

細胞表面糖脂質 LOS の糖鎖構造変化がカンピロバクターの胆汁酸抵抗性および鶏腸管内定着性に及ぼす影響

岩田剛敏¹⁾

Effects of lipooligosaccharide truncation on bile resistance and chick colonization by *Campylobacter jejuni*

Taketoshi IWATA¹⁾

背景と目的

カンピロバクターは我が国で最も重要な食中毒起因菌の一つである。カンピロバクター食中毒の主要な原因食品としては鶏肉が疑われており、農場において *Campylobacter jejuni* が鶏腸管内に高率に保菌されていることが、カンピロバクター食中毒が頻発している根本的な原因となっている。したがって、本食中毒を低減するためには *C. jejuni* の鶏腸管内定着を防ぐ必要があるが、定着のメカニズムについてはほとんど明らかとなっていない。本菌の鶏腸管内定着メカニズムの解明は、養鶏場における *C. jejuni* 制御技術の開発につながるため、非常に重要である。

C. jejuni は鶏の腸管粘膜に侵入・増殖することで、鶏には何の症状も引き起こさず腸管内に長期間維持される。本菌が鶏腸管に定着するためには、まず様々な殺菌性の因子が存在する腸管内環境で生残し、粘膜に到達することが必要である。肝臓でコレステロールから生成され十二指腸に放出される胆汁酸は、代表的な腸管内の殺菌性物質と考えられており、腸管内で菌が生残・定着するためには、この胆汁酸に対する抵抗性が鍵となる。胆汁酸は界面活性作用により殺菌性を示す物質であり、多剤排出トランスポーターや、菌体表面性状（疎水性、ゼータ電位等）の変化が、細菌の抵抗性に影響することが報告されている¹⁾。しかしながら、*C. jejuni* の胆汁酸抵抗性に関与する因子としては、多剤排出系の一つである CmeABC が報告されているのみであり、その他の機構についてはほとんどわかっていないのが現状である²⁾。

C. jejuni の外膜には糖脂質の一種であるリポオリゴサッカライド (LOS) が存在しており、細菌外膜に埋め込まれたりピド A から、細胞外に糖鎖 (内部コア領域および外部コア領域) が突き出す形で菌体表面を覆っている。著者は、ゲノム情報と LOS 糖鎖構造が明らかとなっている *C. jejuni* NCTC11168 株および 81-176 株を親株として、LOS 生合成の各段階に関与する酵素遺伝子を破壊することで様々な LOS 変異株を作出した (図 1)。それら変異株の各種抗菌性物質に対する感受性を比較したところ、LOS 分子量の低下を認めた変異株では、親株と比較して胆汁酸抵抗性が低下すること、特に *hldD* 破壊株のような LOS 内部コア領域の大規模な欠損が予測される株では胆汁酸抵抗性が大幅に低下し、鶏腸管内での生残性および定着性が低下することを確認した³⁾。

本研究では、*C. jejuni* LOS 変異株の LOS 糖鎖構造を質量分析計により決定することで、*C. jejuni* の胆汁酸抵抗性に重要な役割を果たす糖鎖構造を明らかにすることを目的とするとともに、その糖鎖欠損による胆汁酸抵抗性減弱の原因を考察するため、菌体表面の疎水性を親株と変異株の間で比較した。

研究の概要

1. LOS 変異株の糖鎖構造解析

LOS 糖鎖構造が未知である *C. jejuni* NCTC11168 由来 *cj1135*, *cj1136*, *cj1138*, *hldE*, *hldD* 破壊株、ならびに 81-176 由来 *hldE*, *hldD* 破壊株について MALDI-TOF-MS 解析および GC-MS 解析を行い、その結果を、既に構造が決定されている親株と比較することで上記変異株の LOS 糖鎖構造を決定した (図 2)。

親株と比較して胆汁酸抵抗性のわずかな低下を認めた

1) 農研機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域

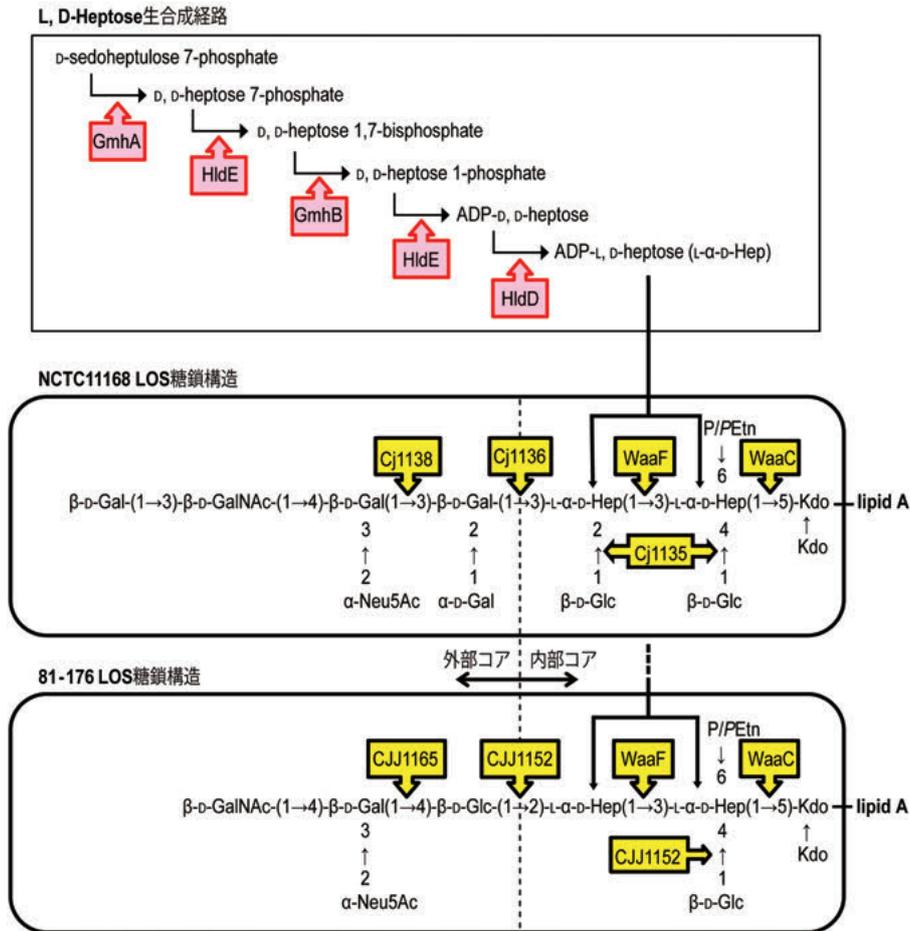


図1. *C. jejuni* NCTC11168 および 81-176 株の LOS 糖鎖構造および LOS 生合成酵素
赤矢印は ADP-L, D-Heptose 生合成酵素, 黄矢印は糖転移酵素を示す。

LOS 変異株 (*cj1135*, *cj1136*, *cj1138* 破壊株) のうち, *cj1136* 破壊株はゲノム情報から予測される構造と一致しており, 全外部コア領域を欠損し, 完全な内部コア領域を保持していた。一方, *cj1135* 破壊株の LOS 糖鎖は, 内部コア領域のグルコース 2 残基だけでなく全外部コア領域を欠損した構造であった。全外部コア領域が欠損していたのは, 内部コア領域からグルコースが欠損したことで, 内部コア領域が糖転移酵素 Cj1136 のアクセプターとして機能しなくなった可能性が考えられる。また, *cj1138* 破壊株の LOS 糖鎖は, 内部コア領域にガラクトース 1 残基が付加した構造であった。

一方, 親株と比較して胆汁酸抵抗性の大きな低下を認め, *waaC* 破壊株に次ぐ大きな LOS 糖鎖欠損が予測された *hldE* および *hldD* 破壊株については, NCTC11168 由来破壊株および 81-176 由来破壊株で同様の結果を示し, いずれもリピド A に 2-ケトデオキシオクトン酸 (Kdo) が 3 残基付加しており, 他の糖残基は存在しない LOS 構造であることが示唆された。グラム陰性菌の保有するリポ

リサッカライド (LPS) および LOS の内部コア領域および内部コア領域生合成関連遺伝子は高度に保存されており, *Escherichia coli* K-12 由来株の *hldE* 破壊株では *waaC* 破壊株と同様にリピド A に Kdo が 2 残基付加する糖鎖構造であり⁴⁾, *Haemophilus influenzae* の *hldD* 破壊株では L, D-Hep の前駆体である D, D-Hep が Kdo に結合し, そこからの糖鎖の伸長がみられない糖鎖構造であったと報告されている⁵⁾。本研究では, 親株や *waaC* 破壊株の LOS では 2 残基付加している Kdo が, *hldD* および *hldE* 破壊株では 3 残基付加しており, これまでの報告とは異なる糖鎖構造の変化が認められた。

糖鎖生合成に関する酵素欠損により生じる糖鎖構造変化を正確に予測するのは困難である。その理由として, ある酵素欠損が他の酵素による糖結合にまで影響を与える場合があり, その影響の仕方は菌株により異なることが挙げられる。例えば, 糖転移酵素の WaaF は, Kdo に結合している L, D-Hep (Hep I) にもう 1 残基の L, D-Hep (Hep II) を付加することが報告されているが, その遺伝子破壊

株の LOS 糖鎖構造は NCTC11168 由来株と 81-176 由来株とで異なる (図 2)。すなわち, NCTC11168 由来 *waaF* 破壊株は Hep I にグルコースが付加した構造を, 81-176 由来 *waaF* 破壊株はグルコースが付加しない構造をとる⁶⁾。これは, WaaF の欠損により Hep II が Hep I に付加しないと, 81-176 株ではグルコース転移酵素のアクセプターとして機能しなくなるのに対し, NCTC11168 株ではほとんど影響がないことが原因と考えられている。本研究でも NCTC11168 由来 *cj1136* 破壊株を除き, その LOS 糖鎖構造はゲノム情報から予測される構造と一致しなかったことから, 質量分析による構造解析の重要性が示唆された。

2. LOS 変異株の菌体表面疎水性

炭化水素としてオクタンを用いた bacterial adherence to hydrocarbons (BATH) 試験により疎水性を測定したところ⁷⁾, 菌体表面の疎水性は LOS 糖鎖が短くなるほど上昇していた (図 3)。特に LOS 内部コア領域が大きく欠損し, 胆汁酸抵抗性が大きく低下した変異株 (NCTC11168 *hldE*, *hldD*, *waaC* 破壊株, ならびに 81-176 *waaF*, *hldE*, *hldD*, *waaC* 破壊株) は, 親株と比較して疎水性が有意に上昇していた。以上の結果から, LOS 変異株では菌体表面の疎水性が上昇したことで胆汁酸疎水基が菌体に作用しやすくなり, 胆汁酸抵抗性が低下していると考えられた。

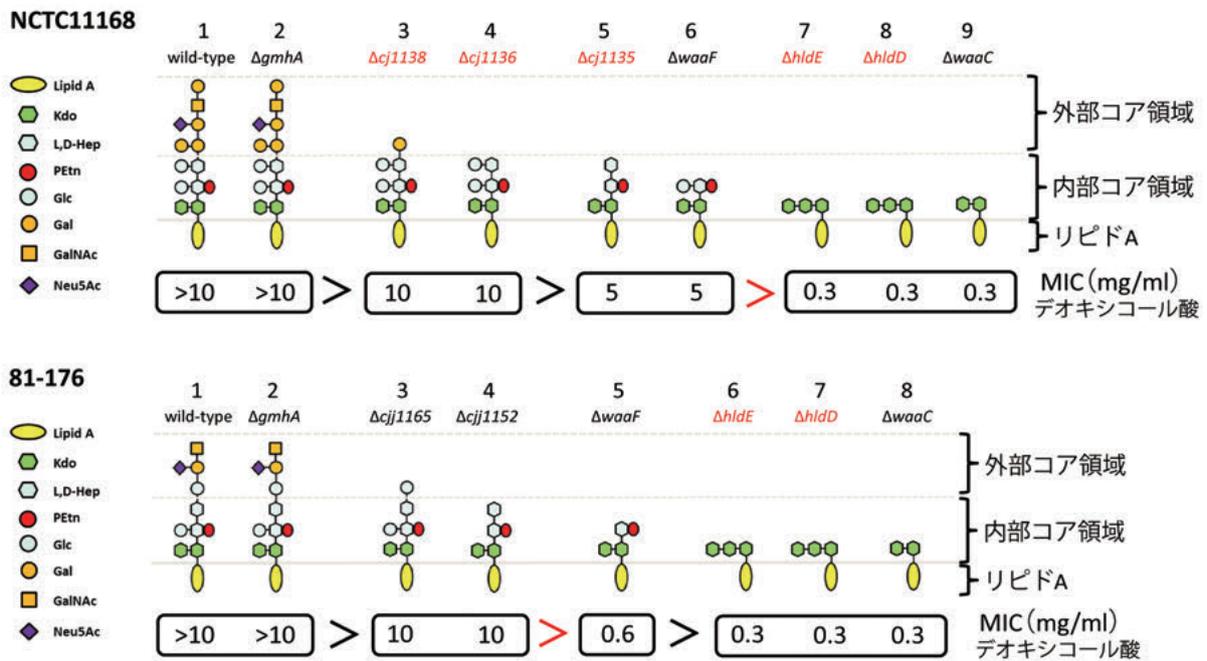


図 2. 供試菌株の LOS 糖鎖構造およびデオキシコール酸に対する最小発育阻止濃度 (MIC) *C. jejuni* の必須遺伝子である *gmhB* を除き, 図 1 に示した LOS 合成酵素の変異株を作成した。LOS 変異株では, ホモログの存在が報告されている *gmhA* の破壊株を除き, 糖鎖欠損が認められた。赤字の変異株については本研究により LOS 糖鎖構造を決定した。赤字の不等号は大きな差があったことを示す。

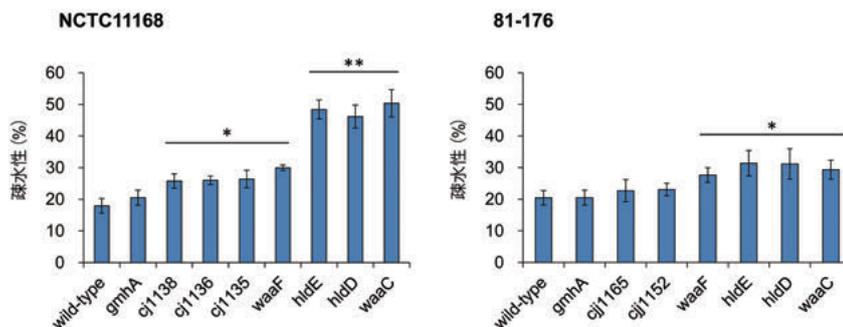


図 3. LOS 変異株の菌体表面疎水性

* : $p < 0.05$ vs wild-type, ** : $p < 0.05$ vs * 群。

残された課題

これまで、グラム陰性菌の細胞表面糖脂質 (LPS/LOS) は動物腸管内定着に関わることが示唆されていたが、糖鎖のどのような構造変化が腸管内定着に影響するのか不明であった。本研究により、*C. jejuni* の LOS 内部コア領域の Kdo に糖が 2 残基以上付加することが本菌の胆汁酸抵抗性に重要であり、鶏腸管内での菌の生残に有利に働く可能性が示唆された。鶏腸管内定着維持のために必要な糖鎖生合成酵素の阻害剤は、本菌の定着阻止技術の開発につながる可能性がある。

一方で、*C. jejuni* が鶏腸管内で生残・定着する機序については未だに不明な点が多く、現在、LOS 以外の因子についても検索・解析を進めているところである。複数の鶏腸管内定着因子について、定着阻止のための標的因子として適切か否か評価し、農場における *C. jejuni* 制御技術の開発につなげていきたいと考えている。

謝 辞

本研究は平成 24 ~ 25 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

引用文献

1) Begley, M., Gahan, C.G. & Hill, C.: The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625-651 (2005).

2) Lin, J., Michel, L.O. & Zhang, Q.: CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2124-2131 (2002).

3) Iwata, T., Chiku, K., Amano, K., et al.: Effects of lipooligosaccharide inner core truncation on bile resistance and intestinal colonization of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE.* 8, e56900 (2013).

4) Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S.N., et al.: Enhanced Biofilm Formation by *Escherichia coli* LPS Mutants Defective in Hep Biosynthesis. *PLoS ONE.* 7, e51241 (2012).

5) Nichols, W.A., Gibson, B.W., Melaugh, W., et al.: Identification of the ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase (*rfaD*) and heptosyltransferase II (*rfaF*) biosynthesis genes from nontypeable *Haemophilus influenzae* 2019. *Infect. Immun.* 65, 1377-1386 (1997).

6) Naito, M., Frirdich, E., Fields, J.A. et al.: Effects of sequential *Campylobacter jejuni* 81-176 lipooligosaccharide core truncations on biofilm formation, stress survival, and pathogenesis. *J. Bacteriol.* 192, 2182-2192 (2010).

7) Rosenberg, M., Gutnick, D. & Rosenberg, E.: Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29-33 (1980).