

学 位 論 文 要 旨

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

Studies on the cell surface proteins which contribute to host
colonization of lactic acid bacteria

北里大学大学院獣医学系研究科
動物資源科学専攻 博士後期課程

西山 啓太

Nishiyama Keita

指導教授 向井 孝夫

平成 26 年度

2014

第一章 序 論

乳酸菌やビフィズス菌の主な棲息域である小腸から結腸の消化管壁は、粘性のムチン糖タンパク質に覆われている。ムチンは、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミン、フコースからなる中性糖鎖と硫酸基やシアル酸が結合した酸性糖鎖により複雑に修飾される。一方、乳酸菌やビフィズス菌は、細胞表層タンパク質を介して、これらのムチン糖鎖に付着することで、消化管内での定着性を有しているものと推察されているが、詳細な定着機構は不明である。

これまで、著者の研究グループは、*Lactobacillus reuteri* JCM1081 株において硫酸化糖鎖結合タンパク質 (P47) の存在を示唆してきた。そこで、本研究では、P47 を同定し、次いで高純度に精製したムチンを用いて P47 のムチン糖鎖との結合動態、認識部位などムチンへの付着機構の全容を明らかにすることを第一の目的とした。さらに、P47 の乳酸菌やビフィズス菌における付着因子としての役割を明確にするため、P47 の細胞表層における局在と細胞外への分泌機構を明らかにすることを第二の目的とした。

第二章 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

第一節 ムチンの精製と糖鎖の解析

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。本研究では、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方法により、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^a 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。

第二節 硫酸化糖鎖結合タンパク質の同定と結合特性の評価

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。次に、組み換え EF-Tu タンパク質 (His₆-EF-Tu) を作製し、His₆-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、His₆-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が示された。以上から、EF-Tu は硫酸化糖鎖と特異な相互作用を示すことが明らかにされた。

次に、EF-Tu のムチン糖鎖への結合性について評価した。ムチンオリゴ糖を競合体としてムチンへの His₆-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 His₆-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阻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 His₆-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。

第三節 *L. reuteri* における EF-Tu の付着因子としての評価

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 が細胞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

より濃度依存的に阻害された。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。

第四節 スルホムチン付着性を示すビフィズス菌の探索

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。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。

第三章 EF-Tu の分泌機構の解明

第二章では，EF-Tu が乳酸菌の細胞表層に存在し，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。第三章では，*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。

第一節 EF-Tu の分泌経路の探索

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。

第二節 EF-Tu の分泌シグナルの探索

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^{FLAG} 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^{FLAG} 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 (His₆-SecA) と相互作用し、さらに、EF-Tu は His₆-SecA の ATPase 活性を高めることが示された。以上より、EF-Tu の C 末端領域が分泌シグナルとして機能することが示された。

第四章 結 論

本研究により以下の点が明らかになった。

- ① EF-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。
- ② EF-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。

以上、本研究では、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。