

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790485  
 研究課題名（和文） 乳酸桿菌による自然免疫賦活化作用に関する菌体因子の解明  
 研究課題名（英文） Transposon mutagenesis of probiotic *Lactobacillus casei* identifies *asnH*, an asparagine synthetase gene that contributes to activation of host innate immunity  
 研究代表者  
 伊藤 雅洋 (Masahiro Ito)  
 北里大学・薬学部・助教  
 研究者番号：90596727

研究成果の概要（和文）：*L. casei* の *AsnH* は細胞壁抽出物存在下においてのみ酵素活性を示した。また、*asnH* 変異株では特徴的な厚く、緻密な細胞壁構造は損なわれることが明らかになり、*asnH* は細胞壁構造形成に関与することが示唆された。すなわち、*L. casei* の有する *asnH* は細胞壁合成に関与し、自然免疫賦活化を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that *AsnH* exhibits asparagine synthetase activity when the lysozyme-treated cell wall extract of *L. casei* was added as substrate. *L. casei* carrying mutated *asnH* lacked its characteristic thick and rigid cell wall structure, indicating that *AsnH* of *L. casei* is involved in cell wall biosynthesis. These results indicate that *asnH* is required for bacterial cell wall biosynthesis and is involved in the probiotic activity of *L. casei* ATCC 27139.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

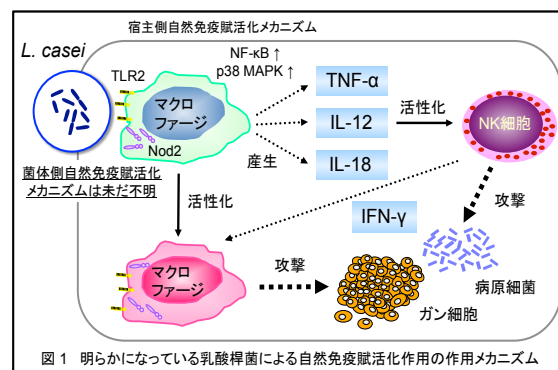
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、細菌学（含真菌学）

キーワード：プロバイオティクス、自然免疫、菌体表層構造

1. 研究開始当初の背景

当研究室では *L. casei* ATCC 27139 の自然免疫賦活化作用によるリステリア初期感染や *MethA* 線維芽肉腫感染に対する防御作用が宿主パターン認識受容体 TLR2 および Nod2 を介した NF- $\kappa$ B および p38 MAPK 両経路の活性化によることを初めて明らかにした (Kim et al. *Microbes Infect* 2006)。これらの活性化に伴い TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-18 および IFN- $\gamma$  タンパク質の産生亢進が確認されており、NK 細胞およびマクロファージの活性化により *L. casei* ATCC 27139 が抗感染症および抗ガン作用を示すことが示唆された (図1)。



このように宿主側の自然免疫賦活化メカニズムが明らかになりつつある一方、菌体側の活性本体やそれら自然免疫賦活化作用の発現に関わる遺伝子はほとんど明らかに

されていない。

*L. casei* ATCC 27139 の自然免疫賦活化作用はビルレントファージである J1 ファージに対する抵抗性変異株では同賦活化作用が著しく低下していることが明らかにされている (Kim et al. *Microbes Infect* 2006)。J1 ファージに対するレセプターは菌体表層に存在する D-ガラクトサミンであることが示唆されていることから、自然免疫賦活化作用と菌体表層構造には関連があることが推察されている。そこで、自然免疫賦活化作用を規定する菌体側の因子を明らかにし、自然免疫賦活化メカニズムを解明するための研究を行い、次のような研究成果を得ていた。

1. *L. casei* ATCC 27139 による自然免疫賦活化作用の菌体側の作用発現メカニズムを解明するため、乳酸桿菌において初めて実用的な変異株作製法および約 9,000 株よりなるトランスポゾン挿入変異株ライブラリーを構築した (Ito et al. *J Appl Microbiol* 2010)。

2. *L. casei* ATCC 27139 の変異株ライブラリーより自然免疫賦活化作用との関連が示唆されている J1 ファージ感受性を指標に自然免疫賦活化作用欠失候補株を選出し、マウスリステリア初期感染防御作用を調べた結果、*asnH* (アスパラギン合成酵素) 遺伝子が自然免疫賦活化作用に関与することを明らかにした。

3. *asnH* 変異株ではリゾチーム抵抗性は著しく低下し、グラム染色像はグラム陰性菌様の赤色を呈すこと、ペプチドグリカンのアスパラギン酸モル比は減少していることが明らかになった (表 1)。以上のことから、*L. casei* ATCC 27139 の *asnH* は菌体表層構造形成に関与することが示唆された。すなわち、*asnH* 変異による菌体表層構造の変化が *asnH* 変異株における自然免疫賦活化作用の喪失の原因であると考えられた。

表 1 *asnH* 変異株と表現型のまとめ

菌株	J1ファージ感受性	リゾチーム感受性	グラム染色像	自然免疫賦活化作用
ATCC 27139	感受性	抵抗性	鮮青色	+++
<i>asnH</i> 変異株	抵抗性	感受性	赤色	-

## 2. 研究の目的

乳酸桿菌 *Lactobacillus casei* ATCC 27139 において、自然免疫賦活化作用との関連が明らかになっている *asnH* (アスパラギン合成酵素) 変異株を用いて、菌体表層構造の

比較、解析を行い、自然免疫賦活化作用を規定する菌体側因子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *asnH* 酵素活性と自然免疫賦活化作用との関連の解明

*L. casei* ATCC 27139 からゲノム DNA を抽出し、*asnH* 遺伝子および点変異 *asnH* (*asnH*<sub>C2S</sub> および *asnH*<sub>D265N</sub>) 遺伝子を導入した *asnH* 発現ベクター pFLAG-*asnH* (pFLAG-*asnH*<sub>WT</sub>, pFLAG-*asnH*<sub>C2S</sub> および pFLAG-*asnH*<sub>D265N</sub>) を作製した。それらを導入した *E. coli* BL 21 において *asnH* を大量発現させ、菌体より抽出した。抽出した各 *asnH* について、Amplex Red glutamic Acid / Glutamate Oxidase assay kit により産生されるグルタミン酸濃度を計測し、アスパラギン合成酵素活性を測定した。

### (2) 乳酸桿菌の菌体表層構造と自然免疫賦活化作用との関連の解明

#### ① SEM 撮影像による乳酸桿菌菌体表層構造の比較

早期定常期まで培養した乳酸桿菌 ( $1 \times 10^{10}/\text{ml}$ ) と 2% グルタルアルデヒド / 0.1% リン酸緩衝液 (pH7.4) を等量混合し、4°C にて前固定した。その後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて遠心洗浄を 3 回行い、2% 四酸化オスミウム水溶液を用いて後固定した。固定した菌をエタノールで脱水した後、臨界点乾燥した。その後、オスミウムプラズマコーティングし、走査電子顕微鏡 (JSM-6320F) にて直接倍率 10,000 で菌体表面を観察し、比較した。

#### ② TEM 撮影像による乳酸桿菌菌体表層構造の比較

早期定常期まで培養した乳酸桿菌 ( $1 \times 10^{10}/\text{ml}$ ) と 2% グルタルアルデヒド / 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を等量混合し、4°C にて前固定した。その後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて遠心洗浄を 3 回行い、2% 四酸化オスミウム / 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて後固定した。固定した菌をエタノールで脱水し、プロピレンオキサイドにて置換後、Quetol1812 で包埋した。得られた試料について透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX) にて直接倍率 12,000 で菌体表層構造の厚さを観察し、比較した。

③ペプチドグリカン-多糖複合体の精製および菌体表層多糖(多糖-ペプチドグリカン複合体)のゲルろ過パターンの比較

定常期の乳酸桿菌加熱死菌体(500 mg)を5 mM Tris-maleate 緩衝液(pH6.4) 30 mlに懸濁し、この懸濁液にN-acetylmuramidase SG(5 mg)を加え、37°Cにて20時間処理した。この反応液を遠心分離し(10,000 x g, 20分)、細胞質を除いた後、上清を透析した(10 mMリン酸緩衝液 pH 6.0/ 0.25 M NaCl, 4°C, 16時間)。透析後の溶液を凍結乾燥することにより粗標品を得た。この粗標品1 mgを1 mlの50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>に溶解し、セファクリルS-200 HR(1.1 x 95 cm)によるゲル濾過を行い、精製した。ゲル濾過による分子量決定は分子量既知のデキストラン標準品T-40(40 kDa)およびT-10(10 kDa)を用いて行った。

#### 4. 研究成果

(1) AsnH 酵素活性と自然免疫賦活化作用との関連の解明

大腸菌にて大量発現したAsnHタンパク質について、Amplex Red glutamic Acid / Glutamate Oxidase assay kitを用いてAsnH酵素活性を算出した。アスパラギン酸を基質として用いた際にはすべてにおいてグルタミン酸の産生は認められなかった(図2)。一方、乳酸桿菌細胞壁抽出物を基質として用いた際、*asnH*遺伝子を有し自然免疫賦活化作用を示す菌株のみグルタミン酸の産生は認められ、点変異体AsnH<sub>C25</sub>およびAsnH<sub>D265N</sub>ではグルタミン酸の産生は認められなかった(図2)。また、反応基質としてATPに代わりATPアナログであるAMP-PNPを用いた際にはすべてにおいてグルタミン酸の産生は認められなかった(図2)。すなわち、*L. casei*の有するAsnHはアスパラギン合成活性を有すること、またAsnHは栄養要求性に関わるのではなく、細胞壁合成に関与することが示唆され、自然免疫賦活化作用を示すことが示唆された。

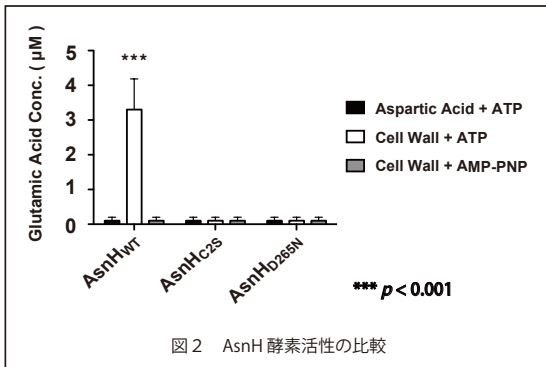


図2 AsnH酵素活性の比較

(2) 乳酸桿菌の菌体表層構造と自然免疫賦活化作用との関連の解明

① TEM 撮影像による乳酸桿菌菌体表層構造の比較

定常期の菌体を透過型電子顕微鏡(TEM)により観察、比較したところ、*asnH*遺伝子を有し自然免疫賦活化作用を示す菌株においてペプチドグリカン層および表層多糖層が明瞭に認められたが、変異株では野生株に比べ、ペプチドグリカン層、表層多糖層ともに薄く、不鮮明であった(図3B)。そこで、ペプチドグリカン層および表層多糖層について詳細な解析を行ったところ、変異株では野生株、相補株と比較しペプチドグリカン層は有意に薄いことが明らかになった。表層多糖層については有意な差は認められなかった。以上の結果から、*asnH*はペプチドグリカン合成に関与することが示唆された。

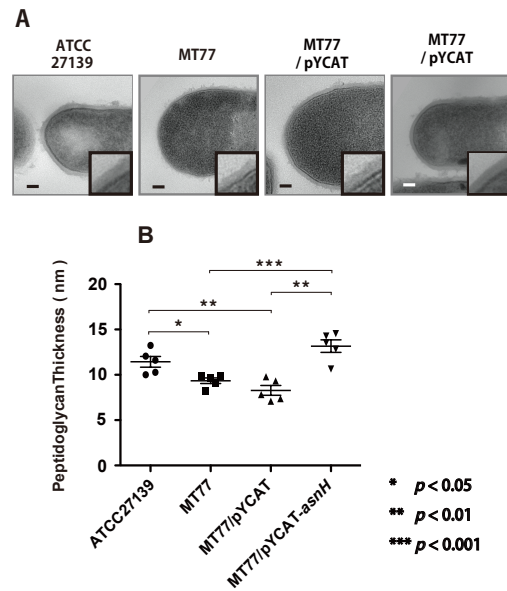


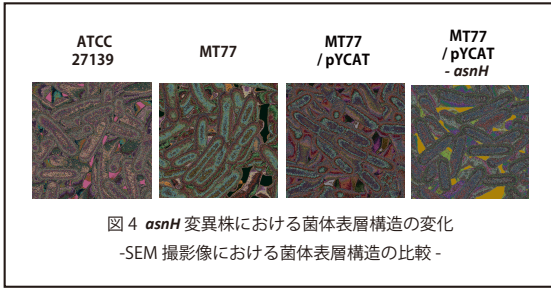
図3 *asnH*変異株における菌体表層構造の変化

(A) TEM撮影像における菌体表層構造の比較

(B) TEM撮影像におけるペプチドグリカンの厚さの比較

② SEM 撮影像による乳酸桿菌菌体表層構造の比較

定常期の菌体を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察、比較したところ、*asnH*遺伝子を有し自然免疫賦活化作用を示す菌株では菌体表層構造は多数の小突起のようなものに覆われているのに対し、変異株ではこれらの突起は認められなかった(図4)。すなわち、*asnH*変異株では緻密な細胞壁構造が損なわれていることが示唆された。



③ 菌体表層多糖（多糖-ペプチドグリカン複合体）の精製およびゲルろ過パターンと比較

野生株の菌体表層多糖をゲルクロマトグラフィーにより解析したところ、溶出位置により、分子量が約 100 kDa 以上の画分（画分 A）と分子量約 30 kDa の画分（画分 B）とに分画された。一方、*asnH* 変異株の菌体表層多糖には画分 A は認められず、画分 B のみがゲル濾過により溶出された。すなわち、自然免疫賦活化作用を規定する菌体成分は多糖-ペプチドグリカン複合体画分 A に存在することが示唆された。

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）

Masahiro Ito, Transposon mutagenesis of probiotic *Lactobacillus casei* identifies *asnH*, an asparagine synthetase gene that contributes to activation of host innate immunity, Exploring Human Host-Microbiome Interactions in Health and Disease 2013, 2013.7.10, Cambridge (UK)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 雅洋 (Masahiro Ito)  
北里大学・薬学部・助教  
研究者番号：90596727