

抗炎症性乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* YK-23株菌体表層タンパク質の抗炎症メカニズム解明に関する研究

金 内 誠

宮城大学食産業学部フードビジネス学科 准教授

緒 言

ヒトの腸内には、数百種類以上、約100兆個に及ぶ細菌が生息し、これらの細菌の中には、炎症を誘発するLPS (lipopolysaccharide) を含むグラム陰性細菌も存在する。このLPSは、糖鎖部位から成るコア多糖とO-抗原、脂質部位からなるリポドAから構成されており、LPSの毒素活性の中心はリポドAである¹⁾(Fig. 1)。

LPSの毒性消去物質として、乳由来のラクトフェリン(LF)が知られる²⁾。LFは哺乳動物の乳に含まれ、牛乳では生乳で0.1~0.4 mg/mL含まれているが、LFは、加熱殺菌により容易に失活する³⁾。さらに、日本を含むアジア地域の人々は乳糖不耐症の割合が高いため、乳由来の食品による大量摂取は困難である⁴⁾。そこで乳由来に代わるLPS消去効果物質が求められる。

これまでKondoら⁵⁾は、炎症物質消去乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* AK23株を分離し、細胞壁に消去タンパク質が局在することを報告した。しかし、AK23株のLPS消去に関するタンパク質の同定には至っていない。

そこで、本研究では乳酸菌AK23株のLPS消去タンパク質の分離およびシーケンスを行い、同定を行うこととした。また、LPS消去時のLPS構造中のリポドA脂肪酸と糖鎖部位の挙動についても検討した。

実験方法

1. AK23株の培養法

乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* AK23株は、GYP培地 (1% Glucose、1% Yeasts extract、0.5% Peptone、1% Tween80 solution、0.5% Salt solution; Tween80 solutionは50 mg/mL水溶液、Salt solutionは蒸留水1 mL中にMgSO₄·7H₂O 40 mg、MnSO₄·4H₂O 2 mg、FeSO₄·7H₂O 2 mg、NaCl 2 mg) にて30℃、24時間培養を行った。

2. LPS消去タンパク質 (LEP; LPS Eliminating Protein) の分画

菌体の分画方法は、口分田⁶⁾の方法を一部改変して行った。すなわち、培養後の菌体 (0.3 g) は、10 mLのリゾチーム (1 mg/mL) にて、37℃で16時間処理した。これを遠心分離し、上清を細胞壁画分とした。この画分を凍結乾燥させ、10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.2) に再溶解した。この画分を300 kDaの遠心ろ過デバイス (CD300C34、日本ポール株式会社) にて分画し、通過画分を得た。さらにこの通過画分を100 kDaの遠心ろ過デバイス (CD100C34、日本ポール株式会社) にて分画し、LPS消去タンパク画分を得た。分画方法のフローチャートはFig. 2に示した。

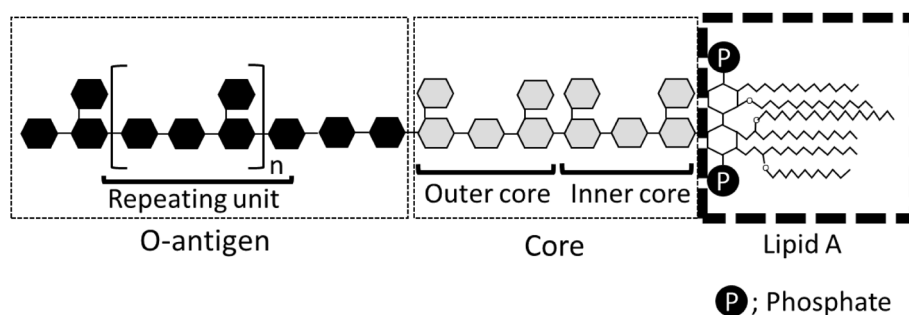


Fig. 1 リポ多糖の構造

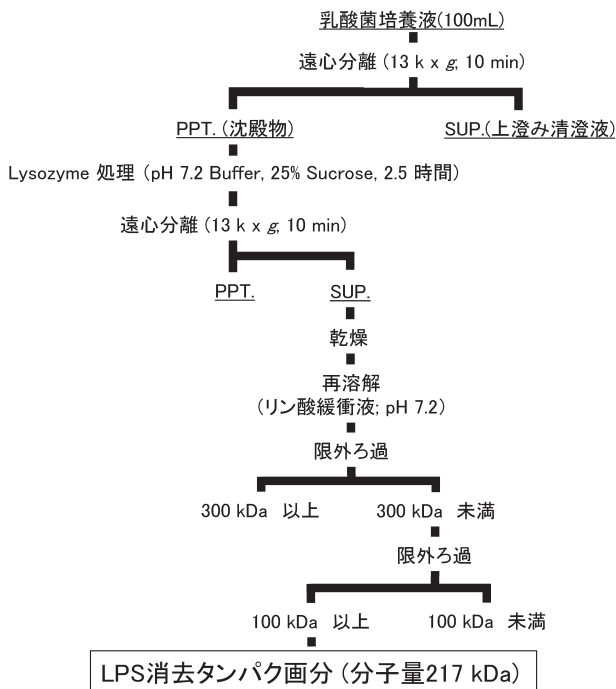


Fig. 2 *P. pentosaceus* Y-23 strainsの細胞の分画方法

各画分 (150 μ L) は、エンドトキシン溶液を加え、15 $^{\circ}$ Cで反応後、エンドトキシン消去活性を測定した。

3. LPS量測定方法

LPS量の測定は、リムスカラー KY テストワコー (和光純薬工業) を用いた比色法により行った。すなわち、LPSを含むサンプルをリムスカラー試薬とマイクロプレートリーダーで測定した。

4. LEPによるLPS消去活性測定法

得られたLPS消去タンパク質溶液 (150 μ L) は、50 μ LのLPS (O18, 1.0 μ g/mL) へ添加し、15 $^{\circ}$ C、24時間反応させた。その後、混合液のLPS量をリムスカラー KY テストワコー (和光純薬工業) にて測定した。LPS消去活性の1Uは、1時間に1.0 (μ g/mL) のLPSを1%消去する能力をもって示した。

5. Blue-Native PAGE

Wittingら⁷⁾のBlue-Native PAGE法によった。ゲルはNative PAGE Novex、3-12% Bis-Tris Protein Gels (ライフテクノロジー社) を用いた。泳動緩衝液はNative PAGE Running Buffer (20X) およびNative PAGE Cathode Buffer Additive (20X) (ライフテクノロジー社) を用いた。LEP分画 (10 μ L) を4 \times Sample Buffer (5 μ L)、5% G-250 Sample Buffer (1 μ L) と混合し、蒸

留水を加え、全量20 μ Lとした。各ウェルに5 μ Lずつ注入し、150 V、100分、500 mA、80 Wの条件で泳動を行った。

6. LEPのホモロジー解析

Blue Native PAGEで得られた217 kDaのバンドは、滅菌メスで切り出し、LC/MS/MSによるプロテオーム解析によってタンパク質同定した。分析は、株式会社日本プロテオミクス社に委託した。また、得られたペプチド断片のアミノ酸配列は、BLAST⁸⁾を用いてホモロジー解析を行った。

7. 分散剤によるLEPのLPS消去への影響

LPS消去タンパク質溶液 (150 μ L) と50 μ LのLPS (O18, 1.0 μ g/mL) にLPS分散剤 (PYROSPERSE、ロンザジャパン株式会社) を、1/200 (v/v%) 添加し、15 $^{\circ}$ C、24時間反応させた。その後、混合液のLPS量を測定した。対照は、LPS消去タンパク質およびLPSを含まない緩衝液を用いた。

8. AK23株による各O抗原LPSの消去

AK23株は、1.0 (μ g/mL) の大腸菌LPS (O18; LPS 410, O111; LPS 420, Glycobiotech GmbH社)、大腸菌 O26 (120-05131, 和光純薬工業) を含むGYP培地にて30 $^{\circ}$ C、24時間培養した。培養後、1 M炭酸ナトリウム溶液にてpH 7.0に調製し、LPS (エンドトキシン) 量を測定した。

9. LPS分解物の測定

LPSから遊離した脂肪酸の測定は、エンドトキシンの試験法⁹⁾を一部改良して行った。すなわち、LEPによって作用させたLPSにクロロホルム-メタノール (2:1) 2 mLを加え抽出した。得られた脂肪酸は、シリル化剤 (ビストリメチルシリルアセトアミド; 和光純薬工業株式会社) 50 μ Lを加えて60 $^{\circ}$ Cで20分間反応させた。また、水層の糖も60 $^{\circ}$ Cで窒素ガスを吹き付け濃縮乾固し、シリル化剤にてシリル化した。脂肪酸と糖の測定は、GCMS-QP2010 (島津製作所)、カラムは、HP-5 (Length: 30 m, ID.: 0.32 mm, Film: 0.25 μ L) を使用し、キャリアガスにはヘリウムガスを使用した。分析条件はTable 1に示した。

結果および考察

1. LPS消去タンパク質 (LEP) の単離

まず、Fig. 3に従いLPS消去能が高い *Pediococcus pentosaceus* AK23株の細胞を菌体外画分、細胞壁消化画分、細胞質画分、細胞膜画分の4つに分画した。細胞画分の活性および精製工程の活性と収率はTable 2に示した。その結果、細胞質画分と培養上清画分は、LPS量消去活性が見られなかった。一方、細胞壁画分は、LPS消去活性が最も高く、15.6 (U/mL) であった。また、細胞膜画分のLPS消去活性は3.0 (U/mL) であった。次に、この細胞消化画分を、限外ろ過膜によって画分した。限外ろ過300 kDa未満の画分に強い活性が見られ、12.2 (U/mL)、比活性で、1.23 (U/mg) まで上昇した。さらに、分画分子量100 kDaで画分の結果、100 kDa以上の画分に強い活性が見られ、10.8 (U/mL)、比活性で、9.87 (U/mg) と純度の高いLEPが得られた。この時の収率は、比活性で19倍まで上昇することができた。

次に、これらタンパク質をBlueNativePAGEにて確認したところ、200 kDaのタンパク質のバンドと150 kDaのタンパク質のバンドが検出された (Fig. 4)。これまでKondoら⁵⁾は、150 kDa以下には活性がないことを報告した。そこで、200 kDaのLEPをアミノ酸シーケンス後に、ホモロジー解析を行った (Table 3)。LC/MS/MS

で、LEPの断片のペプチドを解析した結果、56%の相同性で、DnaK/DnaJ chaperonesの一部のATP-binding subunit of Clp proteaseと一致した。さらに、これらは、DnaKの一部としてHSP70のシャペロンとして作用することが知られ¹⁰⁾、HSP70は、熱ストレスだけでなく、非ストレス環境下においても多く存在する¹¹⁾。また、HSP70は、LPSと特異的に結合する¹²⁾。このタンパク質の疎水性残基に、LPSリポドAの疎水領域が結合していることが考えられた。

2. LPS消去タンパク質 (LEP) の特性

このLEPのLPSのO抗原の違いによるLPS消去の違いを検討するために大腸菌O18、O26、O111由来のLPS

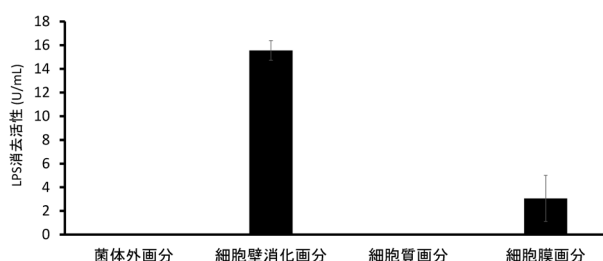


Fig. 3 AK23株の細胞分画によるLPS消去活性

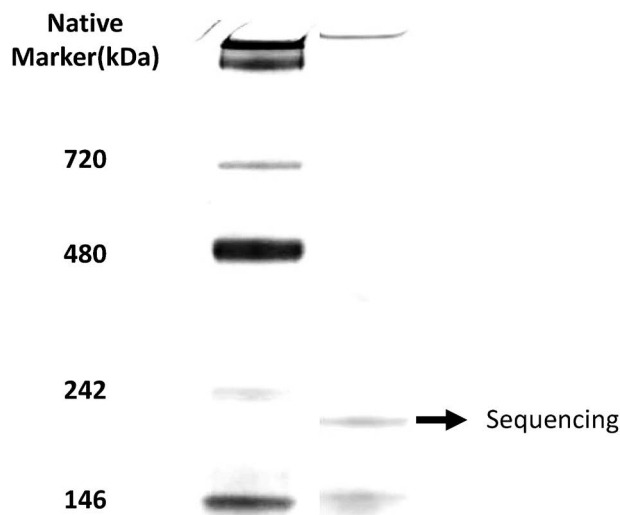


Fig. 4 LEP (LPS消去タンパク質) のBlue-Native PAGE

Table 1 脂肪酸及び糖類の分析条件

Injection temp	170°C
Evaporating temp	280°C
Injection mode	Split less
Control mode	Pressure (99.8 kPa)
Total flow	139.9 mL/min
Column flow	2.69 mL/min
Linear velocity	62.7 cm/s
Purge flow	3.0 mL/min
Injection	5 μ L
Oven program	170°C (5 min hold) \rightarrow 2.5°C/min \rightarrow 240°C (5 min hold)
【MS】	
Ion source temp	260°C
Interface temp	260°C
Measure mode	SCAN (m/z 50~1000)

Table 2 単離工程におけるLPS消去タンパク質の収率

	消去活性 (U)	タンパク質量 (mg)	容量 (mL)	比活性 (U/mg)	精製倍率 (回収率; %)
細胞壁消化画分	15.6	30.3	10.0	0.52	1 (100)
限外ろ過画分					
300 kDa未満	12.2	9.9	5.0	1.23	2.38 (39.1)
100 kDa以上	10.8	1.1	1.0	9.87	19.0 (6.96)

1.0 μ g/mLのエンドトキシンから1時間当たり1%減少させる量を1Uとした。

Table 3 LESのアミノ酸シーケンス

AK23	YL	VNGQSLTPDEF	AOYR	-----	17					
Clp protease ATP-binding subunit	YL	VNGQSLTPDEF	AOYRATGKLP	EQAKTIEVSKD	GGQALKKGGILEKLG	TNLTEQARDGL	95			
AK23	-----	ENEIQ	ETAEILSR***	NNPIL	VGDAGV	GKTAIVEGL	AQAV	VNGK-----	DKE	61
Clp protease ATP-binding subunit	LDSV	IGRENEIQ	ETAEILSR	TKNNP	ILVGDAGV	GKTAIVEGL	AQAV	VNGKVPEA	IRDK	155
AK23	I	YSIDLSSLEAGT	QYRGSFEENIKDLVK	---AAGNI	ILFFDEI	HQI	IGTGST	GGEDGGK	---	117
Clp protease ATP-binding subunit	I	YSIDLSSLEAGT	QYRGSFEENIKDLVK	EVKAAGNI	ILFFDEI	HQI	IGTGST	GGEDGGK	---	215
AK23	-----	GELTV	IGATTQDEYR	-----	132					
Clp protease ATP-binding subunit	LADI	IKPALSRGELTV	IGATTQDEYRNT	ILKNAALARRF	NDVVVNEPNAEDT	LEIL	LGKIK	---	275	
AK23	-----	ATVDYSI	QYIPQR	-----	169					
Clp protease ATP-binding subunit	NLYE	HHHVKL	PDDV	LKATVDYSI	QYIPQRTL	PKAIDL	IDMTAAHLAAHQ	PENDETAL	---	335
AK23	-----	KKEEV	VATVDDVAGS	VERLT	---	189				
Clp protease ATP-binding subunit	EKL	NQLQKEK	DQAVEKEDFK	RAADLKQ	QIEATNKQ	IDNVGK	KKEEV	VATVDDVAGS	VERLT	395
AK23	G	IPVSDMGANDIER	-----	VIGDE	AVAMVA-----	RAGF	SEGEQPI	GSFLFV	---	232
Clp protease ATP-binding subunit	G	IPVSDMGANDIER	ERLKDLSRL	KSKVIG	DEAVAMVA	IRRN	RAGF	SEGEQPI	GSFLFV	455
AK23	G	PTGVG	-----	KL	IGTSAGY	VGYDDNS	NLTL	---	258	
Clp protease ATP-binding subunit	G	PTGVG	KTALAKQLAL	DMFGDKDAI	IRLDMSEY	SDRTAVSKL	IGTSAGY	VGYDDNS	NLTL	515
AK23	E	---RNPYSI	VLLDEIEK	-----	---	LTDG	GNVINF	KNTII	IATSNAGFG	298
Clp protease ATP-binding subunit	ERV	RRNPYSI	VLLDEIEKADP	QVLTLL	LQVMDG	GRLLTDG	GNVINF	KNTII	IATSNAGFG	575
AK23	NE	-----	KLAPFF	RPEFLNRF	NGIVEF	SHLT	---	---	---	325
Clp protease ATP-binding subunit	NE	KL	TGADK	QDTLMDKLAPFF	RPEFLNRF	NGIVEF	SHLT	---	---	616

Accsetion No. ; WP_002833100.1, Honology; 56%

Accsetion No.; WP_002833100.1, Honology; 56%

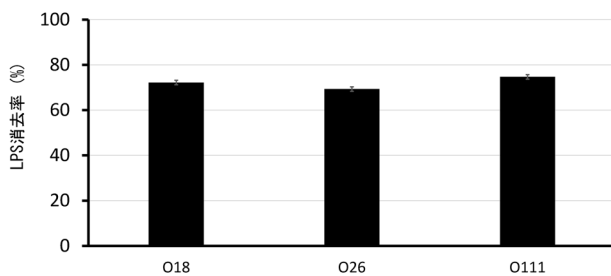


Fig. 5 AK23株による抗原種のことなる大腸LPSの消去率

を用いて、LEPのLPS消去率を検討し、結果をFig. 5に示した。その結果、24時間中にLEPは、大腸菌O18由来LPSに対して72.2%の消去活性を示し、また、大腸菌O26由来LPSに対して69.3%の消去活性を示した。さらに、大腸菌O111由来LPSに対しては、74.7%のLPS消去能が見られた。このようにO抗原の違いによる消去率の差異は認められなかった。これは、本来毒素中心であるリポDに作用するためではないかと推察された。つぎにLPSの作用特性について検討するために、吸着および分解について検討した。LPS吸着阻害剤による消去への影響はFig. 6に示した。分散剤無添加のものの相対活性を100%として示した。その結果、分散剤を添加した試料溶液のLPS消去率は88%と無添加と比べ約10%低い傾向が見られた。本LEPは、結合阻害剤では、LPS消去能は低下せず、分解などにより消去活性すると考えられた。

LPSはO抗原とコア多糖からなる糖鎖部位と、リポDから構成されている。そこでLEPによるLPSからの

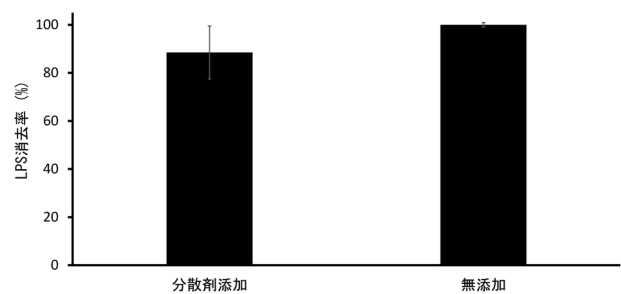


Fig. 6 LPS分散剤によるLPSとLESの結合阻害によるLPS消去への影響

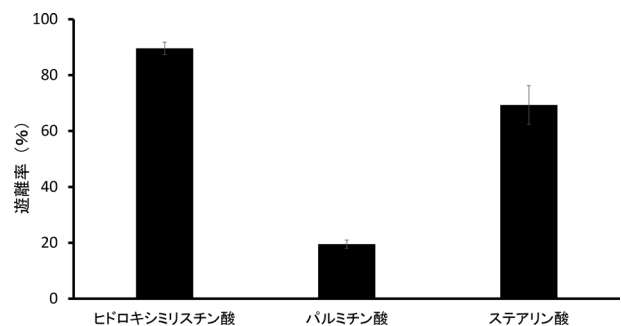


Fig. 7 大腸菌O18由来LPSからの遊離脂肪酸

脂肪酸と糖の遊離について検討した。結果はFig. 7に示した。LEPを作用させたところ、LPSからは、ヒドロキシミリスチン酸は89.6%、パルミチン酸は19.5%、ステアリン酸は69.3%と構成脂肪酸、特に構成脂肪酸率の高いミリスチン酸が遊離していた。

LPSに塩酸を加え、酸分解させた結果、グルコース、ガラクトース、ラムノース、リボース、グルコサミンが

検出された（データ未提示）。これはBomanとMonner¹³⁾やMorrisonとLeive¹⁴⁾とは、構成する糖の種類が異なった。次にLEPにLPSを作用させた結果、グルコースが91%遊離した（データ未提示）。一方、グルコサミンやペントースのリボースの遊離は確認できなかった。このようにLEPは、グルカン鎖の加水分解活性を持ち、LPSを不活性化することが考えられた。一般に、これらLEPとしてのHSPは、ATP hydrolaseに属する酵素である¹⁵⁾。また、一般に大腸菌型LPSのリピドAは、糖鎖骨格にリン酸が結合し、さらに、ヒドロキシミリスチン酸は、LPS中で、アミド結合およびエステル結合した構造を有する¹⁶⁾。また、井口ら¹⁷⁾は、LPSの毒素活性にはリピドAに結合するアミド・エステル両結合脂肪酸の存在が不可欠であることを報告している。

よって、これらの分解によって活性が低下したと考えられた。今後は、本酵素のアミドやエステル、さらにリン酸への結合への分解活性についてさらに詳細に検討する予定である。

要 約

1. *Pediococcus pentosaceus* AK23株のLPS消去物質は細胞壁成分から限外ろ過膜を用い、LPS消去タンパク質（LEP; LPS Eliminating Protein）を分離した。
2. LEPは、217 kDaのタンパク質で、DnaK/DnaJ chaperonesの一部のATP-binding subunit of Clp proteaseと一致した。さらに、これはLPS吸着性のあるHSP（Heat Shock Protein）の一部でもあった。
3. LEPは、大腸菌O18、およびO26、O111由来のLPSに対しても高い消去能が見られた。また、LEPは、

吸着だけによる毒素消去でないことが示唆された。

4. LPSの構成主成分であるミリスチン酸やグルコースを分解・遊離することで、その活性が阻害された可能性が考察された。LEPは、LPSリピドA構成脂肪酸やグルカン鎖を分解し、LPS消去作用することが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) C. Galanos C., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **148**, 1-5, 1985.
- 2) B. J. Appelmek, et al.: *Infect. Immun.*, **62**, 2628-2632, 1994.
- 3) 織田浩嗣: *Milk Science*, **61**, 105-109, 2012.
- 4) 佐久間慶子: 女子栄養大学紀要, **42**, 19-24, 2011.
- 5) A. Kondo, et al.: *J. Food Sci.*, **81**, 1457-1465, 2016.
- 6) 口分田晃: 岡山医学会雑誌, **96**, 757-765, 1984.
- 7) I. Witting, et al.: *Nature Protocols*, **1**, 418-428, 2006.
- 8) National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- 9) 河西信彦: エンドトキシンの試験法（日本細菌学会教育委員会編）, pp. 88-87, 業根出版, 1990.
- 10) M. P. Mayerほか: 蛋白質核酸酵素, **47**, 1189-1195, 2002.
- 11) 呂井利奈: 歯基礎誌, **40**, 528-541, 1998.
- 12) M. F. Tsan, B. Gao: *J. Leukocyte Biol.*, **85**, 905-910, 2009.
- 13) H. G. Boman, D. A. Monner: *J. Bacteriol.*, **121**, 455-464, 1975.
- 14) D. C. Morrison, L. Leive: *J. Biol. Chem.*, **250**, 2911-2919, 1975.
- 15) K. Richter, et al.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 11301-11311, 2006.
- 16) K. Tanamoto: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **126**, 19-33, 2008.
- 17) 井口毅裕ほか: 日本細菌学雑誌, **44**, 805-812, 1989.