

## 論文審査の要旨および担当者

学位申請者	西山 啓太 (3DZ12001 環境生物化学)
学位論文題目	乳酸菌の宿主定着性に寄与する細胞表層タンパク質に関する研究
担当者	主査 北里大学教授 有原 圭三 副査 北里大学教授 佐藤 久聡 副査 和洋女子大学教授 中島 肇 副査 北里大学准教授 柏本 孝茂

### 論文審査の要旨

腸内細菌叢を構成する細菌のひとつである乳酸菌の主な棲息域である十二指腸から小腸下部の粘膜は、粘性のムチン糖タンパク質に覆われており、これに付着することで消化管での定着の足掛かりとしていると考えられている。特に、硫酸化されたムチン（スルホムチン）は消化管粘膜に豊富に存在することから乳酸菌の受容体分子として重要視されてきた。一方、乳酸菌にとって外部環境との接点となる菌体表層タンパク質は、宿主との相互作用を理解する上で重要であり、これら幾つかの菌体表層タンパク質は、付着因子として機能することが知られている。しかし乳酸菌におけるスルホムチンとの詳細な相互作用は未だ見いだされていない。申請者らの研究グループは、スルホムチンと類似の糖鎖構造をもつ複合糖脂質スルファチドに付着性を示す乳酸菌として *Lactobacillus reuteri* JCM1081 株を選抜し、さらにオクチルグルコシドにより抽出された推定分子量 47kDa の細胞表層タンパク質 (P47) を硫酸

化糖鎖結合因子として推察してきた。これを踏まえ、本研究は、*L. reuteri* JCM1081 の消化管での生存戦略における P47 の付着因子としての機能的役割を明らかにすることを目的として行われた。

#### 硫酸化糖鎖結合タンパク質の同定とその結合特性の解析

ムチンは、乳酸菌の付着性の評価に広く用いられるが、粘性の性質ゆえに多くの莢雑物を含む。まず、申請者は、P47 とムチン糖鎖の相互作用を評価するために、ブタの消化管からムチン層を剥離し、ゲル濾過クロマトグラフィーと密度勾配超遠心分離を組み合わせた手法により、高純度なムチンを精製することに成功した。また、種々のレクチンおよび抗ムチンモノクローナル抗体を用いた ELISA 法により、ブタ大腸ムチンに硫酸化血液型糖鎖あるいは Sd<sup>a</sup> タイプ血液型糖鎖構造を含むスルホムチンやシアロムチンが含まれることを明らかにした。

次に、P47 の N 末端と内部アミノ酸配列に基づき遺伝子をクローニングし、配列を解析した結果、P47 は翻訳伸長因子 (EF-Tu) であることが明らかになった。そこで、組み換え EF-Tu タンパク質 (His<sub>6</sub>-EF-Tu) を作製し、His<sub>6</sub>-EF-Tu の複合糖脂質に対する結合特性を解析した。表面プラズモン共鳴による解析から、His<sub>6</sub>-EF-Tu は、1) 非還元末端が硫酸化ガラクトシル基の複合糖脂質に結合すること、2) スルファチドに対してナノモルオーダーの解離定数 ( $K_D$ ) を示すこと、3) 非還元末端がガラクトシル基あるいは負の電荷をもつシアル酸には結合しないことを示し、EF-Tu は硫酸化糖鎖と特異的な相互作用を示すことを明らかにした。そこで、EF-Tu のムチン糖鎖への結合性についても解析を行った。ムチンオリゴ糖を競合体としてムチンへの His<sub>6</sub>-EF-Tu の結合を競合 ELISA により評価した。酸性オリゴ糖画分の添加は His<sub>6</sub>-EF-Tu の結合を濃度依存的に阻

害したが、中性オリゴ糖画分による障害は認められなかった。また、ブタ胃底部粘膜組織の免疫組織化学的染色では HID 染色と His<sub>6</sub>-EF-Tu の反応部位が類似した。以上より、EF-Tu は複雑な糖鎖構造をもつムチンにおいても、硫酸化糖鎖に対して特異な結合性をもつことが示された。

続いて、*L. reuteri* における EF-Tu の局在と付着因子としての機能を評価した。抗 EF-Tu 抗体を用いたウエスタンブロットにより、*L. reuteri* JCM1081 を含む *L. reuteri* 5 菌株において EF-Tu が菌体表層に局在することが確認された。また、*L. reuteri* のムチンへの付着性は、抗 EF-Tu 抗体の処理により濃度依存的に障害された。以上より、EF-Tu は、*L. reuteri* の付着因子として機能することが示された。

EF-Tu を介した付着機構からスルホムチンは確かな乳酸菌の受容体であることが明らかになった。また、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium*) は、ほ乳類の大腸において優勢菌種であり、プロバイオティクスとして利用価値の高い菌種である。そこでビフィズス菌 22 菌株のムチンへの付着性を評価した結果、スルホムチンに付着性を示す幾つかの菌株が存在することを見出した。また、これらの菌株においても EF-Tu の細胞表層局在が確認され、付着因子として機能することが推察された。

### EF-Tu の分泌機構の解明

EF-Tu が乳酸菌の菌体表層に存在し、スルホムチンへの付着因子として機能することを明らかにした。一方、EF-Tu には、分泌に必要な既知の分泌シグナル配列が保存されていないにもかかわらず、乳酸菌を含めた様々な細菌で細胞外への分泌が確認されている。しかし、EF-Tu の分泌機構は全く不明である。そこで *L. reuteri* における EF-Tu の分泌機構の全容を明らかにすることを目的とした。

*L. reuteri* JCM1081 に対して ATPase 阻害剤であるアジ化ナトリウムを添加したところ EF-Tu の分泌は著しく低下した。また，自己溶菌や膜小胞体を介した分泌でないことを示唆するデータが得られたことから，EF-Tu の細胞外への移行に能動的分泌機構が関与している可能性を考えた。そこで ATPase 活性依存性の Sec 輸送経路に着目した。膜チャネル複合体の構成因子である *secY* 欠損株を作出し，分泌を評価した結果，EF-Tu の分泌は殆ど確認されなくなった。以上より，EF-Tu の分泌に Sec 輸送経路の関与が強く推察された。

Sec 輸送経路により分泌されるタンパク質の N 末端には高度に保存されたシグナル配列が存在する。そこで，分泌シグナルを探索するために，EF-Tu の幾つかのアミノ酸残基を欠損または置換させた変異 EF-Tu<sup>FLAG</sup> をプラスミドに導入し，EF-Tu の分泌に及ぼす影響について検討した。その結果，C 末端の 35 アミノ酸残基の欠損により EF-Tu の分泌は著しく低下した。また，本領域のアミノ酸置換により，特定の塩基性または疎水性アミノ酸が分泌に関与する可能性が示された。

次に，本領域の分泌シグナルとしての機能を評価するため，C 末端を欠損した変異 EF-Tu<sup>FLAG</sup> を用いて，プルダウン法により Sec 輸送経路のモータータンパク質 SecA との相互作用を評価した。EF-Tu は C 末端領域を介して組み換え SecA タンパク質 (His<sub>6</sub>-SecA) と相互作用し，さらに，EF-Tu は His<sub>6</sub>-SecA の ATPase 活性を高めることが示された。以上より，EF-Tu の C 末端領域が Sec 依存性の分泌シグナルとして機能することが強く推察された。

以上の研究により，以下の点が明らかになった。①EF-Tu は，硫酸化糖鎖をエピトープとする乳酸菌の付着因子である。②EF-Tu の分泌には，Sec

輸送経路が関与し、既知の分泌シグナルとは異なる C 末端の特定の配列依存的に細胞外へと移行する。これにより、EF-Tu が新たな分泌機構により細胞外へと分泌され、消化管内において硫酸化糖鎖への付着因子として重要な役割を演じていることを明らかにした。なお、本論文における一連の研究成果は、すでに 2 報の学術雑誌掲載論文として公表されている。

審査員一同は、本論文が多くの優れた新知見を含み、当該学問領域の発展に寄与すると共に、プロバイオティクス利用の新たな展開にも貢献をするものとの認識で一致した。さらに、著者は真摯な研究態度と豊かな人間性を備えており、博士（農学）の学位を授与するに相応しいと判断した。