

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05369

研究課題名(和文) 腸内共生細菌のべん毛が宿主免疫系の炎症誘導を免れる理由の分子レベルでの解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms Underlying How the Flagella of Gut Commensal Bacteria Avoid Inflammatory Responses

研究代表者

梶川 揚申 (Kajikawa, Akinobu)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30646972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、動物腸管に共生する運動性乳酸菌が、宿主免疫系に認識され得るべん毛抗原「フラジェリン」を持ちながらも炎症を誘導することがない理由を分子レベルで明らかにすることを目指したものであった。筆者らは、組換えタンパク質や組換え乳酸菌を用いた実験により、運動性乳酸菌がもつフラジェリンの免疫学的な低応答性は、受容体認識部位における特定のアミノ酸残基が病原体由来のフラジェリンと異なることに起因していることを示した。また、運動性乳酸菌のべん毛繊維がフラジェリン糖鎖修飾により安定化していることも炎症応答を減弱する要因になり得ると考え、これを証明するための糖鎖修飾遺伝子欠損変異株を構築することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒトを含む動物の腸管に生息する乳酸菌のべん毛が腸管内で炎症を引き起こすことがない理由を探るものであった。乳酸菌は元々腸管内に生息するものや、発酵食品あるいはサプリメントとして積極的に摂取されるものもある。しかし、乳酸菌の安全性は経験的に知られているものであって、必ずしも科学的な根拠に基づいている訳ではない。また、近年では腸内細菌が想像以上に我々の健康に深く関与することが分かってきており、腸内細菌やそれに影響を与える乳酸菌について理解を深めることは重要な課題である。本研究は運動性乳酸菌が腸管内でどのように宿主との共生関係を築いているかを理解するうえで重要な知見を与えるものであった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate at the molecular level why motile lactic acid bacteria (LAB) symbiotic in the animal gut possess the flagellar antigen "flagellin," which can be recognized by the host immune system, yet do not induce inflammation. The authors demonstrated through experiments using recombinant proteins and recombinant LAB that the flagellin of motile LAB does not trigger inflammation due to specific amino acid sequences in the receptor recognition site. Furthermore, we hypothesized that the glycosylation of flagellin stabilizes the flagellar filaments of motile LAB, which contributes to avoiding inflammatory responses. To prove this, we successfully constructed mutant strains lacking glycosylation genes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：乳酸菌 運動性 べん毛 免疫 腸内細菌 共生

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌の中には運動性を示すものがある。これまでの研究において、腸管由来細菌の運動性やべん毛に関する知見は、サルモネラ菌、ピロリ菌、リステリア菌などの病原性細菌に関するものが大部分を占める。これら病原性細菌が持つべん毛の役割は、主に宿主組織深部への侵入による感染機会の増大であると考えられる。これに対抗する宿主免疫系は、このような病原性細菌を排除するため、細菌に共通する分子パターンを認識する受容体を発達させてきた。Toll-like receptors (TLRs) はそのような微生物関連分子パターン認識レセプターの一つであり、フラジェリン(べん毛繊維構成サブユニットタンパク質)はTLR5のアゴニストであることが知られている。TLR5は腸管上皮細胞や粘膜に局在する免疫担当細胞に存在し、実際にTLR5とフラジェリンを介した相互作用は腸管組織における炎症応答に深く関わることが報告されている。

腸内に常在する細菌の中には、宿主と良好な関係を構築している共生細菌の存在も知られている。乳酸菌やビフィズス菌はその代表格であり、腸管由来の乳酸菌においても稀にべん毛を持つ種が存在する。筆者らはこのような動物腸管に共生する有べん毛乳酸菌 *Ligilactobacillus agilis* の研究を行っており、これまでに乳酸菌がもつべん毛は炎症応答をほとんど誘導しないことを報告している。動物腸管内の恒常性維持において、宿主-細菌間の免疫学的相互作用は極めて重要であり、共生細菌のべん毛が炎症応答を回避する特性を持つことは合理的である。しかし、乳酸菌という共生細菌のべん毛抗原がどのように宿主免疫系の炎症誘導を回避しているか? という点を明確にした研究は過去に見られない。これを明らかにすることは、動物と微生物の共生関係を理解するうえで非常に重要な課題であると思われる。

2. 研究の目的

筆者らによる動物腸管由来有べん毛乳酸菌 *Ligilactobacillus agilis* に(旧称 *Lactobacillus agilis*)に関する最近の研究から、これまで知られていなかった興味深い点として以下のA~Dが見いだされた。A. 乳酸菌のフラジェリンは病原菌由来のそれと比較して免疫学的活性が著しく低い、B. 病原体フラジェリンで共通するTLR5認識部位のうち3アミノ酸残基が不一致、C. べん毛繊維の安定性が高く、フラジェリン単量体の遊離が起こりにくい、D. フラジェリンが多重に糖鎖修飾を受けている。ABより、*L. agilis*のフラジェリンにおける当該の3アミノ酸残基が免疫学的低応答性の原因かもしれないこと、Cより、*L. agilis*からはフラジェリン単量体がほとんど遊離せず、単量体とのみ結合できるTLR5からの認識を免れるであろうこと、また糖鎖修飾の代表的な機能の一つがタンパク質の安定化であり、糖鎖修飾の無いサルモネラべん毛繊維は安定性が低いことから、Dはべん毛繊維の安定性に関わる可能性があること、以上3点が示唆された。これらの考察を踏まえ筆者は、「*L. agilis*はフラジェリンのTLR5認識に決定的なアミノ酸配列の一部を病原体のものとは異にすることに加え、糖鎖修飾によってべん毛繊維を安定化させることでフラジェリン単量体が遊離しにくい状態を保つ。結果として、*L. agilis*は宿主免疫系による炎症応答を惹起することなく、宿主との共生関係を構築している。」との仮説を導いた。本研究課題のねらいは、上記の仮説を検証し、腸内共生乳酸菌のべん毛およびフラジェリンがどのように免疫系からの認識および炎症応答を回避しているかを分子レベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

フラジェリンのTLR5低応答性が特定アミノ酸残基の不一致に起因するかどうかを調べる実験は下記の方法により行った。

(1) 変異型 *L. agilis* フラジェリン組換えタンパク質の調製

既知 *L. agilis* BKN88株のゲノム情報から、フラジェリン遺伝子 *fliC2* の配列を抽出し、特定のアミノ酸残基が置換されるような塩基配列を設計した。この設計に従い、変異導入用のPCRプライマーを合成した。オーバーラップPCRにより塩基配列を変換した *fliC2* 遺伝子を取得し、His-tag タンパク質産生用発現ベクターpQE30 (Takara) に挿入した。大腸菌の形質転換により変異型 *fliC2* 発現クローンを構築し、組換え FliC2 タンパク質を精製した。

(2) ヒト結腸由来 Caco-2 細胞の FliC2 刺激によるインターロイキン-8 (IL-8) 産生誘導

Caco-2 細胞を培養後、マイクロプレートへ播種し、精製 FliC2 タンパク質を添加した。一定時間培養後の培養上清を回収し、ELISAによってIL-8を定量した。

(3) 変異型 *fliC2* を発現する組換え *L. agilis* の構築

上述の実験で作製した変異型 *fliC2* 遺伝子断片を、乳酸菌の染色体に導入可能な温度感受性プラスミド pGhost5 へ挿入した。このプラスミドを用い、フラジェリン遺伝子を欠損した *L. agilis* 変異株に変異型 *fliC2* 遺伝子を導入することで、変異型フラジェリンで構成されたべん毛をもつ組換え *L. agilis* を構築した。また、野生型フラジェリン遺伝子 *fliC1* と変異型 *fliC2* を共発現する組換え体も同様の方法で構築した。取得された組換え *L. agilis* が変異型 *fliC2* を

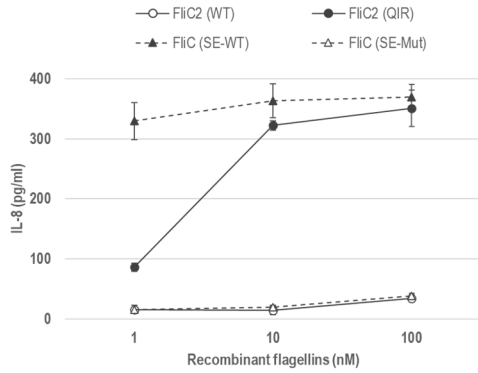


図3. 組換えフラジェリンによる濃度依存的IL-8産生誘導

のみ発現させた組換え体ではべん毛が形成されなかった。そこで、正常なフラジェリンと共発現させたところ、野生型と変異型のフラジェリンが混ざった状態でべん毛が形成された。この変異型フラジェリンを含む組換え *L. agilis* あるいはこの菌株から精製されたべん毛はTLR5を介した免疫学的活性が上昇していた(図4ab)。また、マウスへの経口投与の結果、*L. agilis* べん毛特異的抗体産生誘導が見られ、当該菌株の抗原性も上昇していることが示唆された(図4c)。*L. agilis* を含む運動性乳酸菌においては上述の3カ所のアミノ酸残基のうち、最も上流側にあるものが共通して病原体とは一致していない。したがって、*L. agilis* に限らず、いずれの運動性乳酸菌に由来するフラジェリンも、サルモネラ菌などの病原体に由来するフラジェリンほどの免疫学的活性、抗原性は示さないと思われる。即ち、この特定のアミノ酸残基の違いは、宿主免疫系が病原性細菌と非病原性細菌を見分ける上で非常に重要なものであると考えられる。また、上述の3カ所のアミノ酸残基の変異を導入した組換え *L. agilis* がべん毛形成能を失ったことは、宿主に対して好ましくない、炎症誘導活性と抗原性の上昇を伴う変異が起こった際、その機能を停止させる安全装置のような機能を果たしている可能性も考えられる。以上の研究成果については論文にまとめ、2022年に発表されている。

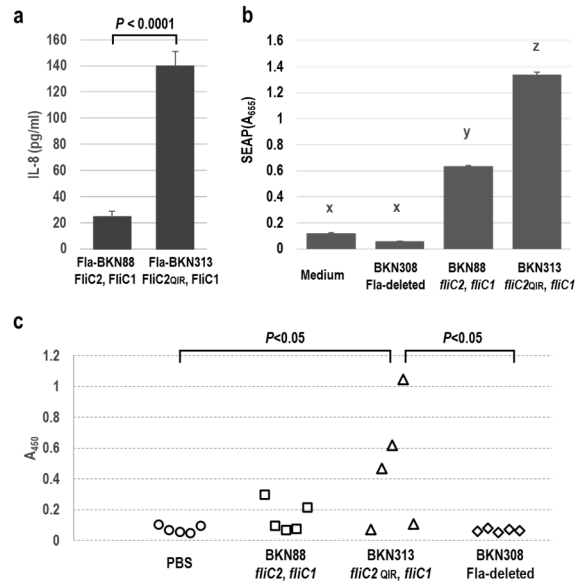


図4. 変異型フラジェリンを発現する組換え乳酸菌の免疫学的活性

(2) *L. agilis* がもつフラジェリンタンパク質の糖鎖修飾は、少なくとも正常な運動性の発揮において必要なものであることが分かった。一方、べん毛に結合する糖の同定、結合アミノ酸部位、免疫学的活性への影響についてはさらなる検討が必要である。まず、*L. agilis* のゲノムにおける運動性オペロン下流側には2コピーの連続したフラジェリンタンパク質遺伝子があり、その近傍に7個の推定糖転移酵素遺伝子が見つかっている(図5a)。

これらの遺伝子のうち、どれが実際のフラジェリン糖鎖修飾に関わるかを調べるため、各遺伝子を一つずつ欠損した変異株の作製を行った。PCRによる検証の結果(図5b)、最終的に全7菌株の作製に成功し、これらの菌株についてべん毛および運動性について調べた。図5cに示す通り、7種類の変異株のうち、3菌株(733, 736, 738)においては明確な変化が見られなかった。これらの遺伝子については、フラジェリン糖鎖修飾に関わらない、何かしらの条件下においてのみ機能する、あるいは他の遺伝子によって代替され得るものである可能性が考えられた。732菌株において

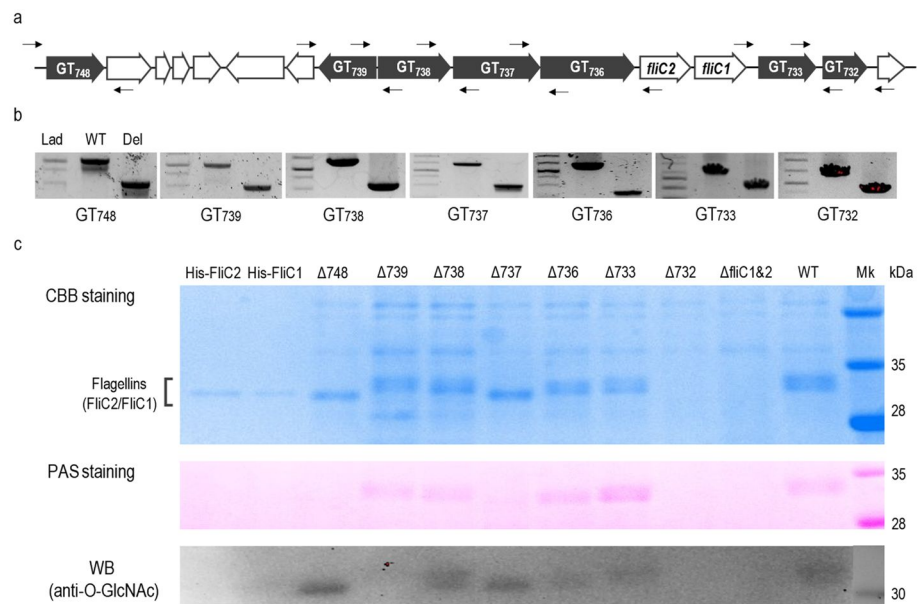


図5. *L. agilis* BKN88における推定フラジェリン糖鎖修飾遺伝子欠損株の構築

のうちの3菌株(733, 736, 738)においては明確な変化が見られなかった。これらの遺伝子については、フラジェリン糖鎖修飾に関わらない、何かしらの条件下においてのみ機能する、あるいは他の遺伝子によって代替され得るものである可能性が考えられた。732菌株において

はフラジェリンの産生自体が見られず、したがってべん毛形成・運動性も失われていた。本菌株で欠損している遺伝子の機能は不明だが、フラジェリンの産生に必要なものと考えられる。また 739 菌株に関しては、不明確ながら糖鎖修飾の変化が疑われた。*L. agilis* のフラジェリンにおいては抗 O-GlcNAc (N-アセチルグルコサミン) 抗体を用いた Western blot によってシグナルが検出されるが、この変異株のフラジェリンでは同シグナルが検出されない。しかしながら糖鎖修飾自体はPAS染色によって野生株と同等以上の染色性が見られることから、おそらくGlcNAcが別の糖鎖によりマスキングされ、抗O-GlcNAc抗体が結合できなくなったものと思われた。また、本変異株は運動性を示すものの不安定であり、培養液中の非運動性菌体の割合が高くなっていることが分かった。残りの2菌株(737、748)についてはフラジェリン分子量の低下、PAS染色による染色性の消失、菌体の凝集、運動性の消失が同様に観察された(図6)。Western blot によりGlcNAcは検出されるため(図5c)糖鎖が完全に失われた訳ではないが、大部分の糖鎖は欠失していると思われた。以上の結果より、これら2つの変異株において欠失している両遺伝子はフラジェリンの糖鎖修飾に直接関わるものであることが強く示唆された。菌体が凝集する原因としては、水酸基を多く含む糖鎖が大幅に減少したことにより、糖鎖結合部位の親水性が低下した可能性が考えられた。糖鎖結合部位はべん毛繊維において表面に露出する部分であることから、べん毛繊維が親水性を失い、他のべん毛繊維と疎水性相互作用によって結合することで菌体同士の凝集が起こったものと推察された。当初、フラジェリンの糖鎖修飾がべん毛繊維の安定性に関わることや、免疫学的活性に影響を及ぼすことが本研究課題で検証される予定であった。糖鎖修飾が大幅に減少しているこれら2菌株のべん毛繊維を実験に供することが求められるが、上述の凝集性の問題から、べん毛の精製および可溶化が困難となっている。今後の研究において、べん毛の立体構造を維持したままべん毛を可溶化する条件の検討が必要となる。

本研究を通じて、動物腸管内に生息する有べん毛常在細菌がなぜ免疫系を過剰に刺激することなく、宿主との共生関係を維持しているかについて、部分的にはあるものの、分子レベルで明らかにすることができた。

<引用文献>

- Kawai, T. and S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, 2010, 373-384.
- Hayashi, F., et al., The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 2001, 1099-1103.
- Ramos, HC., et al., Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *TRENDS in Microbiology*, 12, 2001, 509-517.
- Yoon, S., et al. Structural Basis of TLR5-Flagellin Recognition and Signaling. *Science*, 335, 2012, 859-864.
- Kajikawa, A., et al., Immunogenic Modification of *Ligilactobacillus agilis* by Specific Amino Acid Substitution of Flagellin. *Applied and Environmental Microbiology*, 88, 2022, e0127722

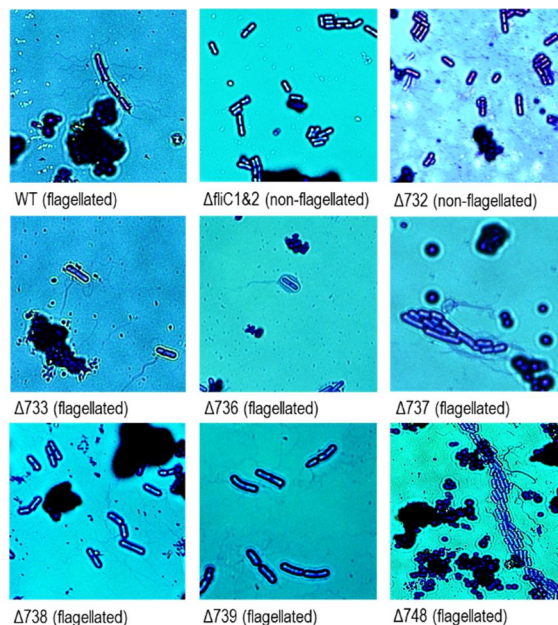


図6. 推定糖転移酵素遺伝子欠損株のべん毛形成

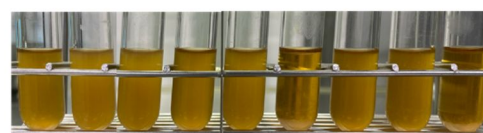
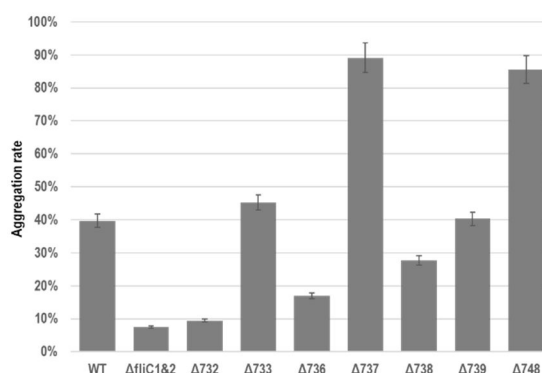


図7. 推定糖転移酵素遺伝子欠損株培養液における菌体の凝集

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 1件）

1. 著者名 Akinobu Kajikawa, Naoto Eguchi, and Shunya Suzuki	4. 巻 88
2. 論文標題 Immunogenic Modification of <i>Ligilactobacillus agilis</i> by Specific Amino Acid Substitution of Flagellin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e0127722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.01277-22.	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶川揚申
2. 発表標題 動物腸管由来運動性乳酸桿菌の特性と応用への展開
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 相原康佑
2. 発表標題 <i>Ligilactobacillus agilis</i> における運動性オペロン内糖鎖修飾関連遺伝子群の機能解析
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------