

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：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850055

研究課題名(和文) 運動性を示す腸管由来Lactobacillus属細菌が持つべん毛の意義

研究課題名(英文) The importance of flagella for motile lactobacilli isolated from animal guts

研究代表者

梶川 揚申 (Kajikawa, Akinobu)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：30646972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：有べん毛乳酸菌の運動性や免疫学的特性を調べ、当該細菌特有の生態を探ることを目的として研究に着手した。Lactobacillus agilisの運動性欠失変異株は野生株よりもマウス腸管への定着性が低い傾向にあった。また、L. agilisの腸管由来成分に対する走化性も、腸管定着性に関与している可能性が示された。多くの有べん毛病原細菌とは異なり、L. agilisが持つべん毛の免疫学的活性は低く、炎症応答を誘導しにくいと考えられた。結論として、有べん毛Lactobacillus属細菌は宿主免疫系の過剰な刺激を避けつつ、運動性による積極的な移動により腸管粘膜への定着性を向上させているものと思われた。

研究成果の概要(英文)：The role of flagella exhibited by motile lactobacilli was investigated in this research. Non-motile mutant of Lactobacillus agilis showed less colonization or persistence at gastrointestinal tract in mice. Chemotaxis of L. agilis on gut-originated substances implied that the characteristics might help the bacteria to survive in the gut. Unlike flagella of many pathogenic bacteria, the flagellar protein of L. agilis is barely responsive to immune cells, which may be preferable as commensal bacteria. In conclusion, the flagella of motile lactobacilli likely contribute to the colonization in the gastrointestinal tract without eliciting inflammation of the host.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Lactobacillus べん毛 flagellin

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトを含む動物腸管には多種多様な細菌が棲息し、宿主と共生している。粘膜組織においては、粘液による物理的バリア、抗菌物質、免疫システムが存在するため、必ずしも細菌にとって穏やかな生育環境ではない。それぞれの細菌は独自の定着機構を発達させ、腸管に留まっていると考えられる。例えば、*Bifidobacterium* は線毛を持ち、腸管の上皮細胞へ結合することができる。*Bacteroides* は腸管粘膜多糖を資化することができるとともに、粘膜深くに潜り込み、腸管内でのプレゼンスを維持している。

(2) *Lactobacillus* 属細菌は、消化管、特に小腸において多く存在する非病原性細菌である。宿主にとって有益な効果をもたらすことが知られており、*Bifidobacterium* 属細菌と並んで最も好ましい共生細菌の一群と考えられている。多くの *Lactobacillus* 属細菌は運動性を示さず、菌体表面に粘膜結合因子と思われるタンパク質を複数持つ。これは、他の多くの腸内細菌同様、結合因子と粘膜組織との相互作用によって腸管に定着していることが示唆される。しかし、一部の *Lactobacillus* 属細菌はべん毛を有することが知られているものの、これまで例外的な存在と見做されてきたため、その生態についてはほとんど知られていない。これらの有べん毛 *Lactobacillus* は運動性を持たない他の同属細菌とは腸管内での生態や挙動が大きく異なる可能性もある。*Salmonella* や *Listeria* などの病原性細菌は鞭毛を持ち、宿主細胞側から管腔側へ流れる粘液のフローに逆らって、上皮細胞層まで効率よく到達すると考えられている。これは、宿主生体内への侵入を試みる上では非常に有効な手段である。一方で、上述の通り共生細菌の腸内定着に運動性は必須ではない。

Lactobacillus 属のものも含め、べん毛は宿主免疫細胞の Toll 様レセプター-5 (TLR5) により認識される微生物関連分子パターン (MAMPs) である。したがって、べん毛を持つことは、むしろ免疫システムからの排除を受けやすくなる可能性さえある。それにも関わらず、べん毛を持つ *Lactobacillus* 属細菌が共生細菌として安定的に腸管に存在し続けていることは興味深い。

(3) 腸管粘膜組織では宿主細胞と管腔が粘液層によって隔てられている。管腔内は食餌由来の内容物が蠕動運動により押し流されているため、細菌が永続的に留まることは困難であると考えられる。また、宿主上皮細胞近傍も免疫細胞が多数存在する上、ムチンに結合する細菌等の競合する常在菌も多く存在していると思われる。さらに、上皮細胞のターンオーバーが活発であるため、定着の足場としては不安定であるように思われる。一方、

粘液中層は比較的穏やかな環境であると考えられる。ただし、上皮細胞側からは粘液が恒常的に分泌されているため、管腔側に向かって押し流されるフローが存在する。そのため、能動的な運動能力を持たなければ、この領域に留まることは困難であると考えられる。また、粘液には宿主或いは競合細菌が産生する抗菌物質が含まれるが、これを回避するためにも運動性は有効であると思われる。

2. 研究の目的

有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌が、運動性によって宿主腸管への定着性を向上させているという仮説に基づき、その検証を行うこととした。選抜された有べん毛 *Lactobacillus* の運動性欠損変異株を作製し、*in vitro* と *in vivo* での評価系を用いて、野生株および変異株が示す腸管定着性、粘液中および抗菌物質存在下での走化性、抗体やサイトカイン解析による抗原性の解析を行う。これにより、運動性を示す腸管由来 *Lactobacillus* 属細菌がべん毛を持つ意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 動物腸管由来の有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌を分離するため、動物園または動物飼育施設から 120 種の糞便試料検体を収集した。べん毛関連遺伝子特異的プライマーを用いた PCR および軟寒天培地を用いた運動性試験により有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌のスクリーニングを行った。運動性がみられた酸生成桿菌について 16S rRNA 遺伝子配列の解析により菌種を推定した。

(2) ニワトリ由来の有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌、*Lactobacillus agilis* BKN88 (JCM 1048 派生株) のモータースイッチプロテイン (MotB) の 23 番目のアスパラギン酸をアラニンに変換した変異株 (D23A) を作製するため、変異型 *motB* 遺伝子を含む温度感受性プラスミド pG+host5 を用いた相同組換えによる当該菌株の形質転換を行った。作製された *motB* 変異株はシークエンス解析および運動性試験による検証を行った。また、ネガティブ染色後の菌体を透過型顕微鏡により観察し、べん毛の有無を確認した。

(3) 動物実験は、所属機関の動物実験倫理委員会の承認を受け、動物福祉の原則に基づいて行われた。抗生物質を用いた *L. agilis* の定着試験を行うため、*L. agilis* BKN88 および D23A 変異株をストレプトマイシン添加 MRS 寒天培地で培養後にコロニーを形成した耐性変異株を取得した。ストレプトマイシン添加飲水を与えた雌の Balb/c マウスへそれぞれの耐性菌株 10^8 cfu を胃内投与し、経日的に排泄される菌数を測定した。1 カ月経過後、ストレプトマイシンを除いた飲水を与え、同様に糞便中の菌数を計測した。ノトバイオトにおける定着試験は、三協ラボサービス株

式会社において行われた。無菌的に飼育された雌の Balb/c マウスへ 10^8 cfu の *L. agilis* BKN88 および D23A 変異株を投与し、定着させた。1週間毎に糞便を回収し、菌数を測定した。1カ月の飼育後、腸管を回収し、内容物および粘液層における菌数を測定した。

(4)*L. agilis* BKN88 における走化性は Tso と Adler および Worku らの方法により行った。腸管に存在すると思われる13種の物質をそれぞれリン酸緩衝液に溶解させ、一定量をガラスキャピラリーに入れた。これを菌体懸濁液中へ挿入し、一定時間後にキャピラリー内に存在する菌数を計測した。測定した菌数を、リン酸緩衝液を用いた対照実験の菌数と比較し、走化性の程度を Chemotaxis index = CFU (試験物質) / CFU (緩衝液) の式により算出した。

(5)Genbank に公開されている *L. agilis* の運動性関連遺伝子群の配列情報を参考に、*L. agilis* BKN88 のフラジェリン遺伝子配列を解読し、2つ存在するフラジェリン遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。また、*L. agilis* BKN88 のべん毛を、超遠心分離により精製し、SDS-PAGE による分離後、CBB 染色と PAS 染色を行った。さらに、MALDI-TOF MS 解析および PMF 解析により検出されたバンドを同定した。

(6)ヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞を *L. agilis* BKN88 由来のフラジェリンで刺激し、放出された IL-8 を ELISA により測定した。また、大腸菌でのクローニングにより精製した組換えフラジェリンも作製し、同様の実験に供した。

4. 研究成果

(1)哺乳類および鳥類から収集した糞便サンプルより有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌の分離を行った結果、11種の動物から合計37株を取得することができた。哺乳類ではブラジルバク、ラマ、ウマ、ブラウンレムールなどから、鳥類ではクジャク、シチメンチョウ、アローカナ、ニワトリなどから分離された。ウマから分離され、16S rRNA 遺伝子配列から *Lactobacillus ruminis* と推定された2株以外は、全て *Lactobacillus agilis* と推定された。運動性を示す *Lactobacillus* 属細菌が分離されなかった糞便サンプルの中には、べん毛関連遺伝子群特異的プライマーを用いた PCR でバンドが検出されたものも多かった。そのため、今回用いた手法では分離できなかった菌株もまだ多く存在する可能性が考えられた。

(2)運動性が宿主への定着性に関与するかどうかを評価するため、運動性のみを欠失した変異株の作製を試みた。MotB タンパク質のアミノ酸置換により運動性を失った変異株を取得することができた(図1)。また、この

変異株はべん毛構造を維持していることが、電子顕微鏡観察により確認された。

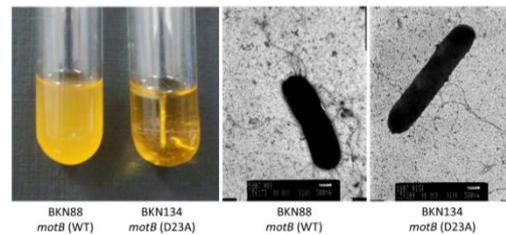


図1. 運動性を欠失した変異株の構築
L. agilis BKN88 (野生株) と D23A (運動性欠失変異株) を軟寒天 MRS 培地に接種し、運動性の有無を観察した(左)。べん毛の有無を透過型電子顕微鏡により観察した(右)。

(3)*L. agilis* BKN88 を通常の飼育条件下で飼育された Balb/c マウスへ胃内投与したところ、2日以内に全て排泄され、定着は見られなかった。そこで、ストレプトマイシンにより腸内細菌の生育を抑制させた状態で、ストレプトマイシン耐性を付与した運動性および非運動性 *L. agilis* 菌株を投与し、糞便中の菌数を定期的に計測したところ、定着が確認された(図2)。この定着性は抗生物質の投与を中止すると失われた。糞便中の *L. agilis* 菌数は不安定であったが、全体的に運動性を示す菌株の方が菌数が多い傾向にあった。

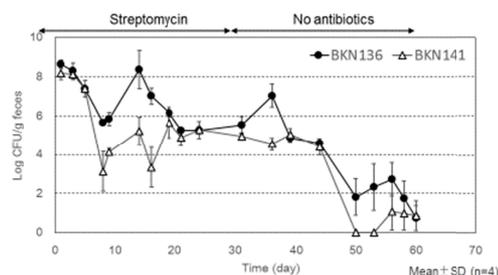


図2 抗生物質を用いたマウスへの *L. agilis* 定着性試験

ストレプトマイシン耐性を付与した運動性 *L. agilis* (BKN136) と非運動性 *L. agilis* (BKN141) を0日目に胃内投与し、経日的に糞便を回収し、菌数を計測した。1群4匹の平均値と標準誤差を表示した。

(4)抗生物質を使用した定着性試験では、糞便から検出される菌数が不安定であり、薬剤耐性菌の影響も考えられるため、ノトバイオマウスを用いた定着性試験による評価も行った。無菌マウスへ定着させた *L. agilis* は試験期間を通して安定的に高い菌数を維持していることが示された(図3)。2群間における糞便中の菌数に差は無く、競合する腸内細菌の非存在下では、運動性の有無が定着性に影響しないことが示唆された。一方、腸管粘膜組織における局在を調べた結果、回腸

の粘液層においてより多くの運動性 *L. agilis* が検出されたことから、運動性が粘液層への進入や残留性の向上に寄与している可能性が示唆された。

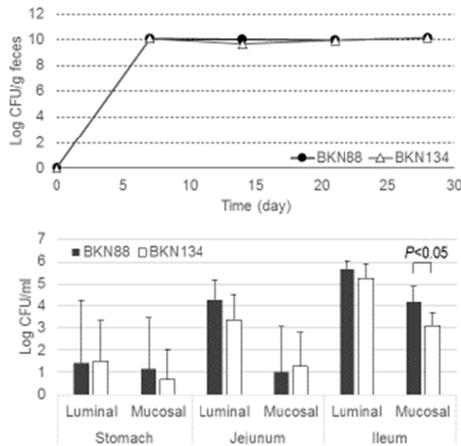


図3 . ノトバイオトマウスを用いた定着性試験
運動性 *L. agilis* (BKN88) と非運動性 *L. agilis* (BKN134) を0日目に胃内投与し、経日的に糞便を回収し、菌数を計測した(上)。胃および小腸を摘出後、管腔内の内容物中の菌数と、粘液洗浄液における菌数を計測した。1群4匹の平均値と標準誤差を表示。Student's T-test による有意差検定を行い、危険率5%未満をもって有意とした。

(5) 動物腸管に存在する物質について *L. agilis* BKN88 が走化性を示すかどうかを調べた。その結果、腸内細菌が産生し得る有機酸3種と殺菌作用をもつ胆汁成分のデオキシコール酸塩に対しては負の走化性を示す一方、粘液の主成分であるムチンを構成する N-アセチルグルコサミンに対しては正の走化性を示すことが明らかとなった(図4)。これは競合する腸内細菌や毒性の高い胆汁酸から逃れることで生存性を向上させる働きと、粘膜への親和性を高めることによる定着性の向上に寄与している可能性を示唆するものであった。

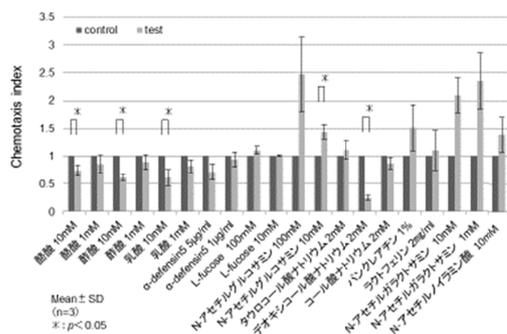


図4 . *L. agilis* BKN88 における走化性試験各試験物質を含むキャピラリー内の菌数 (test) を緩衝液のみを含むキャピラリー内の菌数 (control) に対する相対値として表示した。3回の独立した試験の平均値と標準偏差を表示した。Student's T-test による有意差検定を行い、危険率5%未満をもって有意とした。

(6) 超遠心分離により回収したべん毛を SDS-PAGE により解析した結果、フラジェリンと思われるバンドが2本検出された(図5)。このバンドを切り出して MALDI-TOF MS および PMF 解析を行ったところ、どちらもフラジェリンタンパク質であることが確認された。遺伝子発現解析の結果、2コピー存在するフラジェリン遺伝子はどちらも発現しており、検出されたタンパク質はそれぞれの遺伝子に由来するものであることが示唆された。また、フラジェリン遺伝子の近傍領域にはグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子が複数存在することから、*L. agilis* のフラジェリンタンパク質は糖鎖修飾を受けていることが予想された。PAS 染色の結果、これらのフラジェリンタンパク質は糖鎖と結合していることが示唆された。

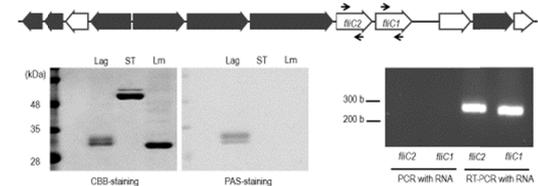


図5 . *L. agilis* BKN88 のフラジェリン遺伝子発現およびタンパク質の検出
L. agilis のフラジェリン遺伝子近傍領域(上)小矢印は RT-PCR のプライマーを示す。RT-PCR によるフラジェリン遺伝子 (*fliC1*, *fliC2*) の発現(下右)。SDS-PAGE および CBB/PAS 染色(下左)。*L. agilis* 由来べん毛 (Lag) と、比較対象として *Salmonella Typhimurium* 由来 (ST)、*Listeria monocytogenes* 由来 (Lm) のべん毛を用いた。

(7) 前述の方法で精製したフラジェリンの免疫学的活性を調べたところ、サルモネラ菌やリステリア菌由来のフラジェリンと比較して、著しく低いことが明らかとなった。この理由として、TLR5 が認識する保存性の高いアミノ酸配列において、*L. agilis* 由来のフラジェリンでは3か所(88番目のアスパラギン、213番目のロイシン、233番目のグリシン)のミスマッチが存在しているためである可能性が考えられた。*L. agilis* は病原体とは異なる TLR5 認識配列を含むフラジェリンを持つことで、宿主免疫系を過剰に刺激することがないものと思われた。

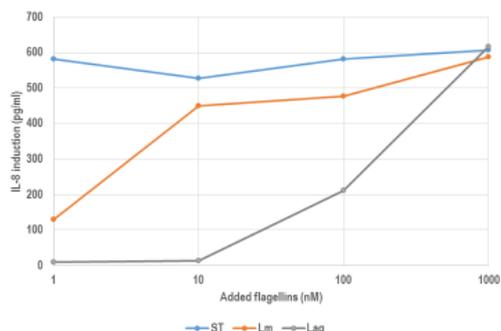


図6 各フラジェリンのTLR5を介したCaco-2細胞からのIL-8産生誘導試験

Caco-2細胞に濃度を変えた各フラジェリンを添加し、IL-8産生誘導能を調べた。使用したフラジェリンタンパク質を以下に示す。*L. agilis*フラジェリン(Lag)、サルモネラ菌由来フラジェリン(ST)、リステリア菌由来フラジェリン(Lm)

(8)結論として、動物腸管由来の有べん毛乳酸菌 *Lactobacillus agilis* は運動性を発揮することによって腸管粘膜局所において定着性を向上させている可能性が考えられた。これには、腸管由来物質に対する走化性の影響も示唆された。一方、*L. agilis* が持つべん毛はTLR5により認識されにくいアミノ酸配列を持つことにより、過剰な免疫応答を惹起しないことも示された。以上の諸性質により、有べん毛乳酸菌は宿主との共生関係を築いているものと考えられる。

<引用文献>

- Turrone et al. 2013 PNAS 110:11151
 Sonnenburg et al. 2005 Science 307:1955
 Lee et al. 2013 Nature 501:426
 Tassell et al. 2011 Nutrients 3:613
 Tso and Adler. 1974 J. Bacteriol 118: 560-576
 Worku et al. 2004 J. Med. Microbiol 53: 807-811

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 1件)

Kajikawa A., Midorikawa E., Masuda K., Kondo K., Irisawa T., Igimi S., Okada S. Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. *BMC Microbiol.* 2016 Mar 22;16:49. (査読有)(doi: 10.1186/s12866-016-0667-x.)

[学会発表](計 5件)

藤田公紀、横田健治、五十君静信、梶川揚申 遺伝子検出法を用いた動物腸管

由来運動性 *Lactobacillus* 属細菌の探索
 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 17 日 ~ 20 日、京都女子大学 (京都府・京都市)

近藤和穂、横田健治、五十君静信、梶川揚申 *Lactobacillus agilis* BKN88 における走化性の解析 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 17 日 ~ 20 日、京都女子大学 (京都府・京都市)

Akinobu Kajikawa, Kazuya Masuda, Kazuho Kondo, Tomohiro Irisawa, and Shizunobu Igimi. Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. 6th ASM Conference on Beneficial Microbes. Sep 9-12, 2016. Motif Seattle Hotel (Seattle, WA, USA)

鎌田美帆、田中尚人、岡田早苗、梶川揚申 運動性を示す *Lactobacillus agilis* のマウス腸管への定着と局在 日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27 日 ~ 30 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

梶川揚申、緑川恵美子、近藤和穂、入澤友啓、榊田和彌、五十君静信、田中尚人、岡田早苗 *Lactobacillus agilis* BKN88 のべん毛におけるフラジェリンの構成 日本乳酸菌学会 2015 年度大会、2015 年 7 月 11 日 ~ 12 日、和洋女子大学 (千葉県・市川市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶川 揚申 (KAJIKAWA, Akinobu)
 東京農業大学・生物応用化学科・准教授
 研究者番号: 30646972