

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2022
課題番号：18K05404
研究課題名(和文) ワクチンアジュバントとしての糖鎖改変酵母の粘膜免疫増強効果とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Oligosaccharides-altered yeast as a vaccine adjuvant: enhancement of mucosal immunity and elucidation of the mechanism

研究代表者
安部 博子 (Abe, Hiroko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40363220
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖改変酵母の細胞壁成分は野生型酵母よりもマクロファージ細胞における炎症性サイトカインの産生活性が低いことがわかった。BMDCにおいては、マンノース8個からなるN-結合鎖(M8)を持つ酵母株の細胞壁成分が多くのサイトカインを誘導すること、またM8株の中にはサイトカインの産生を抑制的に制御するものがあることが明らかになった。加えて、M8株の細胞壁成分の中には脾臓通常型樹状細胞(cDC)においてDectin-1の発現を強く誘導する活性があることが示された一方で、抗原特異的IgA抗体の誘導能を付与することができるレチノイン酸合成酵素の発現を強く誘導することができるものを見出すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出芽酵母の細胞壁を構成するマンナンは全身性免疫を活性化することが知られている。免疫細胞の活性化の程度はリガンドの量や分子量、構造によって左右されることから、細胞壁成分の構造や組成を変えることができれば、より強いIgA抗体およびIgG抗体産生誘導能の獲得に繋がり、そのような細胞壁構造の情報は効果的なワクチンの開発に役立つ。

研究成果の概要(英文)：In macrophage cells, the cell wall components of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains with altered sugar chains produced fewer inflammatory cytokines than wild-type yeast. In BMDCs, cell wall components of yeast strains with N-linked oligosaccharides consisting of eight mannoses (M8) induced many cytokines, and some of the M8 strains suppressively regulated the production of cytokines. In addition, some cell wall components of strain M8 were shown to strongly induce Dectin-1 expression in splenic normal dendritic cells (cDC). On the other hand, we did not find a potent inducer of retinoic acid synthase expression, which can confer the ability to induce antigen-specific IgA antibodies.

研究分野：応用微生物学

キーワード：出芽酵母 細胞壁 糖鎖 免疫細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞壁の構成多糖の一つである β -1,3-グルカンは樹状細胞上に発現するグルカンレセプターである Dectin-1 のリガンドであり、本レセプターへの刺激によって樹状細胞に IgA 抗体産生を誘導する活性が付与されることが分かっている。出芽酵母の細胞壁は β -グルカンの他に、マンナン、キチンなどからなる多糖で構成されており、マンナンはマクロファージや樹状細胞に発現するマンノースレセプターや Toll 様受容体 2(TLR2)のリガンドとして、全身性免疫を活性化することが知られている。免疫細胞の活性化の程度はリガンドの量や分子量、構造によって左右されることから、リガンドとなる細胞壁成分の構造や組成を変えることができれば、より強い IgA 抗体および IgG 抗体産生誘導能の獲得に繋がる。しかしながら、これらの多糖類の分子量は巨大でありかつ複雑な構造をとっていることから、このような多糖を化学合成すること、または人為的に細胞壁成分の組成や構造を改変することは難しく、これらレセプターの最適な活性化を誘導するための細胞壁組成、及び構造について調べた研究はこれまでにない。

2. 研究の目的

上述のように出芽酵母の細胞壁は粘膜免疫、全身性免疫の両方を活性化できる成分を含有している。そこで、本研究では、出芽酵母の細胞壁構成成分の組成、及び構造が変化する変異株を利用して、アジュバントとしての効果が高い変異株を見出し、その作用機序について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 糖鎖改変酵母株のマクロファージ活性化能の解析

マウスマクロファージ培養細胞 RAW-Blue 細胞は TLR2 および Dectin-1 などのレセプターの活性化をレポーター遺伝子の発現を調べることにより容易に評価することができる細胞である。本細胞に各糖鎖改変酵母群から精製した細胞壁成分を添加し、レポータータンパクの活性を調べることにより、マクロファージ細胞で機能するレセプターを活性化する細胞株を見出す。

これまでに、我々が取得している様々な細胞壁組成を持つ糖鎖改変出芽酵母群の中から酵母型糖鎖(外糖鎖)除去株 TIY20(*och1 mnn1 mnn4* 破壊株:マンノース 8 個の *N*-結合型糖鎖を持つ(M8))及び本株に変異処理を施し増殖能および高温度感受性を回復させた株、さらにマンノースを 5 個までにトリミングした(M5)株 及び本株に変異処理を施し増殖能および高温度感受性を回復させた株、0 結合型糖鎖の付加数を減らした株の細胞壁成分を RAW-Blue 細胞に添加し、そのレポーター活性を調べた。

2) 糖鎖改変酵母株の骨髄由来樹状細胞(BMDC)活性化能の解析

マウス骨髄由来樹状細胞は次の方法で得た。6 週令の BALB/c マウス(♀)の骨髄から回収した骨髄細胞を GM-CSF および β -ME 入り培地で 6 日間培養し、浮遊、弱付着性細胞を回収する。回収細胞の中から、CD11c MicroBeads UltraPure (Miltenyi Biotec)に結合する細胞を MACS LS カラムを用いて単離した。単離した細胞は CD11c と I-A/I-E で蛍光染色し FACS 解析を行い cDC が 90 %以上回収できていることを確認した。これら BMDC 細胞に糖鎖改変株由来細胞壁を添加した際のサイトカイン誘導能について調べた。

3) 糖鎖改変酵母株の脾臓通常型樹状細胞(cDC)における Dectin-1 とレチノイン酸合成酵素 Ralldh2 の発現解析

樹状細胞は Ralldh2 を発現しレチノイン酸合成能を持つことによって、抗原特異的な IgA 抗体の誘導能が備わることがすでに分かっている。そこで、本来は Ralldh2 を発現しない脾臓由来 cDC に糖鎖改変酵母株の細胞壁成分を添加することによって刺激を行い、Ralldh2 mRNA の発現を効率よく誘導する酵母株を探索する。Ralldh2 は Dectin-1 の刺激によって発現誘導されることが分かっている。より効率的な Ralldh2 の発現誘導のために Dectin-1 自体の発現量も増加させる必要

がある。そこで、Dectin-1の発現上昇活性を示す酵母株の解析も合わせて行う。

脾臓通常型樹状細胞(cDC)は6週令のBALB/cマウス(♀)の脾臓からCD11c MicroBeads UltraPure (Miltenyi Biotec)に結合する細胞をMACS LSカラムを用いて単離した。回収した細胞はCD11cとI-A/I-Eで蛍光染色しFACS解析を行いcDCが90%以上回収できていることを確認した。

4. 研究成果

1) 糖鎖改変酵母株のマクロファージ活性化能の解析

糖鎖改変酵母群の細胞壁をマウスマクロファージ様培養細胞RAW-Blue細胞に添加し、各種レセプターの刺激によりNFκ-BとAP1転写因子が活性化された際に発現するレポータータンパク質(分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP))の産生活性について調べた。その結果、野生型酵母(WT)に比べ高いSEAP活性を示す酵母株は認められず、野生型酵母(WT)に比べ低い活性を示す株が確認された(図1)。

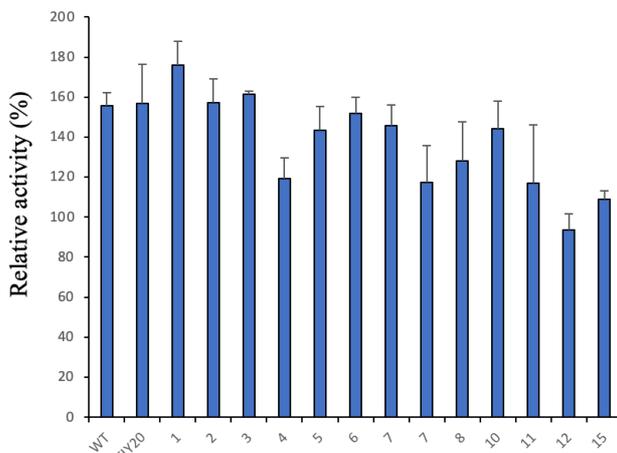


図1. 各糖鎖変異株由来細胞壁成分添加時のSEAP活性
1~8: M8糖鎖の増殖回復株、10~12: M5糖鎖かつO結合型糖鎖減少株、15: M5糖鎖の増殖回復株。各細胞壁は12.5μg/ml添加し添加後20時間後の培養上清のSEAP活性を測定。

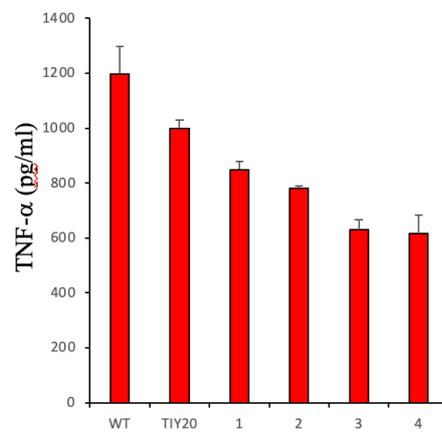


図2. 各糖鎖変異株由来細胞壁成分添加時のTNF-αの産生量
1~4: M8糖鎖の増殖回復株。各細胞壁は25μg/ml添加し添加後20時間後の培養上清を回収しTNF-α量を測定。

さらに、各培養上清中に産生されたTNF-α量についても測定を行ったところ、糖鎖改変酵母では野生型酵母(WT)に比べてTNF-αの産生量が抑えられていることがわかった(図2)。これらの結果から、糖鎖改変酵母はマクロファージ細胞においては野生型酵母よりも炎症性サイトカインの産生を抑えることができることがわかった。

2) 糖鎖改変酵母株の骨髄由来樹状細胞活性化能の解析

上記の通りマウス骨髄細胞から分化・純化した樹状細胞に糖鎖改変酵母を添加してその培養上清中に産生されたサイトカインを調べた。図3の結果から、TIY20および5, 6の糖鎖改変酵母ではIL-2, IL-6, IL-10, TNF-αの産生活性が野生型酵母(WT)に比べ増加している一方、1~4の糖鎖改変酵母は全てのサイトカインの誘導活性が野生型酵母(WT)に比べて低下していることがわかった。野生型との違いだけでなく、同じマンノース8個にトリミングされた糖鎖改変酵母間でこのような違いが出たことから、N-結合型糖鎖以外の糖鎖および多糖が骨髄由来樹状細胞のレセプター刺激に大きく関与していることが明らかとなった。

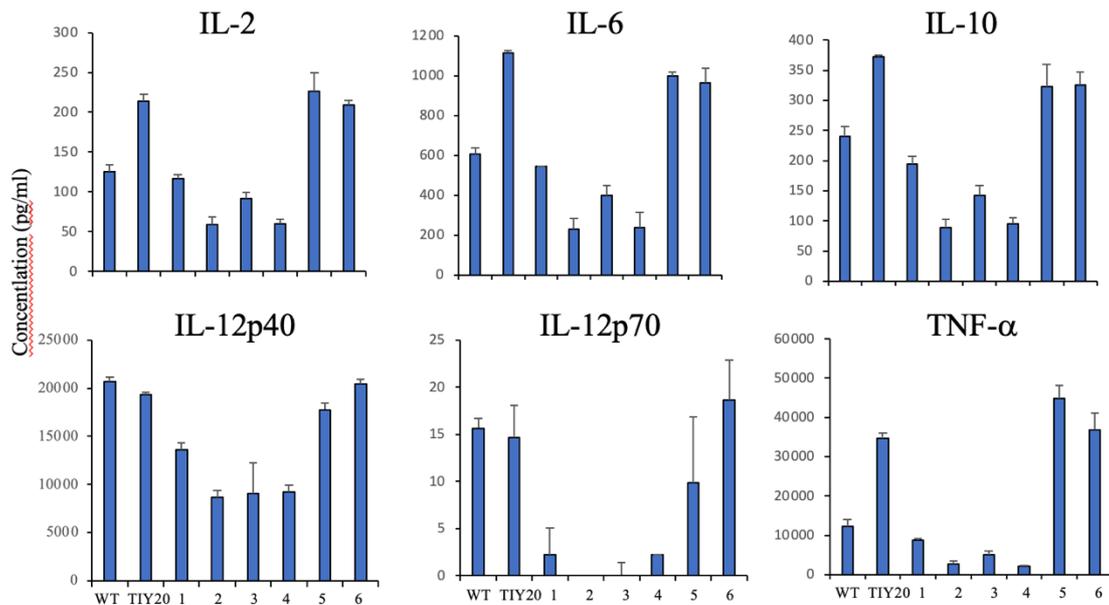


図3. 各糖鎖変異株由来細胞壁成分添加時のサイトカインの産生量
1~6: M8糖鎖の増殖回復株。各細胞壁は25μg/ml添加し添加後48時間後の培養上清を回収し各種サイトカイン量を測定。

3) 糖鎖改変酵母株の脾臓通常型樹状細胞(cDC)における Dectin-1 とレチノイン酸合成酵素 Raldh2 の発現解析

上記の通りマウス脾臓細胞から純化した樹状細胞に糖鎖改変酵母を添加し 24 時間後に細胞を回収し、RNA の回収を行なった。これら回収 RNA を用いて qPCR 解析を行い、Dectin-1 と Raldh2 の発現解析を行なった。Dectin-1 については M8 糖鎖のうちの一つ (図 4) および、M5 かつ O-結合型糖鎖の付加数が減っている糖鎖改変酵母において Dectin-1 の誘導活性が認められた。一方でレチノイン酸合成酵素 Raldh2 についてはいずれの糖鎖改変酵母においても野生型に比して高い発現量を示すものは見いだせなかった (図 5)

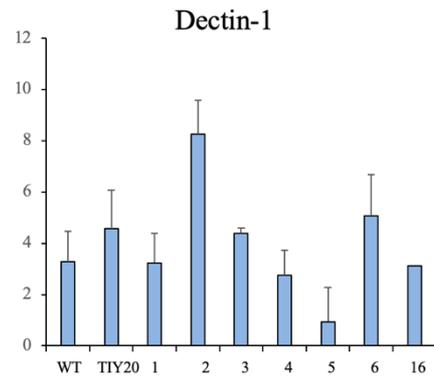


図4. 各糖鎖変異株由来細胞壁成分添加時のDectin-1の発現量
1~6: M8糖鎖の増殖回復株、16: M5糖鎖。脾臓通常型樹状細胞(cDC)に各細胞壁12.5μg/mlを添加し、添加後24時間後の培養上清のSEAP活性を測定。

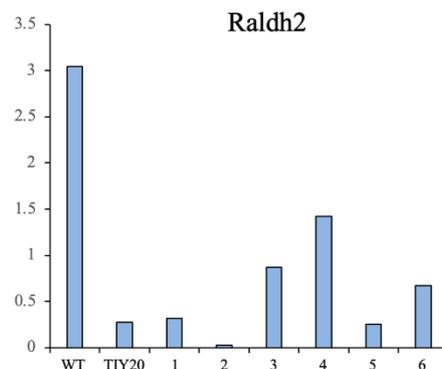


図5. 各糖鎖変異株由来細胞壁成分添加時のRaldh2の発現量
1~6: M8糖鎖の増殖回復株、脾臓通常型樹状細胞(cDC)に各細胞壁12.5μg/mlを添加し、添加後24時間後の培養上清のSEAP活性を測定。

引用文献

Abe et al., Glycobiology, 2009, Abe et al., Glycobiology, 2016, Abe H. et al, Biosci Biotechnol Biochem., 2009

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokota K, Takeo A, Abe H, Kurokawa Y, Hashimoto M, Kajimoto K, Tanaka M, Murayama S, Nakajima Y, Taniguchi M, Kataoka M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Application of Micropore Device for Accurate, Easy, and Rapid Discrimination of <i>Saccharomyces pastorianus</i> from <i>Dekkera</i> spp	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosensors (Basel)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bios11080272.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安部博子
2. 発表標題 食品由来成分の免疫機能性の解析
3. 学会等名 かがわ糖質バイオフォーラム第13回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部博子
2. 発表標題 食品由来成分の免疫機能性の解析
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------