

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20576

研究課題名（和文）べん毛 - TLR5を介した腸内細菌と宿主の共生機構の解明

研究課題名（英文）Flagella and TLR5-mediated symbiosis and co-evolution between gut commensal bacteria and host

研究代表者

鈴木 駿也（Suzuki, Shunya）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：50964227

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「腸内細菌はなぜ宿主免疫系によって排除されないのか」という問いに迫るため、ヒト腸内のべん毛を持つ共生細菌が免疫応答を誘導するのか・しないのかを徹底的に解析した。ヒト由来細胞を用いた試験から、一部の腸内細菌のべん毛がほとんど免疫応答を誘導しない一方で、ある種のべん毛が強力に炎症を誘導することを明らかにした。ノトバイオームマウスを用いた試験では、各腸内細菌の腸内での定着性や免疫誘導能に明確な差異はなく、顕著な炎症誘導もみられなかった。以上の結果は、「強力に炎症を誘導し得る腸内細菌も、腸内では過剰な免疫応答を惹起せずに共生している」という、新たな腸内共生機構の存在を示唆するものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の免疫系は、病原細菌と共生細菌に対して「排除」と「許容」という相反する応答を示し、生体の恒常性を維持している。これまでに、免疫系が病原細菌を排除するメカニズムはよく研究されてきた。一方で、腸内共生細菌がなぜ免疫系によって排除されずに、腸内に常在できるのかは未解明な点が多い。本研究結果は、腸内共生細菌が腸内に常在できる仕組みの一端を明らかにしたものであり、腸内細菌叢の形成原理のみならず、生体の恒常性維持機構の包括的な理解にも繋がる、学術的・社会的意義のある研究成果である。

研究成果の概要（英文）：Immune responses to flagellin, the major subunit protein of the bacterial flagellum, are critical for the recognition and elimination of flagellated pathogens. Although commensal bacteria also produce flagellins, the mechanisms by which flagellated commensal bacteria are able to colonize the gut and evade immune clearance remain unknown. This study aimed to investigate the immunological properties of flagellated commensal bacteria prevalent in the human gut, both in vitro and in vivo. In vitro analysis revealed that some flagellins exhibited attenuated immunological activity, while others demonstrated robust immunological activity. This difference was not observed in gnotobiotic mice with each flagellated commensal, despite comparable gut colonization between the commensals. The commensals elicited only modest immune responses in the gut. These findings indicate that commensal bacteria with significant immunostimulatory potential also colonize the gut and evade the immune system.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 ベん毛 免疫 共生 フラジェリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の腸内は食餌由来の細菌や腸内に常在する細菌(腸内共生細菌)などの様々な細菌に絶えず曝されている。腸内の免疫系はこの無数の細菌の中で、腸内共生細菌には過剰に反応せず「許容」する一方、有害な病原細菌に対しては迅速に免疫応答を誘導し、これらを「排除」する。これまでの研究で、宿主免疫系は、体内に侵入してきた病原細菌を排除するために、病原細菌を感知する様々なセンサーを発達させてきたことが分かっている(Kawai and Akira, 2010)。Toll-like receptor 5 (TLR5)はそのセンサーの一種であり、細菌のべん毛を構成するタンパク質「フラジェリン」を感知する(Hayashi et al., 2001)。TLR5は腸管上皮細胞や粘膜の免疫担当細胞に発現し、フラジェリンを感知することで炎症応答が誘導される。宿主はこの炎症応答やそれに続く獲得免疫応答(抗体産生など)を誘導することでリステリアやサルモネラなどのべん毛を有する病原細菌を排除すると考えられている(Gewirtz et al., 2001)。つまり、べん毛は宿主免疫系の標的であり、「排除」機構を起動させる因子となる。

一方、いくつかの腸内共生細菌もべん毛を有することが知られており(Cullender et al., 2013)。既述のようにべん毛は、宿主免疫系の標的となり得る分子である。そのため、べん毛を有する共生細菌が腸内に常在するためには、TLR5を介した宿主免疫系からの排除を回避する必要があるのではないかと我々は考えた。しかし、細菌のべん毛に関する研究のほとんどは病原細菌を対象にしたものであり、腸内共生細菌のべん毛は炎症応答を誘導しないのか?、べん毛を持ちながらもどのようにして宿主免疫系による排除を回避しているのか?、という根本的な問いに着目した研究はほとんど存在しない。

2. 研究の目的

本研究では「腸内に棲息する有べん毛共生細菌は、なぜ宿主免疫系に排除されないのか?」という重要な問いに迫るために、細菌学・免疫学的解析技術、並びに動物実験技術を基盤とし、ヒト腸内の有べん毛共生細菌が真にTLR5を介して炎症応答を誘導するのか、あるいは誘導しないのか、を徹底的に解明することを目的とした。腸内細菌(叢)は腸内のみならず生体の恒常性維持に深く関わる。そのため、本研究により、腸内共生細菌が腸内に常在できる仕組みの一端を理解することは、「腸内細菌叢の形成原理」だけでなく、「宿主の恒常性維持機構」の包括的な理解にも繋がる。

3. 研究の方法

(1) ヒト腸内有べん毛共生細菌の探索

ヒトの腸内に棲息する有べん毛共生細菌種を推定するために、ゲノム上にべん毛関連遺伝子群を持つ腸内共生細菌種を探索した。過去にヒトの腸内優占菌種として報告されている細菌種のゲノム情報を、NCBI データベースより取得した。各ゲノム上のべん毛関連遺伝子群の有無をゲノム解析により調べた。べん毛関連遺伝子群を持つことが判明した腸内共生細菌種については、菌株保存機関から入手した。入手した推定有べん毛共生細菌を軟寒天培地の中央に穿刺し、一定時間の培養後に運動性を示すのか(穿刺箇所より外側での増殖)を確認した。また、べん毛染色液によりべん毛を染色し、顕微鏡観察によりべん毛の形成を確認した。運動性・べん毛形成が確認できなかった菌株については、軟寒天培地を用いた継代培養を行い、運動性を示すクロロンの取得を試みた。運動性・べん毛形成が確認できた腸内共生細菌を以降の試験に使用した。

(2) 有べん毛共生細菌から精製したべん毛の免疫学的特性の解析

一部の病原細菌が有するフラジェリンは糖鎖修飾を受け、この糖鎖修飾がTLR5を介した炎症応答に影響するとの報告がある(Hanuszkiewicz et al., 2014)。そこで、有べん毛共生細菌から精製したフラジェリンの免疫学的特性を評価することとした。有べん毛共生細菌のべん毛を超遠心分離機により精製した。精製したべん毛は、SDS-PAGEにより分離し、CBB染色を行った。精製したべん毛をモノマー化し、Caco-2細胞やHT-29細胞、TLR5発現レポーター細胞をモノマー化したフラジェリンによりそれぞれ刺激した。刺激後のCaco-2細胞およびHT-29細胞の培養上清を回収し、産生されたIL-8をELISAにより測定した。TLR5発現レポーター細胞は、基質を含む培地中で培養し、一定時間後に吸光度を測定した。

(3) ノトバイオートマウスを用いた有べん毛共生細菌の生態及び免疫学的特性の解析

有べん毛共生細菌の腸内での挙動とそれに対する宿主の免疫応答を解析するために、無菌マウスの腸内に各有べん毛共生細菌をそれぞれ定着させたノトバイオートマウスを作成した。単独では無菌マウスの腸内に定着できない有べん毛共生細菌も存在した。そこで、大腸菌(病原性・べん毛を保持しない株)と各有べん毛共生細菌と一緒に定着させたノトバイオートマウスを作成した。有べん毛共生細菌が宿主免疫系によって排除されずに、腸内に安定して定着できるのかを明らかにするため、作成したノトバイオートマウスから糞便を採取し、選択培地を用いたCFU測定により糞便中の有べん毛共生細菌数を約1ヶ月間、定期的に調べた。また、有べん毛共生細菌

菌が腸内で炎症応答や抗体産生を誘導するのかを明らかにするために、ノトバイオートマウスから定期的に糞便と血液を採取し、各試料中の炎症性サイトカインやリポカリン-2の濃度（炎症応答の指標）および有べん毛共生細菌やべん毛に特異的な抗体の量をELISAにより測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト腸内有べん毛共生細菌の探索

ヒト腸内に棲息する有べん毛共生細菌種を推定するために、ゲノム上にべん毛関連遺伝子群を持つ腸内共生細菌種を探索した。その結果、Lachnospiraceae科やLactobacillaceae科に属する腸内共生細菌の一部が、ゲノム上にべん毛関連遺伝子群を有することが分かった。Clostridiaceae科に属する腸内共生細菌の中には、ゲノム上にフラジェリン遺伝子を有するものも存在したが、フラジェリン遺伝子以外のべん毛合成遺伝子を持たず、べん毛を形成しないことが推察された。そこで、べん毛関連遺伝子群全長を有することが判明した菌株を、菌株保存機関から入手し、運動性とべん毛形成をそれぞれ確認した。その結果、多くの菌株において運動性とべん毛形成が確認できた。どちらも確認できなかった菌株については、軟寒天培地を用いた継代培養を行い、運動性を示すクローンの取得を試みた。その結果、いくつかの菌株で運動性を示し、べん毛を形成するクローンを取得した。これらの結果より、ヒト腸内に棲息する共生細菌の中にも、べん毛を形成し運動性を示すものが存在することが明らかとなった。以降の試験では、運動性・べん毛形成が確認できた腸内共生細菌を使用した。

(2) 有べん毛共生細菌から精製したべん毛の免疫学的特性の解析

運動性とべん毛形成が確認できた有べん毛共生細菌からべん毛の精製を試みた。超遠心分離機によりべん毛を精製し、SDS-PAGEとCBB染色によりべん毛の精製を確認した。その結果、ほとんどの菌株からべん毛を精製することに成功し、フラジェリンの分子量は菌株ごとに異なっていた。また、一部の菌株については複数のバンドが確認でき、それらが複数種のフラジェリンを発現していることが示唆された。続いて、精製したべん毛をモノマー化し、各フラジェリンの免疫学的特性を種々の細胞を用いて解析した。TLR5発現レポーター細胞を用いた試験の結果、TLR5活性化能はフラジェリンごとに大きく異なり、一部のLachnospiraceae科やLactobacillaceae科に属する腸内共生細菌のフラジェリンが、ほとんどTLR5を活性化しないことが分かった。その一方で、ある種の腸内共生細菌のフラジェリンは、サルモネラ由来のフラジェリンと同程度のTLR5活性化能を示した。Caco-2細胞やHT-29細胞を各フラジェリンで刺激し、産生されたIL-8をELISAにより測定したところ、フラジェリンのIL-8産生誘導能はフラジェリンごとに大きく異なり、TLR5活性化能と相関関係にあった。一部の腸内共生細菌由来のフラジェリンが免疫学的に低い活性を示すという結果は、これらの腸内共生細菌が宿主の免疫系を過剰に刺激することなく、腸内に共生していることを示唆していた。しかし、ある種の腸内共生細菌が強力に免疫応答を誘導するフラジェリンを持つにも関わらず、腸内に常在している点は、これまでの知見からは説明がつかない。そこで、有べん毛共生細菌が腸内で真に免疫応答を誘導するのかを、*in vivo*試験により明らかにすることとした。

(3) ノトバイオートマウスを用いた有べん毛共生細菌の生態及び免疫学的特性の解析

有べん毛共生細菌の腸内での挙動とそれに対する宿主の免疫応答を解析するために、無菌マウスの腸内に各有べん毛共生細菌をそれぞれ定着させたノトバイオートマウスを作成した。細胞を用いた試験の結果で、免疫学的活性が低い、あるいは高かったフラジェリンを持つ有べん毛共生細菌を動物試験に供することとした。まず、無菌マウスに大腸菌を経口投与し、大腸菌を腸内に定着させたマウスを作成した。次に、各有べん毛共生細菌または培地のみをそれぞれ大腸菌定着マウスに経口投与し、大腸菌と目的の有べん毛共生細菌を定着させたノトバイオートマウスを作成した。各有べん毛共生細菌の腸内定着を確認するために、1週間おきに糞便を採取し、選択培地を用いてCFUを測定した。その結果、免疫学的活性の強さにかかわらず、各有べん毛共生細菌は約1ヶ月間、継続してマウス腸内に定着していた。興味深いことに、免疫学的活性が高いフラジェリンを持つ有べん毛共生細菌については、腸内定着を誘導して2週間目で菌数が大幅に減少したが、1週間後にはもとの菌数に戻り、その後も高い菌数を維持していた。次に、有べん毛共生細菌が腸内で炎症応答を誘導するのかを明らかにするために、ノトバイオートマウスから定期的に糞便と血液を採取し、各試料中の炎症性サイトカイン（IL-6とTNF- α ）やリポカリン-2の濃度を測定した。その結果、いずれの試料からも炎症性サイトカインは検出できず、糞便中のリポカリン-2濃度も各グループ間で明確な違いはみられなかった。続いて、糞便中の有べん毛共生細菌あるいはべん毛に特異的な抗体の量をELISAにより測定した結果、有べん毛共生細菌の定着後、3週目ごろから各有べん毛共生細菌やべん毛に対する抗体が産生されていた。しかし、各有べん毛共生細菌やべん毛に対する抗体の量に明確な違いはなく、抗体産生量も低レベルであった。これらの結果は、強力に免疫応答を誘導し得る腸内細菌も、腸内では過剰な免疫応答を惹起せず共生しているという、新たな腸内共生機構の存在を示唆するものであった。

腸内共生細菌が免疫系によって排除されずに、腸内に常在できる仕組みは未解明な点が多い。本研究成果は、免疫学的活性の高い腸内共生細菌も、腸内では過剰な免疫応答を誘導することなく共生しているという、未だ知られざる腸内共生機構の一端を明らかにした。

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 Kajikawa Akinobu, Eguchi Naoto, Suzuki Shunya	4. 巻 88
2. 論文標題 Immunogenic Modification of <i>Ligilactobacillus agilis</i> by Specific Amino Acid Substitution of Flagellin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01277-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.01277-22	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木駿也
2. 発表標題 <i>Ligilactobacillus agilis</i> BKN88における腸管由来物質に対する走化性の解析
3. 学会等名 第35回日本微生物生態学会
4. 発表年 2022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
---------	---------