

平成 2 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：8 2 1 1 1

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：2 3 5 8 0 1 2 4

研究課題名（和文）疑似菌体モデルによる乳酸菌夾膜多糖の免疫細胞活性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of immunostimulatory effect of capsular polysaccharides produced by lactic acid bacteria using pseudo-bacterial cell model.

研究代表者

鈴木 チセ（Suzuki, Chise）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所畜産物研究領域・上席研究員

研究者番号：8 0 3 4 3 8 2 0

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000 円、（間接経費） 1,200,000 円

研究成果の概要（和文）：マクロファージ様培養細胞J774.1に乳酸菌の莢膜多糖(CPS)を結合した蛍光標識ビーズを添加して被貪食能をフローサイトメトリーにより解析することにより、CPSの特性を解析可能な疑似菌体モデル系を構築した。莢膜に含まれる*L. lactis* C59に特異的なルテニウムレッド（RR）結合因子を精製した結果、リボソームRNAを主成分とするRNAであった。電子顕微鏡観察の結果、C59ではRNAが溶出するような損傷はなく表面に粒子状の形態が認められたが、CPSを産生しないC63では粒子状の形態はなかった。次世代シーケンサーによる配列解析の結果、C63はC59と同一のeps遺伝子クラスターを有していた。

研究成果の概要（英文）：We have constructed a pseudo-bacterial cell model using streptavidin coated fluorescent beads in conjugation with biotinylated capsular polysaccharides (CPS) purified from *Lactococcus* cells. The CPS-labeled beads were added to macrophage-like cell line J774.1 and cells that engulfed CPS-labeled beads were analyzed by flow cytometry. Ruthenium red-binding factor specific to the CPS of *Lactococcus lactis* C59 was purified and found to be RNAs, in which ribosome RNAs were the main components. By scanning electron microscopy, there were particle-like structures on the cell surface of C59 but no lesions from which RNAs were eluted. Particle-like structures were not observed on the surface of strain C63, a CPS-deficient C59 congenic strain. The result of next-generation sequencing showed that C59 and C63 possessed the identical eps gene cluster.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：Lactococcus lactis capsular polysaccharide

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌の表面を覆う莢膜は多糖類で構成されており、乳製品や漬け物に用いられる *Lactococcus* 属乳酸菌においても一部の株が産生する。この莢膜多糖 (CPS) をもつ株の多くは細胞から遊離した細胞外多糖 (EPS) を培地中に放出する。乳酸菌が生産する EPS の機能性については、抗腫瘍作用 (Oda et al. (1983) Agric. Biol. Chem. 47, 1623-1625)、マクロファージ (Kitazawa et al. (1991) Anim. Sci. Technol. 62, 861-866) や NK 細胞 (Makino et al. (2006) J. Dairy Sci. 89, 2873-2881) の活性化の報告があり、プロバイオティクスの機能として大いに期待されるところであるが、いずれも分子メカニズムについては不明である。EPS と CPS の多くはプラスミドやゲノム上に存在する多糖合成遺伝子群 (以下 *eps* 遺伝子クラスター) から合成される。肺炎球菌等病原菌の CPS は病原性との関連から膨大な研究がなされているが、食品に利用される *Lactococcus* 属においては EPS の構造解析や機能解析が進んでいる一方で、細胞表層に存在する CPS に関してはほとんど研究例がない。遊離の EPS と細胞表層の CPS では糖鎖構造や免疫細胞に対する機能が異なることが予想されるが、乳酸菌の細胞壁やその他の菌体成分にも免疫細胞に対する活性があるため、CPS 単独の効果を検証することは困難である。このため、CPS を表層にもつ疑似菌体モデル系を構築することが必要であると考え、本課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本課題では、乳製品由来 *Lactococcus* 属乳酸菌の表面を覆う CPS が、それらを認識した免疫担当細胞にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。CPS で修飾したビーズを用いた疑似菌体モデル系を構築し、異なる糖組成の CPS や分子遺伝学的手法により改変した CPS と免疫担当細胞との相互作用を解析す

ることにより、免疫賦活作用を有するプロバイオティクスを育種開発するための研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

Lactococcus lactis C59 および DRC2 をグルコース添加酵素分解スキムミルク培地で培養した。菌体を集菌後 PBS で洗浄し、0.1 M 炭酸ナトリウム (SC) 中でインキュベートすることにより菌体から CPS を分離した。得られた CPS を DNase、RNase 処理、プロテアーゼ処理を行った後、エタノール沈殿、透析等により精製し、CPS の凍結乾燥物を得た。この CPS をビオチン化し、ストレプトアビジン標識 (蛍光) ビーズへ結合させ、マウス由来マクロファージ様細胞 J774.1 に添加し、2 時間、5 時間後フローサイトメータにより、蛍光標識ビーズを貪食したマクロファージをカウントすることにより被貪食能を比較した。

C59 に特異的なカチオン性色素ルテニウムレッド (RR) と結合する成分を明らかにするため、0.1 M SC 処理で得られた画分を 0.1 M CaCl_2 存在下で沈殿させ、0.1 M EDTA 存在下で可溶化後、排除限界 50 K の限外濾過膜で濃縮した。

供試菌の表面を比較するため、C59 と C59 の類縁株 C63 (C59 と同じ分離源から単離された *L. lactis* で、CPS は産生しない) をグルタルアルデヒドで固定後オスミウム固定により走査型電子顕微鏡観察 (JEOL JSM-7600F) を行った ((独) 農研機構・動物衛生研究所の協力)。

供試菌のゲノム配列を明らかにするため、C59、C63 を含む *L. lactis* 数株について ((独) 農業生物資源研究所のゲノム支援の協力を得て、次世代シーケンサー (MiSeq) 解析を行った。

4. 研究成果

J774.1 株のフローサイトメトリーにより、貪食した蛍光標識ビーズの個数毎に細胞の

解析が可能であり、DRC2 株の CPS 修飾ビーズは被貪食能が高く、ビーズをとりこまない細胞数が少なかった。C59 株の CPS 修飾ビーズは BSA 修飾したコントロールビーズと差がなかった。菌株によって CPS のビオチン化効率が異なっており、おそらく糖組成や糖の修飾のちがいによるものと考えられた。疑似菌体モデル系は構築できたが、結合させる CPS の純度や性質によって相互比較が難しいという問題が生じた。各菌株の糖組成および *eps* 遺伝子クラスターのうちよく保存されている *epsD* とその下流でコンセンサスが失われる *epsE* 遺伝子配列の菌株特異性と、*L. lactis* の EPS としては新規な糖組成を有する C59 および DRC2 についてとりまとめて報告した 2)。さらに *L. lactis* 菌株添加によるマクロファージの応答をサイトカインおよび NO に着目して検討した結果、NO 産生がインターロイキン 12 の産生を抑制することを見いだした 1)。

これまで莢膜を有する *L. lactis* 菌株の中で C59 のみがカチオン性色素ルテニウムレッド (RR) 含有寒天培地上で赤色コロニーを示し、莢膜成分が RR と結合することを報告している。そこで、莢膜成分のうち RR と結合する成分を精製し、解析した結果、この成分はアガロースゲルで電気泳動後、RR 染色により 1.5 と 2.5 kb の 2 本のバンドとして検出できた。これらのバンドは臭化エチジウム染色で蛍光染色され、その後に RR 染色すると赤く染まった。またサンプルを RNase 処理すると 2 本のバンドは消失した。以上から RR 結合物質はリボソーム RNA であると結論した。莢膜の主要成分が CPS であるという仮定で疑似菌体モデルを作製していたが、その特性 (RR 結合性) に寄与する成分が RNA という予想外の結果となった (鈴木ら、農芸化学会発表)。

0.1M SC 抽出後の菌体は抽出前と同様の濁度 (A620) を保っており、莢膜成分に含ま

れる RNA が溶菌によるものとは考えにくい。RNA の放出が細胞損傷などによるものか調べるため、走査型電子顕微鏡による観察を行った。コントロールとして C59 と同じ分離源から分離された CPS を産生しない *L. lactis* C63 について観察を行った結果、C59 は表面に粒子状の形態が認められ、C63 にはそれらの形態は存在しなかった。粒子状の形態はファージ粒子の電子顕微鏡写真と類似しており、現在その検証を進めている。一方で CPS を産生する *L. lactis* C59 と C63 について次世代シーケンサーによる配列解析を行った結果、C63 は C59 と同一の *eps* 遺伝子クラスター (*epsX* の 5'末端領域から上流は未解析) を有していた。したがって、C63 が CPS を産生しない要因は遺伝子が存在しないためではなく、転写や翻訳のステップの欠損と考えられる。CPS を有する C59 への形質転換は困難であったが、C63 が CPS をもたず、C59 と同一の *eps* 遺伝子クラスターを有することが明らかになったため、今後 C63 を用いた *eps* 遺伝子クラスターの形質転換系の作出を行う予定である。

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 3 件)

1) Suzuki C, Aoki-Yoshida A, Kimoto-Nira H, Kobayashi M, Sasaki K, Mizumachi K. Effects of strains of *Lactococcus lactis* on the production of nitric oxide and cytokines in murine macrophages. *Inflammation* 査読有、印刷中

DOI:10.1007/s10753-014-9901-6

2) Suzuki C, Kobayashi M, Kimoto-Nira H. Novel exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and the diversity of *epsE* genes in the exopolysaccharide biosynthesis gene

clusters. *Biosci Biotechnol Biochem* 査読有、
77(10)、2013、2013-2018
DOI:10.1271/bbb.130322

3) Suzuki C, Kimoto-Nira H, Kobayashi M,
Nomura M, Sasaki K, Yoshida A, Aoki R,
Mizumachi K. Immunomodulatory effects
of *Lactococcus lactis* strains. *Japan
Agricultural Research Quarterly (JARQ)*
査読有、47 (3), 249-255 (2013)
DOI:10.6090/jarq.47.249

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Suzuki C. Utilization of LAB isolated
from Japanese Fermented Vegetable
Products as Functional Materials. (招待講
演) 7th Asian conference on lactic acid
bacteria. 2013.9.7 (インド・ニューデリー)

2) 鈴木チセ、木元広実、小林美穂、
Lactococcus lactis ssp. *lactis* C59 株の細胞
表層に存在するルテニウムレッド結合因子、
日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.26(仙
台市)

3) Suzuki C, Aoki R, Kimoto-Nira H,
Mizumachi K. Behavior of a *Lactococcus
lactis* strain in the murine intestinal
tract. 6th Asian conference on lactic acid
bacteria. 2011.9.9 (札幌市)

4) Suzuki C, Aoki R, Kimoto-Nira H,
Mizumachi K. Effects of lactococcal
strains on production of nitric oxide and
cytokines in the murine peritoneal
macrophages and macrophage cell line
J774.1. 10th Symposium on lactic acid
bacteria. 2011.8.28-9.1 (オランダ・エグモ
ントアンジー)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 チセ (SUZUKI, Chise)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・畜産草地研究所畜産物研究領域・
上席研究員

研究者番号：8 0 3 4 3 8 2 0