

# Bacteroides 属のスフィンゴリン脂質について

加藤信子・田中香お里\*・渡辺邦友\*  
武藤吉徳\*\*・上野一恵\*\*\*

## はじめに

ヒト腸管内の腸内細菌は100種類100兆個といわれている。その腸内細菌叢(フローラ)の主要な構成員である嫌気性無芽胞グラム陰性菌の*Bacteroides*属および近縁の菌種は、腹腔内感染症などから高頻度に分離され、内因性感染症の原因菌として重要視されている<sup>1)</sup>。

*Bacteroides*属の菌種には、菌体成分としてスフィンゴリン脂質を有することが知られている<sup>2, 3, 4)</sup>。このスフィンゴリン脂質は、細菌では極めて希な存在で、*Bacteroides*属はこのスフィンゴリン脂質を含有する数少ない細菌の一群であり、分類上の同定基準の一つにもされている。

スフィンゴリン脂質は高等生物の細胞には広く分布する脂質で<sup>5)</sup>、長鎖塩基であるスフィンゴシンとリン酸を有する極性脂質で、主に生体膜安定化の構成脂質成分として機能していると考えられてきた。

真核生物のスフィンゴリン脂質に関する研究が著しい発展を示しているのに<sup>6, 7)</sup>、細菌のスフィンゴリン脂質に関する研究は非常に少ない。今までに、*Bacteroides*属のスフィンゴリン脂質についてはスフィンゴシンや脂肪酸組成などについての解析が報告されているが<sup>2, 8, 9)</sup>、極性基部分の種類や菌種間での差異については明らかにされていない。本研究では、主にヒト腸管内に常在菌群として存在する*Bacteroides*属の全10菌種と他属の菌

種からスフィンゴリン脂質を抽出し、その詳細な組成と分布状態を検討した。また、いくつかの菌株間でのスフィンゴリン脂質組成についても検討した。

## 材料と方法

### 1. 菌体の培養と脂質の抽出

菌体は*Bacteroides*属の10菌種

*B.fragilis* ATCC 25285,

*B.ovatus* ATCC 8483,

*B.uniformis* ATCC 8492,

*B.caccae* ATCC 43185,

*B.eggerthii* ATCC 27754,

*B.stercoris* ATCC 43183,

*B.merdae* ATCC 43184,

*B.thetaiotaomicron* ATCC 29741,

*B.distasonis* ATCC 8503,

*B.vulgatus* ATCC 8482, および*Prevotella*,  
*Porphyromonas*, *Megamonas*, *Bilophila*,

*Fusobacterium*を用いた。培養はヘミンとメ

ナジオンを含むGAM液体培地(日水製薬(株)製)にて、嫌気条件下(80%N<sub>2</sub>, 10%CO<sub>2</sub>,

10%H<sub>2</sub>, 35℃)で16時間行った。菌体は集菌(8000rpm)し、0.85%NaClで洗浄後Bligh-

Dyerの方法<sup>10)</sup>に従って総脂質を抽出した。

この総脂質を0.5Nのメタノール性KOHで20時間(37℃)攪拌しながら弱アルカリ加水分解した<sup>11)</sup>。次に、1N HClで中性にした後、

クロロホルム-メタノール(2:1)で抽出してアルカリで加水分解されないアルカリ安定脂

\* 岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設

\*\* 岐阜大学医学部看護学科

\*\*\* 岐阜医療技術短期大学

質を得た。一部のアルカリ安定脂質は、Silica Gel 60(半井化学(株)製)のカラム(10x100mm)にて溶出速度0.7ml/min, 溶出溶媒1, CHCl<sub>3</sub>(20ml); 2, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O50ml(11:1:0.06v/v/v); 3, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O60ml(6:1:0.07, v/v/v); 4, CHCl<sub>3</sub>-MeOH30ml(1:4, v/v)の順で溶出して、4のCHCl<sub>3</sub>-MeOH(1:4)の画分から精製されたスフィンゴリン脂質を得た<sup>12)</sup>。

## 2. 薄層クロマトグラフィー

総脂質とアルカリ安定脂質は、Kieselgel 60(Art.5626, Merck社製)の薄層板上でクロロホルム-メタノール-6.7Mアンモニア(33:15:1.25, v/v/v)とクロロホルム-メタノール-酢酸-水(42:12:3.15:1, v/v/v/v)の溶媒にて展開した<sup>13)</sup>。スポットはニンヒドリン試薬(アミノ基の検出)、Dittmer-Lester試薬(Pの検出)、50%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>などの噴霧によって発色検出した。

## 3. 赤外分光分析

赤外吸収スペクトルは、KBr 80mgに脂質0.8mgを含む錠剤を調製して赤外分光光度計(IR 408(株)島津製作所製)を用いて測定した。

## 4. リンの定量

アルカリ安定脂質中のリン含量は、渋谷ら<sup>14)</sup>のC=P結合を有するホスホノリピド以外のリン脂質のリン定量法である過ヨード酸法に従って820nmの吸光度を測定することで求めた。

## 結 果

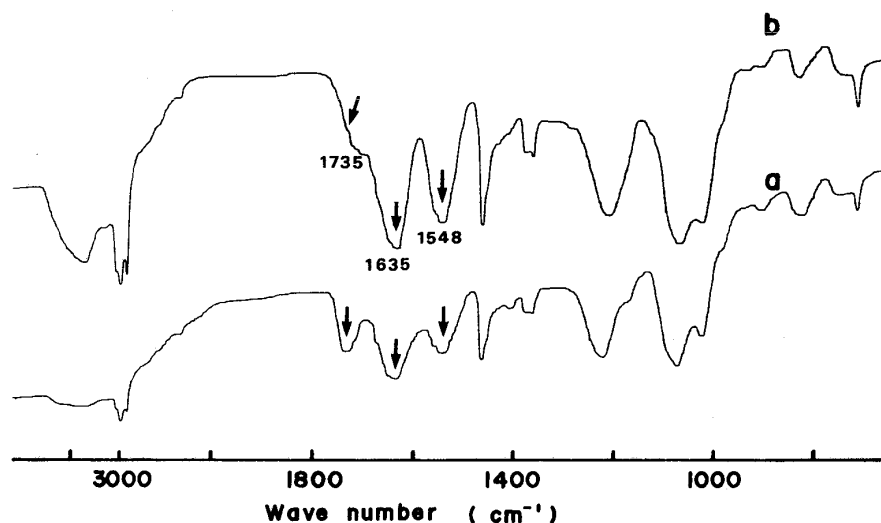
### 1. 脂質量

*Bacteroides fragilis* ATCC 25285の菌体(乾燥重量2.77g)から、160mg(5.8%)の総脂質を得た。この総脂質を弱アルカリ加水分解することにより、32mg(約20%)のアルカリ安定脂質が得られた。また、アルカリ安定脂質のリン含量は0.15 μmolP/mg(6.8mg/μmolP)であった。

### 2. 赤外吸収スペクトルによる分解

図1は総脂質(a)とアルカリ安定脂質(b)の赤外吸収スペクトルで、双方にスフィンゴリン脂質特有のアミド結合由来の1635cm<sup>-1</sup>と1548 cm<sup>-1</sup>の吸収が見られるが、スペクトル(b)のアミド吸収帯はスペクトル(a)のそれより大きく、シャープになっている。また、グリセロリン脂質由来と考えられるエステル結合の吸収(1735 cm<sup>-1</sup>)は、アルカリ

図1 *B. fragilis* ATCC25285 由来リン脂質の赤外吸収スペクトル



a : 総脂質      b : アルカリ安定脂質

安定脂質のスペクトルbでは完全に消失している。したがって、今回得られたアルカリ安定脂質は、スフィンゴリン脂質として精製されてきていることが分かる。

### 3. スフィンゴリン脂質の薄層クロマトグラフィ

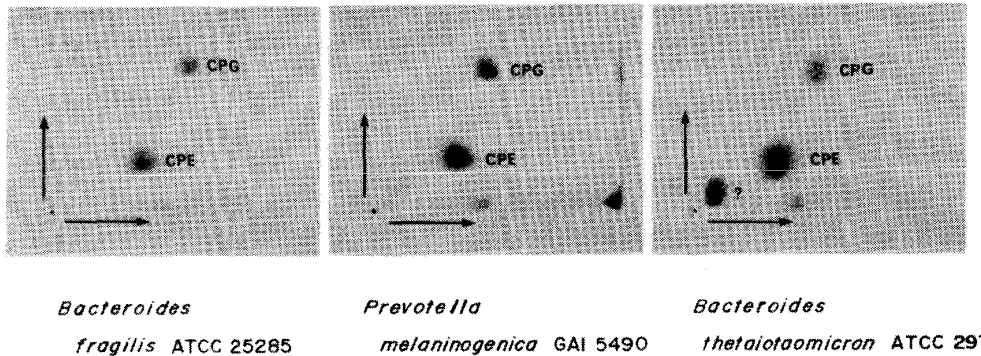
図2は*Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Prevotella melaninogenica* GAI 5490, および*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741からのスフィンゴリン脂質を二次元TLCで展開した結果である。かつて、*Bacteroides* に属していた *Prevotella melaninogenica* はホワイトら<sup>13)</sup>がこの菌体のスフィンゴリン脂質を分析してセラミドホスホリルエタノールアミン(CPE)とセラミドホスホリルグリセロール(CPG)をはじめ

同定した菌種である。今回、私たちもDittmer-Lester試薬とニンヒドリン試薬に対して陽性を示すスポットCPE(Rf=0.19, 0.31)とDittmer試薬にのみ陽性を示すスポットCPG(Rf=0.51, 0.44)をTLC上で確認した。さらに、図2に示すように*B.fragilis*と*B.thetaiotaomicron*にもCPEとCPGが存在することが見いだされた。また、*B.thetaiotaomicron*にはDittmer試薬に陽性を示し、含有量的にもかなり多いとみられる未知物質のスポット(Rf=0.07, 0.07)が検出された。

### 4. 菌種間のスフィンゴリン脂質

*B.fragilis*や*B.thetaiotaomicron*にもCPEとCPGが存在することが明らかになったので、*Bacteroides*属全10菌種のスフィンゴリン脂質の組成について検討した。図3に*Bacteroides*

図2 嫌気性菌スフィンゴリン脂質の二次元薄層クロマトグラフィ



薄層板：Kieselgel 60    溶媒：クロロホルム-メタノール-6.7Mアンモニア(一次) (33:15:1.25, v/v/v)  
 溶媒：クロロホルム-メタノール-酢酸-水(二次) (42:12:3.15:1, v/v/v/v)    発色：(1) Dittmer-Lester試薬  
 (2) ニンヒドリン試薬

表1 *Bacteroides* 属におけるスフィンゴリン脂質

Organism			Spot							
			a	b	c	d	CPE	f	CPG	
<i>B.fragilis</i>	ATCC	25285		P				PN		P
<i>B.ovatus</i>	ATCC	8483		P		P		PN		P
<i>B.uniformis</i>	ATCC	8492		P		P		PN		P
<i>B.caccae</i>	ATCC	43185		P		P		PN		P
<i>B.eggerthii</i>	ATCC	27754		P		P		PN		P
<i>B.thetaiotaomicron</i>	ATCC	29741		P		P		PN		P
<i>B.stercoris</i>	ATCC	43183		P		P		PN		P
<i>B.merdae</i>	ATCC	43184	P			P			P	
<i>B.distasonis</i>	ATCC	8503	P		P	P			P	
<i>B.vulgatus</i>	ATCC	8482	P		P	P			P	

P: Dittmer試薬陽性

N: Ninhydrin試薬陽性

属10菌種のスフィンゴリン脂質のTLCと、そのまとめを表1に示した。7菌種からCPEとCPGの双方が検出された。図3のdは、図2 *B.thetaiotaomicron*の未知物質に対応するスポットで、9菌種に存在している。その他、a, b, c, fのスポットが検出されており、*Bacteroides*属の各菌種には3, 4種類のスフィンゴリン脂質が存在すると考えられる。

今回の分析から、*Bacteroides*属のスフィンゴリン脂質の組成は、大きく四つの型に分けられる。すなわち、表1に見るように(1) *B.fragilis*の型、(2) *B.ovatus*, *B.uniformis*, *B.caccae*, *B.eggerthii*, *B.thetaiotaomicron*, *B.stercoris*の型、(3) *B.merdae*の型、そして(4) *B.distasonis*, *B.vulgatus*の型である。

5. 菌株間のスフィンゴリン脂質の分布

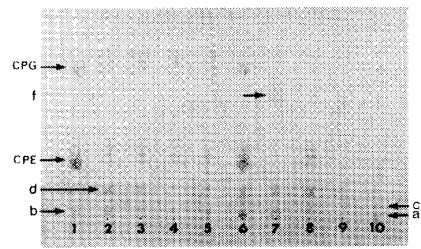
図4と表2は *B.fragilis*, *B.ovatus*, *B.thetaiotaomicron*, と *B.distasonis*, 等それぞれの菌株間におけるスフィンゴリン脂質の分布をみたものである。今回分析した菌株は臨床分離株を含んでいるが、これらの菌株内でのスフィンゴリン脂質の組成にほとんど変異は認められなかった。したがって、スフィンゴリン脂質の組成は、*Bacteroides*属の各菌種において比較的安定した性状であると考えられる。

6. その他の菌種

*Prevotella*属の4菌種、*Porphyromonas*属の1菌種、*Megamonas*属の1菌種、*Bilophila*属の1菌種と *Fusobacterium*属の3菌種におけるスフィンゴリン脂質の分布を表3に示した。

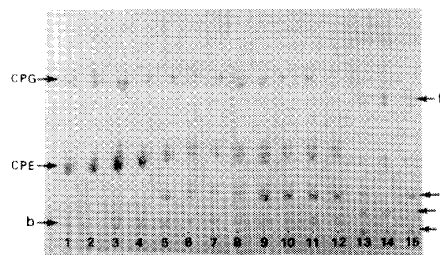
かつて *Bacteroides*に属していた *Prevotella* および *Porphyromonas*属の菌種からはCPEとCPGの両者が検出された。しかし、*Megamonas*属、*Bilophila*属からはCPEとCPGは検出されなかったが、スフィンゴリン脂質(アルカリ安定脂質)に対応する脂質を有した。*Fusobacterium*属の3菌種からはスフィンゴリン脂質に相当する脂質は検出されなかった。

図3 *Bacteroides*属におけるスフィンゴリン脂質



- |                                  |   |
|----------------------------------|---|
| 1. <i>B.fragilis</i> ATCC 25285  | 6. <i>B.stercoris</i> ATCC 43183        |
| 2. <i>B.ovatus</i> ATCC 8483     | 7. <i>B.merdae</i> ATCC 43184           |
| 3. <i>B.uniformis</i> ATCC 8492  | 8. <i>B.thetaiotaomicron</i> ATCC 29741 |
| 4. <i>B.caccae</i> ATCC 43185    | 9. <i>B.distasonis</i> ATCC 8503        |
| 5. <i>B.eggerthii</i> ATCC 27754 | 10. <i>B.vulgatus</i> ATCC 8482         |

図4 *Bacteroides*属各菌種内でのスフィンゴリン脂質



- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 1. <i>B.fragilis</i> ATCC 25285 | 9. <i>B.thetaiotaomicron</i> ATCC 29741 |
| 2. <i>B.fragilis</i> NCTC 10581 | 10. <i>B.thetaiotaomicron</i> 10-1      |
| 3. <i>B.fragilis</i> GAI 0558   | 11. <i>B.thetaiotaomicron</i> 8-30      |
| 4. <i>B.fragilis</i> GAI 7955   | 12. <i>B.thetaiotaomicron</i> 5-12      |
| 5. <i>B.ovatus</i> ATCC 8483    | 13. <i>B.distasonis</i> ATCC 8503       |
| 6. <i>B.ovatus</i> 10-58        | 14. <i>B.distasonis</i> 10-67           |
| 7. <i>B.ovatus</i> 10-40        | 15. <i>B.distasonis</i> 8-14            |
| 8. <i>B.ovatus</i> 10-34        |   |

考 察

スフィンゴリン脂質は、図5に示すようにセラミド(スフィンゴシンに脂肪酸が酸アミド結合したもの)の第一級水酸基に置換ホスホリル基がエステル結合したものである。高等動物の細胞膜や神経組織などに広く分布し、従来から知られているスフィンゴミエリンは、セラミドの第一級水酸基にホスホリルコリンが結合したスフィンゴリン脂質である。ところが、グリセロリン脂質で知られているようなホスホリルエタノールアミンやホスホリルグリセロールなどの極性基が結合したスフィンゴリン脂質は高等生物ではほとんど報告されていない。一方、細菌のスフィンゴリン脂質については、ホワイトら<sup>13, 15)</sup>が、かつて

表 2. *Bacteroides* 属各菌種内でのスフィンゴリン脂質

Organism			Spot							
			a	b	c	d	CPE	f	CPG	
<i>B.fragilis</i>	ATCC	25285		P				PN		P
<i>B.fragilis</i>	NCTC	10581		P				PN		P
<i>B.fragilis</i>	GAI	0558		P				PN		P
<i>B.fragilis</i>	GAI	7955		P				PN		P
<i>B.ovatus</i>	ATCC	8483		P			P	PN		P
<i>B.ovatus</i>		10-58		P			P	PN		P
<i>B.ovatus</i>		10-40		P			P	PN		P
<i>B.ovatus</i>		10-34		P			P	PN		P
<i>B.thetaiotaomicron</i>	ATCC	29741		P			P	PN		P
<i>B.thetaiotaomicron</i>		10-1		P			P	PN		P
<i>B.thetaiotaomicron</i>		8-30		P			P	PN		P
<i>B.thetaiotaomicron</i>		5-12		P			P	PN		P
<i>B.distasonis</i>	ATCC	8503	P		P		P		P	
<i>B.distasonis</i>		10-67	P		P		P		P	
<i>B.distasonis</i>		8-14	P		P		P		P	

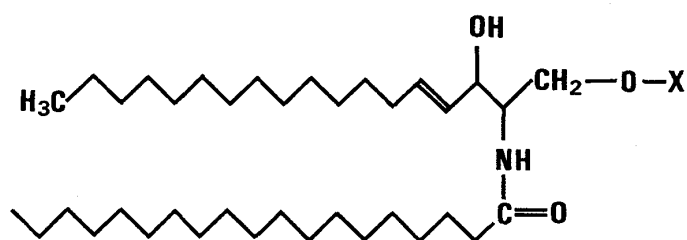
P : Dittmer 試薬陽性      N : Ninhydrin 試薬陽性

表 3 グラム陰性嫌気性菌におけるスフィンゴリン脂質

			Spot												
			a	b	c	1	d	CPE	2	3	f	CPG	4		
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC	25285		P					PN					P	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	GAI	5490		P					PN					P	
<i>intermedia</i>	ATCC	25611		P					PN					P	
<i>bivia</i>	ATCC	29303		P					PN					P	
<i>disiens</i>	ATCC	29426				P				P					P
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC	33277							PN					P	
<i>Megamonas hypermegas</i>	ATCC	25560				P				P					P
<i>Bilophila wadsworthia</i>	WAL	7959				P					P				
<i>Fusobacterium Necrophorum</i>	ATCC	25286													
<i>Nucleatum</i>	ATCC	25586													
<i>varium</i>	ATCC	8501													

P:Dittmer 試薬陽性      N:Ninhydrin 試薬陽性

図5 スフィンゴリン脂質の構造



X : H Ceramide

X :  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---P---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ | \\ \text{O}^- \end{array}$  Sphingomyelin

X :  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---P---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH}_2 \\ | \\ \text{O}^- \end{array}$  Ceramide  
phosphorylethanolamine

X :  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---P---O---CH}_2\text{---CH---CH}_2 \\ | \quad | \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$  Ceramide  
phosphorylglycerol

*Bacteroides*属、現在は*Prevotella melaninogenica*の脂質からセラミドホスホリルエタノールアミン(CPE)とセラミドホスホリルグリセロール(CPG)をはじめて分析同定している。しかしながら、その後宮川ら<sup>3)</sup>やKunzman<sup>16)</sup>による*Bacteroides*属の菌種のスフィンゴリン脂質に関する研究においては、CPEやCPGに関する検討は全くなされていない。

今回、私たちは*Bacteroides*属全10菌種のうち*B. fragilis*をはじめとして7菌種からCPEとCPGのスフィンゴリン脂質を見いだすことができた。また、各菌種内ではスフィンゴリン脂質の株間に変異は少なく、安定して検出されることも示された。したがって、高等

生物では見いだされることの少ないCPEとCPGは、細菌のスフィンゴリン脂質においては比較的一般的な存在であると考えられる。

ところで、今回検出されたCPEやCPGなどのスフィンゴリン脂質は、高等生物のスフィンゴミエリンの機能から類推すれば、おそらく菌体の細胞質膜に存在していると考えられる。そして、菌体中の総リン脂質中でスフィンゴリン脂質が占める割合が著しく高いことから、CPEやCPGは対応するグリセロリン脂質(ホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルグリセロール)などの代わりに機能していることが示唆される。一方、動物細胞においては、近年、スフィンゴリン脂質の構成成分であるスフィンゴシンが細胞内情

報伝達系に關与していることが報告されており<sup>17)</sup>動物細胞の生理機能の調節にスフィンゴリン脂質が重要な役割を果たす可能性が示唆されている。したがって、CPEやCPGが検出された菌種の中で、特に*B. fragilis*のような腹腔内感染症の原因菌として重要視されているものにおいては、CPEやCPGなどのスフィンゴリン脂質が病原因子として機能することも十分に予想される。

## 要 旨

*Bacteroides fragilis* ATCC 25285から得られたアルカリ安定脂質は赤外吸収スペクトルでアミド結合に由来する特徴的な吸収がみられることや、スフィンゴシンを有することなどからスフィンゴリン脂質であることが示された。このスフィンゴリン脂質の薄層クロマトグラフィーによる分析からセラミドホスホリルエタノールアミン(CPE)とセラミドホスホリルグリセロール(CPG)の2種類のスフィンゴリン脂質が検出された。また、*Bacteroides*属の全10菌種についてスフィンゴリン脂質の組成を分析して菌種間の分布を調べたところ、CPEとCPGは7菌種から見いだされた。さらに、薄層クロマトグラフ上にはスフィンゴリン脂質と考えられる未知スポットが見いだされた。各菌種で見いだされたスフィンゴリン脂質組成は、菌種について特徴的であり、菌株間での変異は認められなかった。

## 文 献

- 1) Finegold S. M. : Gneral Aspects of Anaerobic Infection. In Anaerobic Infections in Humans. (Finegold S.M., George W.L. ed.), p.137~153, Academic Press, San Diego, CA., 1989.
- 2) Miyagawa, E., R. Azuma, and T. Suto. : Distribution of sphingolipids in Bacteroides species. J. Gen. Appl. Microbiol. 1978; 24: 341-348.
- 3) Miyagawa, E., R. Azuma, T. Suto. and I. Yano. : Occurrence of free ceramides in Bacteroides fragilis NCTC 9343. J. Biochem. 1979; 86:311-320.
- 4) Stoffel, W., K. Dittmar, and R. Wilmes. : Sphingolipid metabolism in Bacteroidaceae. Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 1975; 356:715-725.
- 5) Barenholz, Y. and Thompson, T.E. : Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1980; 604:129-158.
- 6) Riboni L., Viani P., Bassi R., Prinetti A. and Tettamanti G.: The role of sphingolipids in the process of signal transduction. Prog. Lipid Res. 1997; 36(2-3):153-195.
- 7) Meyer zu Heringdorf D, van Koppen C.J. and Jakobs K.H. : Molecular diversity of sphingolipid signaling. FEBS Lett. 1997; 410(1):34-38.
- 8) Steiner, S., S. F. Conti, and R.L. Lester. : Occurrence of phosphosphingolipids in Bdellovibrio bacteriovorus strain UKi2. J. Bacteriol. 1973; 116:1199-1211.
- 9) Yano, I., I. Tomiyasu, and E. Yabuuchi. : Long chain base composition of strains of three species of Sphingobacterium gen. nov. FEMS Microbiol. Lett. 1982; 15:303-307.
- 10) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: Can. J. Biochem. Physiol. 1959; 37:911.
- 11) Karlsson, K.A.: Chem. Phys. Lipids. 1970; 5: 6.
- 12) 医化学実験法講座 1B 生体構成成分 II 第2章 脂質, p.194.
- 13) LaBach, J. P. and White, D. C. : Identification of ceramide phosphoryletanolamine and ceramide phosphorylglycerol in the lipids of an anaerobic bacterium. J. Lipid Res., 1969;10:528-534.
- 14) Shibuya, I. Honda, H. and Maruo, B. : A simplified colorimetry without incineration of phosphorus in phosphatides. Agric. Biol. Chem. 1967; 31:111-114.
- 15) Rizza, V., Tucker, A. N. and White, D. C. : Lipids of Bacteroides melaninogenicus. J. Bacteriology. 1970;101:84-91.
- 16) Kunsman, J. E. : Characterization of the lipids of six strains of Bacteroides ruminicola. J. Bacteriology. : 1973;113:1121-1126.

- 17) Hannun YA and Bell R.M. : Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. Science. 1989; 243(4890):500-507.

—生活学科 食物栄養—