

主論文の要旨

Lipopolysaccharide-Deficient Mutants of *Salmonella enterica* Have Increased Sensitivity to Catechins

〔 *Salmonella enterica* のリポ多糖欠損変異株は
カテキンに対する感受性が増加した 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
微生物・免疫学講座 分子病原細菌学分野

(指導：荒川 宜親 教授)

吉井 美穂

【緒言】

茶の健康効果は長期にわたり知られており、最近 25 年の間に生物活性をもつ緑茶抽出物が特定されてきた。緑茶抽出物の主成分はカテキンであり、(-)-epicatechin、(-)-epigallocatechin、(-)-epicatechin gallate および(-)-epigallocatechin gallate として他の関連した合成物から成っている。カテキンの特性の一つは、抗菌活性である。カテキンの抗菌機序についてはいくつかの仮説があるが、人工リポソームによる研究ではカテキンが主に脂質二重層に損傷を引き起こすことによって抗菌効果を及ぼすという考えを裏づけている。

通常、グラム陽性菌はグラム陰性菌よりカテキンの影響を受ける。生貝らは、感染性の違いは細菌細胞表面の違いに起因すると述べており、すなわちこれは、グラム陰性菌の外膜はカテキンに対する強固なバリアを構成しているということを示している。しかしながら、一方で、*Vibrio* spp. は腸内細菌科に属する *Escherichia coli* や *Salmonella* spp. といった他のグラム陰性菌よりカテキンに影響されやすいことを示した報告もある。*Vibrio* spp. もまたリポ多糖体 (lipopolysaccharide ; 以下、LPS) を含む外膜を有しているが、LPS構造は腸内細菌科のそれとはわずかに異なる。これらの結果は、外膜の有無がカテキンに対する感染性に影響を及ぼす可能性がある唯一の因子でないことを示唆しており、グラム陰性菌の細胞表面構造も考慮されなければならない。

この研究において、我々は O 抗原を欠損、あるいはコア多糖の長さが異なる *Salmonella enterica* の変異株を用いてカテキンへの感染性と LPS 構造の関係を調査した。

【材料と方法】

(1) 菌株と培養条件

菌株として前述した *Salmonella enterica* 血清型 Minnesota (R50、R5、R7、R4 と R595) を使用した。これら菌株の O 抗原およびコア多糖の構造を Figure 1 に示す。対照菌株として全長 LPS を持つ野生株 LT2 (*S. enterica* 血清型 Typhimurium) を使用した。

細菌は、通常、普通寒天培地で増殖させ、ハートインヒュージョン液体培地を用いて 37°C 一晚培養した。

(2) (-)-Epigallocatechin および (-)-Epigallocatechin Gallate の抗菌活性に対する耐性

(-)-Epigallocatechin および (-)-epigallocatechin gallate はシグマ社から購入した。どちらの試薬も 1×10^6 - 10^7 CFU/mL の菌数で終濃度が 0.25、0.5、1 mg/ml になるよう調整した。各試薬の抗菌活性は殺菌時間によって分析した。懸濁液は 96 穴プレートで 37°C、6 時間静置培養し、1 時間ごとに採取し、菌数の計測 (CFU) に供した。菌数を計測するために PBS を用いて 10^{-1} - 10^{-9} までの希釈列を準備し、寒天培地に接種した後、37°C で一晚培養した。

【結果】

カテキンの抗菌活性を殺菌時間によって評価した (Figure 2)。対照菌株である LT2 は 0.25 mg/ml 濃度の(-)-epigallocatechin および(-)-epigallocatechin gallate において 6 時間経過後も生菌が認められた (Figure 2C, F)。比較的短いコア部分を持つ変異株 R595, R4 そして R7 は全濃度において 6 時間以内に殺菌された (Figure 2)。Rc LPS (すなわち、Rd1 LPS (R7) にガラクトース-グルコースが結合したもの) を持つ変異株 R5 は(-)-epigallocatechin および(-)-epigallocatechin gallate とともに 0.25 mg/ml 濃度で 6 時間後も生菌が認められた (Figure 2C, F)。Ra LPS をもつ (すなわち、全長コア多糖をもつが O 抗原を持たない) 変異株 R50 は 0.25 mg/ml 濃度の(-)-epigallocatechin gallate において 6 時間後も生菌が認められた (Figure 2C)。

【考察】

カテキンの抗菌機序は不明なままであるが、カテキンの界面活性が脂質二重層に損傷を与えるという根拠は存在する。さらにカテキンに対する感受性は菌種や菌株によって異なる。例えば、グラム陽性菌はグラム陰性菌より影響されやすい。生貝らはこの相違はカテキンとグラム陰性細胞表面の反発により引き起こされていると述べており、それは LPS によって覆われていることを指している。しかしながら、グラム陰性菌の中でも、*Vibrio* spp. は腸内細菌よりカテキンに対してより高い感受性を示すと報告されており、これらはカテキンに対する感受性はいくつかの分子機構と関連しており、細胞表面の LPS の有無だけで決定されるものではないということを示唆している。したがって、LPS の構成要素もまたカテキンへの感受性に影響を及ぼす可能性が考えられる。

LPS はリピド A、コア多糖そして O 多糖 (O 抗原) の 3 つの領域からなる複合糖脂質であり、グラム陰性菌の物理的安定に関与することで抗菌分子に対するバリアとして働いている。リピド A はエンドトキシンとして作用する疎水性領域であり、グリコシル残基のポリマーである O 抗原は親水性表面層を構成するコア多糖を介してリピド A に結合するが、O 抗原の繰り返し単位のサイズや数は、菌の属や種間の相違、さらに増殖の化学的、物理的条件で異なっている。

この研究では LPS 欠損変異株に対する抗菌活性を、時間によるそれぞれの菌株の死滅曲線によって評価したところ、O 抗原の欠損とコア多糖の短縮がカテキンの抗菌活性に対する感受性を増加させるという結果を得た。これらは不完全な LPS が細胞表面の物理的特性に影響を与えているという可能性とともに、O 抗原の欠損が細胞表面の親水性を弱め、疎水性の性質を与えるコア多糖が短くなることによってカテキンの脂質二重層への接触を容易にしているかもしれないという可能性を示唆している。また薬剤排出ポンプのような他の要因が関係している可能性も考えられるが、今回の結果からは、細胞表面の LPS 構造がカテキンの抗菌活性の耐性にとって重要であるように思われた。

【結語】

不完全な細胞外膜構造を持つ変異体株は、完全な細胞外膜構造をもつ菌株よりカテキンに対して感受性を増加させた。したがって、カテキンの抗菌活性からグラム陰性菌を守るために O 抗原とコア多糖が重要な役割を果たしているものと考えられた。