

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15028

研究課題名(和文) イムノバイオティクス利用性拡大のための「イムノバイオゲノミクス」統合解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis by 'Immunobiogenomics' for expanding the immunobiotic availability

研究代表者

北澤 春樹 (Kitazawa, Haruki)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10204885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオインフォマティクスと免疫機能ゲノミクスの分野融合による「イムノバイオゲノミクス」により、イムノバイオティクスの菌株特異的な粘膜免疫調節システムに関する網羅的解析から、その機構解明を飛躍的に進めるための基盤を構築することができた。それにより、イムノバイオティクスの効果的な利用性の拡大が見込まれ、関連学問と産業の飛躍的發展に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we were able to build a certain base for elucidating a strain-specific mucosal immunoregulatory mechanisms of Immunobiotics by constructing an "Immunobiogenomics" in the interdisciplinary study field between bioinformatics and immunobiotics. Expansion for effective availability of Immunobiotics is expected and can thereby contribute to further studies and industrial development.

研究分野：農学

キーワード：畜産学、イムノバイオティクス、免疫学、イムノバイオゲノミクス、トランスクリプトミクス、食品  
飼料、微生物

### 1. 研究開始当初の背景

近年、プロバイオティクスの中でも特に粘膜免疫調節機能を有するイムノバイオティクスを積極的に利用して、薬のみに頼らない家畜の健全育成とヒトの健康生活の飛躍的向上が期待されるようになった。しかしながら、イムノバイオティクスが発揮する免疫調節機能は菌株特異的であるため、その選抜・評価と共に、詳細な免疫調節機構の解明から効果的な有効利用が切望されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、バイオインフォマティクスと免疫機能ゲノミクスの分野融合による「イムノバイオゲノミクス」を基盤として、イムノバイオティクスの菌株特異的な粘膜免疫調節システムに関する網羅的解析から、その機構解明を飛躍的に進めるための基盤構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

「イムノバイオゲノミクス」の基盤を構築する目的から、以下の項目について検討した。

(1) イムノバイオティクスの全ゲノム配列解析：イムノバイオティクスやその候補菌株についてゲノムDNAを抽出・精製し、全ゲノム塩基配列を解析した。さらに、常法に従い、オープンリーディングフレーム (ORF) 機能の推定を行なった。比較ゲノム解析から、免疫調節機能性発現に関連するイムノジェニクスの候補因子を推定した。

(2) インビトロ解析：ブタ腸管上皮 (PIE) 細胞やウシ腸管上皮 (BIE) 細胞の単層培養を用い、イムノバイオティクスの免疫評価パラメータと刺激時間を設定すると共に、その評価解析を進めた。また、免疫機能発現機構の詳細解明の基礎を得るため、PIE細胞における遺伝子発現変動につて、トランスクリプトミクスにより網羅的な解析を進めた。さらに、PIE細胞を用いたウイルス免疫評価モデル系により、発展的解析を進めた。

### 4. 研究成果

(1) イムノバイオティクスの全ゲノム配列解析：イムノバイオティクス候補菌株を含む4菌株 (*Lactobacillus jensenii* TL2937, *Lactobacillus plantarum* TL2766, *Lactobacillus plantarum* MPL16, *Lactobacillus rhamnosus* IBL027) について解析し、ドラフトゲノム情報を登録すると共に、論文として公表した。国際共同研究により先行して解析が進んでいる他の *Lactobacillus rhamnosus* および *Lactobacillus plantarum* の両菌株のゲノム

情報より、同菌種における比較ゲノム解析から、イムノジェニクス (イムノバイオティクスが有する免疫活性因子) 候補の解析を進めることができた。それにより、同候補のさらなる解析と、免疫機能性に関する実証研究が可能となった。

(2) インビトロ解析：ブタ腸管上皮 (PIE) 細胞やウシ腸管上皮 (BIE) 細胞を用い、マイクロアレイによる網羅的解析から、イムノバイオティクス評価における、免疫関連パラメータが得られた。中でもケモカイン、補体因子並びにリンパ球接着因子を指標として、病原性細菌やウイルスに対する防御免疫調節機能性の発展的評価が可能となった (図1)。それらの評価指標により、これまでに得られているイムノバイオティクスについて再評価を行い、イムノバイオティクスとしての特性について詳細解明が可能となった (図2)。

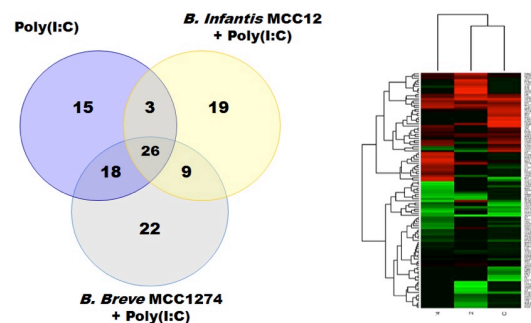


図1 BIE細胞におけるマイクロアレイによるイムノバイオティクスの抗ウイルス性免疫評価因子の網羅的解析 (論文④の一部内容)

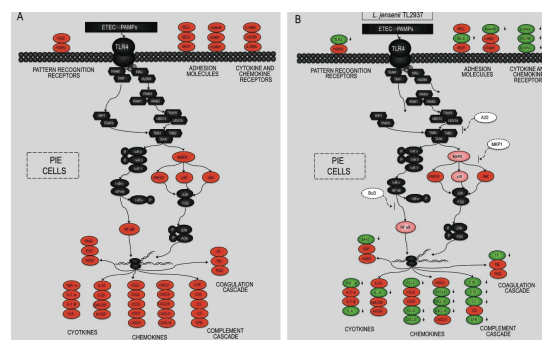


図2 PIE細胞におけるマイクロアレイによる炎症性免疫評価因子の網羅的解析とイムノバイオティクスの抗炎症性評価 (論文⑧)

本研究により、新たな「イムノバイオゲノミクス」の創成によるイムノバイオティクスにおけるイムノジェニクスの解析とイムノバイオティック機構の詳細解明が可能となり、イムノバイオティクスの効果的な利用性の拡大が見込まれ、関連学問と産業の飛躍的発展に貢献することができる。

## 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10件)

- ① Villena, J., H. Aso, V. PMG Rutten, H. Takahashi, W. Van Eden, H. Kitazawa, Immunobiotics for the bovine host: their interaction with intestinal epithelial cells and their effect on antiviral immunity, *Front. Immunol.*, 査読有, 9:326, 2018, 1-10, DOI: 10.3389/fimmu.2018.00326
- ② Kanmani, P, L. Albarracin, H. Kobayashi, H. Iida, R. Komatsu, AKM H. Kober, W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Suda, H. Aso, S. Makino, H. Kano, T. Saito, J. Villena, H. Kitazawa, Exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* OLL1073R-1 modulate innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells, *Mol. Immunol.*, 査読有, 93, 2018, 253-265, DOI: org/10.1016/j.molimm.2017.07.009
- ③ Clua, P., P. Kanmani, H. Zelaya, A. Tada, AKM H. Kober, S. Salva, S. Alvarez, H. Kitazawa, J. Villena, Peptidoglycan from immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice to respiratory syncytial viral infection and secondary pneumococcal pneumonia, *Front. Immunol.*, 査読有, 8:948, 2017, 1-15, DOI: 10.3389/fimmu.2017.00948
- ④ Albarracin, L., H. Kobayashi, H. Iida, N. Sato, T. Nochi, H. Aso, S. Salva, S. Alvarez, H. Kitazawa, J. Villena, Transcriptomic analysis of the innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells: influence of immunobiotic lactobacilli, *Front. Immunol.*, 査読有, 8:57, 2017, 1-15, DOI: 10.3389/fimmu.2017.00057
- ⑤ Maria Guadalupe Vizoso-Pinto, M. G., L. Saavedra, E. Hebert, F. R. Tonetti, L. Albarracin, S. Alvarez, H. Kitazawa, J. Villena, Draft genome sequence of immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* IBL027 a potential adjuvant for mucosal vaccine development, *Genome Announc.*, 5(50):e01268-17, 2017, 1-2, DOI: 10.1128/genomeA.01268-17
- ⑥ Villena, J., L. Saavedra, E. Hebert, Y. Suda, Y. Masumizu, L. Albarracin, P. Clua, W. Ikeda-Ohtsubo, H. Kitazawa, Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* MPL16 a wakame-utilizing immunobiotic strain from swine feces, *Genome Announc.*, 5(10): e00006-17, 2017, 1-2, DOI: 10.1128/genomeA.00006-17
- ⑦ Villena, J., Y. Masumizu, H. Ida, W. Ikeda-Ohtsubo, L. Albarracin, S. Makino, S. Ohkawara, K. Kimura, L. Saavedra, E. Hebert, H. Kitazawa, Draft genome sequence of the immunobiotic strain *Lactobacillus jensenii* TL2937, *Genome Announc.*, 5(9): e00005-17, 2017, 1-2, DOI: 10.1128/genomeA.00005-17.
- ⑧ Kobayashi, H., L. Albarracin, N. Sato, P. Kanmani, AKM H. Kober, W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Suda, T. Nochi, H. Aso, S. Makino, H. Kano, S. Ohkawara, T. Saito, J. Villena, H. Kitazawa, Modulation of porcine intestinal epitheliocytes immunetranscriptome response by *Lactobacillus jensenii* TL2937, *Benef. Microbes*, 7(5), 2016, 769-782, DOI: org/10.3920/BM2016.0095
- ⑨ Villena, J., L. Saavedra, E. Hebert, Y. Masumizu, N. Sato, AKM H. Kober, L. Albarracin, W. Ikeda-Ohtsubo, S. Makino, K. Kimura, S. Ohkawara, H. Kitazawa, Draft Genome Sequence of *Lactobacillus plantarum* TL2766, a strain with the ability to ferment wakame, *Genome Announc.*, 4(6): e01328-16, 2016, 1-2, DOI: 10.1128/genomeA.01328-16

⑩ Tada, A., H. Zelaya, P. Clua, S. Salva, S. Alvarez, H. Kitazawa, J. Villena, Immunobiotic *Lactobacillus* strains reduce small intestinal injury induced by intraepithelial lymphocytes after Toll-like receptor 3 activation, *Inflamm. Res.*, 65(10), 2016, 771-783, DOI: 10.1007/s00011-016-0957-7

[学会発表] (計 8 件)

① 小松 稜弥、須田 義人、牧野 聖也、狩野 宏、齋藤 忠夫、北澤 春樹、*Lactobacillus delbrueckii* OLL1073R-1 由来菌体外多糖のブタ腸管上皮細胞における抗ウイルス自然免疫修飾、日本食品免疫学会 第 13 回学術大会、2017 年 11 月 9-10 日、東大 (東京都)

② Nakano, Y., Y. Masumizu, AKM. H. Kober, V. Garcia, W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Suda, K. Suzuki, T. Saito, J. Villena, H. Kitazawa, "Immunosynbiotics" approach by using wakame and immunobiotics as livestock healthy growth strategy, 日本畜産学会第 123 回大会 (英語口頭発表), 2017 年 9 月 6-7 日、信大 (長野県南箕輪村)

③ Albarracín, L., AKM H. Kober, H. Kobayashi, N. Sato, P. Kanmani, W. Ikeda-Ohtsubo, T. Nochi, H. Aso, N. Iwabuchi, J.-z. Xiao, T. Saito, J. Villena, H. Kitazawa, Effect of immunobiotic Bifidobacteria on the innate antiviral immune response in bovine intestinal epithelial cells: immunotranscriptomic analysis, FEMS2017, 2017年7月9-13日, Valencia (Spain)

④ 舛水 由季、飯田 ひかる、須田 義人、大坪 和香子、麻生 久、齋藤 忠夫、鈴木 啓一、北澤 春樹、ブタ腸管由来ワカメ資化性乳酸菌の免疫バイオティック利用性、日本畜産学会第122回大会、2017年3月28-30日、神戸大学 (兵庫県神戸市)

⑤ 舛水 由季、飯田 ひかる、須田 義人、齋藤 忠夫、北澤 春樹、畜産食品の安全性向上に寄与するブタ由来ワカメ資化性乳酸菌の免疫バイオティック利用性、日本食品免疫学会第12回学術大会、2016年11月9-10日、東大 (東京都)

⑥ Kitazawa, H., Immunoregulatory effects of lactic acid bacterial exopolysaccharides: new insights into molecular intestinal epithelial cells, V International Symposium on Lactic Acid Bacteria-Benefitting from lactic acid bacteria, Progress in health and food, 2016 年 10 月 19-21 日, Tucuman (Argentina) (招待講演)

⑦ Masumizu, Y., AKM H. Kober, B. Tzu-An Chao, H. Iida, W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Suda, L. Albarracín, L. Saavedra, E.M. Hebert, T. Nochi, H. Aso, T. Saito, K. Suzuki, J. Villena, H. Kitazawa, Isolation and characterization of *Lactobacillus plantarum* MPL16: A Wakameutilizing immunobiotic strain from swine feces, V International Symposium on Lactic Acid Bacteria-Benefitting from lactic acid bacteria, Progress in health and food, 2016 年10月19-21日, Tucuman (Argentina)

⑧ 舛水 由季、AKM H. Kober、B. Tzu-An Chao、飯田 ひかる、大坪 和香子、須田 義人、麻生 久、齋藤 忠夫、鈴木 啓一、J. Villena、北澤 春樹、ワカメ資化性免疫バイオティックスの応用基礎研究、2016年9月9日、日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市)

[図書] (計 1 件)

① Villena, J., H. Kitazawa. (Eds.).

Immunobiotics: Interactions of beneficial microbes with the immune system., *Front. Immunol.* and *Front. Microbiol.*, Total 307 pages (2018).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：1 0 2 0 4 8 8 5

(2) 研究分担者

麻生 久 (ASO HISASHI)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：5 0 2 4 1 6 2 5