

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：32704

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590537

研究課題名(和文) 乳酸菌糖脂質およびペプチドグリカンの自然免疫活性化における役割

研究課題名(英文) The role of glycolipids and peptidoglycan of lactic acid bacteria for the stimulation of innate immunity

研究代表者

川原 一芳 (KAWAHARA, Kazuyoshi)

関東学院大学・理工学部・教授

研究者番号：20195126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳酸菌が示す穏やかな免疫活性化能と乳酸菌の細胞膜成分との関係を解明しようとした。一般的な乳酸菌である *Lactobacillus brevis* と *Enterococcus faecium* について、グリセロ糖脂質を精製し、機器分析によって構造の一部を明らかにした。またペプチドグリカン抽出し、酵素処理や化学処理で可溶化した。これらの菌体成分について免疫活性を調べたところ、グリセロ糖脂質が示すナチュラルキラーT細胞活性化能は弱かったものの、可溶化ペプチドグリカンは明瞭なサイトカイン産生活性を示した。これらの結果から、免疫活性を示す細胞膜成分の主体はペプチドグリカンであると推定された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to clarify the relationship between mild immunostimulatory effects of lactic acid bacteria and their cell membrane components. *Lactobacillus brevis* and *Enterococcus faecium*, as typical lactic acid bacteria, were used in this study. Glyceroglycolipids of these bacteria were extracted, purified, and their structure was partially determined by spectrometric analysis. Peptidoglycan was also extracted, solubilized, and purified by enzyme and chemical treatments. These cell membrane components showed only weak activity of natural killer T cell activation, but solubilized peptidoglycan exhibited distinct activity of cytokine induction. These results indicated that the cell membrane component of lactic acid bacteria responsible for the immunostimulatory effects was mainly peptidoglycan.

研究分野：細菌学

キーワード：自然免疫 糖脂質 ペプチドグリカン 乳酸菌

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳動物の免疫系のうち、近年自然免疫に関する研究が活発に行われるようになった。1990年代後半にはグラム陰性細菌のリポ多糖(LPS)の受容体としてToll様受容体(TLR)が発見され¹⁾、各種の細菌菌体成分が特異的な受容体を介して自然免疫系を活性化する機構が明らかになってきた。一方、自然免疫と獲得免疫の中間位置で働いていると考えられている natural killer T (NKT)細胞についても注目が集まってきた。NKT細胞については当初、感染免疫との関連性が不明であったが、キリン(株)が海綿から見出した α -galactosylceramide (α -Gal-cer)がNKT細胞を活性化し、サイトカイン産生を促すことが報告された後は、微生物由来のNKT細胞活性化物質が探索されるようになった。その中で、本研究の研究代表者が長年研究を続けてきた *Sphingomonas* 属細菌由来のスフィンゴ糖脂質(GSL)がNKT細胞に認識され、これを活性化することがわかってきた²⁾。

2. 研究の目的

これまで自然免疫系を刺激する微生物菌体成分としてはLPSやGSLを始めとするグラム陰性細菌の成分が研究されることが多かった。これは、グラム陰性細菌の成分が強い免疫刺激活性を有していることに起因すると思われる。一方、グラム陽性細菌については結核菌などの *Actinobacteria* 門の細菌の糖脂質に関する研究は古くからあるものの、ブドウ球菌、連鎖球菌などを含む *Firmicutes* 門の細菌に関しては、物質レベルでの研究があまり行われてこなかった。

その中で他の細菌にも共通の成分として、ペプチドグリカン(PG)は常に研究者の興味を集めてきた。しかし、受容体の研究が進展するにつれてPG本来の巨大分子の状態では免疫刺激は起こらず、分解物であるムラミルジペプチド(MDP)がNOD2に、グルタミルジアミノピメリン酸(iE-DAP)がNOD1に認識され、免疫系を活性化することが定説となってきた³⁾。また、リポテイコ酸についても、TLR2を受容体とする以前の考えは否定され、混入するリポペプチドが活性の主体であると考えられるようになった⁴⁾。つまり *Firmicutes* 門の細菌に関しては定説が覆ったものの、依然として疑問が残る状況が出現していた。

最近研究代表者は金城らとの共同研究で、肺炎球菌のグリセロ糖脂質(GGL)がNKT細胞を活性化することを見出し報告した⁵⁾。これにより、他の *Firmicutes* 門の細菌が持つGGLの活性についても注目が集まるようになった。GGLはリポテイコ酸の脂質部分と同一の分子であることにも興味を持たれた。研究代表者は以前より乳酸菌が示すプロバイオティクスとしての「体に良い」作用、つまり穏やかな免疫刺激活性に興味を持って

いたが、肺炎球菌のGGLに関する新知見により、分類学的に近縁の乳酸菌についてもGGLを始めとする菌体成分に強い興味もたれるようになってきた。そこで、本研究では乳酸菌のGGL、および前述のPGについて、構造に関する化学的研究と、自然免疫に関わる活性測定を組合せ、乳酸菌が示す免疫刺激活性の物質レベルでの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) GGLの精製

乳酸菌として *L. brevis* NBRC 3345 および *E. faecium* NBRC 100485 を使用した。これらの乾燥菌体をクロロホルム/メタノール(C/M)(2:1, v/v)で抽出し、抽出脂質をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーで精製した。溶出にはC/M/水(20:9:1, v/v/v)を用いた。*L. brevis*のGGL-L3および *E. faecium*のGGL-E3はDEAEセルロースカラムに非吸着の画分に回収された。*E. faecium*のGGL-E4はDEAEセルロースカラムに吸着したため、溶出溶媒に酢酸アンモニウムを添加して溶出した。これらの3種類のGGLは、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製された。GGL-E4については、最終的に調製用薄層クロマトグラフィー(TLC)により精製し、分析に用いた。

(2) PG試料の調製

粗PGは常法に従い調製した。湿菌体を緩衝液に懸濁しグラスビーズを加えて、超音波処理により破碎し、遠心分離により膜画分を集め、凍結乾燥した。これを4% SDS処理、5% トリクロロ酢酸処理し、乾燥させることにより粗PGを得た。粗PGをリゾチーム処理(PG 5 mgの懸濁液にリゾチーム 2 mgを混合し、37℃、1時間反応)を行い不溶物を除くことで可溶化した。これをフェノール抽出し、水相にPGを回収して透析し、高分子の可溶性PGを得た。さらにこれを0.1 M NaOHで、100℃、30分加水分解し、透析、凍結乾燥して、アルカリ処理PGを得た。

(3) 化学分析

GGLの脂肪酸は、加水分解(4 M HCl, 100℃、5時間)の後、遊離脂肪酸を5%塩酸メタノールによりメチルエステル誘導体として、ガスクロマトグラフィー(GLC)により定量した。中性糖は、加水分解(0.1 M HCl, 100℃、48時間)の後、遊離した糖を還元して糖アルコールとし、アセチル化誘導体とすることにより、GLCにて定量した。PGに含まれるアミノ酸の分析は以下の方法で行った。PGを加水分解(6 M HCl, 100℃、18時間)し、遊離したアミノ酸を1.2 M塩酸ブタノールでブチルエステル化し、さらにトリフルオロ酢酸でトリフルオロアセチル化して、GLCにより分析した。

(4) 機器分析

メチル化分析は、GGL を箱守法により完全メチル化し、加水分解の後に中性糖分析と同様の方法で誘導体化し、ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC-MS) (GC-MS QP 2010plus, Shimadzu) により分析した。

GGL の質量分析は MALDI-TOF マススペクトロメトリー (MS) (AXIMA-CFR plus, Shimadzu) により、reflectron モードで行い、陽イオンを検出した。マトリックスには 2,5-dihydroxybenzoic acid を用いた。

糖のアノマー分析には核磁気共鳴スペクトル (NMR) (JNM-ECX 500 MHz, JEOL RESONANCE) を用いた。試料を直接、CDCl₃/CD₃OD (2:1, v/v) に溶解し、室温あるいは 55 °C で、一次元あるいは二次元 ¹H-NMR を測定した。

(5) NKT 細胞活性化試験

抗原提示細胞には CD1d 発現マウス培養細胞、ハイブリドーマには V α 14 iNKT 細胞を用いた。GGL をマウス培養細胞に添加した後 4 時間培養し、細胞数を調整してハイブリドーマと混合し、一晚培養した。その後、遠心分離の培養上清中に含まれる IL-2 を mouse IL-2 ELISA kit (DY402) (BD Bioscience) で定量した。

(6) human β -defensin 2 mRNA 発現の測定
ヒト歯肉扁平上皮癌由来細胞株 Ca9-22 を継代培養した後にアッセイに供した。細胞に PG を添加後、human β -defensin 2 (hBD-2) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定した。

(7) IL-8 産生活性の測定

ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞を活性化型ビタミン D3 添加培地で 72 時間培養した。培養後、この細胞に PG を添加して 24 時間培養し、遠心分離の培養上清中に含まれる IL-8 を human IL-8 ELISA kit (BD Bioscience) で定量した。

4. 研究成果

(1) GGL 精製法の検討

GGL を効率良く高純度に精製するために、精製法を検討した。肺炎球菌の GGL を始めとする多くの GGL は荷電を有していないため、粗抽出物を陰イオン交換樹脂のうち有機溶媒でも使用可能な DEAE セルロースのカラムに通して、得られる非吸着画分をさらに精製する方法を確立した。上記カラムに吸着する GGL がある場合には C/M/水 (20:9:1, v/v/v) の溶出溶媒に酢酸アンモニウムを添加して溶出し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーや TLC で精製した。Fig. 1 には *E. faecium* GGL 精製時の粗抽出物、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー溶出物、および最終的精製物の TLC 分析結果を示した。

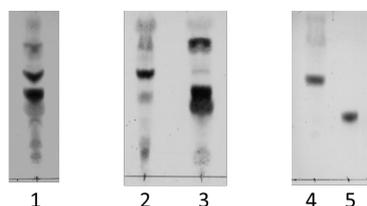


Fig. 1 *E. faecium* GGLの精製

1, 粗抽出画分; 2, DEAEセルロース非吸着画分;
3, DEAEセルロース吸着画分; 4, 精製E3; 5, 精製E4.

(2) GGL の構造解析

L. brevis の GGL については、肺炎球菌 GGL と同一の糖鎖構造を有する α -Glc-Diacylglycerol (DAG) あるいは α -Gal-(1 \rightarrow 2)- α -Glc-DAG (GGL-L3) であることが知られている (Glc: グルコース, Gal: ガラクトース)。得られた *L. brevis* GGL の化学組成はこれに一致するものであった。但し、本菌には単糖型の GGL 量はごく僅かであった。肺炎球菌の GGL と比べて DAG の脂肪酸組成には乳酸菌の特徴が見られ、パルミチン酸 (C_{16:0}) 32%、シスバクセン酸 (C_{18:1, n-9}) 18%、オレイン酸 (C_{18:1, n-7}) 23%、ラクトバシル酸 (C_{19cycl}) 13%、その他 14% となった。MALDI-TOF MS による質量分析の結果、GGL-L3 には 5 つのピークが検出されたが主要なピークは m/z 955 であった。これは DAG 部分に C_{16:0} および C_{19cycl} が結合し Na が付加したものと考えられるので、既報の GGL が調製できたものと考えられた。この精製二糖型 GGL を NKT 細胞活性化試験に供した。

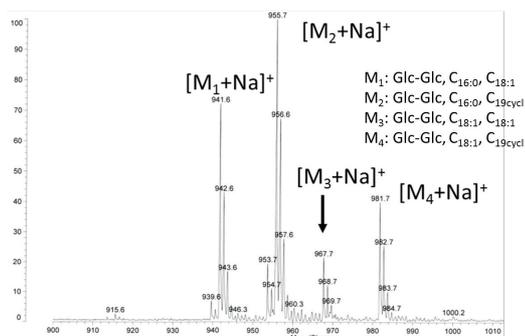


Fig. 2 *E. faecium* GGL-E3のMALDI-TOFマススペクトル

E. faecium の DEAE セルロース非吸着 GGL (GGL-E3) は脂肪酸分析において *L. brevis* GGL と同じ結果を示した。また質量分析においても Fig. 2 に示したように、*L. brevis* GGL とほぼ同じパターンが得られた。ところが、糖成分としては Glc のみが検出された。従って、糖鎖部分は Glc の二糖構造であろうと推定された。メチル化分析においては非還元末端の Glc と 2 位置換の Glc が検出された。さらに二次元 ¹H-NMR において Fig. 3 に示したスペクトルが得られ、H-1 プロトンの化学シフト値は Glc (A) が 4.91 ppm, Glc (B) が 4.87 ppm、結合定数は A, B とともに 4.0 Hz であった。これらのデータから 2 分子

の Glc はいずれも α アノマーであることがわかった。さらに H-1 と H-2 のクロスピークから推定した H-2 の化学シフト値は Glc (A) が 3.50 ppm、(B) が 3.35 ppm となったので A が 2 位置換の Glc、B が非還元末端の Glc と決定した。以上をまとめて、GGL-E3 の構造は以下のように決定された (Fig. 4)。

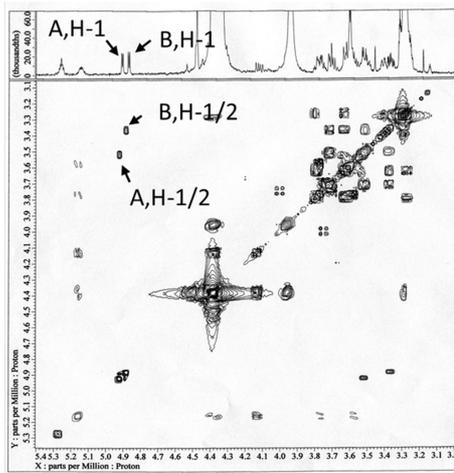


Fig. 3 GGL-E3の2D- $^1\text{H-NMR}$ (^1H , $^1\text{H-COSY}$) スペクトル

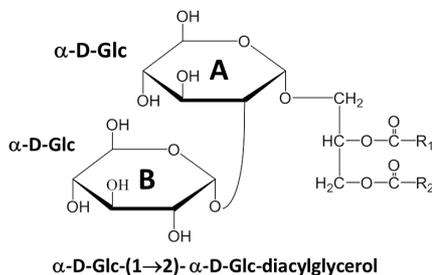


Fig. 4 *E. faecium* GGL-E3の化学構造

E. faecium の DEAE セルロース吸着 GGL (GGL-E4) については、糖鎖部分のメチル化分析および NMR 分析のデータが GGL-E3 と一致したため GGL-E3 と同一の Glc 二量体を含むことが確かめられた。しかし酸性基を含む点で E3 とは異なっており、この酸性基を TMS ジアゾメタンでメチルエステル化した後の分子量は E3 と大きく異なっていた。Fig. 5 に MALDI-TOF MS の分析結果を示した。現在のところ E4 の構造決定には至っていないが、GGL-L3 や GGL-E3 よりも親水性が強い脂質であることから、NKT 細胞等への活性という面からは興味もたれる。

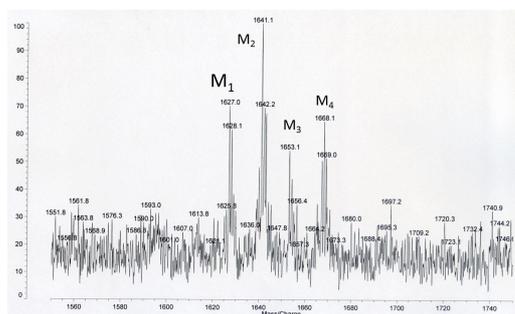


Fig. 5 *E. faecium* GGL-E4 メチルエステルの MALDI-TOF マススペクトル

(3) アミノ酸分析による PG の純度分析
ペプチドグリカン是不溶性の高分子であるため、これまで多くの実験系で不溶物の形態で使用されてきた。このため、取り扱いが難しい面があった。また純度も低く、リポペプチド等の強い免疫活性を有する物質が混入するケースが多く見られた。そこで本研究では PG をリゾチームで可溶化し、さらにリポペプチドを分解除去するために、弱アルカリ加水分解を行った。得られたアルカリ処理 PG を不溶性 PG (粗 PG) と比較するために両者のアミノ酸組成分析を行った。

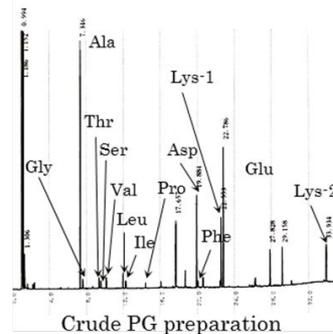


Fig. 6 *L. brevis* 不溶性PG(粗PG)のアミノ酸分析

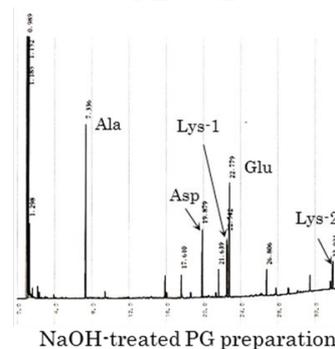


Fig. 7 *L. brevis* アルカリ処理PGのアミノ酸分析

その結果、Fig. 6 と Fig. 7 に示したように可溶化とアルカリ処理により、PG 構成アミノ酸のみが検出されるまでに純度が向上した。本研究ではこれらの PG 試料を用いて、サイトカイン等の産生活性を測定した。なお、リゾチームによる PG の可溶化は生体内でも起こり得る反応であるため、本研究で用いた可溶化 PG は実際の活性型 PG の形態をある程度反映したものと考えられる。

(4) GGL による NKT 細胞活性化
L. brevis GGL-L3 を用いて乳酸菌 GGL の NKT 細胞活性を調べた結果、2.5 $\mu\text{g/ml}$ から 40 $\mu\text{g/ml}$ の範囲において極めて弱い活性が測定された。GGL 40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した際の IL-2 産生量は、*S. yanoikuyae* GSL-1' 10 $\mu\text{g/ml}$ の場合の 10 分の 1 以下であった。活性が安定して発現される GSL に比べると GGL の場合はデータのばらつきが大きい傾向が見られた。GGL は GSL と比べて疎水性がより高いことからアッセイ系への添加形態に改良の余地があると思われる。GGL の活性については今後さらに検討を続

ける予定である。

(6) PG による hBD-2 mRNA 発現

L. brevis の 3 種類の PG (不溶性 PG、可溶性 PG、アルカリ処理 PG) を用いて測定を行った。その結果、全ての試料で明瞭な hBD-2 mRNA 発現の亢進が認められた。そのうち、アルカリ処理 PG による mRNA の発現亢進が最も強く、不溶性 PG の活性が最も弱いことがわかった。

(7) PG による IL-8 産生

免疫細胞刺激からサイトカイン産生までの時間は、刺激物質やサイトカインの種類によって異なることが知られている。そこで最初に、不溶性 PG を用いて IL-8 産生量の経時変化を調べた。その結果、*L. brevis* あるいは *E. faecium* の PG を THP-1 細胞に添加後、2 時間目から IL-8 が産生され、時間経過とともに産生量は増加し、24 時間培養により最も高い値を示すことがわかった。そこで、以降の実験では PG 添加後 24 時間の培養を行い、IL-8 の定量を行った。

次に、不溶性 PG を用いて PG 濃度による IL-8 産生量の変化を調べた。その結果、Fig. 8 に示したように、両菌の PG 共に、0.01 μg から 10 μg まで産生量が増加することが確かめられた。しかし、*L. brevis* PG による産生量には大きな変化が見られなかったのに対して、*E. faecium* PG では濃度依存的に産生量の大きな増加が見られた (Fig. 8A, B)。

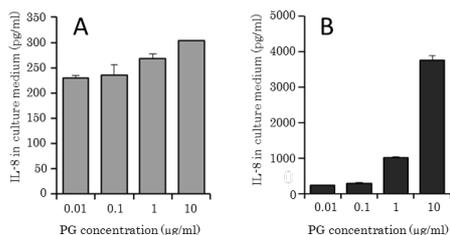


Fig. 8 不溶性PGのIL-8産生活性
A, *L. brevis* 不溶性PG; B, *E. faecium* 不溶性PG.

さらに、同様の濃度範囲で可溶性 PG およびアルカリ処理 PG の IL-8 産生活性を測定した。その結果、Fig. 9 に示したように、濃度依存的に産生量が増加することがわかったが、い

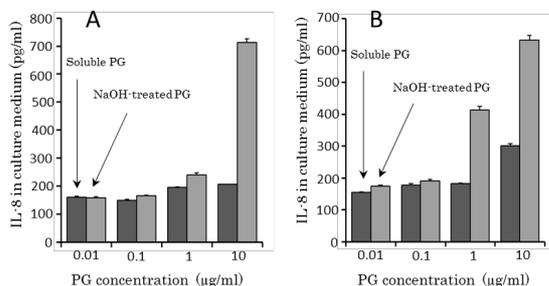


Fig. 9 可溶性PGのIL-8産生活性
A, *L. brevis*; 左: リゾチーム可溶性PG, 右: アルカリ処理PG
B, *E. faecium*; 左: リゾチーム可溶性PG, 右: アルカリ処理PG

ずれの PG でも増加の程度はアルカリ処理 PG で顕著であった。

以上の結果により、リゾチーム可溶性 PG (グリカン鎖を部分的に切断) および可溶性 PG をさらにアルカリ処理した PG (リポペプチドを分解除去) は IL-8 の産生活性をもつことが明らかになった。これまで PG の免疫活性に関しては、MDP 等の部分構造が NOD2 等の受容体に認識され引き起こされると考えられてきた。しかし本研究により、高分子状態を保った PG についても、IL-8 産生活性を有していることが証明された。

(8) 総括

本研究の目的の一つは、乳酸菌のグリセロ糖脂質に焦点を当て、免疫活性を持つ可能性のある新たな糖脂質を見出すことであった。この点においては *E. faecium* の一つの糖脂質の構造を決定し、さらにこれまで知られていなかった糖脂質を見出したことで、ある程度成果を上げることができた。今後、菌種を増やして新規の糖脂質を検索し、構造決定していくことが必要であろう。

最も重点を置いた研究目的は、乳酸菌の穏やかな免疫活性化の因子となる細胞膜成分を見出すことであったが、これに関しては必ずしも期待通りの結果が得られなかった。即ち、当初は乳酸菌グリセロ糖脂質による NKT 細胞の活性化が明瞭に見られると予想したが、期待通りの結果を得ることができなかった。一方、PG に関しては、これまでの不溶性 PG だけではなく、リゾチーム可溶性試料、およびアルカリ処理によりリポペプチドの混入を排除した試料にも強い IL-8 産生活性を見出すことができた。この PG は透析により透析膜内部に留まることから、高分子構造を維持していると考えられる。従って、従来の低分子部分構造を認識する受容体とは別の受容体の存在が示唆された。今後、本研究で得られた新知見を論文発表するとともに、受容体についても明らかにしていく必要があると考えている。

本研究で得られた成果を総合的に判断すると、乳酸菌が示す穏やかな免疫活性化能は、主として PG に起因すると結論づけることができる。しかしグリセロ糖脂質が関与する可能性についても、実験系の改良等も含め今後とも検討していく予定である。

< 引用文献 >

- Poltorak, A., et al., Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*, 282, 1998, 2085-2088.
Kinjo, Y., et al., Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*, 434, 2005, 520-525.
Inohara, N., et al., Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Opin.*

Microbiol., 5, 2002, 76-80.
Hashimoto, M., et al., Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. J. Immunol., 177, 2006, 3162-3169.
Kinjo, Y., et al., Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-negative bacteria. Nature Immunol., 12, 2011, 966-974.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

川原一芳、*Enterococcus faecium* 由来グリセロ糖脂質の化学的性状、第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26 日～28 日、「長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)」₁、日本細菌学雑誌、70、2015、147.

尾之上さくら、川原一芳、乳酸菌由来リゾチーム可溶化ペプチドグリカンのサイトカイン産生活性、第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26 日～28 日、「長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)」₁、日本細菌学雑誌、70、2015、138.

6. 研究組織

(1)研究代表者

川原 一芳 (KAWAHARA, Kazuyoshi)
関東学院大学・理工学部・教授
研究者番号：20195126

(2)研究分担者

尾之上 さくら (ONOUÉ, Sakura)
関東学院大学・理工学部・講師
研究者番号：60214194

(3)研究協力者

金城 雄樹 (KINJO, Yuki)
国立感染症研究所・真菌部 部長

水口 裕紀 (MIZUGUCHI, Yuki)
関東学院大学大学院・工学研究科・博士前期課程・学生

高田 春比古 (TAKADA, Haruhiko)
東北大学大学院・歯学研究科・教授

多田 浩之 (TADA, Hiroyuki)
東北大学大学院・歯学研究科・講師

飯田 博一 (IIDA, Hirokazu)
関東学院大学・理工学部・准教授