

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350961

研究課題名(和文) プロバイオティック細菌由来成分による宿主免疫調節機構の解析

研究課題名(英文) Elucidation of immunomodulatory effects of probiotic bacterial components

研究代表者

橋本 雅仁 (HASHIMOTO, Masahito)

鹿児島大学・理工学域工学系・教授

研究者番号：30333537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プロバイオテック細菌のように経口で外部から摂取される細菌およびその成分が、腸管内で作用することで宿主の恒常性を維持し、免疫機能を改善することが知られている。またこれまでの我々の研究から、鹿児島特産の醸造酢である黒酢には酢酸菌由来の成分であるリポタンパク質とリボ多糖が含まれており、免疫調節に関与していることが示唆されている。本研究では、このうちのリボ多糖の化学構造を明らかにするとともに、リボ多糖が小胞として黒酢中に存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Probiotic bacteria and their bacterial components are known to keep the host homeostasis and modulate the host immune systems by interacting with intestinal immune cells. Previously we found that a traditional Japanese vinegar kurozu contains acetic acid bacterial components including lipoproteins and lipopolysaccharide, which are considered to contribute to host immune system modulation. In this study, we elucidated chemical structure of the lipopolysaccharide and found that the lipopolysaccharide exist as nano-sized vesicles in kurozu.

研究分野：複合新領域

キーワード：自然免疫 構造解析 酢酸菌 リボ多糖 外膜小胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には腸内フローラと呼ばれる数百種以上もの細菌が定着して常在細菌叢を形成している。これらの細菌は、消化の補助だけでなく、微量な栄養素の合成や、腸管免疫系の分化誘導等、ヒトの恒常性の維持に必須の機能を担っている。一方、外部から経口で腸管内に侵入する細菌が、ヒトの恒常性を調節することも知られている。例えば、感染型の食中毒細菌は腸管内で増殖して胃腸炎を引き起こし宿主の恒常性を破壊する。逆に、プロバイオティック乳酸菌等の細菌は、腸内フローラ構成の調節や、腸管免疫系のバランスの調節によって、宿主の恒常性を維持し、免疫機能を改善することが知られている。しかし、前者の機構は多くの研究によってかなり明らかになっているのに比べ、後者の機構についてはいまだに十分には解明されていない。

プロバイオティック細菌による免疫調節効果の代表として、I型アレルギー症状の緩和とウイルス感染への抵抗性の増大がある。これらの効果は、投与された細菌が宿主の免疫細胞を活性化することが原因であると考えられている。前者では、アレルギー患者体内で過剰なIgE抗体を産生する原因となる2型ヘルパーT細胞(Th2)の分化を抑制し、1型ヘルパーT細胞(Th1)や抑制性ヘルパーT細胞(Treg)の分化を促進することで、アレルギー症状を緩和することが示唆されている。また後者では、ウイルス感染細胞の排除を司るナチュラルキラー細胞(NK)を活性化することで、感染抵抗性を増大することが示唆されている。近年、これらの免疫細胞の機能は自然免疫系と呼ばれる宿主のシステムによって制御されていることが明らかとなってきた。自然免疫系は、自然免疫レセプターであるToll-like receptor (TLR) やNOD-like receptor (NLR) 等のレセプターが、宿主には通常存在しない分子である微生物特異的分子パターン(PAMPs)等を認識し、下流のシグナルを活性化することによって調節されている。例えば、細菌由来の非メチル化DNAは、TLR9を介して自然免疫を活性化することでTh1を誘導する。また、グラム陰性菌のリポ多糖(LPS)もTLR4を介してTh1を誘導する。プロバイオティック細菌は加熱死菌でも効果を示すことが知られていることから、細菌に含まれているPAMPsが腸管等で吸収され、宿主の免疫細胞に認識されることで、機能が調節されている可能性がある。

黒酢は鹿児島県特産の醸造酢であり、アレルギー症状を緩和しうるなど健康維持機能を持つことが知られている。これまでに我々は、黒酢からTLR2、TLR4を刺激する画分を分離し、それらがりボタンパク質およびLPS様成分であることを見出した。さらに黒酢醸

造に關する酢酸菌から、TLR4を介してTh1を誘導するサイトカインであるインターフェロン γ (IFN- γ)を誘導する新規の構造を持つLPSを分離することにも成功した。これらの分子はプロバイオティック細菌の機能性分子として働いている可能性がある。しかし、これらの分子がアレルギー症状緩和に働く際の関与細胞、反応場所などの詳細な機構はまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、プロバイオティック作用を示す細菌から分離した成分を用いて、その構造や性質について検討し、細菌成分がどのようにして宿主の免疫系を調節するかを明らかにすることを目的とする。具体的には、以前の研究で明らかになった免疫系を調節しうる酢酸菌由来成分の一つであるLPSについて検討する。一般的にLPSは、オリゴ糖の繰り返し構造を持つO抗原多糖とコアオリゴ糖とで構成される多糖部分と、活性中心であるリポドAと呼ばれる糖脂質が、3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo)で結合された構造を持つ。しかし酢酸菌由来LPSは、そのリポドAが大腸菌型の典型的なリポドAと構造が異なることがわかっている。そこで本研究ではまずその詳細な構造を明らかにする。また、LPSは水中でミセルを形成しており、ミセルの外部はO抗原多糖で覆われている。そのため、細胞への接着などの相互作用はO抗原多糖の構造による影響を受けると考えられる。そこでO抗原多糖の構造についても検討する。さらに、黒酢中にはLPS様成分が含まれているが、LPSは細菌の膜成分であり培養中の外部への放出量は少ないと考えられる。そこで黒酢中のLPSの存在状態についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細菌成分の分離

酢酸菌は、*Acetobacter pasteurianus* NBRC3283を用いた。細菌は、804培地(0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% glucose, 0.1% MgSO₄·7H₂O)を用い25℃で培養した。

LPS画分は、細菌を温水-フェノール法で抽出した後、疎抽出物をOctyl-Sepharoseを用いた疎水性クロマトグラフィーで精製して得た。リポドAは、LPS画分を弱酸加水分解し、疎水性成分を薄層クロマトグラフィーによって分離して得た。多糖画分は、LPS画分を強アルカリによって加水分解し、水溶性画分をSephadex G50を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって分離して得た。

外膜小胞(OMV)は、培養上清をメンブラ

ンフィルターでろ過後、超遠心分離によって分離し、さらに密度勾配遠心分離で精製して得た。

(2) TLR2、TLR4 活性化能の検討

TLR2 または TLR4-MD2 と NF- κ B 結合性ルシフェラーゼレポーターを強制発現した細胞を用いて、各サンプルで4時間刺激し、発光基質を添加し TLR 活性化能を検討した。

(3) 分析法

SDS-PAGE は Tris-glycine 法を用いて泳動した後、CBB 染色、銀染色、過ヨウ素酸酸化-銀染色を用いて可視化した。

タンパク質は、トリプシン消化後、MALDI-TOF-MS/MS 測定し、MASCOT データベース検索することで、同定した。

単糖は、アルジトールアセテートに誘導後 GC-MS で、または 4-aminobenzoic acid ethyl ester 化した後に HPLC で分析した。単糖の立体配置は、(S)-2-butyl グリコシド化後にアセチル化して GC-MS により決定した。

脂肪酸の種類は、メチルエステルに誘導後 GC-MS を用いて分析した。3-ヒドロキシ脂肪酸の立体配置は、(S)-phenylethylamide 化後さらにメチルエーテル化して GC-MS により決定した。

化学構造は、1次元、2次元 NMR および ESI-MS/MS データから解析した。

OMV の形態は、透過型電子顕微鏡 (TEM)、動的光散乱法 (DLS) を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 酢酸菌由来リポ多糖の構造解析

以前の研究から、LPS の活性中心であるリピド A の構造は概ね解明されており、新規の4糖構造に長鎖脂肪酸が5または6本結合していることがわかっている。また、Kdo ではなく D-glycero-D-talo-oct-2-ulosonic acid (Ko) を介して多糖部分に結合していることもわかっている。そこで本研究では、リピド A の詳細構造と多糖部分の構造について検討した。

リピド A は、単糖および脂肪酸の立体配置を検討して詳細構造を決定し、論文化した (発表論文参照)。

多糖部分は、まず LPS の分解法について検討した。Ko のケトシド結合は酸性加水分解されにくく、LPS 分解の際の常法である弱酸加水分解ではリピド A と多糖部分を分解することが難しい。そこでまず Ko のケトシド

結合を切断できる硝酸アンモニウムセリウムによる酸化分解を試みた。しかし、副反応が進行し多糖部分の収率が少ない結果となった。つぎに、強アルカリを用いた脂肪酸の加水分解によって多糖部分を得る方法を検討した。しかし、4 M KOH を用いて分解した場合、ほとんど多糖部分を得ることができなかった。これはピーリング反応によって、多糖の解重合が起こったものと考えられる。そこで、最後に NaBH₄ を添加して強アルカリ加水分解したところ、収率よく多糖部分を得ることができた。NMR を用いた解析の結果、多糖部分はグルコースとガラクトースからなる3糖の繰り返し構造であることがわかった (図1、論文作成中)。

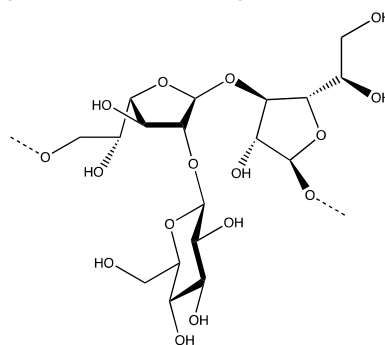


図1 O-抗原多糖の構造

そこで、LPS の抗原性について検討した。マウスに腹腔内免疫して血清中の抗 LPS 抗体量を検討したところ、2回免疫後に抗体量の上昇が観察され、抗原性を持つことがわかった。

(2) 酢酸菌由来外膜小胞の解析

グラム陰性菌は、外膜小胞(OMV)と呼ばれるナノ構造体を産生することが知られている。OMV は LPS や外膜タンパク質を含むことから、LPS は OMV として培地中に分散していることが考えられた。そこで、酢酸菌の OMV 産生について検討した。

酢酸菌を培養し TEM 観察したところ、培養2日目以降に OMV の産生が観察された。そこで、酢酸菌培養上清を超遠心分離したところ、培養3日目以降に OMV を回収できることが分かった (図2)。DLS による分析の結果、120nm を中心とした粒子径であることがわかった。糖含量を基準に OMV の回収量を比較したところ、培養7日目に最も多くの OMV を回収できることが分かった。ついで OptiPrep を用いた密度勾配遠心法により OMV を精製した。精製 OMV を SDS-PAGE で分離し、糖およびタンパク質を可視化したところ、精製 OMV が酢酸菌 LPS および外膜タンパク質を含むことがわかった。また酸性条件下でも安定に存在することもわかった。精製 OMV の TLR 活性化能を測定したところ、TLR2 を強く、TLR4 を僅かに活性化することが明らかとなった。これらの結果は、酢酸菌

が OMV を産生すること、また OMV がヒトの自然免疫系を調節しうることを示している。

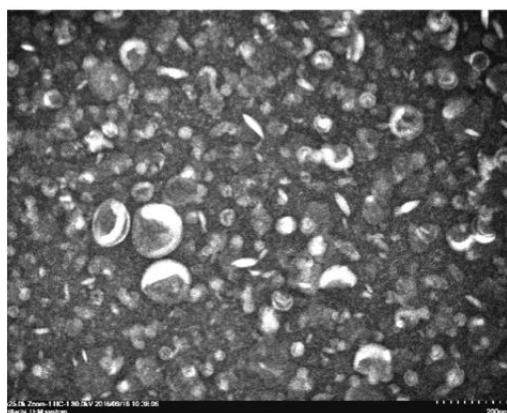


図2 酢酸菌由来 OMV の TEM 像

また、黒酢を同様に処理したところ、黒酢中にも酢酸菌由来 OMV と同様なナノ構造体が存在することがわかった(図3)。SDS-PAGE の結果から、酢酸菌の LPS と同様の成分を含むことも明らかとなった。また単糖分析の結果、酢酸菌 LPS と同様な O-抗原多糖を持つ可能性が示唆された。さらに黒酢由来ナノ構造体が、TLR2 および TLR4 を活性化することも分かった。以上の結果は、黒酢中の LPS 様成分は OMV として分散していることを示している(論文投稿中)。

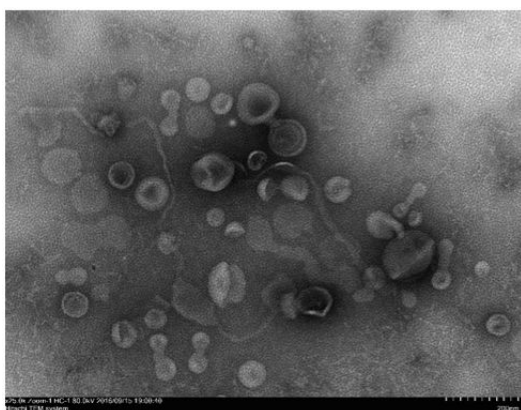


図3 黒酢中のナノ構造体の TEM 像

(3) まとめ

本研究では、黒酢のプロバイオティック作用を示す成分の候補として LPS に注目して、その構造と存在状態について検討した。その結果、黒酢中の LPS 様成分が OMV 用のナノ構造体として分散していることを明らかにした。一般に OMV はその大きから細胞に取り込まれやすく、宿主の免疫系を制御できることが知られている。そのため黒酢および酢酸菌由来の OMV も経口摂取することで腸管に到達して M 細胞などから取り込まれ、腸管免疫細胞と相互作用することが予想される。今後は、酢酸菌 OMV と腸管細胞の相互作用

や、その際の LPS の O 抗原多糖の影響などを検討し、黒酢の免疫調節作用を機構面から明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hashimoto M, Ozono M, Furuyashiki M, Baba R, Hashiguchi S, Suda Y, Fukase K, Fujimoto Y., Characterization of a novel D-glycero-D-talo-oct-2-ulosonic acid-substituted lipid moiety in the lipopolysaccharide produced by the acetic acid bacterium *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283. *J. Biol. Chem.* (査読有) 2016, 291(40), 21184-21194.

〔学会発表〕(計 3 件)

橋本雅仁、松元太一、馬場梨沙子、大園まみ、橋口周平、「酢酸菌由来外膜小胞の免疫刺激能」第 90 回 日本細菌学会総会、2017 年 3 月 21 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

橋本雅仁、「酢酸菌由来リポ多糖の構造と生物活性」かがわ糖質バイオフォーラム 複合糖質・糖鎖研究会、2017 年 1 月 11 日、e-とびあ・かがわ BB スクエア(香川県・高松市)

橋本雅仁、隅田泰生、深瀬浩一、藤本ゆかり、「酢酸菌由来リポ多糖の性質とそのリピド A 構造」第 22 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2016 年 12 月 3 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

〔図書〕(計 1 件)

橋本雅仁、馬場梨沙子、大園まみ、橋口周平、隅田泰生、深瀬浩一、藤本ゆかり、医学図書出版、エンドトキシン・自然免疫研究 20、2017/10 発刊予定(共著)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：免疫増強剤及びその製造方法

発明者：橋本雅仁

権利者：橋本雅仁

種類：特許

番号：特願 2017-27138

出願年月日：2017 年 2 月 16 日

国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 雅仁 (HASHIMOTO, Masahito)
鹿児島大学・理工学域工学系・教授
研究者番号： 30333537