

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780126

研究課題名(和文) 乳抗菌タンパク質と腸上皮由来レクチンの協調的作用による乳児腸内細菌定着制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of the coordinative function between a milk antimicrobial protein and an intestinal epithelial lectin for microbial colonization in the infant intestine

研究代表者

大島 健司(Oshima, Kenzi)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：90391888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食品として摂取されたミルク中の抗菌タンパク質ラクトフェリン(LF)が腸上皮細胞由来タンパク質インテレクトインと乳児消化管内で結合し、協調的に乳児の初期腸内細菌叢形成を制御するというモデルを提唱し、その検証を目的として研究を遂行し、以下の結果を得た。1) インテレクトインは一部が細胞内に局在し、腸上皮細胞によるLF受容に影響した。2) インテレクトインとLFは、それぞれ異なるビフィズス菌株の生育に影響した。3) 腸上皮細胞と細菌の相互作用を解析するため、ヘテロな細胞集団であるHT29細胞から異なる性質を持つ複数のクローン株を単離した。

研究成果の概要(英文)：We suggest a hypothetical model in which anti-bacterial protein lactoferrin (LF), which is ingested as a component of milk, and intestinal protein, intelectin, bind and cooperate to regulate primary intestinal flora development in the infant digestive tract. This study validated this hypothesis and obtained following results. 1) Intelectin partially localized in some specific cellular compartments and affected LF intake by the cultured intestinal epithelial cells. 2) Intelectin and LF differently promoted growth of some Bifidobacterium lines. 3) To analyze interaction between intestinal epithelia and microbes in the culture system, several cell lines with the various characters were isolated from heterogenous HT29 cell line.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：腸内細菌 ラクトフェリン 食品機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸内細菌叢形成の制御

腸内細菌は、免疫系の成熟を促進し、食物消化を助け栄養素の供給を行うなど宿主に有益に働いている一方で、体内への過剰な細菌の侵入は炎症や敗血症などの原因となり、病原菌の増殖は伝染病発症の原因となる。そのため、望ましい腸内細菌叢の形成・維持は、病気の発症を抑え健康な生活を維持するために重要なものである。細菌が腸内にとどまって増殖するためには、細菌が腸上皮や上皮表面の粘膜層へと結合することが重要であることから、腸内細菌の腸管上皮への接触・結合を制御することは、腸内細菌叢形成に関わる重要な要因の一つである。例えば、乳酸菌は大腸菌やサルモネラ菌とムチン層や細胞表面への結合を競合するため、非病原菌を優先的に定着させることによって病原菌の生着を抑えることが可能である。これまで、抗菌タンパク質や腸管免疫系により抑制的に細菌叢を制御する機構については多くの研究がなされている一方、細菌叢の形成を促進する機構については、古くからルミナコイドを用いたプレバイオティクスなど外来物質による選択的細菌増殖制御の研究がなされているが、宿主の内在的因子についての研究は進んでいない。

(2) 腸内分泌性レクチン

腸内細菌への応答として、腸上皮から粘液や抗菌物質と共に様々なレクチンが産生され、細菌のペプチドグリカンへと結合し殺菌作用や抗菌作用を発揮する。またレクチンは、腸管への生着を促進する細菌の受容体として機能することも考えられる。腸上皮により発現されるレクチンの一つ、インテレクチンは、腸内細菌の定着により発現が誘導され、細菌の細胞壁であるペプチドグリカンの糖鎖構造と結合するため、腸内細菌の制御に関わっていることが強く予想されるが、どのように腸内細菌叢形成に影響するか明らかとなっていない。また、インテレクチンは明確な膜結合ドメインを持たず、細胞で過剰発現すると分泌タンパク質として細胞外へと放出されるため、正確な細胞内局在についても議論が続いている。

(3) ラクトフェリンとインテレクチンの協調的作用

胎児期の腸管は無菌的であり、出生直後一日以内に環境や母体由来の細菌が腸内に定着する。この最初の腸内細菌生着は、免疫系の未発達な新生児にとって感染症のリスクを伴う危険なものである。新生児が摂取するミルク中には抗体や抗菌活性を示すラクトフェリンが含まれており、特に出生直後の新生児が摂取する初乳中に多く含まれる。そのため、これらのミルク由来因子が初期腸内細菌叢の形成に影響していると考えられている。興味深いことに、インテレクチンは胎児期から腸管で発現が高く、ラクトフェリンと特異的に結合することが報告されている。また、

インテレクチンは腸上皮細胞表面に存在し、ラクトフェリン受容体として細胞に何らかのシグナルを伝達しているとも考えられている。このことから、インテレクチンはレクチン活性により特異的に細菌の接着を促進すると共に、ラクトフェリンと協調して直接または間接的に望ましくない菌の増殖を制御し、初期腸内細菌叢形成を制御していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、腸管におけるラクトフェリンとインテレクチンの協調的生理作用の分子的な基盤を明らかにすることを目的としている。ラクトフェリンは抗菌タンパク質として働く一方、ビフィズス菌の生育を促進することが知られている。また、インテレクチンも細菌のペプチドグリカンへと結合することが明らかとなっている。そのため、これらが結合したインテレクチン-ラクトフェリン複合体が細菌へ直接結合することにより、さらに協調的に細菌の生育に影響することが考えられる。また、ラクトフェリンは腸筋線維芽細胞の遺伝子発現を誘導すること、インテレクチンは血中の adipokine として細胞のシグナル伝達を制御することが知られているため、ラクトフェリンとインテレクチンは腸上皮細胞にもシグナルを伝達し、間接的に腸内細菌を制御する可能性が考えられる。この時、インテレクチンはラクトフェリン受容体としても機能するという可能性がある。以上から本研究では、ラクトフェリンとインテレクチンが協調して機能するターゲットとして、腸内細菌と腸上皮細胞の二つに分けて解析を進めた。

3. 研究の方法

(1) ラクトフェリンとインテレクチンによる腸上皮細胞制御の解析

(定量的インテレクチン検出系の構築) 腸上皮細胞における内在性インテレクチンタンパク質の発現レベルを解析するため、可溶性タンパク質の高感度検出系であるサンドイッチ Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法による検出系の構築を目指した。サンドイッチ ELISA 法には二種類以上の動物種から作製された異なる抗体が必要であるため、インテレクチンペプチドによりウサギおよびマウスを免疫し、抗血清を作製した。また、ウサギ抗インテレクチン抗血清からアフィニティー精製により特異抗体を濃縮した。

(インテレクチンの細胞内局在解析) インテレクチンは腸上皮分泌細胞の分泌顆粒内に存在するタンパク質として同定され、培養細胞により過剰発現させると培養培地中へと放出されること、血中から adipocytokine として検出されることが報告されている。しかしその一方で、腸上皮細胞の刷子縁膜に存在し、細胞膜上でラクトフェリン受容体とし

て機能することも報告されており、インテレクチンの機能的な細胞局在はいまだ結論が出ていない。そこで内在性インテレクチンが発現する培養腸上皮細胞における詳細な局在を、上記で作成した特異抗体を用いて生化学的手法と組織化学的手法により解析した。インテレクチンはラクトフェリンのエンドサイトーシスに關与すると考えられているため、組換えインテレクチンを発現させた HEK293T 細胞を用いてエンドソームにおけるインテレクチンの局在を解析した。

(腸管上皮細胞によるインテレクチンを介したラクトフェリンの受容・輸送メカニズム)

インテレクチンはラクトフェリン受容体の一つであると考えられており、腸上皮細胞でインテレクチンの発現を阻害すると、ラクトフェリンのエンドサイトーシス量が減少することが報告されている。しかしながらインテレクチンによるラクトフェリンの取り込みメカニズムは全く明らかになっていない。ラクトフェリン-インテレクチン複合体がどのように腸上皮細胞に取り込まれるか評価するため、内在性インテレクチン発現細胞として培養腸上皮細胞を用い、内在性インテレクチン非発現細胞と比較した。細胞の培地中へヒトまたはウシ由来ラクトフェリンを添加し、抗ラクトフェリン抗体および抗インテレクチン抗体により免疫組織学的染色した。さらにエンドサイトーシス後のラクトフェリン-インテレクチン複合体の細胞内局在部位を明らかとするため、エンドソームでの局在を各細胞で比較解析した。また、細胞外へ分泌されたインテレクチンがラクトフェリンの取り込みを促進する可能性を検討するため、過剰発現させた組換えインテレクチンをラクトフェリンと共に培養腸上皮細胞の培地中に添加し、ラクトフェリンの取り込み効率を比較した。

(分泌上皮様 HT29 株の単離)

腸分泌上皮細胞から放出される粘液(ムチン)は、腸上皮細胞層を覆い菌が細胞へ直接接するのを物理的に防いでいる。それと共に、腸内細菌はムチンと結合することにより生着を促進している。消化管では、インテレクチンはムチンを産生する杯細胞で発現するため、細胞外へと分泌されたインテレクチンもムチン層に留まることが予想される。粘液に存在するインテレクチンの性質や腸内細菌への影響を調べるため、これらを高発現する細胞を得ることを目的とし、代表的なヒト腸上皮細胞株の一つである HT29 細胞を methotrexate により選択、サブクローン化し、その性質を解析した。

(2) ラクトフェリンとインテレクチンによる腸上皮細胞制御の解析

ビフィズス菌は、乳児腸管で主要を占める腸内細菌の属のひとつである。これまでに、ラクトフェリンはビフィズス菌に直接的に作用し生育を促進することが知られているが、

実際の乳児腸管内ではインテレクチンと共に機能を発揮していると予想される。これを検証するため、まずビフィズス菌の *in vitro* 増殖速度解析系を確立した。この系を用いて、4 種類のビフィズス菌株の培地中にラクトフェリンとインテレクチンを添加し生育速度の解析を試みた。

4. 研究成果

(1) ラクトフェリンとインテレクチンによる腸上皮細胞制御の解析

(定量的インテレクチン検出系の構築)

マウスおよびウサギを免疫し、インテレクチン特異抗血清を得た。また、抗原カラムを用いてウサギ抗インテレクチン抗体をアフニティー精製した。作成抗体と精製インテレクチンタンパク質を用い、サンドイッチ ELISA による定量的インテレクチン解析系を確立したが、検出可能感度は 100ng 程度までであった。

(インテレクチンの細胞内局在解析)

作成した抗体の特異性を調べるため、HEK293T 細胞で組換えインテレクチンを発現させ生化学的手法と免疫組織学的手法により解析したところ、作成抗体は特異的にインテレクチンを検出できることが確認された。そこで培養腸上皮細胞で発現する内在性インテレクチンを染色したところ、細胞表面では検出されず、細胞の中心から頂端側にかけて細胞質中で顆粒状に存在していた。同様の顆粒状局在は、HEK293T 細胞で発現させた組換えインテレクチンでも観察された。培養腸上皮細胞での染色の強さは細胞毎に異なっていたため、インテレクチンの発現レベルは一定でないと考えられる。その理由として、使用した培養腸上皮細胞はヘテロな細胞集団であること、またはインテレクチンの発現は細胞周期など何らかの誘導条件が必要であることが考えられる。内在性インテレクチンは培養上清中と細胞溶解液どちらからも生化学的に検出できなかったため、発現タンパク質量は多くないと考えられる。HEK293T 細胞での再構成実験によるエンドソームマーカーとの局在解析により、インテレクチンの一部は初期～後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームに幅広く局在することが明らかとなった。また、HEK293T 細胞で発現させた組換えインテレクチンは大部分が細胞培地中へと分泌されていたが、再び細胞にエンドサイトーシスされることは観察されなかった。そのため、インテレクチンのエンドソームへの局在は細胞自律的であり、小胞体やゴルジ体から直接エンドソームへと輸送される可能性が考えられた。

(腸管上皮細胞によるラクトフェリン-インテレクチン複合体の受容・輸送メカニズムの解析)

腸上皮に取り込まれたラクトフェリンは、核へと局在することが報告されている。インテレクチン発現細胞および非発現細胞におけ

るラクトフェリンの取り込み経路を解析したところ、どちらの細胞でもラクトフェリンはエンドサイトーシスされていたものの、核局在は培養腸上皮細胞でのみ観察された。またラクトフェリンのエンドソームでの局在を比較したところ、インテレクチン非発現細胞では後期エンドソームに蓄積が見られた一方、培養腸上皮細胞では初期エンドソームでのみ見られた。また培養腸上皮細胞では、インテレクチンの発現量が高い細胞がラクトフェリンをより多く取り込んでいた。さらに培養腸上皮細胞の培地中にインテレクチンを添加すると、特異的にラクトフェリンの取り込み量が上昇した。過去の報告ではインテレクチンはラクトフェリンと生化学的に結合する分子として同定されているが、免疫沈降により解析したところ我々の系では結合を確認することはできなかった。以上の結果より、インテレクチンはラクトフェリンの取り込みと細胞内輸送経路に機能する可能性が示唆された。この機能は直接的な分子間相互作用による可能性と、インテレクチンが間接的に細胞に作用することでラクトフェリンのエンドサイトーシス経路が変化する可能性が考えられる。

(分泌上皮様 HT29 株の単離)

methotrexate により選択した HT29 細胞から、親株細胞と異なるムチン発現パターンを示すクローン株が得られた。今後これらの細胞株を用いて、異なるムチンを含む細胞分泌物が細菌の生着に与える影響を解析する予定である。

(2) ラクトフェリンとインテレクチンによる腸上皮細胞制御の解析

96 穴プレートを用いて簡便に嫌気性菌の増殖速度を測定する系を確立した。この系を用いた予備的な実験により、ラクトフェリンと ITLN は異なるターゲットの菌株に対して増殖を促進することを示唆する結果が得られた。現在、これらの協調的效果を解析中である。

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)

[学会発表](計 1 件)

加藤元常、小田聖、灘野大太、松田幹、大島健司、腸上皮細胞でのラクトフェリンの取り込みおよび細胞内輸送におけるインテレクチンの機能解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 健司 (OSHIMA Kenzi)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・助教
研究者番号: 90391888