

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K15770

研究課題名（和文）新奇機能性食品素材の応用に向けたガセリ菌の膜小胞に関する研究

研究課題名（英文）Extracellular vesicles of *Lactobacillus gasseri* for development of novel functional food materials

研究代表者

白石 宗 (shiraishi, tsukasa)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70725168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、宿主と相互作用する「膜小胞（MV）」に関して、乳酸菌のMVの知見が少ないことに着目して、*Lactobacillus gasseri* のMVの特徴と免疫誘導能を明らかにすることで、MVの応用の可能性を評価することを目的とした。*L. gasseri* JCM 1131T および *Staphylococcus aureus* ATCC 10832 のMVを精製して、両MVに免疫調節因子として知られているリポテイコ酸（LTA）が含まれていることを明らかにした。THP-1、SW480細胞における各種サイトカインの誘導能を評価したところ、菌体と異なるMVの免疫誘導能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MVは、菌体にとって生理的な役割を担うだけでなく、宿主と相互作用することも知られている。一方で、乳酸菌のMVの知見は少なく、腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* のMVに関する情報はこれまで皆無だった。本研究では、*Staphylococcus aureus* を比較対象として、両者のMVに免疫調節因子として知られるLTAが検出され、MVのサイトカイン誘導能を評価することで菌体との違いが示唆されたことは、乳酸菌のMVを介した宿主との相互作用機序の解明において重大な意義をもつ。さらに、将来的にMVをポストバイオティクスとして応用することも期待され、社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although MV interacts with the host, there is little knowledge about MV of lactic acid bacteria. The aim of this study was to clarify the characteristics of *Lactobacillus gasseri* MV and its immune-inducing ability. We purified MVs from *L. gasseri* JCM 1131T and *Staphylococcus aureus* ATCC 10832, and revealed the presence of lipoteichoic acid (LTA), a known immunomodulatory factor, in both purified MVs. Furthermore, we compared the ability of both MVs to induce cytokines in THP-1 and SW480 cells to bacterial cells. Our results suggested that the immunity-inducing ability of MVs is different from that of bacterial cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Lactobacillus gasseri 膜小胞 リポテイコ酸 プロバイオティクス ポストバイオティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膜小胞 (MV) は、菌体の細胞膜より産生され、菌体由来の脂質二重膜と (菌体の) 表層分子を最外層に有し、様々なタンパク質や核酸を内包し、菌体外へ放出される。MV の産生は、多くの生理学的な役割を有しており、生物に共通して観察される重要な生理現象である。菌体外に放出された MV は、菌体にとって生理的な役割を担うだけでなく、宿主と相互作用することも知られている。一方で、乳酸菌を含むグラム陽性細菌では、細胞表層に厚いペプチドグリカンを有することで、近年まで MV の産生の有無が疑問視されていた背景もあり、グラム陰性細菌に比べて MV に関する研究が遅れている。さらに、グラム陽性細菌でも、その研究対象は病原性細菌が中心であり、乳酸菌のような有用細菌の知見は少ない。*Lactobacillus gasseri* もヒト小腸内の優勢乳酸菌であり、プロバイオティクスとして利用されているにもかかわらず、MV に関する情報はこれまで皆無である。

## 2. 研究の目的

本研究では、*L. gasseri* の MV の化学組成や免疫誘導能の特徴を明らかにすることで、新たなポストバイオティクスとして機能性食品素材への応用の可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、*L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> の MV の化学組成や免疫誘導能の特徴を明らかにするため、以下に示す研究計画を遂行する。

(1) MV の化学組成を明らかにするために脂質分析を行う。脂質分析は、Sep-Pak カラムによって糖脂質、リン脂質、中性脂質画分に分画し、これらの構成比を GC-MS により算出する。さらに SDS-PAGE 分離後の抗 LTA 抗体を用いたイムノプロット法により MV における LTA の有無を明らかにする。

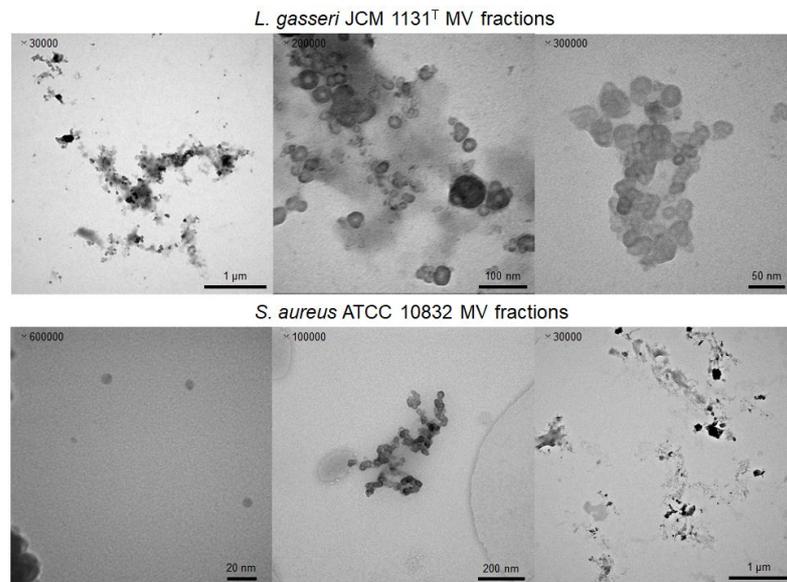
(2) 精製した MV および比較対象として菌体を用いて、細胞株に対する免疫誘導能 (サイトカイン誘導能) を ELISA によって定量評価することで免疫誘導能の特徴を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) MV の精製

*L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> および比較対象として *Staphylococcus aureus* ATCC 10832 を使用して、定常期後期の培養上清より MV の精製を行った。精製方法は、一般的な MV 精製法である超遠心を用いた。透過電子顕微鏡により、得られた画分中に MV の存在を確認した (図 1)。さらに、*L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> と *S. aureus* ATCC 10832 から、それぞれ湿重量で 8.2 mg/g cell と 6.7 mg/g cell の粗精製 MV 画分が得られた。また、タンパク質および核酸含有量は、それぞれ *L. gasseri* で 8.1 ug/mg、0.3 ug/mg であり、*S. aureus* で 0.2 ug/mg、2.1 ng/mg だった。

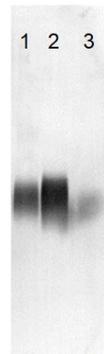
図1



### (2) MV の化学組成と LTA の有無

*L. gasseri* および *S. aureus* から得られた MV 画分を使用して、菌体との膜脂質組成を比較するため、まずは菌体から脂質を抽出して、Sep-Pak カラムによってリン脂質、糖脂質、中性脂質に分けて GC-MS で分析した。その結果、全脂質に対して *L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> では約 15%、*S. aureus* ATCC 10832 では約 35% のリン脂質が検出された。しかし、中性脂質および糖脂質の含有量に関しては安定した結果が得られなかった。MV の脂質分析にはカラムの精製条件等を検討して分析する必要がある。さらに、リポテイコ酸 (LTA) は細菌が細胞表層に有する免疫刺激因子である。そこで MV への LTA の有無をイムノプロットにより評価したところ、両者の MV 画分には LTA が確認された (図 2)。ただし、イムノプロットにおけるシグナルの強さが *L.*

図2



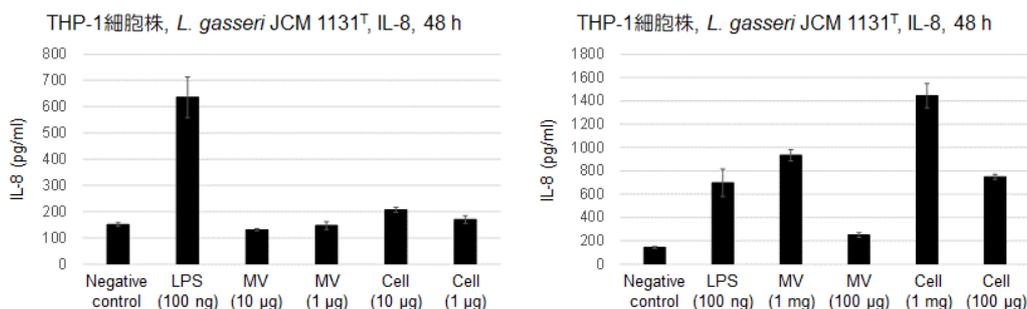
1. Control *L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> LTA (15 ng)  
2. *L. gasseri* JCM 1131<sup>T</sup> MV (100 ug)  
3. *S. aureus* ATCC 10832 MV (100 ug)

*gasseri* と *S. aureus* の MV で異なり、これは両者の LTA の構造の違いによる抗 LTA 抗体への反応性の違い、または MV における LTA 量の違いが考えられる。

### (3) MV のサイトカイン誘導能の評価

MV の免疫誘導能を評価するため、ヒト単球細胞株 THP-1 細胞を用いて、MV 画分に対する IL-8 の産生量を ELISA によって測定した。その結果、MV 画分を 100 ug 以上添加した場合に IL-8 の誘導が確認された (図 3)。一方で、菌体 (100 ug) を添加した場合と比較すると、MV 画分の IL-8 を誘導する量は約半分であり、菌体と比べると MV の IL-8 誘導能は低いことが示唆された。

図3



さらに、THP-1, SW480 細胞を使用して IL-8, IL-6, IL-10, IL-12 の誘導能を比較評価した。その結果、THP-1 細胞に対する IL-8 および IL-6 の産生量において、*L. gasseri* の菌体では両サイトカインを誘導したのに対し、MV では誘導が見られなかった (図 4)。一方で、*S. aureus* では菌体 MV ともに誘導は見られなかった。SW480 細胞においては、IL-8, IL-10 の産生量において、*L. gasseri* および *S. aureus* の菌体では Negative control よりも産生が抑制されているのに対し、MV では Negative control と同等で誘導が見られなかった (図 5)。

以上の結果は、菌体と異なる MV の免疫誘導能を示唆しており、乳酸菌の MV を介した宿主との相互作用機序の解明において重大な意義をもつ。さらに、将来的に MV をポストバイオティクスとして応用することも期待され、社会的な意義も大きいと考えられる。

図4

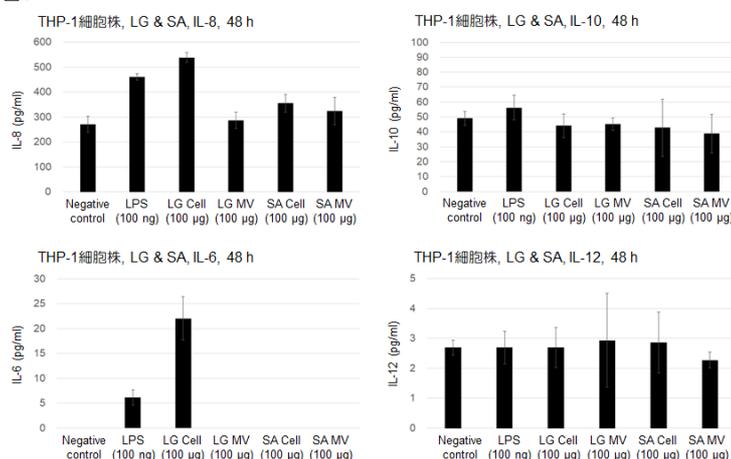
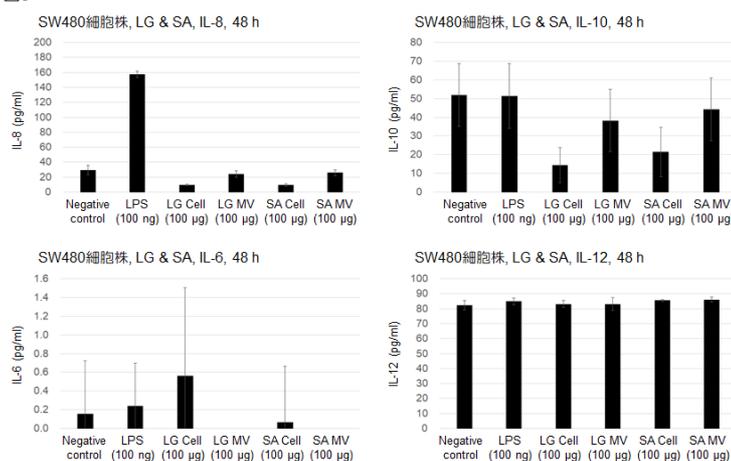


図5



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shiraishi T, Yamamoto S, Yokota SI.	4. 巻 166
2. 論文標題 Structural analysis of the lipoteichoic acid anchor glycolipid: Comparison of methods for degradation of the glycerophosphate backbone polymer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Microbiol Methods.	6. 最初と最後の頁 105726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2019.105726	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------