

ノンターゲットリポドミクスを用いた酢酸菌の機能性脂質の探索

岡橋 伸幸

大阪大学大学院情報科学研究科

研究の目的

酢酸菌は α プロテオバクテリアに属するグラム陰性細菌であり、エタノールを酢酸へ酸化する能力を有することから、古くから酢醸造に利用されてきた。さらに、カスピ海ヨーグルトやカカオ発酵、ナタデココ、コンブチャなど多様な食品発酵の製造にも関与しており、食産業において極めて重要な微生物群である。近年、酢酸菌の細胞膜脂質やグラム陰性菌に特有のリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) が、酢酸菌のストレス耐性に関与するだけでなく、免疫応答や炎症制御といった宿主生体への作用を介して機能性を発揮する可能性が指摘されている。酢酸菌は細菌としては例外的に Phosphatidylcholine やスフィンゴ脂質を生合成し、脂質の観点から非常にユニークな特徴を有する。特に、LPS の生物活性はその脂質部分である Lipid A に依存しており、アシル鎖の数や長さ、飽和度など微細な構造変化によって宿主免疫系の認識や炎症応答の強さが大きく左右される。しかし、これまでの研究は代表的な *Acetobacter* 属 のリン脂質組成や一部の Lipid A に限られており、その構造的多様性や菌株ごとの分布は未解明の部分が多い。そこで本研究では、包括的に脂質を解析できるノンターゲットリポドミクスを用いて、多様な酢酸菌種の脂質プロファイルを網羅的に明らかにすることを目的とした。

方法

Acetobacteriaceae 科に含まれる 6 属 11 種 *Acetobacter* 属 (*A. pasteurianus*, *A. orientalis*, *A. aceti*)、*Gluconobacter* 属 (*G. frateurii*, *G. oxydans*)、*Gluconoacetobacter* 属 (*Ga. takamatsuzukensis*, *Ga. liquefaciens*)、*Asaia* 属 (*As. siamensis*, *As. bogorensis*)、*Novacetobacter* 属 (*N. hansenii*)、*Acidomonas* 属 (*Ac. methanolica*) を GYC 培地で好氣的にフラスコ培養し、対数増殖中期の菌体を回収した。菌体をビーズ破砕し、メタノール・クロロホルム・水 (10:5:1) の一層抽出法により総脂質を抽出し、液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析装置 (LC-QTOF/MS, Shimadzu LCMS-9050) の Data-dependent-acquisition 法で膜脂質を分析した。データ解析には、MS-DIAL を用いた。また、TRI-Reagent で菌体からリポ多糖 (LPS) の粗抽出を行い、酸処理により多糖部分を切断することで疎水性アンカー部である Lipid A を抽出し、同様に LC-QTOF/MS で分析した。得られた MS/MS スペクトルを帰属することで、構造推定を行った。

結果

11 種の酢酸菌のノンターゲットリピドミクスを行い、グリセロ脂質、スフィンゴ脂質、プレノール脂質などを含む 195 脂質分子種を同定できた。まず、代表的なリン脂質分子種の検出強度をクラスごとに足し合わせたところ、どの菌株でも Phosphatidylcholine (PC)、Phosphatidylethanolamine (PE)、Phosphatidylglycerol (PG) が大部分を占めており（図 1）、これは既報とも一致したことから¹⁾、正しい計測ができていることが確認された。

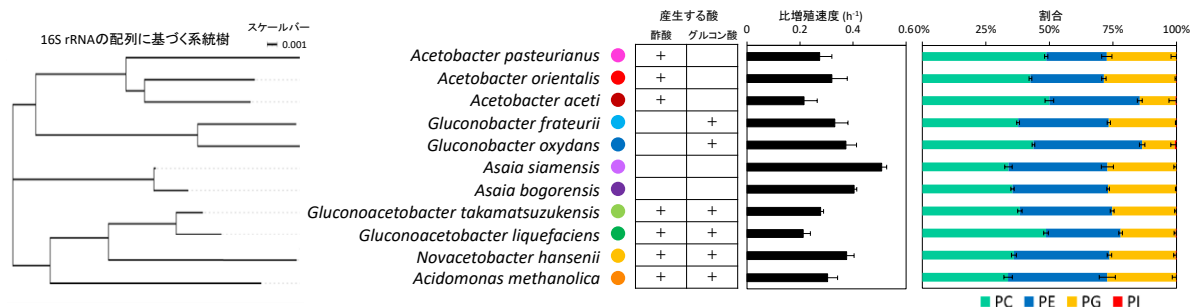


図 1 菌株ごとの系統樹と比増殖速度、リン脂質の割合

検出された脂質プロファイルの傾向を可視化するために、主成分分析を行った。スコアプロットからは属ごとにクラスターを形成する様子が見られ、属レベルの分類と脂質プロファイルが対応していることが分かった（図 2）。それぞれの菌株のプロファイルの特徴を見ると、*Acetobacter* 属および *Gluconobacter* 属は Coenzyme Q のプレニル鎖長の違いによって明確に区別されることが分かった。また、酢酸を高産生する菌株ほど奇数鎖脂肪酸を含む脂質が多く見られ、酸耐性との関連が示唆された。唯一、*Acetobacter* 属のうち *A. aceti* は他の株から離れたところにプロットされ、分類上の特異性が示唆された。

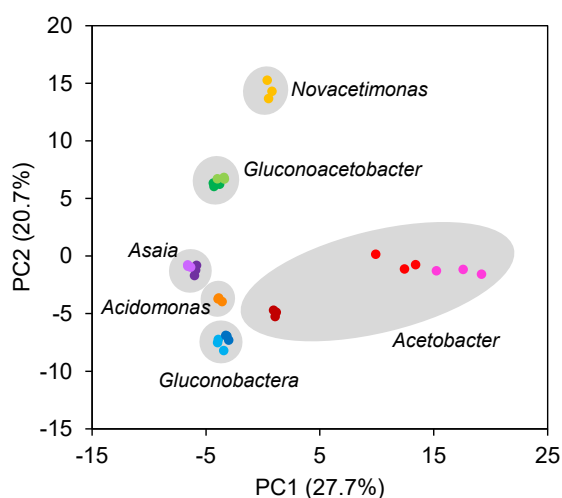


図 2 主成分分析のスコアプロット

プロットの色は図 1 の菌株名横の色と対応している。

続いて、免疫不活化作用を有する Lipid A を菌体から粗精製し、LC-QTOF/MS で分析した。既報では、*A. pasteurianus* の Lipid A は、6-acyl 型 96:0 (総アシル鎖長:総不飽和度) と報告されていたが²⁾、本研究の測定では、4-acyl 型、5-acyl 型、6-acyl 型が混在していることが明らかとなった (図 3)。さらに、6-acyl 型には 94:0~98:0、5-acyl 型には 78:0~82:0 が存在し、酢酸菌の Lipid A は非常に多様な構造の分子の集合であることが示唆された。他の酢酸菌株についても同様の解析を行い、Lipid A の分子種の存在比を比較したところ、分類上の属と対応したプロファイルを示すことが明らかとなった。

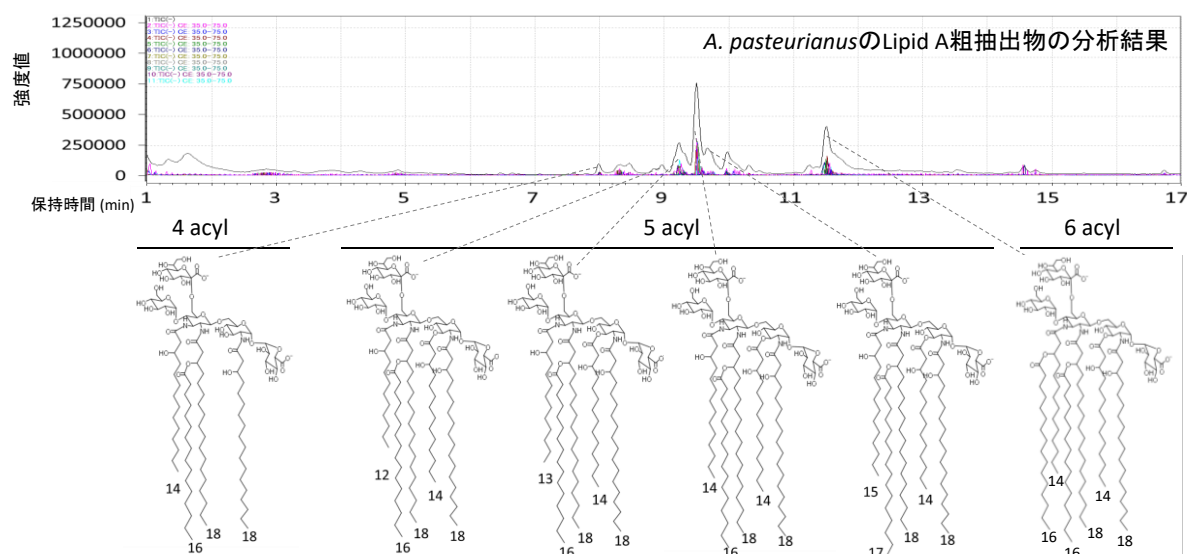


図 3 *A. pasuteruianus* の Lipid A 抽出物のクロマトグラムと構造推定結果
アシル鎖に付記された数字は炭素鎖長数を表す。

結論

本研究では、11 種の酢酸菌の脂質をノンターゲットリピドミクスで分析し、機能的脂質 Lipid A を含む包括的な脂質分子種の構造多様性と菌種ごとの不均質性を明らかにした。

文献

- 1) Han, C., Xia, K., Yang, J., Zhang, H., DeLisa, M. P., & Liang, X. (2020). Investigation of lipid profile in *Acetobacter pasteurianus* Ab3 against acetic acid stress during vinegar production. *Extremophiles*, **24**: 909–922.
- 2) Hashimoto, M. et al. (2016). Characterization of a novel D-Glycero-D-talo-oct-2-ulosonic acid-substituted lipid A moiety in the lipopolysaccharide produced by the acetic acid bacterium *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283. *J. Biol. Chem.*, **291**: 21184–21194.