

共生における接着の効果

片倉 啓雄

微生物の研究の多くは、その単離と同定からはじまるため、私たちは単離した微生物を純粋培養することに疑いをもつことは少ない。しかし、自然界では、ある環境に単一の微生物が生息していることはごく希であり、さまざまな微生物が共存して複合微生物系を形成している。発酵食品などの人工的な環境においてさえ、一部の微生物管理が行き届いた発酵食品を除いて、酵母、乳酸菌、糸状菌など複数の微生物が共存している。

これらの複合微生物系において、ある微生物は、

- ① 他の微生物が生産する物質を基質として受け取る。
- ② 生育に不利になる物質を、他の微生物による分解あるいは資化によって除去してもらう。
- ③ 他の微生物が分泌する加水分解酵素の働きによって生じる基質を利用する。
- ④ 他のある微生物が生産する抗菌物質がその他の(彼我以外の)微生物を駆逐することにより、基質の競合が軽減される。

などの恩恵を受けている。

本稿では、自然界での微生物たちの営みを理解し、応用するために、まず、乳酸菌や酵母など身近な微生物の共生系における①~④の実例をいくつか紹介し、基質の取り込みおよびシグナル分子と受容体の kinetics を確認した上で、実験室では見落としがちな接着の効果について述べる。

身近な共生系の例

伝統的なヨーグルトには、*Lactobacillus bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* が共存していることが知られている¹⁾。 *Lb. bulgaricus* はそのプロテアーゼによって乳タンパク質を分解してアミノ酸を得るが、*S. thermophilus* はこのアミノ酸を利用しており、③の関係が成立している。一方、*S. thermophilus* は *Lb. bulgaricus* に対して、プリン生合成に必要な CO_2 、ギ酸、葉酸を供給しており、①の関係が成立している。また、両者が生産する乳酸は、その他の微生物の成育を阻害するため④の関係も成立していると言える。

ところで、偏性嫌気生菌は、その純粋培養において CO_2 を要求することが多い。*Bifidobacterium longum* は、ミルク分解培地では、単に N_2 ガスを通気して嫌気にしても増殖せず、20%程度の CO_2 を含む嫌気ガスを通気する必要がある²⁾。 $^{13}\text{CO}_2$ を用いた解析の結果、アスパラギン酸の他に核酸の生合成に CO_2 が必要であると推定されたことから、ミルク分解培地にピリミジンとプリ

ンを共に添加したところ、 CO_2 を含まない N_2 ガスを通気しても良好に増殖した(未発表)。現在の地球の大気には酸素が21%含まれているが、土壌や消化管などが嫌気的な環境になるのは、ほとんどの場合、微生物が呼吸によって酸素を消費するからである。これは裏を返せば、自然界の嫌気的な環境には、ほとんどの場合、約20%の CO_2 が含まれていることを意味している。偏性嫌気生菌や一部の通性嫌気性菌(例えば上述のヨーグルトの例における *Lb. bulgaricus*) の炭酸同化系はこの濃度の CO_2 が存在することを前提とした(CO_2 あるいは HCO_3^- に対する K_m が低くない) システムになっていることは想像に難くない。言葉を換えれば、これらの微生物にとって、好気性菌あるいは通性嫌気性菌は、十分な濃度の CO_2 を供給してくれるパートナーであり、①の関係が成立していることになる。

乳酸菌はその名の通り、生育に伴って乳酸を著量生産し、pHの低下と乳酸そのものによる阻害を受けるが、酵母は酸素が利用できれば乳酸を炭素源として資化するものが多い。一方、酵母の多くはデンプンなどの多糖やオリゴ糖を資化することができないが、乳酸菌の中にはこれらを資化できるものが少なくない。つまり、乳酸菌にとって酵母は、自身の代謝産物であるが阻害的に働く乳酸を除去してくれるパートナーであり、酵母にとって乳酸菌は自身が資化できない炭素源を乳酸に変換してくれるパートナーであると言える。

ロシアのコーカサス地方の伝統的な発酵乳においては、乳酸菌 *Lactobacillus kefiranofasiens* が多糖を生産し、酵母と共にケフィール粒と呼ばれる共生体を形成している。この多糖は、ケフィランと呼ばれ、保湿性や免疫賦活などの有用な機能をもつため、その生産方法が検討されたきた。しかし、この乳酸菌を純粋培養すると、乳酸の蓄積とともにケフィラン生産性は著しく低下してしまう。そこで、Cheirsilpら³⁾は、乳糖を炭素源とし、乳酸資化が良好で乳糖を資化しない *Saccharomyces cerevisiae* IFO0216と、この乳酸菌を好氣的に共培養することによってケフィラン生産性を向上させている。Tadaら⁴⁾は、さらに、乳酸菌による乳酸生産と酵母による乳酸資化のバランスがとれるように乳糖を流加することによって、純粋培養時の2/3の培養時間でケフィランの対糖収率と生産量をともに1.5倍に向上させている。これらは①および②の関係をうまく利用できた例といえるだろう。

日本酒の生もと造りには、さまざまな微生物が関与している^{5,6)}。近代の日本酒醸造は、雑菌の増殖を防ぐため、

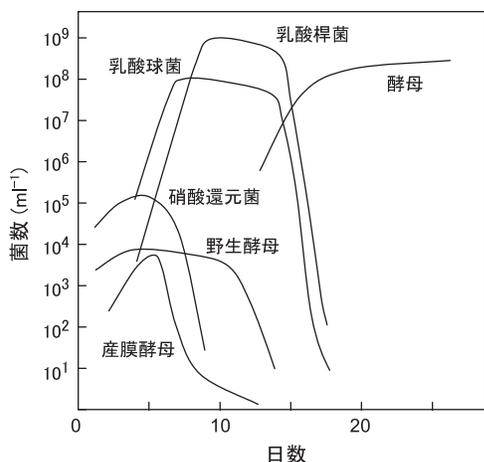


図1. 生もと中の微生物の遷移 (文献5から許可を得て転載)

米麴に外部から乳酸を添加して酵母を培養した、速醸もとを用いて行われることが多い。これに対して、伝統的な生もと造りにおいては、次のような巧妙な方法で雑菌汚染を防いでいる。まず、低温で米麴を仕込むと、仕込み水に由来する *Pseudomonous* 属や *Enterobactor* 属などの細菌が硝酸塩を還元して亜硝酸を生成する(図1)。次いで、麴に由来する *Leuconostoc mesenteroides* や *Lactobacillus sake* などの乳酸菌が増殖して乳酸を生成し、硝酸還元菌を死滅させるとともに、乳酸と亜硝酸との相乗作用によって野生酵母を含む雑菌を死滅させる。ここに純粋培養した酵母を添加すると、これらの乳酸菌はエタノールに弱いため、酵母の発酵が始まると速やかに死滅し、結果として、原料を殺菌することなく、添加した酵母のみからなる種母ができあがる。このとき酵母は、麴菌から糖化酵素によって③の恩恵を、硝酸還元菌と乳酸菌によって④の恩恵を受けており、さらに、以下に述べるように②に相当する恩恵も受けることになる。すなわち、原料の米に含まれる脂肪酸は主にリノール酸(18:2)とパルミチン酸(16:0)であるが、上述の乳酸菌は、低温での増殖時に不飽和脂肪酸を取り込むため、その後に接種された酵母は残った飽和脂肪酸を取り込み、細胞膜の脂肪酸の飽和度は著しく高まる。これによって酵母はエタノールに対する耐性が高まり、醗酵が進んでも死滅を免れるという恩恵を受けており、その結果、私たちが酵母の内容物の漏出に由来する雑味が少ないすっきりした清酒を味わえる、という恩恵を受けているのである。

基質の取り込みとシグナリングの kinetics

ここで、細胞が基質を取り込む場合、および、細胞表面層の受容体でシグナル物質を感知する場合の kinetics を確認しておく。一般に、細胞が基質を取り込む速度 V は、Monod型となり、最大の取り込み速度を V_m 、最大の

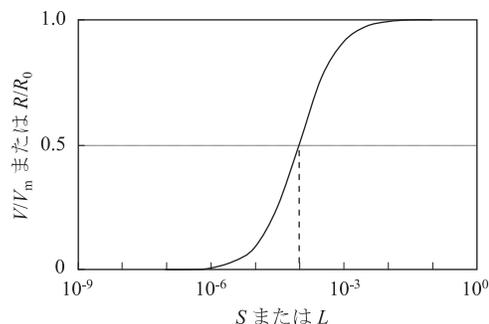


図2. トランスポーターまたは受容体の応答. K_m または K_D が 10^{-4} M の場合.

$1/2$ の取り込み速度を与える基質濃度を K_m とすれば

$$\frac{V}{V_m} = \frac{S}{S + K_m} \quad (1)$$

の関係がある。また、シグナル伝達物質が細胞表面層の受容体に結合する場合も同様に、全受容体濃度を R_0 、シグナル伝達物質が結合している受容体濃度を R 、遊離のシグナル伝達物質濃度を L とすれば、受容体の結合率 f は、シグナル伝達物質の受容体からの解離定数 K_D を用いて、

$$f = \frac{R}{R_0} = \frac{L}{L + K_D} \quad (2)$$

で与えられる。いずれの場合も、基質またはシグナル物質の濃度の対数に対してそれぞれ V/V_m または R/R_0 をプロットすれば、図2に例示するようなシグモイド型のカーブになる。

分子の拡散速度が共存する細胞の挙動に及ぼす影響

液体中での分子の拡散は意外に遅く、拡散係数は $10^{-9} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ オーダーであることが知られている。これは、マグカップの底に沈んだ砂糖(ショ糖)の分子が液面まで拡散するには、もし対流がなければ、数十日のオーダーを要することを意味する。実験室で微生物を培養する場合、培養の再現性を高め、均一なサンプリングを行うために、液体培地を用いて攪拌しながら培養を行うことが多く、この場合、ある微生物の細胞が生産する物質は、短時間で系全体にほぼ均一に拡散する。これに対して自然界では、微生物は半固体状の高粘度の環境で生育していることが少なくない。分子の拡散速度は粘度に反比例するので、粘度が高いほど、生産物はそれを生産する細胞の周囲にとどまりやすくなり、濃度に分布が生じる。また、固形分がない環境であっても、細胞外に多糖を生産するなどして、流れや対流が少ない状態になれば、やはり、生産物の濃度には分布が生じる。

この濃度分布は、周囲に存在する微生物にとって、ど

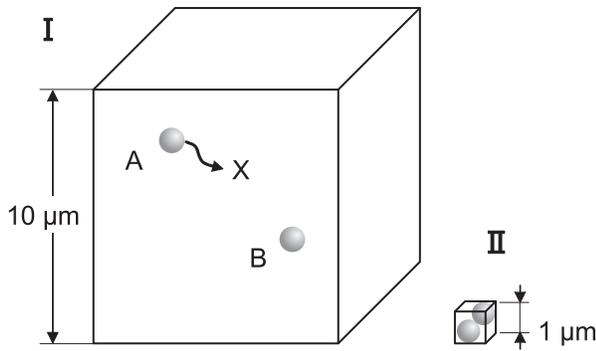


図3. 細胞Aが生産する物質Xと細胞B

のような意味をもつのかを考えてみよう。一辺10 μm の立方体 ($=10^{-12} \text{ l}$) の中に細胞AとBが1個ずつ存在する状態Iを考える(図3)。これは液体培養では、それぞれの細胞の濃度が 10^9 cells/ml になったときに相当する。この状態で一つの細胞Aが1 amol ($=10^{-18} \text{ mol}$) の代謝産物Xを生産し、Xが立方体内に均一に拡散したとすれば、その濃度は 10^{-6} M である。もし、これら2つの細胞が物質の拡散が遅い環境において近接して存在し、その状況が一辺1 μm の立方体 ($=10^{-15} \text{ l}$) の中に2つの細胞が置かれた状態IIに近似できるとすれば、この立方体中でのXの濃度は 10^{-3} M となる。この時、細胞Aが生産する物質Xを細胞Bが基質とし、その輸送タンパク質の K_m が 10^{-4} M であるなら、状態Iでは $V=0.01V_m$ であるのに対して、状態IIでは $V=0.91V_m$ となる(式(1)、図2)。同様に、Xが細胞Bに対するシグナル伝達物質であれば、状態Iでは細胞Bの受容体の1%しか応答していないのに対して、状態IIでは91%の受容体が応答していることになる(式(2)、図2)。

ここで状態IとIIが、それぞれ、実験室で2種類の微生物を液体培地で攪拌しながら共培養をする場合と、自然界で2種類の微生物が接着して高粘度の環境に置かれた場合に相当すると考えれば、上述の計算結果は、実験室では、彼らの本来の挙動とは全く異なる挙動を観察してしまう可能性を示唆している。

微生物の接着機構

ある微生物にとって、パートナーから得たい物質の濃度は、パートナーに近づくほど高く、逆に、パートナーに処理してもらいたい物質の濃度は、パートナーに近づくほど低くなる。従って、冒頭に述べた4つの恩恵は、いずれも、パートナーの細胞に近接するほど大きくなり、パートナーの細胞に接着すれば最大の恩恵を受けられることになる。とすれば、微生物は積極的にパートナーと接着し、さらには、接着したことを認識して応答していると考えられる。

Cheirsilpらは、先に述べた*S. cerevisiae* IFO0216と共培養で*Lb. kefiranofasiens* JCM6985によるケフィラン生産を向上させる研究において、*S. cerevisiae*は、その乳酸除去の効果以上に*Lb. kefiranofasiens* JCM6985のケフィラン生産を促進することに気づいた⁷⁾。熱処理して不活性化した酵母を添加した場合にもケフィラン生産が促進され、逆に、酵母(生菌)をカラギーナンゲルに封入すると、促進効果は観察されなくなったことから、酵母との物理的な接触によってケフィラン生産が増加したと考えられた。その後、蛍光標識した酵母のインペルターゼ(酵母の細胞壁に局在し、高マンノース型の糖鎖をもつ)によって、*Lb. kefiranofasiens* JCM6985および*Lactococcus lactis* IL1403の細胞が酸性pHにおいて染色されることが確認できたので、乳酸菌の表層のマンナンを認識するタンパク質の分離同定を試みた⁸⁾。すなわち、*Lc. lactis*の細胞を等張液中で溶菌酵素処理して表層のタンパク質を可溶化し、インペルターゼを固定したカラムでアフィニティ精製し、二次元電気泳動で分離した。その結果、DnaK, GroEL, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)など、本来は細胞質に局在するタンパク質が同定され、大腸菌で発現させたDnaKはpH4において0.1 mg/ml以上の濃度で*Lc. lactis* IL1403細胞と*S. cerevisiae* IFO0216細胞を凝集させた。

微生物が細胞質タンパク質をヒト細胞などとの接着タンパク質として細胞表層に局在させる例は以前から知られており、*Escherichia coli*⁹⁾および*Helicobacter pylori*¹⁰⁾のDnaK (hsp70)、*Legionella pneumophila*¹¹⁾、*Clostridium difficile*¹²⁾、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*¹³⁾、*Salmonella typhimurium*のGroELs (hsp60)¹⁴⁾がヒト細胞への接着に、*Paracoccidioides brasiliensis*のGAPDH¹⁵⁾が宿主細胞の細胞外マトリクスに、*Lb. plantarum* LA318のGAPDH¹⁶⁾および*Lb. johnsonii* LalのGroEL¹⁷⁾およびelongation factor Tu¹⁸⁾が腸管のムチンとの接着に関与することが報告されている。さらに、S-layer proteinをはじめとする腸内細菌の細胞壁に局在するさまざまなタンパク質は、腸管のムチンの他に、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリクスタンパク質に親和性をもつことが報告されており^{19,20)}、最近では、*Lb. rhamnosus* GGは繊毛の構成タンパク質であるSpaCでムチンに結合することが報告されている²¹⁾。

接着による微生物の応答

図4に示すように、ある細胞Aがパートナーの細胞Bと接着したとき、パートナーが生産する物質の濃度は大きく上昇し、細胞内への取り込み速度は著しく増大し、また、パートナー細胞表層の構成物に対する受容体は、常に細胞内にシグナルを伝える状態になるだろう(図4)。

Kawaraiらは、乳酸菌と酵母が特定の組み合わせで培養すると多糖を生産してバイオフィルムを形成し、酵母

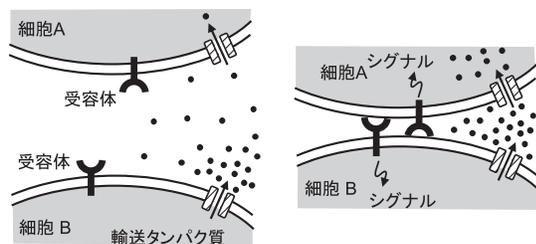


図4. 接着の効果

の表層の状態が変化することを報告している²²⁾。著者らも、*Lb. casei* ATCC334は、*S. cerevisiae* IFO0216に接着すると、細胞外多糖の生産量を増加させ、polyprenyl glycosylphosphotransferase 遺伝子に相同性のある遺伝子などの発現を増加させることを確認している²³⁾。この接着によって発現量が増加した他の遺伝子の多くは、*Lactobacillus*属細菌にホモログが存在しており、酵母マンナンを添加した場合にもこれらの遺伝子発現が増加した。これらのことから、乳酸菌と酵母は、条件によって接着し、互いに接着したことを認識して応答する機構を持っていると考えられる。

接着現象の研究において留意すべき点

接着に関与する分子を特定し、その応答を調べる際には、以下に述べるように、接着の価数、pHの分布、拮抗物質の存在に注意する必要がある。

まず、細胞同士の接着は、複数の接着分子の仲介によって成立する多価の相互作用である。IgM (10価) やIgG (2価) の重鎖と軽鎖の可変領域を接続したsingle chain Fv (1価) の親和性は、もとの分子よりも低くなるのと同様に、単離した接着分子のターゲットに対する1価での親和性は低く、場合によっては測定できないこともあるだろう。実際に、これまでの報告において、接着分子の1価での親和性を測定できている例は少なく、接着分子であることの確認は、接着分子の遺伝子破壊や拮抗実験によって行われている。

次に、pHの分布であるが、上述の*Lc. lactis*のDnaKの場合、酵母および乳酸菌に対する親和性はpH 4で最も高く、中性pHでは低下する。見かけ上pHが中性であっても、乳酸菌が乳酸を生産し、その拡散が遅く、周囲のpHが低下すれば、接着タンパク質としての機能は高まる。具体的には、大腸のpHは7~8とされているが、これは平均のpHであり、腸壁に接着した乳酸菌やビフィズス菌が乳酸や酢酸を生産すれば、その周辺のpHは周囲に比べて有意に低いはずである。

上述のDnaKは、酵母マンナンに対する親和性を有しているが⁸⁾、酵母エキスには酵母由来のマンナンが高濃度に含まれている。これは、乳酸菌をMRS培地などの

酵母エキスを含む培地で培養すれば、細胞表層の酵母に対する接着分子は、遊離のマンナンと結合するため、酵母との接着が妨げられることを意味している。さらに上述のDnaKは、ムチン(ブタ由来)に加えて、セルロース(パルプ由来)、キチン(エビ由来)などに対しても有意な親和性をもっており²³⁾、もし、腸内細菌の接着タンパク質も、腸壁のムチンだけでなく、これらの食物繊維に対する親和性を有しているのであれば、腸壁への接着の研究においては、食物繊維による拮抗を考慮しなければならないことを意味している。

おわりに

微生物の共生系を理解し、活用しようとするなら、その環境を理解した上で、彼らの挙動を上手に制御する必要がある。そのためには、複雑な菌叢のリアルタイム解析に加えて、不均一系での物質の濃度分布の解析、食物繊維を含めて腸内環境を再現し得る実験系など、これまでにない研究手法が求められるだろう。

文 献

- 1) Sieuwerts, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 7775 (2010).
- 2) Ninomiya, K. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 535 (2009).
- 3) Cheirsilp, B. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **100**, 43 (2003).
- 4) Tada, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 557 (2007).
- 5) 溝口晴彦: 生物工学ハンドブック, p.561, コロナ社 (2005).
- 6) <http://www.kikumamune.co.jp/daigakuin/hakushi/hakushi01.html>
- 7) Cheirsilp, B. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 279 (2003).
- 8) Katakura, Y. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 319 (2009).
- 9) Jesus, M. C. *et al.*: *J. Infect. Dis.*, **192**, 1430 (2005).
- 10) Huesca, M. C. *et al.*: *Infect. Immun.*, **66**, 4061 (1998).
- 11) Garduno, R. A. *et al.*: *Infect. Immun.*, **66**, 4602 (1998).
- 12) Hennequin, C. *et al.*: *Microbiology*, **147**, 87 (2001).
- 13) Goulhen, F. *et al.*: *Infect. Immun.*, **66**, 5307 (1998).
- 14) Ensgraber, M. and Loos, M.: *Infect. Immun.*, **60**, 3072 (1992).
- 15) Barbosa, M. S. *et al.*: *Infect. Immun.*, **74**, 382 (2006).
- 16) Kinoshita, H. J. *et al.*: *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 1667 (2008).
- 17) Bergonzelli, G. E. *et al.*: *Infect. Immun.*, **74**, 425 (2006).
- 18) Granato, D. *et al.*: *Infect. Immun.*, **72**, 2160 (2004).
- 19) Lebeer, S. *et al.*: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 728 (2008).
- 20) Sanchez, B. *et al.*: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **54**, 1 (2008).
- 21) von Ossowski, I. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2049 (2010).
- 22) Kawarai, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4673 (2007).
- 23) 片倉啓雄: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 101 (2011).