

<令和元年度助成>

乳酸菌由来の耐熱性免疫増強成分の同定と 加熱耐性プロファイルの解析

松崎 千秋

(石川県立大学 生物資源工学研究所)

背景

高齢者の易感染性には、加齢による免疫機能の低下が大きく関与している。それゆえ、健康寿命延伸に寄与する機能性食品開発へのニーズは高く、特に免疫力を増強する効果について世間の関心が集まっている。

乳酸菌は、発酵乳や漬物、アルコール飲料など発酵食品製造工程において古くから用いられているという長い食経験ゆえに、日本では安全な食品素材として認知されている。近年、乳酸菌には様々な保健効果を有することが明らかになってきており、免疫力を増強するプロバイオティクスに期待が寄せられている。しかしながら加熱による殺菌を必要とする食品加工工程において、加熱による免疫増強活性の低下は、機能性食品開発を推進する上で大きな障害となっている。

ヒトの体内における外界との接点である粘膜面は、ガス交換（肺）や食物吸収（腸管）などの生理的機能を担うため、比較的透過性の高い薄い障壁から成り立っている。それゆえ病原性微生物の侵入に対し、優れた防御機構である粘膜免疫系が発達している。粘膜免疫系の主役となっているのは、粘膜から分泌されるイムノグロブリンA抗体（IgA抗体）であり、粘膜面における病原体の排除、毒素の中和などの役割を果たしている。そのため、IgA産生を誘導するような乳酸菌は、免疫力増強の機能性を付加できる機能性食品素材として期待される。本研究では、IgA抗体の産生誘導能を有し、かつ耐熱性の高い乳酸菌 *Apilactobacillus kosoi* の、機能性食品開発素材としての可能性を明らかにするため、IgAの

産生を誘導する因子を明らかにするとともに、加熱温度と免疫誘導活性との相関を明らかにした。

方法

乳酸菌の培養およびリポタイコ酸の精製

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* JCM1149 および *Lactobacillus rhamnosus* GGは、de Man-Rogosa-Sharpe 培地を用い、30℃で一晩培養した。*Apilactobacillus kosoi* は生育に高濃度のフルクトースを必要とするため、培地に10%のフルクトースを添加して培養した。リポタイコ酸の精製は白石ら¹⁾の方法にて行った。乳酸菌培養液を8,000 g、30分間の遠心にて集菌した菌体を、0.1 M クエン酸バッファー（pH 4.7）に懸濁し、ビーズ破碎後、等量のブタノールを加えて遠心し、水層を回収した。その後 Octyl Sepharose を用いた疎水性クロマトグラフィーにて分離し、糖およびリン酸基を含有する画分を回収し、凍結乾燥することによって、精製リポタイコ酸を得た。

マウスパリエル板細胞を用いたIgA産生誘導活性の測定

1週間予備飼育した8週齢BALB/cAマウス（オス）よりパリエル板を摘出し、コラゲナーゼ処理によりパリエル板の免疫細胞を調製した。その免疫細胞 1.25×10^6 cells/mlに、非加熱または加熱処理（70℃、30分）した乳酸菌（OD₆₀₀ = 0.01）、またはリポタイコ酸（50 μg/ml）を加え、5日間37℃、5% CO₂ インキュベーターにて培養した後、上清中に分泌したIgA量をELISA法にて検出した。

樹状細胞の遺伝子発現誘導

4週齢 BALB/cA マウス (メス) より骨髓細胞を採集し、GM-CSF にて樹状細胞を誘導した。6日後、autoMACS Pro (Miltenyi Biotec) を用い CD11c 抗体にて樹状細胞を精製した。得られた樹状細胞 (1×10^6 cells) をリポタイコ酸 (50 μg) によって 24 時間刺激後、細胞を回収し、免疫関連遺伝子の発現解析を行った。

示差走査熱量計による構造変化の解析

示差走査熱量計 (Shimazu DSC-60) を用いて、精製したリポタイコ酸 2.0 mg を 100 μl の超純水に溶解した試料を耐圧セルにて測定した。0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の昇温条件にて 30 $^{\circ}\text{C}$ から 90 $^{\circ}\text{C}$ まで測定を行った。

結果と考察

乳酸菌 *Apilactobacillus kosoi* の菌体を用いて、粘膜免疫増強に重要な IgA を誘導する効果をマウスパリエル板細胞を用いて評価したところ、高い活性が認められ、かつ 70 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間の熱処理に対し、耐熱性を有していた (図 1a)。これまでに *Lactobacillus*

plantarum L-137 株由来のリポタイコ酸が、耐熱性を有する免疫誘導因子として、報告されている²⁾。乳酸菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸は、免疫細胞が発現しているパターン認識レセプターである Toll 様レセプター 2 と 6 に結合する免疫誘導因子であり、乳酸菌のプロバイオティクスのモデル株として知られる *Lactobacillus rhamnosus* GG においても、リポタイコ酸が主要な免疫活性成分として報告されている³⁾。そこで、*Apilactobacillus kosoi*、*Lactobacillus plantarum* JCM1149、*Lactobacillus rhamnosus* GG の乳酸菌体よりリポタイコ酸の精製を行い、その IgA 産生誘導活性を比較した。

L. plantarum より精製したリポタイコ酸については弱い IgA の誘導が見られ、*L. rhamnosus* GG より精製したリポタイコ酸については誘導が見られなかったのに対し、*A. kosoi* より精製したリポタイコ酸においては、*L. plantarum* の 4.7 倍、*rhamnosus* GG の 6.2 倍の強い IgA の分泌誘導が認められた (図 1b)。また、それぞれのリポタイコ酸中の糖含量を比較したところ、*A. kosoi* のリポタイコ酸中の糖含量は、*L. plantarum* の 1.8 倍、*L. rhamnosus* GG の 6.0 倍であり、リポタイコ酸の構造の違いが活性に

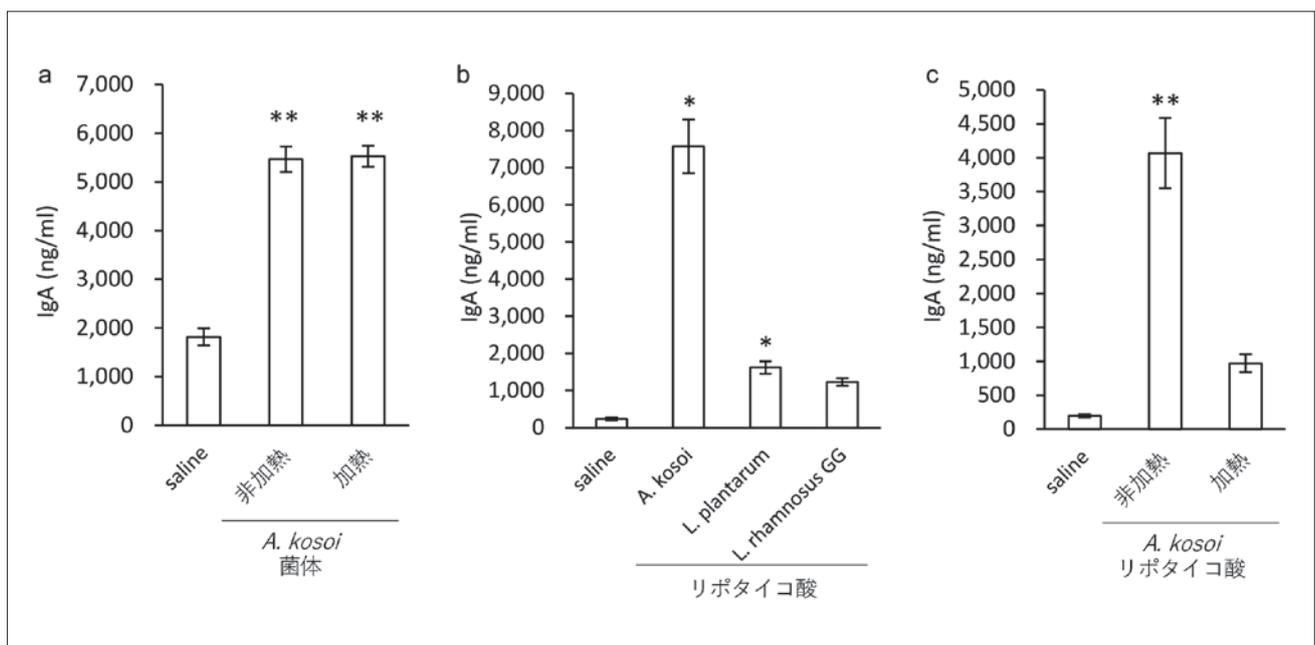


図1 乳酸菌菌体および菌体成分であるリポタイコ酸によるIgA産生の誘導
マウスパリエル板細胞と5日間、5%CO₂条件下37 $^{\circ}\text{C}$ で共培養し、培養上清中に分泌されたIgA量を比較した。a. 非加熱または70 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間加熱した*A. kosoi*菌体と共培養。b. 非加熱の*A. kosoi*、*L. plantarum*、*L. rhamnosus* GGのリポタイコ酸と共培養。c. 非加熱または70 $^{\circ}\text{C}$ 30分間加熱した*A. kosoi*リポタイコ酸と共培養。mean \pm SE ($n=6$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. saline. Dunnett's multiple comparison test.

影響を与えていることが示唆された。

精製後のリポタイコ酸について、IgA 産生誘導活性に対する、加熱の影響を評価したところ、70℃、30分間の熱処理により IgA 分泌量が4分の1に低下した(図 1c)。菌体中の共存成分が、リポタイコ酸の熱に対する構造の安定性に寄与していたと考えられる。

脂質分子は、疎水性の高いアシルグリセロール構造を有し、水溶液中で氷点(0℃)から沸点(100℃)の間で相転移が生じ、構造が変化することが知られている。乳酸菌のリポタイコ酸は、グリセリンに2つの脂肪酸がエステル結合を介して結合した疎水性のジアシルグリセロール構造と、親水性のグリセロールリン酸ポリマーが、糖残基を介して結合している。ジアシルグリセロール構造を有することから、アシルグリセロール部位の相転移が、IgA 産生誘導活性に与えている影響を評価した(図 2)。30℃～90℃の DSC 加熱曲線を求めたところ、50℃付近か

ら吸熱が認められ、融点が 54.3℃であった。また、30℃～90℃まで30分の加熱処理をしたリポタイコ酸による IgA 産生誘導量を比較したところ、50℃において40%、60℃において75%の減少が認められた。加熱による IgA を誘導する活性の低下に、アシルグリセロール部位の構造変化が影響していることが強く示唆された。

リポタイコ酸による IgA 産生誘導を遺伝子発現レベルで明らかにするため、免疫応答の際の初動を担う樹状細胞を用いてリポタイコ酸による刺激の効果を解析した。A. kosoii のリポタイコ酸で24時間刺激したところ、IL-6 の顕著な発現誘導が認められた(図 3)。腸管関連リンパ組織において、樹状細胞による IL-6 の分泌は腸管粘膜からの IgA 分泌を強く誘導することが知られている⁴⁾。リポタイコ酸刺激による IL-6 の産生増強が IgA の分泌を促進したことが予想された。

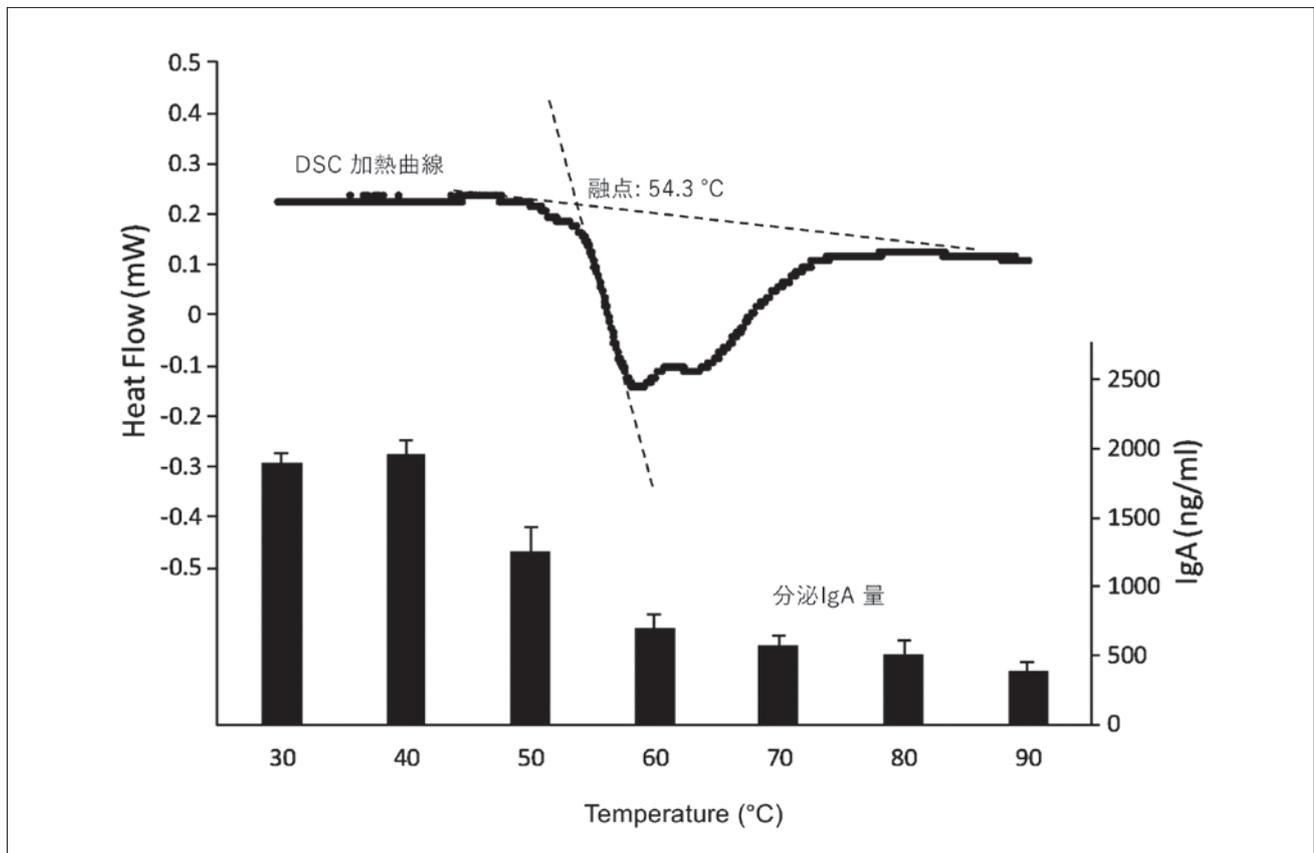


図2 A. kosoii リポタイコ酸の昇温に伴う構造変化と IgA 産生誘導活性との関係
 示差走査熱量計を用い、0.5℃/min の昇温にてリポタイコ酸の DSC 加熱曲線を求めた。また、30～90℃までの各温度で30分間加熱したリポタイコ酸を用い、図1と同様の方法でマウスパイエル板細胞から誘導される IgA 量を測定した。

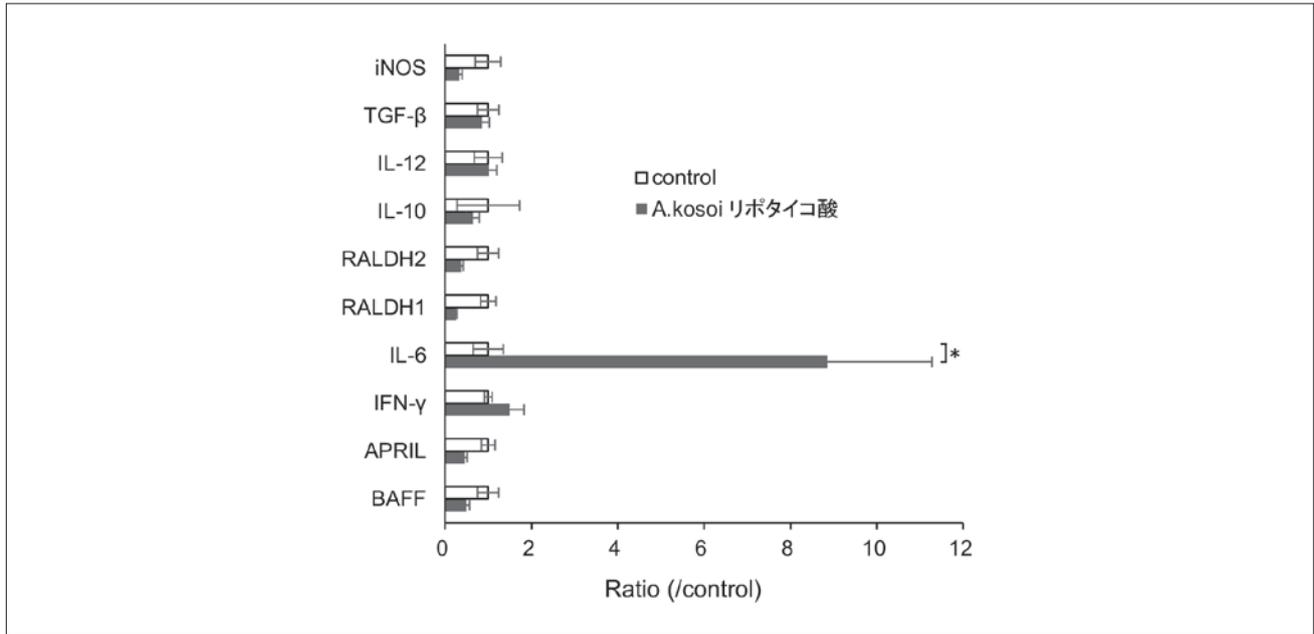


図3 リポタイコ酸刺激による樹状細胞の遺伝子発現解析
 リポタイコ酸にて樹状細胞を刺激し、24時間後の遺伝子発現を qRT-PCR で解析した。無刺激をコントロールとした。mean ± SE (n = 3). *P < 0.05.

まとめ

本研究では、耐熱性のある高い IgA 産生誘導活性を有する乳酸菌 *A. kosoi* から、活性成分であるリポタイコ酸を精製することに成功した。また、*A. kosoi* のリポタイコ酸の免疫誘導機序を解析したところ、樹状細胞を刺激し IL-6 の分泌を促すことによって粘膜における IgA 産生を誘導することを明らかとした。しかしながら、精製後のリポタイコ酸は加熱による耐性が低下した。昇温による構造変化を、示差走査熱量計を用いて解析することにより、耐熱性にはアシルグリセロール部位の構造の安定性が重要であることを明らかとした。今後、加熱を有する機能性食品開発のための重要な知見を得ることが出来た。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なご支援を頂きました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に深く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Shiraishi T et al. 2013. Characterization of a *Lactobacillus gasseri* JCM 1131T lipoteichoic acid with a novel glycolipid anchor structure. *Applied and environmental microbiology*, 79(10), 3315-3318.
- 2) Hirose Y et al. 2010. Lipoteichoic acids on *Lactobacillus plantarum* cell surfaces correlate with induction of interleukin-12p40 production. *Microbiology and immunology*, 54(3), 143-151.
- 3) Claes I J et al. 2012. Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 161.
- 4) Sato A et al. 2003. CD11b + Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *The Journal of Immunology*, 171(7), 3684-3690.

Identification and heat treatment of lactic acid bacteria

Chiaki MATSUZAKI

Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University

Both live and heat-killed cells of *Apilactobacillus kosoï* display a strong ability to induce immunoglobulin A (IgA) secretion in mice. In this study, we purified an immunostimulant from *A. kosoï* cells and evaluated its effects. After purifying lipoteichoic acid using the butanol extraction method, the IgA-inducing ability of the purified lipoteichoic acid from *A. kosoï* was found to be 6.2-fold higher than lipoteichoic acid from the probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG. However, the heat-resistance of the activity of purified lipoteichoic acid was remarkably decreased. A determination of the structural change of lipoteichoic acid using differential scanning calorimetry revealed that the impaired activity at 50°C corresponds to the transition temperature of lipoteichoic acid at 54.3°C.

To gain insight into the mechanisms of inducing IgA secretion, murine bone marrow-derived dendritic cells were treated with lipoteichoic acid from *A. kosoï*. After a 12 h treatment, IL-6 gene expression was found to be upregulated considerably, suggesting that IL-6 induced by lipoteichoic acid stimulated IgA production from B cells in mucosal lymphoid tissue. These findings can be instrumental in supporting the innovation of functional heated foods.