

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05352

研究課題名(和文) 発酵食品細菌や腸内細菌によって生産される膜小胞の生理機能の解明と応用

研究課題名(英文) Elucidation of the physiological functions of membrane vesicles produced by fermented food-derived bacteria and their application

研究代表者

倉田 淳志 (Kurata, Atsushi)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：10416000

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)：腸内細菌は、細胞外膜小胞(MVs)と呼ばれる代謝物を介して、宿主の生体機能へ重大な影響を与える。本提案では、独自に発酵食品細菌や腸内細菌のMVsを対象に生理機能を解明して、新たな免疫賦活剤を開発する。研究の結果、乳酸菌やビフィズス菌のMVsについて物理化学的、生化学的、機能的な特性を解明できた。これらのMV画分から、免疫賦活作用を示すタンパク質を発見した。免疫細胞や腸管上皮細胞に対するこれらのMVsの作用機序を明らかにした。細胞外MVsを高生産する培地条件を見出した。ランダム変異導入により、細胞外MVsの高生産株を育種した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌が放出するMVsは、宿主の免疫賦活作用を示すため、ワクチンアジュバントへの応用が期待される。しかしMVsによって増強される免疫応答は不明であり、MVsによる宿主細胞への作用機序も不明である。MVsの生産機構は不明であり、免疫賦活能に優れたMVsの高生産株は育種されていない。MVsの活用には、これらの点を解明する必要があり、本研究成果はこれらの問題点の解決に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Membrane vesicles (MVs) are spherical bioactive nanoparticles that range in size between 50 and 100 nm and are naturally secreted by many bacteria. MVs released from gut bacteria are becoming increasingly recognized as having a significant impact on host biological functions. This proposal aims to elucidate the physiological functions of MVs derived from fermented-food bacteria and gut bacteria, and to develop immune adjuvants using these vesicles. We were able to elucidate the physicochemical, biochemical, and functional properties of MVs from *L. plantarum* and *B. infantis*. We were able to elucidate the mechanisms by which these MVs act on immune cells and intestinal epithelial cells. We identified proteins with an immune-stimulating activity from these MV fractions. We developed a culture medium that allows for the high-yield production of MVs. We developed high-producing strains of extracellular MVs through random mutagenesis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：細胞外膜小胞 腸内細菌 抗体 蛍光顕微鏡観察 免疫賦活作用 タンパク質 サイトカイン Toll様受容体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

発酵食品に関連する細菌や腸内共生細菌は細胞外に多様な物質を生産し、これらの発酵産物や代謝産物が我々の健康増進に寄与していることは経験的に明白である。Membrane vesicles (MVs) とは、細菌が細胞外に放出する、脂質二重膜からなる粒径 50~100 nm 程度の小胞であり、細菌由来のタンパク質や核酸、代謝物を含む(図1)。発酵食品に関連する細菌や腸内共生細菌の放出する MVs が、宿主の生体機能、特に宿主免疫系へ重大な影響を与えることが明らかになりつつある。しかしこれらの細菌由来の MVs によって惹起される免疫応答には不明な点が多く、MVs による宿主細胞への作用機序も不明である。これらの細菌における MVs の生産機構は不明であり、免疫賦活能に優れた MVs の高生産株は、これらの細菌では育種されていない。発酵食品に関連する細菌や腸内共生細菌の MVs の活用には、これらの点を解明する必要がある。

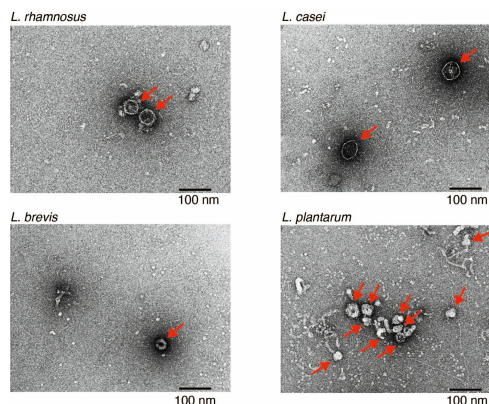


図1. 各種の乳酸菌が生産する MVs  
赤矢印で MVs を示した。文献(1)の図を改訂した。

## 2. 研究の目的

本研究では、独自に見いだした発酵食品に関連した細菌や腸内細菌の MVs を用いて、その生理機能を解明して、新たな免疫賦活剤を開発する。すでに発酵食品や腸から独自に分離した細菌の MVs に、免疫賦活作用を発見し、MVs による免疫細胞への作用機序を解明しつつある。そこで独自の MVs を対象に抗体の産生誘導活性を担う物質の同定、MVs に対する腸管細胞層の応答や作用機序の解明、MVs の高生産条件の検討、MVs の高生産株の育種を行う。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 抗体の産生誘導活性を担う物質の同定

*L. plantarum* や *B. infantis*、*Lactobacillus* sp. 属細菌の培養液上清から MVs を独自に見出した。これらの MVs を対象に、構成成分を網羅的に同定した。LC-MS や MALDI-MS で MVs 中のタンパク質を同定し、次世代シーケンサーを用いて MVs 中の DNA や RNA の鎖長と塩基配列を決定した。次に各候補物質を調製した。まず核酸は塩基配列に基づいて合成した。続いてタンパク質は、異種発現系で発現させて各種カラムワークで精製したほか、合成ペプチドを準備した。各候補物質を対象に、*in vivo* 試験で炎症性・抗炎症性サイトカインや抗体の産生作用を評価した。

### 3-2. MVs に対する腸管細胞層の応答や作用機序の解明

MVs やその構成成分を認識する細胞受容体を同定した。蛍光色素を用いて各細菌由来の MVs やタンパク質、核酸を標識して、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて免疫細胞や腸管上皮細胞への MVs やタンパク質、核酸の局在を明らかにした。細胞受容体と MVs の局在から、MVs による細胞への作用機序を明らかにした。さらに MVs やその構成成分によって惹起される細胞応答に関して、リアルタイム RNA やウエスタンブロット法を用いて、細胞内部のシグナル伝達経路の同定を試みた。

### 3-3. MVs の高生産条件の検討、MVs の高生産株の育種

独自に見出した *L. plantarum* や *B. infantis*、*Lactobacillus* sp. 属細菌を対象に、MVs を高生産する培養条件を検討した。ランダム変異導入法を用いて、これらの単離株から MVs の高生産株を育種した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 発酵食品に関連する細菌や腸内共生細菌の MVs の構成成分

*L. plantarum* の培養液上清から分画遠心法で回収したナノサイズの粒子に注目して、その粒子中の MVs 量を評価した。ナノ粒子の透過電子顕微鏡 (TEM) 観察によって、多数の球形の構造体 (粒径 50 nm) を検出できた(図1)。蛍光色素で MVs を標識して、ナノ粒子トラッキング分析を行った結果、粒径 50-800 nm の MVs を確認できた。およそ 400 nm の大きさの MVs が最も多く、蛍光色素で標識された MVs は、全てのナノ粒子の 86%であった。この MVs は弱く負に帯電しており、TEM 観察で認められた粒径 50 nm の MVs は、培養液中では単量体や多量体を形成する可能性がある。以上から、*L. plantarum* は培養液中に少なくとも  $4.5 \times 10^{10}$  個/ml の MVs (粒子径 50~400 nm) を生産した。これは、*B. infantis*、*Lactobacillus* sp. 属細菌の MVs でも同様の粒子径

や濃度であった。*L. plantarum*の MVs を構成する脂質分析から、*L. plantarum*の細胞膜から本 MVs が構成されると考えられた。*L. plantarum*の MVs にはペプチドグリカンやリポテイコ酸を構成する物質は検出できなかった。*L. plantarum*の MVs には、主にタンパク質が含まれ、さらに RNA を検出できた。これは、この点についても、*B. infantis*、*Lactobacillus* sp. 属細菌でも同様であった。発酵食品に関連する細菌や腸内共生細菌が生産する MVs がどのようなものか、基盤となる実体を明らかにできた。

#### 4-2. *L. plantarum*の MVs のタンパク質と RNA の解析

*L. plantarum*の MVs には、411 種類のタンパク質を同定できた。細胞内局在を予測した結果、58%のタンパク質は細胞膜に、33%のタンパク質は細胞質に局在することが分かった。本 MVs には、僅かな細胞壁や細胞外に存在するタンパク質が含まれた。本 MVs と同様に、*B. infantis*の MVs に含まれるタンパク質は、34%のタンパク質は細胞膜に存在することが分かった。さらにこれらの MVs には、細胞壁の分解に関与する lysozyme や cell wall amidase を見出した。これらの MVs の分泌機構として、細菌の細胞壁がこれらの酵素によって局所的に薄くなり、細胞膜が膨圧のために細胞外に突き出た際に、菌体細胞から MVs として放出されることが考えられた。一方、*L. plantarum*の MVs に含まれる RNA を網羅的に同定した結果、72%の短鎖 RNA は 5S、16S、23S rRNA に由来していた。20%の短鎖 RNA は tRNA に、4%の短鎖 RNA は mRNA にそれぞれ由来した。DNA も微量ながら検出することができた。これらのタンパク質や核酸が、宿主細胞へ作用して細胞応答を惹起することが考えられた。

#### 4-3. MVs の免疫賦活作用

*L. plantarum*の MV 画分によって、自然免疫に関して炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの産生がそれぞれ誘導された。一方、本 MVs の存在下で、抗体の産生を誘導したことから、MVs の添加によって獲得免疫が刺激されると考えられた。本 MVs は、宿主の自然免疫と獲得免疫の両方を活性化すると考えられた (図 2)。*B. infantis* と *Lactobacillus* sp. 属細菌の MVs は、それぞれ炎症性サイトカインの産生、抗体の産生誘導効果を示した。生産が誘導された抗体は、腸管免疫系によって産生・分泌される主要な免疫グロブリンであり、消化管において腸内細菌群集の組成と分布を調節する上で重要な役割を果たしている。そのためこれらの細菌は、MVs を生産して、宿主免疫細胞に働きかけて抗体の産生を増強することで、腸内環境の恒常性の維持に参与している可能性がある。一方、これらの細菌の菌体と MVs は、異なる細胞応答を惹起する可能性が示唆された。

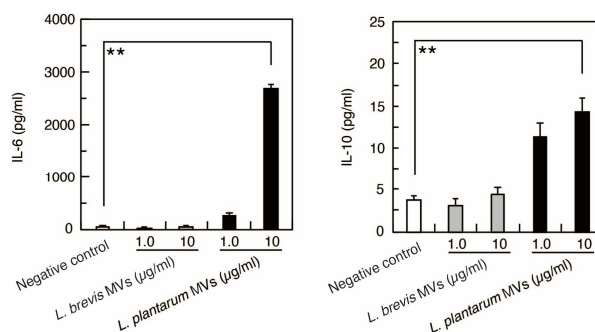


図 2. 各種の乳酸菌 MVs による免疫賦活作用  
文献 (1) の図を改訂した。

#### 4-4. MVs を認識する免疫細胞の受容体

本研究では、発酵食品に関連する細菌や腸内共生細菌として *L. plantarum*、*B. infantis*、*Lactobacillus* sp. 属細菌に注目した *L. plantarum*、*B. infantis*、*Lactobacillus* sp. 属細菌は、宿主の免疫細胞を刺激する MVs を生産した。これまで MVs を認識する宿主細胞の受容体には不明な点が多い。本研究では、細菌の構成成分を認識するパターン認識受容体としてヒト TOLL 様受容体 (TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9) とヒト NOD 様受容体 (NLR1、NLR2) に注目した。さらに、これらの受容体によって活性化されるシグナル経路の下流で作用する転写因子として、NF- $\kappa$ B に注目した。NF- $\kappa$ B は、宿主細胞内で炎症性・抗炎症性サイトカインの産生を促す。そこで宿主細胞上で上記の受容体によって MVs が認識されるかどうか、NF- $\kappa$ B が活性化されるかどうか検討した。その結果、*L. plantarum*、*B. infantis*、*Lactobacillus* sp. 属細菌の MVs は、宿主細胞表層の TLR2 によって主に認識されて、各種サイトカインの産生と抗体の産生を誘導する可能性が示唆された。

#### 4-5. MVs のリガンド

*L. plantarum* と *B. infantis* の MV 画分から、特徴的なりポタンパク質をそれぞれ見いだした。*Lactobacillus* sp. 属細菌の MV 画分から Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を見出した。4-4 の結果に基づいて、これらのタンパク質やペプチドを用いて、TLR2 による認識と各種サイトカインの生産作用を評価した。その結果、これらのタンパク質は、TLR2 のアゴニストとして作用することが明らかとなった。特に、上記のリポタンパク質は、それぞれの MVs の表層に提示されて、宿主細胞の表層の受容体に作用することで、各種の炎症性・抗炎症性サイト

カインの産生が惹起されたことが示唆された。

#### 4-6. 各種細胞に対する MVs の局在

*L. plantarum* と *B. infantis*, *Lactobacillus* sp. 属細菌の MVs を蛍光色素を用いて標識した。さらに蛍光色素と抗体で GAPDH を標識した。これらの標識した MVs と GAPDH を用いて、免疫細胞や腸管上皮細胞の培養液に添加して、細胞応答を惹起する MVs やタンパク質の各種細胞への局在を検討した。その結果、多数の MVs はこれらの細胞の細胞膜表層に局在した。この結果は、MVs やリポタンパク質や GAPDH が細胞表層の受容体 TLR2 を刺激した結果を支持した。

#### 4-7. MVs の高生産条件の検討、MVs の高生産株の育種

以上の研究から、*L. plantarum* や *B. infantis*, *Lactobacillus* sp. 属細菌は、免疫賦活作用に優れた MV 画分を生産することを明らかにできた。これらの MV 画分を多量に得るために、高生産条件の検討、高生産株の育種を試みた。MVs の高生産条件を検討した結果、界面活性剤を添加しない培地を用いた場合に、これらの細胞外 MVs の生産量が 10 倍程度増加することを見出した。さらにランダム変異導入により、これらの細菌を用いて、細胞外 MVs の高生産株の育種を試みた結果、2~3 倍量の細胞外 MVs を生産する変異株を得ることができた。

#### 4-8. まとめ

ヒトの生理機能は、発酵食品に関連した細菌や腸内共生細菌による影響を受けているが、このような影響の分子基盤はほとんど明らかになっていない。本研究では、発酵食品に関連した細菌や腸内共生細菌が MVs を生産すること、MVs の実体、MVs によって引き起こされる細胞応答、その作用機序、受容体と細胞内のシグナル伝達系を明らかにして、共生細菌による影響の一端を解明できた(図3)。さらに有用な MVs を多量に得るために、培養条件を明らかにして、高生産株を育種することができた。以上から、本研究によって有用な MVs を活用する基盤技術を確立することができた。

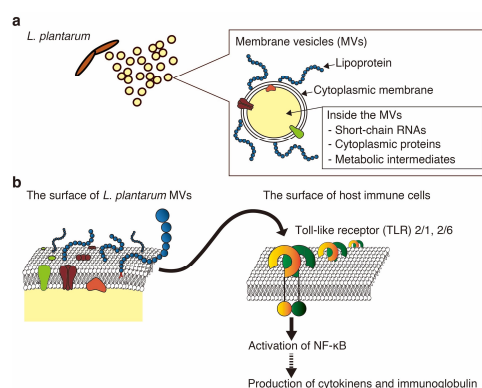


図 3. 発酵食品に関連した細菌や腸内共生細菌による MVs を介した宿主細胞への影響の分子基盤

a, *L. plantarum* の MVs の特徴。B, MVs のタンパク質による宿主細胞の受容体への刺激。文献(1)の図を改訂した。

#### <引用文献>

- (1) Kurata A et al. (2022) Sci Rep 12, 1-12.
- (2) Kurata A et al. (2023) BBB 87:1, 119-128.
- (3) Kurata A et al. (2023) BBB 87:8, 907-915.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Atsushi Kurata, Shogo Kiyohara, Tomoya Imai, Shino Yamasaki-Yashiki, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama, Noriaki Kishimoto, Koichi Uegaki	4. 巻 12 (13330)
2. 論文標題 Characterization of extracellular vesicles from <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-17629-7	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 倉田淳志	4. 巻 33 (3)
2. 論文標題 乳酸菌が放出する細胞外膜小胞の特性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本乳酸菌学会誌	6. 最初と最後の頁 179-185
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 Atsushi Kurata, Shino Yamasaki-Yashiki, Tomoya Imai, Ayano Miyazaki, Keito Watanabe, Koichi Uegaki	4. 巻 87 (1)
2. 論文標題 Enhancement of IgA production by membrane vesicles derived from <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ,	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 119-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac172	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 Takagi Hironobu, Yamamoto Kazuki, Matsuo Yoshifumi, Furuie Miki, Kasayuki Yasuha, Ohtani Rina, Shiotani Mizuki, Hasegawa Tetsuya, Ohnishi Toru, Ohashi Masataka, Johzuka Katsuki, Kurata Atsushi, Uegaki Koichi	4. 巻 86
2. 論文標題 Influence of mutation in the regulatory domain of <i>-isopropylmalate synthase</i> from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> on its activity and feedback inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 755 ~ 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac045	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 Kurata Atsushi, Takeuchi Shimpei, Fujiwara Ryo, Tamura Kento, Imai Tomoya, Yamasaki-Yashiki Shino, Onuma Hiroki, Fukuta Yasuhisa, Shirasaka Norifumi, Uegaki Koichi	4. 巻 87
2. 論文標題 Activation of the toll-like receptor 2 signaling pathway by GAPDH from bacterial strain RD055328	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 907 ~ 915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbad059	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 前田 瑞歩, 小西 莉子, 入江 健太, 岡田 美玖, 福田 隆志, 川本 純, 今井 友也, 栗原 達夫, 倉田 淳志, 上垣 浩一
2. 発表標題 Bifidobacterium dentiumが生産するMVsの特性
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉田 淳志
2. 発表標題 乳酸菌が放出する細胞外膜小胞の特性
3. 学会等名 日本乳酸菌学会設立30周年記念シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kurata
2. 発表標題 Novel TLR2 ligand of Lactiplantibacillus plantarum BMVs induces the pro/anti-inflammatory cytokines and IgA production
3. 学会等名 EMBO Workshop; Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相松 光太、石田 隼斗、木村 友希、藤井 暁、長野 正信、今井 友也、倉田 淳志、上垣 浩一
2. 発表標題 壺造り純米黒酢より単離した <i>Acetobacter pasteurianus</i> のMVsの免疫賦活作用
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度 大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 隼斗、相松 光太、木村 友希、藤井 暁、長野 正信、今井 友也、倉田 淳志、上垣 浩一
2. 発表標題 壺づくり黒酢からJurkat細胞の増殖抑制作用を示すMVs生産細菌の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度 大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内 慎平、安井 萌香、田村 健人、倉田 淳志、山崎 思乃、今井 友也、上垣 浩一
2. 発表標題 <i>Lactobacillus</i> sp. RD055328によって生産される膜小胞の特性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度 大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米田 菜織、氷見山 幹基、長澤 壯柄、佐々本 康平、加塩 健悟、大嶋 真紀、倉田 淳志、中村 努、上垣 浩一
2. 発表標題 高熱性古細菌 <i>Pyrococcus abyssi</i> 由来 N-acyl-D-amino 酸加水分解酵素の生化学的的特性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度 大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 朝海、倉田 淳志、河野 健一、上垣 浩一
2. 発表標題 乳酸菌細胞外膜小胞の高生産条件の検討
3. 学会等名 日本乳酸菌学会 2023 年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原 遼、石崎 真尋、竹内 慎平、田村 健人、倉田 淳志、山崎 思乃、今井 友也、 上垣 浩一
2. 発表標題 RD055328 株由来の GAPDH による TLR2 シグナル伝達経路の活性化
3. 学会等名 日本乳酸菌学会 2023 年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田朝海、倉田淳志、河野健一、上垣浩一
2. 発表標題 乳酸菌が産生する細胞外膜小胞の高生産条件の検討
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田瑞歩、入江健太、岡田美玖、福田隆志、川本純、今井友也、栗原達夫、倉田淳志、上垣 浩一
2. 発表標題 Bifidobacterium dentiumのMVsが示すJurkat細胞の増殖抑制効果
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 倉田 淳志
2. 発表標題 腸内環境の恒常性の維持におけるプロバイオティクス由来の細胞外膜小胞の機能
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会(シンポジウム)(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田 朝海、倉田 淳志、河野 健一、上垣 浩一
2. 発表標題 乳酸菌細胞外膜小胞の高生産条件の開発
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原 遼、石崎 真尋、竹内 慎平、田村 健人、倉田 淳志、山崎 思乃、今井 友也、上垣 浩一
2. 発表標題 乳酸菌 RD055328 株由来の GAPDH の特性と細胞外膜小胞の精製
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉田 淳志
2. 発表標題 腸内環境の恒常性維持における乳酸菌やビフィズス菌が放出する細胞外膜小胞の役割
3. 学会等名 Cytekウェブセミナー(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

オープンイノベーションの創成を目指した全学横断型研究プロジェクト(研究クラスター)  
[https://www.kindai.ac.jp/rd/core/#module\\_table-type02\\_scroll](https://www.kindai.ac.jp/rd/core/#module_table-type02_scroll)  
L plantarum genome shotgun sequencing project  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BPFY00000000.1/>  
extracellular solute-binding protein  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/acj51183>  
乳酸菌が細胞外膜小胞を介して免疫を活性化する仕組みを解明  
<https://newscast.jp/news/5480460>  
乳酸菌が免疫を活性化する仕組み  
<https://research-er.jp/articles/view/113994>  
オープンイノベーションの創成を目指した全学横断型研究プロジェクト(研究クラスター)  
[https://www.kindai.ac.jp/rd/core/#module\\_table-type02\\_scroll](https://www.kindai.ac.jp/rd/core/#module_table-type02_scroll)

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
---------	---------