

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06935

研究課題名(和文)免疫賦活作用をもたらす乳酸菌の表層に露出したリポテイコ酸部分構造の解析

研究課題名(英文) Analysis of structure of a lipoteichoic acid with adjuvant activity exposed on the surface of lactic acid bacteria

研究代表者

片倉 啓雄 (Katakura, Yoshio)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：50263207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌は腸管免疫の発達や活性化に寄与する。本研究では *Lactobacillus antri* JCM 15950 の免疫グロブリン A の産生促進作用の理解を目指し、免疫賦活をもたらす成分の特定と構造解析を行った。活性成分がグラム陽性菌の細胞壁成分を認識する Toll 様受容体 2 を刺激する脂質成分であることを示す結果から、リポテイコ酸(LTA)に注目した。LTA を細胞壁画分から抽出し、各種クロマトグラフィーで精製したところ、本菌株には免疫賦活作用の程度が異なる 2 種の LTA が存在することがわかった。これらの LTA の構造の差異に基づき、免疫賦活に重要な部分構造を推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LTA の構造と免疫調節作用との相関は、病原性細菌では一部理解されているものの、乳酸菌を含むプロバイオティクスでは不明な点が多い。幅広い世代にとって摂取が容易なプロバイオティクスの免疫賦活作用は、感染症の予防の観点からもますます注目されると考えられる。本研究の知見は、免疫賦活作用をもたらすプロバイオティクスのスクリーニング指標となるとともに、LTA の構造や表層への露出様式といった菌体の表層構造の設計に基づく機能性の向上にも貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Several strains of lactic acid bacteria contribute to the development and activation of the intestinal immune system. In this study, to understand how *Lactobacillus antri* JCM 15950 enhanced immunoglobulin A production, we began with identification of a component that caused immune-stimulation and analyzed its structure. This strain stimulated Toll-like receptor 2 of the host that recognizes the cell wall component of Gram-positive bacteria. In addition, the immunostimulatory activity disappeared by the removal of lipids from the bacterial cells. Based on these results, immunomodulatory component was presumed to be lipoteichoic acid (LTA). LTA was extracted from the cell wall fraction and purified using various chromatographic techniques. We found that this strain has two types of LTA, with different immunostimulatory activities. Based on the difference in the structures of these two LTAs, we predicted the partial structure important for immunostimulation.

研究分野：生物化学工学

キーワード：乳酸菌 リポテイコ酸 腸管免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢のメタゲノム解析やメタボローム解析により、腸内細菌と私たち宿主との共生関係が明らかになりつつある。中でも、腸内細菌叢のバランスは宿主の健康や疾病に密接に関与することから、腸内環境の維持・改善の重要性が指摘されている。腸内環境の改善のアプローチのひとつとして、プロバイオティクスの摂取がある。我々は、これまでに乳酸菌 *Lactobacillus antri* JCM 15950 が、腸管免疫系を活性化し、病原体の感染防御や腸内細菌叢のバランスの維持にはたらく免疫グロブリン A (IgA) 抗体の産生を増強することを見出してきた。この免疫調節作用のメカニズムを理解することができれば、乳酸菌による腸内環境制御の可能性が高まる。

この乳酸菌による免疫賦活作用には、菌体と免疫細胞の相互作用が極めて重要である。すなわち、菌体の表層に露出する特定の成分が、免疫細胞上に発現する受容体に結合することにより、免疫細胞の応答が開始する。乳酸菌を含むグラム陽性菌に関して、免疫調節をもたらす菌体成分として、ペプチドグリカンやリポテイコ酸などの細胞壁成分や菌体外多糖、核酸などが特定されている。しかし、この活性成分は菌体から菌体から分離すると、その作用は減弱し、解析が困難となることが多いため、その全容は未だ解明されていない。ところで、活性成分を菌体から分離すると免疫調節作用が減弱するという現象は、その成分(リガンド)が菌体に存在する場合、免疫細胞上の受容体と多価で相互作用することで受容体への刺激が増幅するが、分離により一価の結合となり、刺激が減衰することによるものと考えられる。すなわち、活性成分の解析を行うには、リガンドが菌体構造に保持されたままの状態での機能を確認するとともに、表層に露出する部分構造を特定する必要がある。

2. 研究の目的

我々はこれまでに乳酸菌の一種 *Lactobacillus antri* JCM 15950 がマウス腸管パイエル板細胞からの IgA 産生を増強することを明らかにしている。本菌株は、病原体の認識に関わる Toll 様受容体 (TLR) 2 を介して樹状細胞を活性化してサイトカインの産生を促進し、最終的に B 細胞からの IgA 産生を増強する。乳酸菌に関して、TLR2 のリガンドとして、グラム陽性菌の細胞壁成分であるリポテイコ酸 (LTA) やペプチドグリカンなどが報告されているが、免疫調節作用はすべての菌株に共通するものではなく、リガンドの構造や表層への露出の様式が菌株により異なると予想される。本研究では、菌体成分と受容体との相互作用に基づく乳酸菌の免疫調節作用の理解を目指し、*L. antri* JCM 15950 をモデル菌株として、免疫賦活をもたらす成分の特定と構造解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 乳酸菌の培養

Lactobacillus antri JCM 15950 は MRS 液体培地中、アネロパック (三菱ガス化学) を用いた嫌気条件下、37°C で 7 時間前培養した後、17 時間本培養した。

(2) LTA の精製

LTA はブタノール水抽出および各種クロマトグラフィーにより精製した。具体的には、遠心分離で回収した菌体を 100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.7) に懸濁し、ビーズショッカーで破碎した。上清に等量のブタノールを加えて混合した後、水層を凍結乾燥して粗 LTA を得た。粗 LTA を 15% 1-プロパノールを含む 100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.7) に溶解し、疎水性相互作用クロマトグラフィー Octyl Sepharose カラム (GE Healthcare) にアブライした。15 ~ 60% (v/v) 1-プロパノールのグラジエントで溶出し、LTA が検出された画分を減圧乾燥した。これを 30% (v/v) 1-プロパノールを含む 20 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.7) に再溶解して、陰イオン交換クロマトグラフィー DEAE Toyopearl-650M (Tosoh) にアブライし、0 ~ 1.0 M NaCl のグラジエントで溶出した。

リン酸濃度はリンモリブデン法で、LTA 濃度はマウス由来抗 LTA 抗体 (Hycult Biotech) とヤギ由来 HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いた ELISA 法で測定した。LTA の標準物質として、*Staphylococcus aureus* 由来 LTA を用いた。

(3) 細胞培養

マウスを用いた動物実験は、関西大学動物実験委員会の承認を得て実施した。パイエル板細胞は雌性の BALB/c マウスの小腸パイエル板からコラゲナーゼ処理により分離し、10% ウシ胎児血清および 55 μM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI 1640 培地中、37°C で 4 日間培養した。マウス由来マクロファージ様 RAW264 細胞は、同培地中、37°C で 24 時間培養した。培養上清中の IgA および IL-6 濃度は ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) 免疫賦活をもたらす菌体成分の特定

本菌株の免疫賦活作用は TLR2 を介してもたらされる。TLR2 のリガンドとなる菌体成分を推定するために、菌体から各種成分を段階的に除去し、菌体をもたらす免疫賦活作用を評価した。具体的には、タンパク質分解酵素アクチナーゼ E による除タンパク質、メタノール・クロロホルムによる脱脂、DNase および RNase による除核酸を順次行い、パイエル板細胞からの IgA 産生に及ぼす影響を調べた。その結果、脱脂により菌体の IgA 産生誘導作用が顕著に減弱したことから、脂質成分に免疫賦活作用があることが示唆された(図1)。ところで、TLR2 のリガンドとして報告のあるペプチドグリカン、N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸を含む糖ペプチドから成るポリマーであるのに対し、LTA はグリセロールリン酸の繰り返し構造から成る主鎖が細胞壁を縦断し、糖脂質で細胞膜にアンカーされる構造をもつ。これより、本菌株の免疫賦活作用をもたらす成分は LTA であると推定した。

また、細胞壁分解酵素であるリゾチームとムタノリシンで菌体を処理して、ペプチドグリカン層を適度に分解し、菌体表層に LTA を露出させたところ、IgA 産生促進作用が増強した(データは示さず)。この結果は、本菌株の LTA に免疫賦活作用があるという推定を指示するものである。一方、菌体をリパーゼで処理すると IgA 産生促進作用が減弱することがわかり、菌体から切り出された分解物の構造解析を試みたが、夾雑物のため免疫賦活に必要な構造の同定はできなかった。これより、本菌株から LTA を精製し、その構造と免疫賦活作用との相関を調べることにした。

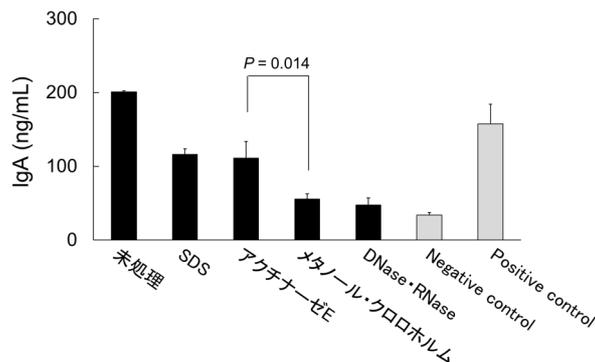


図1 免疫賦活をもたらす菌体成分の特定

(2) LTA の免疫賦活作用

LTA の精製とその免疫賦活作用の評価にあたり、単一細胞系で、かつ多試料の分析が容易な株化マクロファージ様 RAW264 細胞を用い、IgA 産生に重要なインターロイキン-6 (IL-6) 産生を指標として免疫賦活作用を評価した。

本菌株から LTA をブタノール水抽出し、疎水性相互作用クロマトグラフィーで分画したところ、2つの LTA のピーク (LTA-1 および LTA-2) が検出された(図2)。また、RAW264 細胞からの IL-6 産生誘導作用を調べたところ、LTA-1 は IL-6 産生を誘導したのに対し、LTA-2 は誘導しなかった。また、LTA-1 による IL-6 産生促進は、RAW264 細胞の TLR2 を抗 TLR2 抗体で中和すると消失することから、LTA-1 は TLR2 のリガンドであることを確認した。以上より、本菌株には構造の異なる 2 種の LTA が存在し、TLR2 を介した免疫賦活作用の程度はその構造の差異に依存することが示唆された。

この LTA-1 と LTA-2 の構造の差異を明らかにできれば、免疫賦活をもたらす部分構造を明らかにできると考え、それぞれの LTA をさらに陰イオン交換クロマトグラフィーで精製し、構造解析を行った。その結果、菌体表層に露出していると考えられるポリマー部の構造が一部異なることを示すデータを得た(データは示さず)。

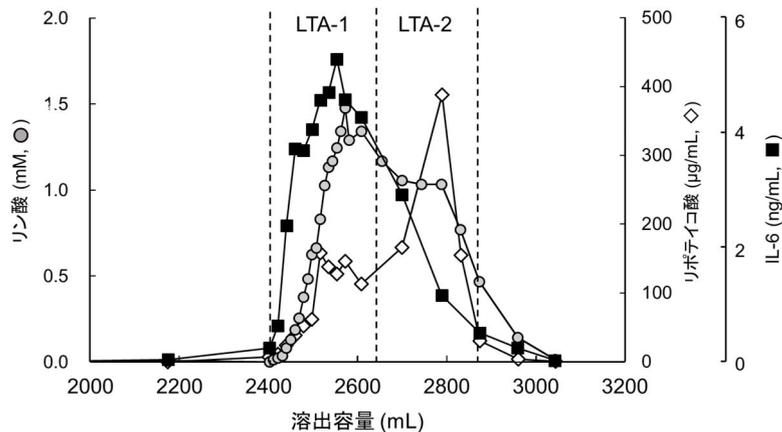


図2 疎水性相互作用クロマトグラフィーによる LTA の分画

(3) 今後の展望

本研究では、乳酸菌の免疫賦活をもたらす菌体成分と、免疫賦活に必要な LTA の部分構造を明らかにした。LTA の構造と免疫調節作用との相関は、病原性細菌では研究されているものの、乳酸菌のようなプロバイオティクスにおいては、いまだ理解が進んでいない。プロバイオティクスは幅広い世代が容易に摂取できることから、その免疫賦活作用は、感染症の予防の観点からますます注目されると考えられる。本研究で得られた知見は、免疫賦活作用をもたらす乳酸菌のスクリーニング指標となりうるとともに、LTA の構造や表層への露出様式といった菌体の表層構造の設計に基づく機能性の向上にも貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山崎（屋敷）思乃	4. 巻 84
2. 論文標題 細菌がつくる膜小胞メンブランベシクル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学工学	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S. Yamasaki-Yashiki, Y. Miyoshi, T Nakayama, J. Kunisawa, Y. Katakura	4. 巻 38
2. 論文標題 IgA-enhancing effects of membrane vesicles derived from <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> NBRC15893	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosci. Microbiota Food Health.	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12938/bmfh.18-015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S. Yamasaki-Yashiki, H. Sawada, M. Kino-oka, Y. Katakura	4. 巻 36
2. 論文標題 Analysis of gene expression profiles of <i>Lactobacillus paracasei</i> induced by direct contact with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> through recognition of yeast mannan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosci. Microbiota Food Health.	6. 最初と最後の頁 17-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12938/bmfh.BMFH-2016-015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 山崎（屋敷）思乃	4. 巻 95
2. 論文標題 共生する細菌の選択	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 1.山崎 思乃, 三好 柚紀, 雑賀 あずさ, 長竹 貴広, 松永 安由, 國澤 純, 片倉 啓雄
2. 発表標題 乳酸菌 <i>Lactobacillus sakei</i> のメンブランベシクルによる腸管IgA産生増強メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 4.佐々木 晴菜, 仲田 真穂, 前田 新一, 雑賀 あずさ, 國澤 純, 片倉 啓雄, 山崎 思乃
2. 発表標題 <i>Lactobacillus antri</i> が産生するメンブランベシクルのIgA産生促進作用の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 5.三好 柚紀, 井谷 彩乃, 雑賀 あずさ, 長竹 貴広, 松永 安由, 國澤 純, 片倉 啓雄, 山崎 思乃
2. 発表標題 <i>Lactobacillus sakei</i> 由来メンブランベシクルによるIgA産生促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Yamasaki-Yashiki, Y. Miyoshi, J. Kunisawa, Y. Katakura
2. 発表標題 Enhancement of intestinal IgA production by membrane vesicles derived from <i>Lactobacillus sakei</i>
3. 学会等名 The 13th International Symposium in Science and Technology at Cheng Shiu University 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口 茉莉亜, 倉光 香奈, 山崎 思乃, 片倉 啓雄
2. 発表標題 腸内細菌と食物繊維の接着現象の解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三好 柚紀, 山崎 思乃, 中山 知哉, 國澤 純, 片倉 啓雄
2. 発表標題 Lactobacillus sakei由来メンブランベシクルを介するIgA産生促進作用の解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 思乃, 倉光 香奈, 谷口 茉莉亜, 片倉 啓雄
2. 発表標題 乳酸菌と食物繊維およびムチンとの相互作用の解析
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 一瀬 涼, 福田 雄一, 山崎 思乃, 片倉 啓雄
2. 発表標題 Lactobacillus reuteriのグリセリン共流加による乳酸生産の抑制
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河合 美桜, 原田 里紗, 土屋 麻美, 依田 伸生, 山崎 思乃, 福崎 英一郎, 片倉 啓雄
2. 発表標題 乳酸菌培養における乳酸生産の抑制
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山崎 (屋敷) 思乃, 谷口茉莉亜, 片倉啓雄	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 264 (216-222)
3. 書名 乳酸菌と酵母の相互作用、および乳酸菌と炭水化物への接着現象の解明とプロバイオティクスへの応用、 酵母・麹菌・乳酸菌の産業応用展開	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山崎 思乃 (YAMASAKI Shino) (50602182)	関西大学・化学生命工学部・准教授 (34416)	