究所生物プロセス研究部門分子生物工学研究グループ

A unique species-specific structure of lipoteichoic acid common to *Lactobacillus gasseri*

Tsukasa Shiraishi[1)], Ryosuke Kutomi[1)], Yamaha Sato[2)], Naoki Morita[3)], Satoru Fukiya[2)], Toyotaka Sato[1)],
Atsushi Yokota[2)], Shin-ichi Yokota[1)]

[1)]Department of Microbiology, Sapporo Medical University School of Medicine
[2)]Laboratory of Microbial Physiology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University
[3)]Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology（AIST）

Abstract

The lipoteichoic acid（LTA）is a specific polymer on Gram-positive bacterial cell surfaces, and is not found in Gram-negative bacterial cells. LTA is an amphipathic anionic polymer typically comprised of poly-glycerophosphate（GroP）linked to glycolipid of cell membrane. In general, hydroxyl groups of GroP residues in polymer region are often substituted by D-alanine and/or carbohydrates. Glycolipid anchor typically comprises diglycosylglycerolipid containing two acyl groups. On the other hand, structural variation on species- or strain-level has been observed in degree of polymerization, substitution ratio of the GroP repeating unit, and numbers of carbohydrate and acyl groups in glycolipid moiety. However, structural information has not sufficiently accumulated to discuss unity and diversity of LTA structures.

We determined chemical structure of LTA derived from seven strains of *Lactobacillus gasseri*, an intestinal lactic acid bacterium. All strains shared common structure. Polymer chain comprised poly-GroP with partial substitution with D-alanine. Glycolipid anchor contained novel tetrasaccharide structure and two or three acyl groups. The three acyl group-containing glycolipid anchor is characteristic LTA structure in lactic acid bacteria, including *Lactobacillus* genus, *Lactococcus* genus and *Leuconostoc* genus. The tetrasaccharide structure has not been reported in other Gram-positive bacterial LTA. In conclusion, the tetrasaccharide-containing glycolipid anchor is unique and species-specific LTA structure in *L. gasseri*.

Endotoxin and Innate Immunity 21：35～37, 2018

Key words：*Lactobacillus gasseri*, リポテイコ酸，乳酸菌，糖脂質，構造多様性

はじめに

リポテイコ酸（lipoteichoic acid：LTA）は，グラム陽性細菌の細胞膜に局在する糖とリン酸から構成されるポリマーである。典型的な LTA は，グリセロールとリン酸（GroP）を繰り返し単位とするポリマー部位と，2 糖と 2 残基のアシル基で構成される糖脂質（アンカー糖脂質）部位から成り（図 1A），アンカー糖脂質部位を介して細胞膜にアンカーしている。一方でその化学構造は，菌種および菌株レベルで多様性のあることが示唆されているが，個々の菌種内における構造情報はいまだ不足しており，LTA を理解するためにはより多くの構造情報を蓄積する必要がある。LTA には，さまざまな生理学的な役割が報告されているほか，宿主との相互作用においても細胞接着や免疫応答に関与すると考えられており，構造の違いによって機能が異なる可

白石　宗　札幌医科大学医学部微生物学講座　〒 060-8556 北海道札幌市中央区南 1 条西 17 丁目
TEL：011-611-2111　FAX：011-614-3732　E-mail：shiraishi1020@sapmed.ac.jp

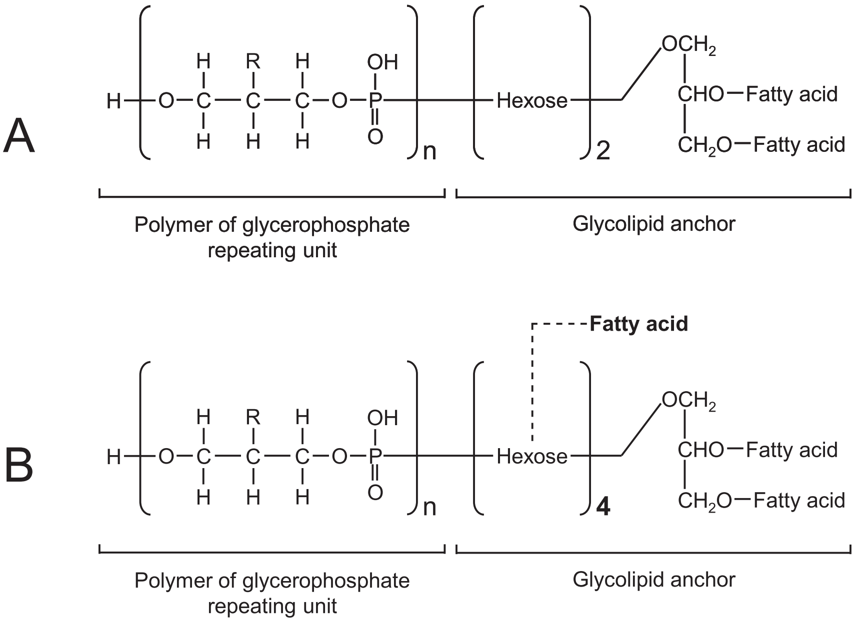

図 1 LTA の構造
A：一般的な LTA，B：*L. gasseri* JCM 1131^{T}の LTA，R：水酸基，D-アラニン残基，ヘキソース残基など（*L. gasseri* では水酸基と D-アラニン残基のみ）

能性が言及されている[1)]。これまで 11 属 53 種 91 株においてLTA の完全構造が報告されているが[2)]，このうち約 80%は病原性を有する細菌であり，乳酸菌のような有用細菌の LTA の構造情報は多くない。そこでわれわれは，ヒト腸内の優勢乳酸菌である *Lactobacillus gasseri* の JCM 1131^{T}の LTA 構造を解析して，本菌株に他の細菌にはみられていない新奇の構造として 4 糖から成るアンカー糖脂質構造を報告した[3,4)]（図 1B）。本稿では，この 4 糖のアンカー糖脂質の *L. gasseri* における分布について概説する。

1. *L. gasseri* における LTA のポリマー部位の構造

7 株の *L. gasseri* を用いて LTA の構造解析を行った。7 株は，それぞれ分離源が異なる 3 株［JCM 1131^T（ヒト腸管），JCM 1130（ヒト糞便），JCM 5814（ニワトリ糞便）］とヒト膣由来臨床分離株 4 株（VLG1，VLG2，VLG3，VLG4）を使用した。ポリマー部位は^{1}H-NMR 分析によって解析した。すべての菌株において GroP を繰り返し単位としたポリマーを主鎖として，グリセロール残基の 2 位の水酸基に部分的に D-アラニンが置換した構造が認められた。ポリマー鎖長は菌株間で大きな違いはみられなかったが，D-アラニン置換率は菌株ごとに異なり，最大で 55%，最小で 17%だった（表 1）。LTA における D-アラニン残基の存在は，宿主への免疫刺激能に重要な化学構造であるとの報告もあり[5)]，置換率の違いによって同一菌種内でも個々の菌株の免疫刺激能の強さが異なる可能性も考えられる。一方でこの置換率は，生育条件により変化することや[6)]，グリセロールと D-アラニンのエステル結合が不安定で分解を受けやすいことから，LTA の調製による影響の可能性も否定できない。置換率の差については今後より慎重な検討が必要である。また，置換基として，他の菌種では D-アラニンの他にグルコースや *N*-アセチルグルコサミンなどが知られているが *L. gasseri* では D-アラニンによる置換のみが確認された。

表 1 *L. gasseri* 種 7 株の GroP ポリマー部位の D-アラニン置換率とポリマー鎖長

Strains	Ratio of D-alanine substitution（%）	Average number of repeating unit
JCM 1131^T	55	22 to 33
JCM 1130	55	11 to 17
JCM 5814	53	10 to 15
VLG1	17	10 to 15
VLG2	45	14 to 21
VLG3	40	15 to 22
VLG4	24	11 to 16

2. *L. gasseri* における LTA のアンカー糖脂質部位の構造

アンカー糖脂質部位の構造は，98%（v/v）酢酸処理（100℃，3 h）によって GroP ポリマーを選択的に分解して，その有機溶媒可溶性画分をアンカー糖脂質標品と

して MALDI-TOF MS によって解析した。さらに，アンカー糖脂質標品を 20%（w/v）アンモニア処理（室温，12 h）によって脱アシル化して，その水溶性画分をアンカー糖標品として MALDI-TOF MS によって解析した。その結果，4 糖構造と，3 残基と 2 残基のアシル基置換がすべての菌株に共通して確認された。4 糖構造は他菌種の LTA には報告がなく，*L. gasseri* に特異的で，この種に共通した構造と考えられる。3 残基のアシル基置換は，*Lactobacillus* 属，*Lactococcus* 属，*Leuconostoc* 属といった典型的な乳酸菌にのみ認められる共通の構造である[2,4)]。属レベルで異なる細菌間で共通する構造が典型的な乳酸菌に存在することは興味深い。

おわりに

本稿では，*L. gasseri* に共通する種特異的なリポテイコ酸の化学構造を紹介した。LTA は，菌種および菌株レベルで構造多様性があると考えられているが，これまで報告された構造情報を整理すると，同一菌種内で複数株の LTA の構造が明らかになっている例は少ない。今回われわれは，7 株の *L. gasseri* を用いて種特異的な構造を明らかにしたが，同様の規模で LTA の構造が比較された菌種は，*Bacillus subtilis*（10 株）と *Listeria monocytogenes*（6 株）のみである。*B. subtilis* においては，1 残基のアシル基置換を有するアンカー糖脂質部位をもつ LTA が共通して認められている[2,7)]。また，*L. monocytogenes* では，6 株中 5 株でアンカー糖脂質部位に 2 残基のアシル基をもつホスファチジン酸の置換が認められ，1 分子の LTA に計 4 残基のアシル基を有する構造が報告されている[2,7)]。これらは非常に特徴的で種特異的な構造と考えられる。一方で他菌種では，同一種内の複数菌株での構造情報はまだまだ十分ではない。解析された菌株数は少ないものの，特徴的な LTA の構造が *Clostridioides*（*Clostridium*）*difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis* などでも報告されている[2,7)]。

L. gasseri は，腸内や口腔内，膣などから分離され，ヒトとかかわりが深い乳酸菌である。本菌種において *Lactobacillus* 属を含む他の乳酸菌とは異なる菌種特異的な構造が発見されたことから，LTA を介した細菌と宿主との相互作用において，その化学構造を知ることが重要であると考えられる。LTA の構造活性相関を明らかにするためには，構造情報のさらなる蓄積と，宿主との相互作用の詳細な評価の両輪が必要であり，今後この分野の進展に期待したい。

文　献

1）Ryu YH, Baik JE, Yang JS, et al.：Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. Int Immunopharmacol 9：127-133, 2009

2）Shiraishi T, Yokota S, Fukiya S, et al.：Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria：focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. Biosci Microbiota Food Health 35：147-161, 2016

3）Shiraishi T, Yokota S, Morita N, et al.：Characterization of a *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^{T} lipoteichoic acid with a novel glycolipid anchor structure. Appl Environ Microbiol 79：3315-3318, 2013

4）白石宗，横田伸一，吹谷智，他：腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^{T}のリポテイコ酸に認められた新奇構造．“エンドトキシン・自然免疫研究 18”エンドトキシン・自然免疫研究会編，医学図書出版，2015，pp79-81

5）Grangette C, Nutten S, Palumbo E, et al.：Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. Proc Natl Acad Sci USA 102：10321-10326, 2005

6）Li M, Lai Y, Villaruz AE, et al.：Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. Proc Natl Acad Sci USA 104：9469-9474, 2007

7）白石宗，横田伸一，吹谷智，他：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 5：26-32，2017