

# 付着性乳酸菌のIgA産生を誘導する細胞壁成分の構造解析と 接着関連分子の機能評価

山崎 思乃

関西大学化学生命工学部 助教

## 緒言

「食」は我々にとって毎日欠くことのできない栄養源であるが、最近では、健康意識の高まりから「食」の機能が注目されている。中でも、発酵食品などに含まれる乳酸菌は、我々の健康に有益な生体調節作用を示すことから、プロバイオティクス菌として幅広い世代に利用されている。

乳酸菌が示す生体調節作用のひとつに免疫賦活作用がある。食餌成分が直接作用する腸管が、単なる消化吸収のための器官ではなく、全身の60%の免疫細胞が集まる最大の免疫器官であることから、「食」による免疫系の制御が期待されている。この腸管に発達した粘膜免疫系(腸管免疫系)において特徴的な分泌型IgA抗体は、粘膜上で病原体に結合することで、病原体の侵入および感染防御にはたらく。したがって、腸管IgA産生を誘導するプロバイオティクス菌の摂取は病原体の感染予防の観点から効果的であり、すでにIgA産生を増強する乳酸菌株やビフィズス菌株は数多く報告されている<sup>1-3)</sup>。しかし、これらのIgA産生増強作用は、特定の菌株に限定されており、免疫刺激となる菌体成分の同定や菌株間の系統的解析などは十分に進んでいない。

一方、乳酸菌やビフィズス菌の生体調節作用は、生菌でのみ認められる作用と死菌であっても認められる作用とがある。免疫賦活作用は、菌体表層と免疫細胞表層との相互作用により発現することが多いため、死菌であっても得られることが多い。品質管理の観点からは、死菌は生菌よりも安定性において優れており、培養条件により菌体の表層構造を制御することができれば、期待する効果を付与した菌体の供給が可能となる。著者らは、これまでに死菌体でIgA産生を増強する乳酸菌株のスクリーニングを行い、*Lactobacillus antri*に強いIgA産生増強作用を見出している。本研究では、菌体の表層構造の制御によるIgA産生増強作用の向上を目指し、その基礎的研究として、*L. antri*をモデル菌株としたIgA産生

を増強する菌体成分の同定と表層構造の改変による免疫刺激の制御の可能性を検討した。

## 方法

### 1. 乳酸菌の培養

*Lactobacillus antri*の前培養として、フローズンストックを解凍し、適量を5 mLのMRS培地(BD社製)に植菌した後、アネロパック(三菱ガス化学社製)を使用して、37°Cで20時間、嫌気条件下で静置培養した。本培養として、MRS培地に前培養液を1% (v/v) 植菌した後、37°Cで20時間、静置培養した。

### 2. パイエル板細胞の培養

マウスはBALB/c(8~10週齢、雌性)を使用した。マウスを安楽死させた後、腸管からパイエル板を採取し、コラゲナーゼ処理によりパイエル板細胞を単離した。培養用培地として、10%ウシ胎児血清、100 U/mLのペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシンおよび55 µMの2-メルカプトエタノールを含むRPMI培地を用いた。96穴プレートに $1.0 \times 10^5$  cells/wellとなるようにパイエル板細胞を播種し、死菌体あるいは菌体成分を添加した後、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で4日間培養した。培養上清中のIgA濃度はELISA法により測定した。

## 結果および考察

### 1. 乳酸菌が示すIgA産生増強作用

パイエル板細胞における*L. antri*のIgA産生増強作用を図1に示す。70% (v/v) エタノールで殺菌後、減圧乾燥した菌体は、濃度依存的にIgA産生を増強した(図1A)。また、オートクレーブ殺菌を行った菌体においても、エタノール殺菌菌体と同程度のIgA産生の増強を確認した。一方、エタノール殺菌した菌体を超音波処理により破碎すると、処理時間が長くなるに伴い、IgA産生増強作用が低下した(図1B)。これらの結果より、本菌

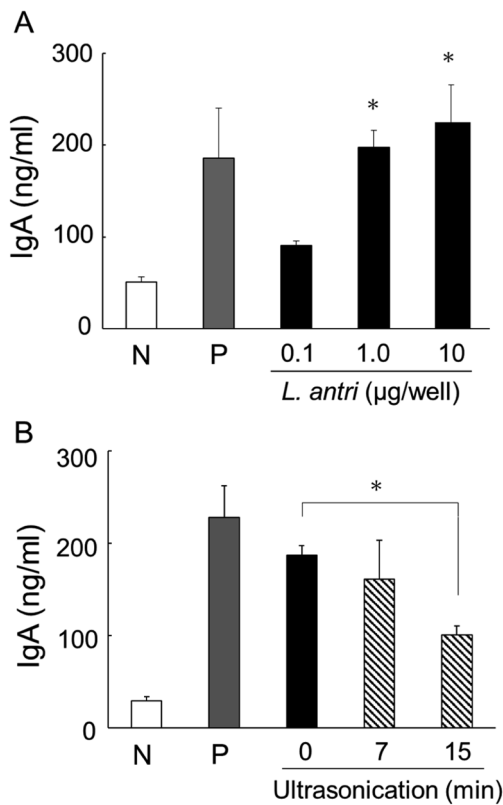


図1 パイエル板細胞における *L. antri* のIgA産生増強作用

パイエル板細胞にA: エタノール殺菌した菌体、B: 超音波破碎し、遠心分離により上清を除去した菌体を添加し、4日間培養したときのIgA産生量。

N: negative control, P: positive control (Pam3CSK4 1 µg/mL), \**p*<0.05

株のエタノールおよび熱に安定な細胞壁成分にIgA産生増強作用があり、その作用の発現には菌体の構造そのものが重要であることが示唆された。

## 2. IgA産生増強作用に関与するTLRの特定

Toll様受容体 (toll-like receptor; TLR) は樹状細胞やマクロファージなどの細胞表面に存在し、特定の病原体の分子パターンを認識する受容体である。これまでに、グラム陽性菌のペプチドグリカン<sup>4)</sup>、リポテイコ酸<sup>5)</sup>、および表層タンパク質<sup>6)</sup>などがTLR2の、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) がTLR4のリガンドとなることが報告されている。*L. antri*が作用するTLRからIgA産生誘導作用を示す菌体成分を推定するために、パイエル板細胞に抗TLR2抗体または抗TLR4抗体 (Biolegend社製) を添加し、エタノール殺菌菌体と培養したところ、抗TLR2抗体の添加によりIgA産生増強作用が抑制されたが、抗TLR4抗体による影響は見られなかった (図2)。*L. antri*がTLR2を介してIgA産生を増強することから細胞壁の構成成分に着目し、菌体の構造を維持したまま、タンパク質、脂質、および核酸を順次除去し、IgA産生を増強する細胞壁成分を特定することとした。

## 3. IgA産生増強作用を示す菌体成分の特定

菌体を0.3% SDS溶液で煮沸処理後、0.02% アクチナーゼEによる除タンパク質、メタノールおよびクロロホルムによる脱脂、0.01% DNaseおよびRNaseによる

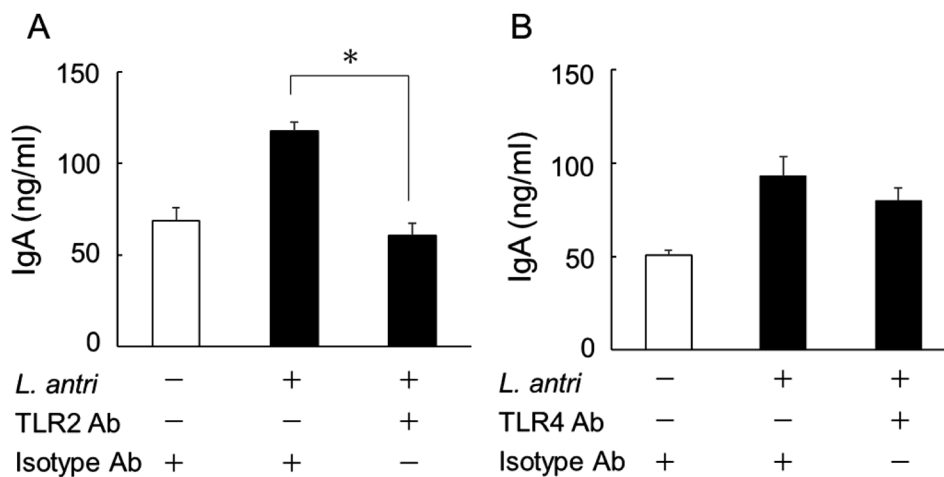


図2 *L. antri* のIgA産生増強作用に関与するTLR

パイエル板細胞にエタノール殺菌した菌体 (10 µg/well) およびA: 抗TLR2抗体 (TLR2 Ab; 5 µg/mL) またはアイソタイプ抗体 (IgG<sub>1</sub>; 5 µg/mL), B: 抗TLR4抗体 (TLR4 Ab; 10 µg/mL) またはアイソタイプ抗体 (IgG<sub>2a</sub>; 10 µg/mL) を添加し、4日間培養したときのIgA産生量。

\**p*<0.05

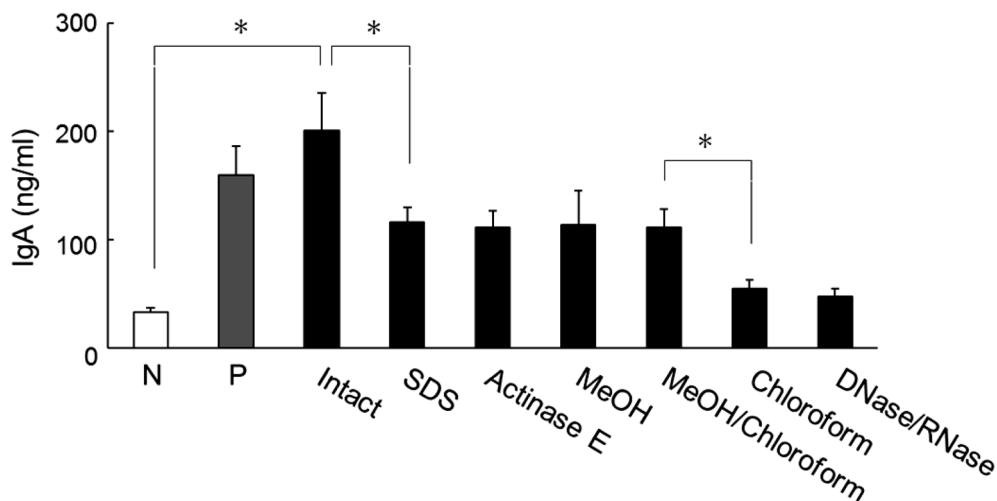


図3 IgA産生増強作用を示す細胞壁成分の特定

SDS溶液での煮沸処理、アクチナーゼによる除タンパク質、メタノールおよびクロロホルムによる脱脂、核酸分解酵素による除核酸を行い、各成分を除去した画分 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をパイエル板細胞に添加し、4日間培養したときのIgA産生量。

N: negative control, P: positive control (Pam3CSK4 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), \* $p < 0.05$

除核酸を順次行い、各細胞壁成分を除去した画分のIgA産生の増強能を測定した。その結果、クロロホルムによる脱脂処理によりIgA産生増強作用が低下し、逆にクロロホルム抽出物にはIgA産生増強作用が認められた(図3)。また、菌体を細胞壁分解酵素であるリゾチームおよびムタノリシンで処理すると、ある酵素濃度域においてIgA産生が増強することがわかった。また、抗リポテイコ酸抗体で菌体表層のリポテイコ酸を蛍光標識し、フローサイトメトリー法により表層への露出の程度を調べたところ、酵素の濃度依存的に表面に露出するリポテイコ酸密度の増大が確認された。これらの結果から、*L. antri*の細胞壁のリポテイコ酸などの脂質成分がTLR2に結合してIgA産生を増強していると考えられた。現在、脂質成分の同定と機能解析を進めている。

## 要 約

乳酸菌は、食品成分として経口摂取が容易で習慣化しやすく、腸管免疫系を介した「食」による免疫調節に大きく寄与するものである。本研究では、*L. antri*をモデル菌株とし、IgA産生増強作用を細胞壁の脂質に見出すとともに、その活性成分を酵素処理により菌体表層に露出させるとIgA産生が増強することを明らかにした。これは、免疫賦活作用のメカニズムに基づく菌体表層構造

の設計が、乳酸菌の高機能化に有効であることを示唆するものである。一方、本菌株は高い凝集性を示すことから、腸管付着性に関わる接着分子の機能解析にも着手している。乳酸菌の表層構造を解析し、設計することで腸管免疫系の制御が可能となれば、免疫機能が十分でない小児や高齢者のQOLの向上にも貢献できると期待される。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に厚く御礼申し上げます。また、細胞培養に関するご支援および免疫学的見地からのご助言をいただきました国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチンマテリアルプロジェクトプロジェクトリーダー 國澤純博士に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) A. Sato, et al: *Immunol.*, **171**, 3684–3690, 2003.
- 2) Y. Kotani, et al: *PLoS ONE*, **9**, e91857, 2014.
- 3) F. Sakai, et al: *PLoS ONE*, **9**, e105370, 2014.
- 4) H. Y. Lin, et al: *J. Cell Physiol.*, **226**, 1573–1582, 2011.
- 5) B. F. Sels, et al: *Microb. Cell Fact.*, **11**, 161, 2012.
- 6) S. R. Konstantinov, et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19474–19479, 2008.