

機関番号：82111  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21880053  
 研究課題名（和文） 新規ウシ腸管上皮細胞株によるプロバイオティクスの消化管自然免疫調節機構の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanisms of intestinal immunomodulation by probiotics on newly established bovine intestinal epithelial cell line.  
 研究代表者  
 遠野 雅徳（TOHNO MASANORI）  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・機能性飼料研究チーム・  
 研究員  
 研究者番号：50547718

研究成果の概要（和文）：家畜飼料や糞便由来乳酸菌 53 菌株について詳細に解析した。ウシ腸管上皮細胞株と組織解析により、微生物成分認識受容体のうち、各種 TLR、NOD1、PGLYRP の強発現を見出した。腸管上皮細胞は、菌体表層成分を認識する微生物成分認識受容対を特徴的に発現していたことから、主に菌体内ではなく菌体表層成分の認識により、消化管内へと移行した乳酸菌等の微生物を識別していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A total of fifty-three lactic acid bacteria strains isolated from feeds and feces of livestock were subjected to phenotypic and genetic analysis, taking particular interests in the application as probiotic additives for feeds. According to expression analysis on newly established bovine intestinal epithelial cell line and tissues, the high expression of various TLRs, NOD1, and PGLYRPs were observed. Bovine intestinal epithelial cells preferentially expressed pattern-recognition receptors, which recognize not bacterial intracellular components but cell-surface components, suggesting that such pattern-recognition receptors play an important role in the recognition of intestinal microorganisms such as lactic acid bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,150,000	345,000	1,495,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,160,000	648,000	2,808,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：畜産学、獣医学、プロバイオティクス、消化管

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに、自給飼料の有効利用に重要なサイレージ研究や各種資源の大家畜用飼料化技術の開発研究が展開されている。これら飼料化技術において、主にサイレージ由来植物寄生性乳酸菌が飼料品質向上のため

に利用されてきたが、これら乳酸菌の腸管免疫調節作用は未解明であった。

(2) 近年、家畜用抗生剤の使用量は、ヒト医療用の年間約 500 トンをはるかに超える年間約 1,200 トン以上に増大しており、抗菌剤の

低減を可能とする新規代替技術の開発が必要不可欠であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、家畜貯蔵飼料であるサイレージ等の自給飼料の免疫機能性強化に有用な高免疫刺激性プロバイオティクスの高度有効利用により、薬剤に頼らない家畜健全育成の実現を目指す。また、世界に先駆けて樹立された新規ウシ腸管上皮細胞株を利用し、生体腸管内の嫌気状態（低酸素条件下）を反映した家畜対応型の腸管上皮細胞培養系を新規に構築することにより、プロバイオティクスの消化管自然免疫調節機構を解明する。それにより、抗菌剤非依存型の家畜の育成と畜産食品生産技術の飛躍的発展に貢献することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) サイレージおよび牛糞由来乳酸菌の分離・同定と生理・生化学的性状解析

イタリアンライグラスおよびチモシー・オーチャードグラス混播牧草サイレージ並びに家畜糞便より、MRS 培地を用いて乳酸菌を分離し、生理・生化学的性状解析、16S rRNA 遺伝子塩基配列解析および種・亜種識別 PCR 法により、分離菌株の同定を行った。

(2) ウシ腸管上皮細胞株培養系の構築

初代細胞であるウシ腸管上皮細胞株の培養システム（通常酸素条件・低酸素条件）の確立を行った。

(3) 腸管上皮細胞における微生物成分認識受容体（パターン認識受容体）の発現解析

確立した培養システムを用いて、微生物成分を認識し、自然免疫システムに重要な役割を果たすと考えられたパターン認識受容体の機能発現を解析した。

(4) プロバイオティクスによる“ユニークな”パターン認識受容体の発現誘導

生体から消化管を含む各種臓器をサンプリングし、プロバイオティクスと関係の深いと想定されたユニークなパターン認識受容体 (peptidoglycan recognition proteins) にいち早く着目し、相互作用を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 大家畜の消化管自然免疫調節作用に有用な乳酸菌の選抜において、チモシー・オーチャードグラス混播牧草より乳酸菌を 262 菌株分離し、そのうち 30 菌株を免疫調節ポテ

ンシヤルを考慮して詳細に検討した。生理・生化学的性状解析および 16S rDNA シークエンス解析により、分離菌株を 13 グループに分類した。解析の結果、*Lactobacillus* (*L.*) *plantarum*、*L. coryniformis*、*L. acidiphiscis*、*L. sakei*、*Weissella paramesenteroides*、*Weissella hellenica*、*Leuconostoc pseudomesenteroides*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Lactococcus garvieae*、*Pediococcus acidilactici*、*Pediococcus pentosaceus*、*Enterococcus gallinarum* が分離され、興味深い事に、特に自然免疫調節作用が強いことが期待される *L. plantarum* が 30 菌株中 10 菌株得られた(図1および表1)。

これまでに我々は、動物寄生性乳酸菌とはペプチドグリカン (PGN) 構造のまったく異なる植物寄生性乳酸菌 (*L. plantarum*) の強い免疫調節作用を見出している。PGN の主要構造に当たる MurNAc-L-Ala-D-isoGln 構造 (MDP: パターン認識受容体 NOD2 リガンド) に続くアミノ酸は、多くの動物寄生性乳酸菌では L-Lys (L-Lys 型 PGN) であるが、*L. plantarum* などの植物寄生性乳酸菌の中には、ジアミノピメリン酸 (DAP) である場合がある (DAP 型 PGN: パターン認識受容体 NOD1 リガンド)。

今回の微生物学的解析により、家畜飼料中に存在し特徴的な PGN 構造を有する *L. plantarum* の強力な免疫調節作用が強く期待された。

更に有望な家畜飼料由来の乳酸菌株の分離・性状解析・選抜として、数多くの飼料素材からの分離の重要性を考慮し、イタリアンライグラス牧草サイレージより乳酸菌を 37 菌株を分離し、そのうち 23 菌株について免疫調節ポテンシャルを考慮して詳細に検討した。生理・生化学的性状解析および 16S rDNA シークエンス解析により、分離菌株を 7 グループに分類した。本研究により、これまで本サイレージより分離報告のない *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* と *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* が初めて分離され(表1)、これら新規分離株についても自然免疫調節作用が強く期待された。

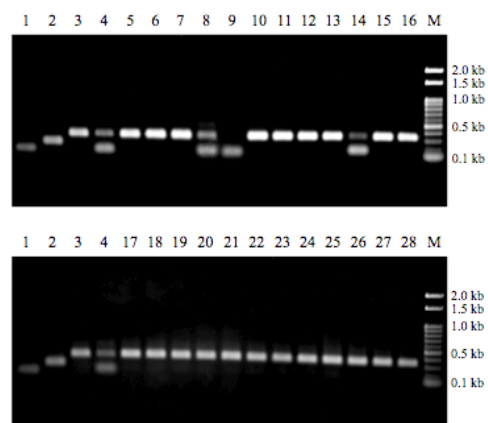


図1. 家畜飼料から分離した乳酸菌の recA 遺伝子を標的にしたマルチプレックス PCR 法による菌種解析. レーン: M, marker 2 kb plus DNA ladder; 1, *L. paraplantarum* DSM 10667<sup>†</sup> 株; 2, *L. pentosus* JCM 1558<sup>†</sup> 株; 3, *L. plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149<sup>†</sup> 株; 4, *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* JCM 16169<sup>†</sup> 株; 5-28, Ni 795 株, Ni797 株, Ni800 株, Ni804 株, Ni957 株, Ni997 株, Ni1000 株, Ni1002 株, Ni1030 株, Ni1031 株, Ni1033 株, Ni1036 株, Ni1243 株, Ni1245 株, Ni1247 株, Ni1323 株, Ni1325 株, Ni1327 株, Ni1377 株, Ni1378 株, Ni1380 株, Ni1381 株, Ni1384 株および Ni1385 株.

表1 本研究で分離同定した材料草およびサイレージ由来乳酸菌種

菌種名	菌種名
<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>
<i>Lactobacillus paraaplantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	<i>Weissella hellenica</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>	

同様に、牛糞便より分離した菌株のうち、合計 171 菌株の乳酸菌を同定した (表 2)。

表2 本研究で分離同定した牛糞便由来乳酸菌種

菌種名	菌種名
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Lactobacillus ruminis</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>Lactobacillus mucosae</i>	

(2) ウシ腸管上皮細胞株の培養システム (通常酸素条件・低酸素条件) を確立し、パターン認識受容体である Toll-like receptor (TLR) および Nucleotide-oligomerization domain (NOD) の発現について RT-PCR 法により検討した。本研究で着目したパターン認識受容体のリガンドの概要は以下の通りである; TLR1 (細胞表層成分: リポプロテイン, ペプチドグリカン, ザイモサン)、TLR2 (細胞表層成分)、TLR3 (二本鎖 RNA)、TLR4 (リポ多糖 (LPS))、TLR5 (細菌鞭毛成分)、TLR6 (細胞表層成分)、TLR7 (一本鎖 RNA)、TLR8 (一本鎖 RNA)、TLR9 (DNA)、TLR10 (未同定)、RP105 (リポ多糖 (LPS))、NOD1 (ジアミノピメリン型ペプチドグリカン断片)、NOD2 (リジン型ペプチドグリカン断片)。

発現解析の結果、好気・嫌気両条件下において、ウシ腸管上皮細胞株における TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6 および NOD1 の遺伝子発現が認められた (図 2)。一方、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、RP105 および NOD2 の遺伝子発現は認められなかった (図 2)。以上のことから、ウシ腸管上皮細胞は、菌体の細胞表層成分を認識するパターン認識受容体を持徴的に発現していることが明らか

となり、主に菌体内成分ではなく菌体表層成分の認識により、サイレージから消化管内へと移行した乳酸菌等の微生物を識別していることが考えられた。

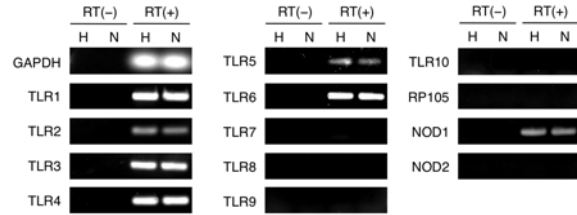


図 2. ウシ腸管上皮細胞における各種パターン認識受容体の発現解析. ウシ腸管上皮細胞を通常酸素条件下 (N, normoxia) および低酸素条件下 (H, hypoxia) で培養後、RT-PCR 法による mRNA 発現解析に供した. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TLR, Toll-like receptor; NOD, nucleotide oligomerization domain; RP105, Radio-protective 105-kD protein; RT (-), 逆転写酵素無処理区; RT (+), 逆転写酵素処理区.

(3) 我々は、ユニークなパターン認識受容体である peptidoglycan recognition proteins (PGLYRP) にも着目し、各種臓器における発現解析を行った。その結果、初生期および成熟期の個体において、本受容体の各種消化管組織における強発現を見出した (図 3)。さらに、消化管組織の中でも、酸性条件下の胃の上部に存在する食道における顕著な強い発現を明らかにした (図 3)。以上のことから、本受容体が、胃の酸性条件による微生物死滅以前の局面において、機能的な微生物制御に機能していることが示唆された。

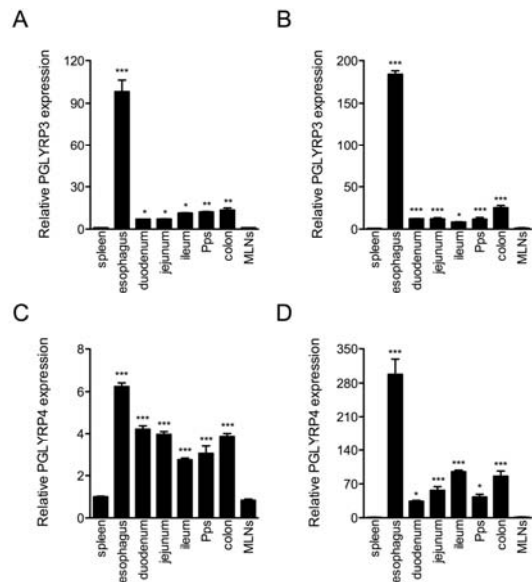


図 3. 各種臓器における (peptidoglycan recognition proteins) PGLYRP の発現定量解析. PGLYRP3 (A および B), PGLYRP4 (C および D). 初生期 (A および C), 成熟期 (B および D).

さらに、本パターン認識受容体の詳細な解

析を行った結果、本パターン認識受容体は、膜結合型のみならず分泌型でも存在していることが明らかとなり(図4)、異なる2つの発現形式の機能的な違いに興味を持たれた。また、プロバイオティック乳酸菌株の刺激により、本パターン認識受容体の発現が誘導されることが明らかとなり(未発表データ)、プロバイオティクスによる消化管自然免疫機構の一端として、本パターン認識受容体の重要性が示唆された。

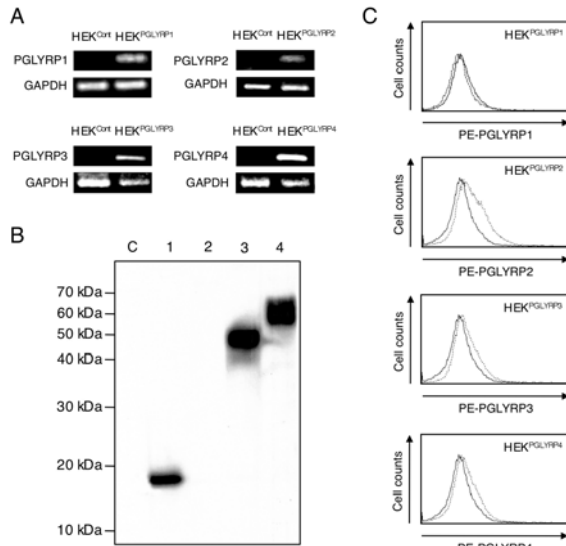


図4. PGVPR3 および 4 の強制発現による発現様式の解析. (A) 強制発現細胞における RT-PCR 法による遺伝子発現解析. (B) 強制発現細胞培養液上清のウェスタンブロット解析. (C) 強制発現細胞におけるフローサイトメトリー法による発現解析.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① M. Tohno, H. Kobayashi, M. Nomura, M. Kitahara, M. Ohkuma, R. Uegaki, Y. Cai. Genotypic and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian ryegrass silage. *Animal Science Journal*, doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00923.x, 2011, 査読有.
- ② M. Tohno, H. Kobayashi, M. Nomura, R. Uegaki, Y. Cai. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from mixed pasture of timothy and orchardgrass, and its badly preserved silage. *Animal Science Journal*, Accepted, 査読有.
- ③ Ueda, W\*, M. Tohno\*, T. Shimazu, H. Fujie, H. Aso, Y. Kawai, M. Numasaki, T. Saito, H. Kitazawa(\*;Equal contribution), Molecular cloning, tissue expression,

and subcellular localization of porcine peptidoglycan recognition proteins 3 and 4. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, doi:10.1016/j.vetimm.2011.05.026, 査読有.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 遠野雅徳、小林寿美、鹿会利、曹陽、上垣隆一、蔡義民、チモシー・オーチャードグラス混播牧草由来乳酸菌の性状とその多様性、日本草地学会、2010年3月26日、三重.
- ② 遠野雅徳、島津朋之、下里剛士、麻生久、齋藤忠夫、北澤春樹、NOD受容体を介するペプチドグリカン断片の免疫刺激微細構造、平成22年度日本酪農科学シンポジウム、2010年8月25日、長野.
- ③ 遠野雅徳、島津朋之、下里剛士、麻生久、齋藤忠夫、北澤春樹、腸管免疫系におけるプロバイオティクスによるNODの発現増強と可溶性ペプチドグリカンフラグメント微細構造の免疫活性相関、日本食品免疫学会2009年度大会、2009年5月26日、東京.

[図書] (計 2 件)

- ① 遠野雅徳、京都大学学術出版、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、第二章乳酸菌・ビフィズス菌の構造と生理、細胞壁の多糖成分 (a) ペプチドグリカン、(b) 細菌細胞壁とテイコ酸、テイクロン酸、2011、10
- ② 遠野雅徳、北澤春樹、京都大学学術出版、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、第四章乳酸菌・ビフィズス菌の産生する有用物質、菌体外多糖:EPSとペプチドグリカン、2011、8

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 非公表

発明者: 遠野雅徳

権利者: 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2011-079264

出願年月日: 2011年3月31日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://nilgs.naro.affrc.go.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠野 雅徳 (MASANORI TOHNO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究

機構畜産草地研究所・機能性飼料研究チーム

・研究員

研究者番号：50547718