

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34416

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18302

研究課題名(和文)免疫賦活作用をもたらす乳酸菌の表層構造の解明と設計

研究課題名(英文) Analysis and design of surface structure of lactic acid bacteria that induce immunostimulatory effect

研究代表者

山崎 思乃(Shino, Yamasaki)

関西大学・化学生命工学部・助教

研究者番号：50602182

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)：乳酸菌 *Lactobacillus antri* は腸管免疫系を活性化し、IgA抗体産生を促進する。このIgA産生促進作用には、リガンドとなる菌体成分と免疫細胞に発現する受容体との結合の多価性や相互作用の継続時間が関与すると考えられる。そこで、菌体とトル様受容体(TLR)2との相互作用について、表面プラズモン共鳴法を用いて速度論的に解析した。酵素処理によりリガンド成分を分解しIgA産生促進作用が減弱した菌体のTLR2との相互作用を解析したところ、解離速度が速くなることがわかった。これより、菌体とTLR2との相互作用の継続時間がIgA産生促進作用の強弱の重要な因子となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： *Lactobacillus antri* activates the gut immune system and promotes IgA production. It is considered that the multivalency of the binding between the bacterial components serving as ligands and the receptor expressed on the immune cell and the duration time of the interaction are related to the IgA-enhancing effect. Therefore, the interaction between the cells and the Toll-like receptor (TLR) 2 was analyzed kinetically using the surface plasmon resonance method. The interaction with TLR2 of the bacterial cells which digested the ligand components by enzymatic treatment and attenuated the IgA-enhancing effect resulted in increase of the dissociation rate. It was revealed that the duration time of the interaction between the bacterial cells and TLR2 was an important factor of the strength of the IgA-enhancing effect.

研究分野：生物化学工学

キーワード：乳酸菌 免疫調節作用 分子間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢のメタゲノム解析やメタボローム解析は、腸内細菌と我々宿主との共生関係を明らかにしつつある。この共生関係には、細菌と宿主細胞の相互作用の場となる表層間の接触・接着が極めて重要である。ある種の乳酸菌は、腸管免疫系を活性化し、IgA 抗体産生を誘導することで病原性細菌の感染を防ぐ。これまで乳酸菌の免疫賦活作用は、細胞壁成分による免疫細胞の活性化や菌体成分(リガンド)と受容体との親和性の有無(親和定数)により一部解析されている。しかし、菌体成分や免疫細胞の受容体は、起伏があり、他の表層分子の立体障害もあるそれぞれの細胞の表層に固定されているため、親和性の有無だけではなく複数の分子による結合の多価性や、免疫細胞に刺激を与えるまでの相互作用の継続時間を考慮しなければならない。一方で、乳酸菌は培養条件により増殖や代謝のみならず、菌体構造が変化する。免疫賦活作用は菌体構造、特に表層構造に直接的に依存することから、適切な培養条件を整えることで乳酸菌の免疫賦活作用を強化・付与できると期待される。しかし、どのような表層構造が免疫賦活作用を強く誘導するのかについての指標はなく、菌体表層構造を設計するには表層構造に対する具体的な指標が不可欠である。

## 2. 研究の目的

我々は、腸管免疫系を活性化し、IgA 産生を促進する乳酸菌のスクリーニングを行い、*Lactobacillus antri* JCM 15950 に IgA 産生促進作用を見出した。これまでの研究から、この作用は、グラム陽性菌の細胞壁成分をリガンドとする Toll-like receptor (TLR) 2 を介したシグナリングにより誘導されることが明らかとなっている。従来、乳酸菌と免疫細胞との相互作用は、細菌の表層成分と免疫細胞に発現する受容体との親和性の有無で説明されてきたが、免疫細胞活性化の重要な因子となる相互作用の「速さ」や「強さ」についてはほとんど解析されていない。そこで、本研究では、*L. antri* JCM 15950 の TLR2 と菌体表層リガンドとの相互作用の「速さ」、すなわち、結合の保持時間、と IgA 産生促進作用と関連を明らかにすることを目的とした。まずは、酵素処理により菌体の表層構造、特に表層に露出したリガンド密度を変化させ、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を利用して菌体と TLR2 との相互作用を速度論的に解析し、IgA 産生促進作用との関連を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳酸菌の培養および菌体調製

*L. antri* JCM 15950 のフローズストックを MRS 液体培地に植菌し、嫌気条件下、37 で 7 時間前培養した。前培養液を MRS 液体

培地に 1% (v/v) 植菌し、37 で 17 時間培養した。菌体は遠心分離 (9,000×g, 10 min, 4 ) により回収した後、一晚凍結乾燥した。

### (2) 乳酸菌の酵素処理

凍結乾燥した菌体 5 mg を 300 U/ml のリパーゼ (天野エンザイム) および抗生物質を含む 10 mM Tris-HCl 1 ml に懸濁し、至適条件にて 4 時間インキュベートした。遠心分離 (18,000×g, 10 min, 4 ) により生理食塩水で 3 回洗浄した後、一晚凍結乾燥した。

### (3) IgA 産生促進作用の評価

BALB/c マウス (雌性、8~14 週齢) の腸管からパイエル板を採取し、コラゲナーゼによりパイエル板細胞を調製した。10% (v/v) ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地を用いて、パイエル板細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/well となるように丸底 96 穴プレートに播種し、10 µg/well の未処理の菌体あるいは酵素処理した菌体を添加し、37、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて 4 日間培養した。培養上清中の IgA 濃度は ELISA 法で測定した。

### (4) SPR 解析

*L. antri* JCM 15950 菌体と TLR2 との相互作用の速度論的解析は、Biacore T200 (GE Healthcare) を用い、HBS-EP 緩衝液 (pH 7.4) 中、25で行った。センサーチップには CM5 チップ (GE Healthcare) を用い、抗 His-tag 抗体 (GE Healthcare) をアミンカップリング法により固定し、さらに His-tag 融合マウス TLR2 組換えタンパク質 (R&D) を結合させた。3 mg/ml に調製した菌体懸濁液を 10 µl/min で 5 分間注入した後、10 µl/min で 5 分間 HBS-EP 緩衝液で洗浄した。センサーチップは 10 mM Gly-HCl (pH 1.5) を 30 µl/min で 30 秒間注入して再生した。

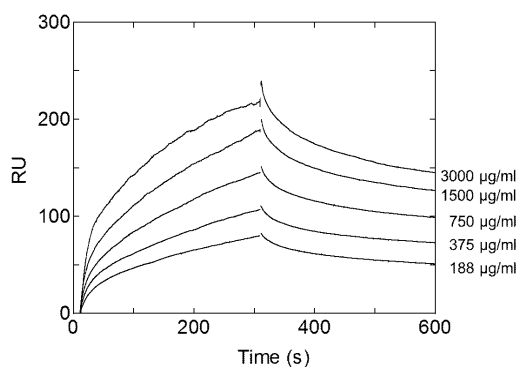
## 4. 研究成果

### (1) 乳酸菌と受容体との相互作用

本研究では、マウスパイエル板細胞からの IgA 産生を促進する *L. antri* JCM 15950 をモデル菌株として使用した。まず、乳酸菌とその免疫賦活作用に関わる受容体である TLR2 との結合および解離について、SPR 法を用いて速度論的に解析できるかを検証した。センサーチップ上に菌体を注入すると、TLR2 と特異的に結合し、結合量が経時的に増加することが確認できた。また、洗浄液に切り替えると、菌体の解離による結合量の減少が確認された (図 1)。フィッティングによるみかけの結合速度定数  $k_{on}$  および解離速度定数  $k_{off}$  値の算出を試みた。結合に関して、菌体と TLR2 との結合様式が複雑なため、フィッティングによる  $k_{on}$  を決定することはできなかった。そこで、解離部分からみかけの解離速度定数  $k_{off}$  を算出し、これを指標として IgA 産生促進作用を評価することとした。

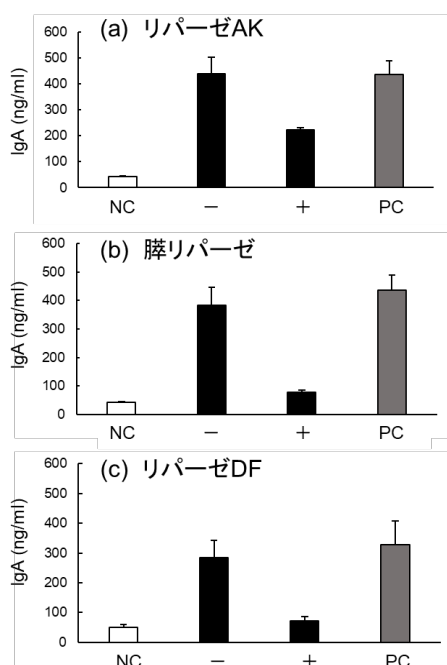
## (2) 菌体の表層構造と IgA 産生促進作用

予備的検討として、各種酵素で菌体を処理し、IgA 産生促進作用を増大あるいは低下させる酵素をスクリーニングしたところ、数種のリパーゼに *L. antri* JCM 15950 の IgA 産生促進作用を顕著に減弱させることがわかった。特に、リパーゼ AK (天野エンザイム) 腓リパーゼあるいはリパーゼ DF (天野エンザイム) で菌体を処理すると、IgA 産生量は未処理の菌体と比較して、それぞれ 54、89、



**図 1** TLR2 を固定化したセンサーチップ上に *L. antri* JCM15950 菌体を注入したときのセンサーグラム

アナライトである菌体懸濁液を 10 µl/min で 5 分間注入後、10 µl/min で 5 分間 HBS-EP 緩衝液で洗浄した。注入に伴う結合量の増加と洗浄による解離が確認され、フィッティングにより解離速度定数  $k_{off}$  値を決定した。



**図 2** 菌体の酵素処理が IgA 産生促進作用に及ぼす影響

各酵素の至適条件にて、酵素存在下あるいは非存在下で処理した菌体をパイエル板細胞に添加し、4 日間培養した後、IgA 産生量を測定した。Positive control として TLR2 の合成リガンドである Pam3CSK4 (1 µg/ml) を用いた。

91%低下した (図 2)。これより、リパーゼ処理により TLR2 のリガンドとして作用する菌体成分が分解された、すなわち、酵素処理により菌体表層に露出するリガンド密度が減少したと判断した。

## (3) 解離の速さと IgA 産生促進作用との関連

リパーゼ AK およびリパーゼ DF で処理した菌体と TLR2 との解離を SPR 法にて解析したところ、 $k_{off}$  値はそれぞれ 1.9 および 0.55  $s^{-1}$  となり、リパーゼ無添加で処理した菌体と比較して、それぞれ 25 および 60 倍に増大した (表 1)。これらの結果より、菌体のリパーゼ処理による IgA 産生誘導作用の低下は、菌体表層の IgA 産生誘導に關与する成分がリパーゼ処理により分解され、TLR2 からの菌体の解離速度が増大した、すなわち結合の結合の保持時間が短くなったことに起因する可能性が明らかとなった。

**表 1** 解離速度定数  $k_{off}$  と IgA 低下率との関係

温度 (°C)	pH	酵素	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )			IgA 産生低下率 (%)
			-酵素	+酵素	+酵素/-酵素	
37	6.8	リパーゼ DF	0.06	0.4	7	54
37	7.8	腓リパーゼ	0.08	N.D.	N.D.	89
60	7.8	リパーゼ AK	0.20	2	10	91

N.D.; not determined

## 今後の予定と展望

*L. antri* JCM 15950 の IgA 産生促進作用はリパーゼ処理によって消失したことから、IgA 産生促進作用をもたらす成分が菌体表層に露出した脂質である可能性が高い。今後、この成分を同定し、TLR2 との一価の結合についても速度論的な解析を行うことで、IgA 産生促進作用に及ぼす結合の多価性の影響を明確にしていく。また、本研究では、溶菌酵素処理により IgA 産生促進作用が増強されることも見出している。速度論的パラメータを指標として、速度免疫賦活に有利な菌体表層を設計することで、プロバイオティクスの高機能化に貢献できると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) [Shino Yamasaki-Yashiki](#), Hiroshi Sawada, Masahiro Kino-oka, Yoshio Katakura: Analysis of gene expression profiles of *Lactobacillus paracasei* induced by direct contact with *Saccharomyces cerevisiae* through recognition of yeast mannan, *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 査読有, 36, 16-25 (2017)
- (2) [山崎\(屋敷\)思乃](#), 共生する細菌の選択, *日本生物工学会誌*, 査読無, 95, 83 (2017)

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 山崎 思乃、乳酸菌と腸管や炭水化物との相互作用の研究、平成29年度第4回生活習慣病予防のための機能性食品開発に関する研究会、大阪(2018.2)
- (2) 山崎 思乃、倉光 香奈、谷口 茉莉亜、片倉 啓雄、乳酸菌と食物繊維およびムチンとの相互作用の解析、第69回日本生物工学会大会、2P-I124、東京(2017.9)
- (3) Shino Yamasaki-Yashiki, Taku Toramoto, Jun Kunisawa, Yoshio Karakura, Characterization and modulation of cell wall components of *Lactobacillus antri* for the enhanced production of intestinal IgA antibody, 5th AFSLAB International Symposium, Taiwan (2016.11)
- (4) 寅本 拓、山崎 思乃、國澤 純、片倉 啓雄、腸管 IgA 産生を増強する *Lactobacillus antri* の細胞壁成分の解析、第68回日本生物工学会大会、1P-1p101、富山(2016.9)

〔図書〕(計1件)

- (1) 山崎(屋敷) 思乃、谷口 茉莉亜、片倉 啓雄、乳酸菌と酵母との相互作用、および乳酸菌の炭水化物への接着現象の解析とプロバイオティクスへの応用、酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開、シーエムシー出版、216-222(2018)

〔その他〕

ホームページ等

<http://biocheng.life-bio.kansai-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

研究代表者

山崎 思乃 (Shino, YAMASAKI)

関西大学・化学生命工学部・助教

研究者番号：50602182