

福岡大学博士論文

Lactobacillus plantarum D2905 株による Caco-2
細胞からの elafin 分泌促進作用に関する研究

Lactobacillus plantarum D2905 induces elafin
secretion from Caco-2 cells.

令和 3 年 3 月

PD171004

坂本 大輔

微生物薬品化学教室

- 目次 -

緒言	5
第1章 Caco-2 細胞から elafin 分泌を促進させる <i>Lactobacillus plantarum</i> D2905 株乳酸菌のゲノム DNA およびゲノム DNA 由来 ODN	
第1節 D2905 株のゲノム DNA の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討	9
第2節 Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を持つ D2905 株のゲノム DNA に存在する ODN の特定	18
第3節 小括	26
第2章 D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討	
第1節 D2905 株が産生する EPS の抽出・精製	29
第2節 D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討	32
第3節 D2905 株が産生する NPS の構成糖の解析	37
第4節 小括	38

総括	41
実験の部	43
引用文献	50
謝辞	58

略語表

本論文においては以下の略語を用いた。

IBD : inflammatory bowel disease (炎症性腸疾患)

IL-8 : interleukin-8 (インターロイキン-8)

IL-10 : interleukin-10 (インターロイキン-10)

TGF- β : Transforming growth factor (トランスフォーミング増殖因子 β)

TLR9 : toll-like receptor 9 (toll 様受容体)

ODN : oligodeoxynucleotide (オリゴ DNA)

DSS : dextran sodium sulfate (デキストラン硫酸)

EPS : exopolysaccharide (菌体外多糖類)

NPS : neutral exopolysaccharide (中性多糖類)

APS : acidic exopolysaccharide (酸性多糖類)

NK : natural killer (ナチュラルキラー細胞)

IFN- γ : interfereon- γ (インターフェロンフェロン γ)

Glc : glucose (D-グルコース)

Gal : galactose (D-ガラクトース)

Man : mannose (D-マンノース)

Ara : arabinose (D-アラビノース)

Rib : ribose (D-リボース)

Xyl : xylose (D-キシロース)

Rha : rhamnose (D-ラムノース)

Fuc : Fucose (D-フコース)

ManNAc : *N*-acetylmannosamine (*N*-アセチル-D-マンノサミン)

GlcNAc : *N*-acetylgalcosamine (*N*-アセチル-D-グルコサミン)

GalNAc : *N*-acetylgalactosamine (*N*-アセチル-D-ガラクトサミン)

緒言

乳酸菌は自然界に広く分布し、宿主に有益な作用を持つことから医薬品や発酵食品など幅広く利用されてきた。乳酸菌を利用した代表的な発酵食品の1つにヨーグルトがあり、伝統的にヨーグルトを摂取するブルガリアで長寿者が多いのは、ヨーグルト中の乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ブルガリア菌) が生きて腸まで届き腸内環境を整えてくれるからであるとロシアの学者イリヤ・メチニコフは考え、「ヨーグルト不老長寿説」を提唱した【1】。これにより乳酸菌の生理活性作用が着目され、現在では乳酸菌の生菌体のみでなく死菌体でも生理活性作用の効果があり、乳酸菌の細胞壁構成成分や代謝産物、ゲノム DNA などにも生理活性作用を有することが明らかになっている【2】。

乳酸菌が示す生理活性作用の1つに抗炎症作用があり、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) といった腸内の炎症疾患に乳酸菌を利用する研究の報告もある【3,4】。炎症を起こしている腸管に対して乳酸菌の生菌体を利用すると腸管に到達した菌体が血液中に移行したり、敗血症の原因となったりするリスクが伴うという問題点がある【5, 6】。そこで、抗炎症作用を示す成分の1つである乳酸菌のゲノム DNA を利用すればこのような問題点は解決できると考えられる【7-9】。実際、乳酸菌のゲノム DNA を使った抗炎症作用の報告は数多くあり、例えば、*Lactobacillus casei* 株のゲノム DNA は TLR9 を介してヒト結腸癌由来細胞株の Caco-2 細胞から IL-8 の分泌を抑制したという報告もある【10】。

IBD は腸管における慢性的な炎症を繰り返す疾患であり、厚生労働省から難病指定されている。IBD の治療にはモノクローナル抗体やグルココルチコイドなどが用いられているが、副作用などの問題があり、治療の確立はなされていない【11-14】。近年、プロテアーゼやその阻害剤が IBD の病態に関与するという報告がなされており、健常人の腸粘膜で分泌されるエラスターゼ阻害剤の elafin もその 1 つである【14-18】。elafin は抗炎症作用、抗菌作用を有しており、炎症から腸管内を保護する働きを持っている【19, 20】。また、IBD 患者の腸管内では elafin の分泌が減少しているとの報告もあり【14】、この elafin の分泌が IBD の治療に応用できる可能性がある。これまでに乳酸菌を利用した elafin と IBD に関する研究も行われており、例えば、遺伝子組換えにより乳酸菌自身が elafin を産生するように作出した *Lactococcus lactis* を用いた *in vivo* 試験の結果、elafin の方が抗炎症性サイトカインである IL-10 や TGF- β より腸管内の炎症に対する保護作用が強いという結果も報告されている【21】。しかし、これまでに乳酸菌による腸管粘膜からの elafin 分泌促進作用の報告はまだなされていない。

Lactobacillus plantarum D2905 株乳酸菌（以下、D2905 株）はクルマエビの腸管から単離された乳酸菌である【22】。海洋生物の腸管に生息している乳酸菌であるため、低温増殖能を有するほか、抗菌活性作用や菌体外多糖類（Exopolysaccharide: EPS）を多く産生するなどの特徴的な性状を有している乳酸菌株である【22】。EPS は主に菌体の周辺環境ストレスから自身を守る働きをしており、菌体に付着、もしくは遊離した状態で存在している。また、その糖組成の違いから 1 種類の単糖のみで構成されるホモ多糖と 2 種類以上の単

糖から構成されるヘテロ多糖が存在する【23】。これまでも乳酸菌が産生する EPS の報告はいくつかあり【24, 25】、乳酸菌の産生する EPS は食品にも応用され、保存期間の延長、食感の変化、栄養価の向上などを食品に与えている。EPS 産生乳酸菌の食品への応用とともに近年、乳酸菌の産生する EPS 自体の生理活性作用に着目した研究が行われている。*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *buigaricus* OLL1073R-1 株は中性多糖 (neutral EPS; NPS) と酸性多糖 (acidic EPS; APS) を分泌し、そのうち APS のみがマウスの秘蔵細胞およびパイエル板細胞の分裂促進作用を示すことが明らかになっている【26】。さらに *L. delbrueckii* subsp. *buigaricus* OLL1073R-1 株 APS は高分子量分画と低分子量分画が存在し、そのうち高分子量分画の APS はリン酸化多糖であり、インターフェロン- γ (IFN- γ) の産生を促進し、ナチュラルキラー (NK) 細胞を活性化し【27, 28】、抗インフルエンザウイルス作用があること【29】、さらに *L. delbrueckii* ssp. *buigaricus* OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトの摂取が高齢者における風邪症候群の罹患リスクを低下するといった報告がある【27】。また、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* FC 株が産生する EPS の B 細胞を活性化作用【30】、などの報告がある。EPS を産生する乳酸菌の菌株も多くあり、菌株によって産生する EPS の特徴や生理活性作用が異なっている。しかし、D2905 株が産生する EPS の生理活性作用については未だ解明されていない。

そこで本研究では D2905 株のヒト大腸癌由来細胞である Caco-2 細胞からの抗炎症作用を示す elafin の分泌の促進作用を検討した。第 1 章では、Caco-2 細胞からの elafin の分泌を促進させる D2905 株のゲノム DNA、およびそのゲノム DNA に存在するオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) の特定を、第 2 章

では D2905 株が産生する EPS を抽出・精製し、その Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討を行った。

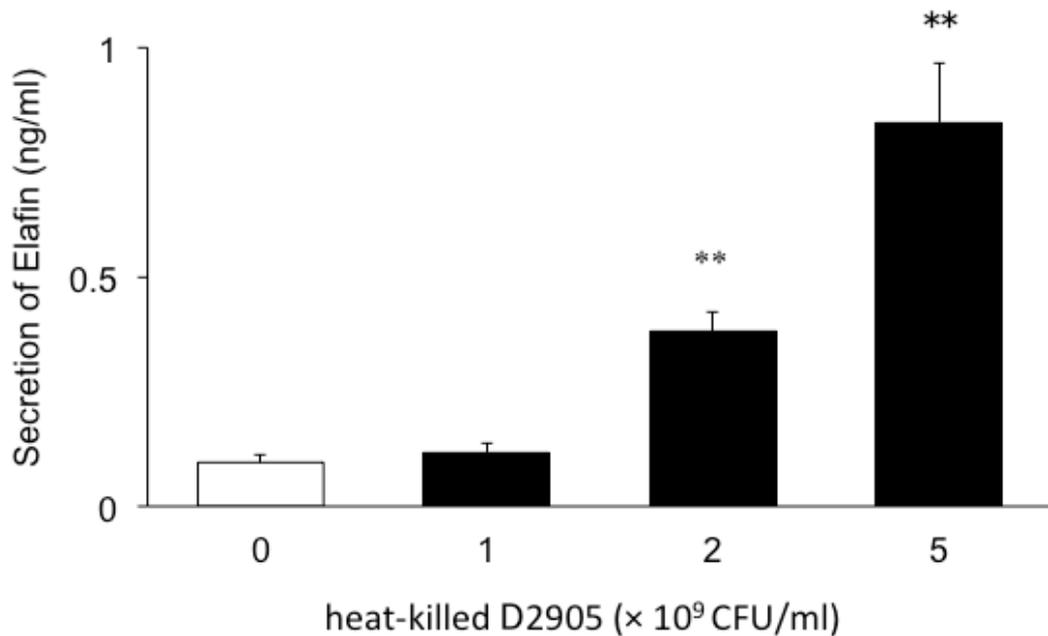
第1章 Caco-2細胞からの elafin 分泌誘導を促進させる *Lactobacillus plantarum* D2905 株乳酸菌のゲノム DNA およびゲノム DNA 由来 ODN

第1節 D2905 株のゲノム DNA の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討

乳酸菌の生理活性作用は生菌体だけでなく死菌体や乳酸菌の代謝産物にもその効果があるとされている【2】。そこで D2905 株の生菌体と死菌体の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を検討した。

1-1. D2905 株の生菌体と死菌体の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討

D2905 株の生菌体、および死菌体に Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用があるか確認するため、1, 2, 5×10^9 CFU/mL の D2905 株の生菌体と死菌体を 24-well plate に Caco-2 細胞 (2.0×10^5 cells /well) に曝露し、48 時間後の培養上清中の elafin の分泌量を比較した。その結果、生菌体および、 1×10^9 CFU/mL の死菌体は elafin の分泌促進作用を示さなかったが、 2×10^9 CFU/mL、 5×10^9 CFU/mL の死菌体では elafin の分泌が有意に促進され、D2905 株の死菌体の Caco-2 細胞からの elafin の分泌促進作用が濃度依存的に認められた (図 1)。



**** $P < 0.01$ [one-way ANOVA followed by Tukey's test]**

図 1. D2905 株死菌体の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用

D2905 株の死菌体の濃度を変えて Caco-2 細胞に曝露し、48 時間後の培養上清中の elafin 分泌量を測定した。

さらに D2905 株の死菌体 5×10^9 CFU/mL を Caco-2 細胞に曝露して、12, 24, 48 時間後の培養上清中の elafin の分泌量を測定したところ、D2905 株の生菌体は時間経過とともに Caco-2 細胞からの elafin の分泌に有意な促進は見られなかったが、D2905 株の死菌体は Caco-2 細胞からの elafin の分泌が時間経過とともに有意に促進された。(図 2)。

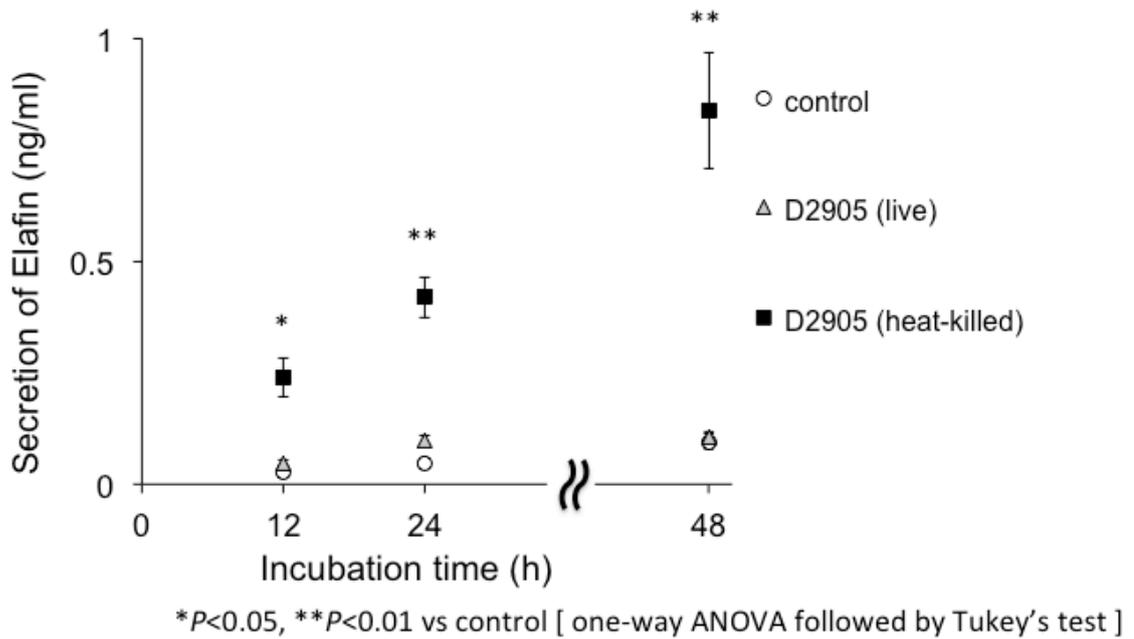


図 2. D2905 株の生菌体、および死菌体の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用

D2905 株の生菌体あるいは死菌体 (5×10^9 CFU/mL) を Caco-2 細胞に曝露し、経時的に elafin 分泌量を測定した。

1-2. D2905 株のゲノム DNA の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討

D2905 株の生菌体では Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用は確認できなかったが、死菌体では Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用が確認された。この 1 つの要因として、死菌体作製時の熱処理の過程で菌体内のゲノム DNA が細胞外に漏出し、そのゲノム DNA の作用のため、elafin の分泌が促進されたのではないかと予想した。そこで D2905 株の死菌体 5×10^9 CFU を DNase I で

処理して DNA を分解させ、Caco-2 細胞に曝露して elafin 分泌促進作用の検討を行った。その結果、DNase I で DNA を分解処理した D2905 株の死菌体の Caco-2 細胞からの elafin 分泌量は DNase I による DNA 分解処理をしていない D2905 株死菌体 Caco-2 細胞からの elafin の分泌量と比較して約半分近く低下した (図 3)。

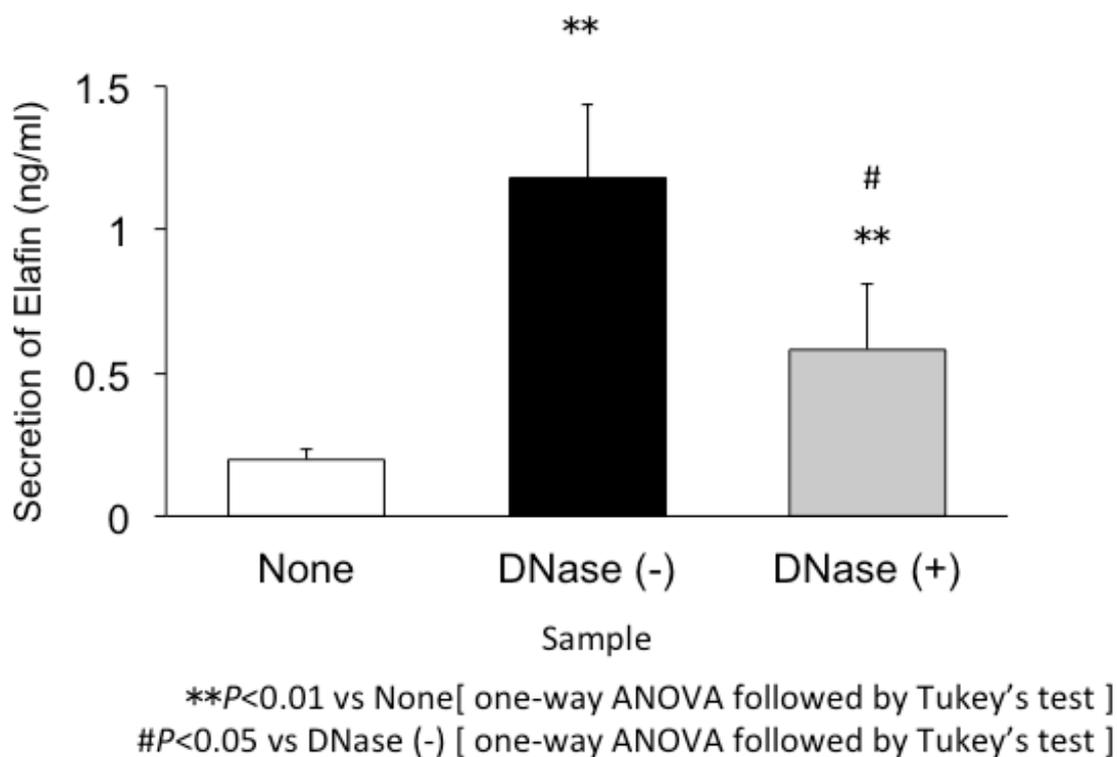


図 3. D2905 株死菌体の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用におよぼす DNase I 処理の影響。

None: 死菌体添加なし、DNase(-): DNase I 未処理死菌体、DNase(+): DNase I 処理死菌体

D2905 株の死菌体 (5×10^9 CFU) を DNase I で処理して Caco-2 細胞に曝露し、elafin 分泌促進作用を未処理の場合と比較した。

次に D2905 株からゲノム DNA を抽出し、3.5, 7, 17 μ g/mL の濃度に調製したゲノム DNA を Caco-2 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を検討した。その結果、DNA をトランスフェクションしなかった Caco-2 細胞からの elafin 分泌量と比較して、7 および 17 μ g/mL のゲノム DNA をトランスフェクションした Caco-2 細胞からの elafin の分泌量は有意に促進した (図 4)。

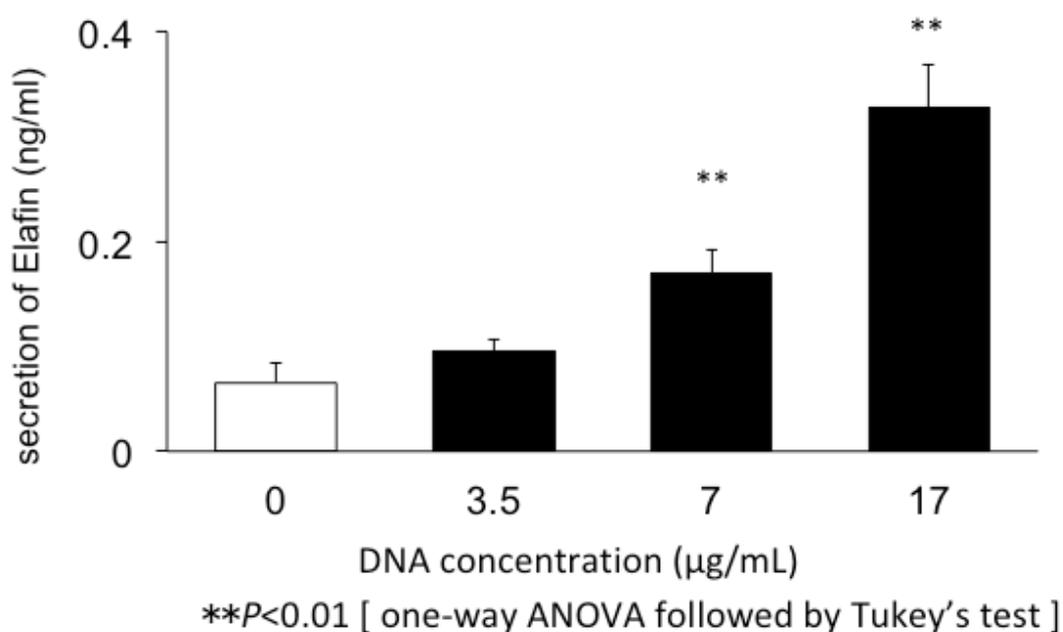


図 4. Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用に及ぼす D2905 株ゲノム DNA 濃度の影響

各種濃度の D2905 株ゲノム DNA を Caco-2 細胞にトランスフェクションし、Caco-2 細胞からの elafin 分泌量を比較した。

さらに、D2905株のゲノムDNAのCaco-2細胞からのelafin分泌促進作用と曝露時間の関係を検討するため、17 μ g/mの濃度のゲノムDNA 5 μ LをCaco-2細胞にトランスフェクションし、12、24、48時間後のCaco-2細胞から分泌されるelafin量を測定した。その結果、17 μ g/mLのゲノムDNAをCaco-2細胞にトランスフェクション後、12時間後のelafin分泌量は有意差が認められなかったが、12時間、48時間と時間経過とともにCaco-2細胞からelafinの分泌量が有意に促進された(図5)。

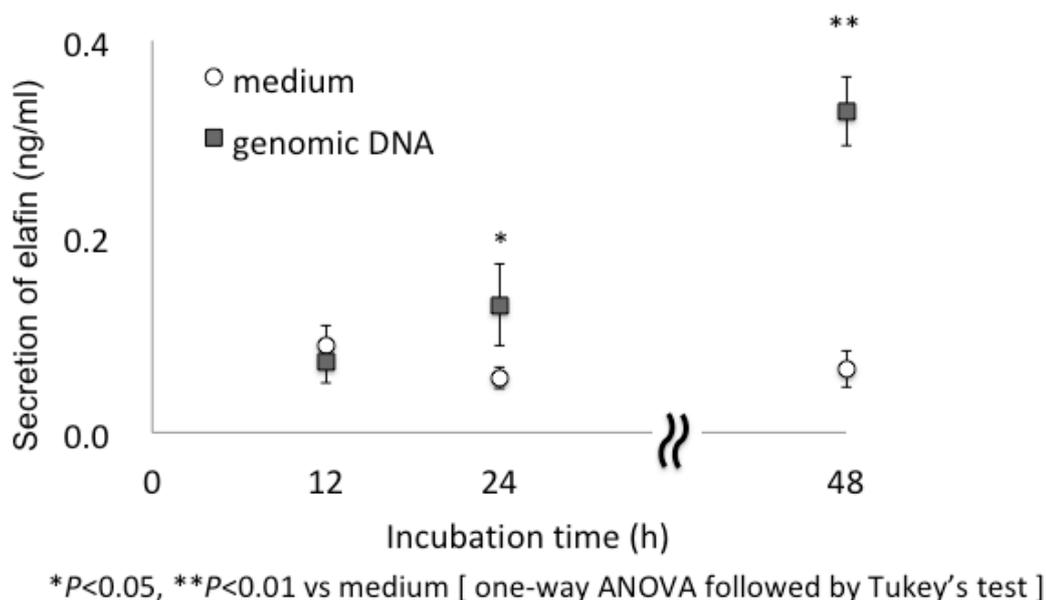


図 5. D2905株のゲノムDNAのelafin分泌促進作用に及ぼす曝露時間の影響

17 μ g/mL濃度のD2905株のゲノムDNAを5 μ LをCaco-2細胞にトランスフェクションし、経時的にCaco-2細胞からのelafin分泌量を調べた。

1-3. D2905 株のゲノム DNA の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用と Toll 様受容体 (TLR) 9 の関係

D2905 株のゲノム DNA が容量依存的および、時間依存的に Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を示すことがわかった。乳酸菌由来成分を認識するパターン認識受容体に Toll 様受容体 (TLR) がある。TLR のサブタイプの 1 つである TLR9 は細菌のゲノム DNA を認識する受容体であり、これまでも乳酸菌のゲノム DNA を TLR9 が認識し抗炎症作用を示したという報告もある【9, 10, 39】。そのため、D2905 株のゲノム DNA の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用も TLR9 で認識されたのではないかと予想した。そこで、RNAi 法を用いて TLR9 の発現を抑制した Caco-2 細胞からの D2905 株の死菌体とゲノム DNA の elafin 分泌に与える影響を検討した。まず、Caco-2 細胞の TLR9 の siRNA を用いた発現の抑制に関して、ウエスタンブロット法で確認した。その結果、死菌体あるいはゲノム DNA の曝露に関わらず、siRNA を処置していない細胞および scramble TLR9-siRNA をトランスフェクションした細胞では、TLR9 の発現が確認できた。一方、TLR9-siRNA をトランスフェクションした細胞では、いずれの場合も TLR9 の発現を確認できなかった (図 6-1)。

次に、D2905 株の死菌体、およびゲノム DNA の TLR9 が発現していない Caco-2 細胞と TLR9 が発現している Caco-2 細胞からのそれぞれの elafin の分泌量の比較を行った。D2905 株の死菌体 5×10^9 CFU/mL を TLR9 が発現している Caco-2 細胞 (siRNA non-transfected、scramble TLR9-siRNA) に曝露した場合の elafin 分泌量と比較して TLR9 の発現を抑制した Caco-2 細胞

(TLR9-siRNA)に曝露した場合の elafin の分泌量は有意に減少した。一方、17 $\mu\text{g}/\text{m}$ の濃度のゲノム DNA を TLR9 が発現している Caco-2 細胞 (siRNA non-transfected、scramble TLR9-siRNA) にトランスフェクションした場合の elafin 分泌量と比較して、TLR9 の発現を抑制した Caco-2 細胞 (TLR9-siRNA) にトランスフェクションした場合の elafin の分泌量は有意に減少した (図 6-2)。

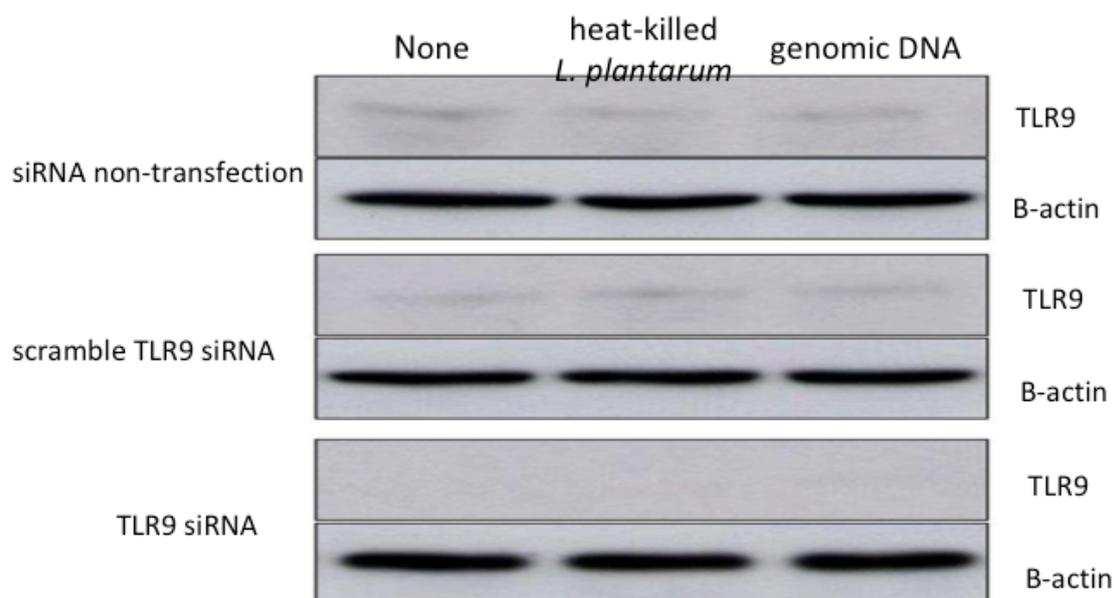
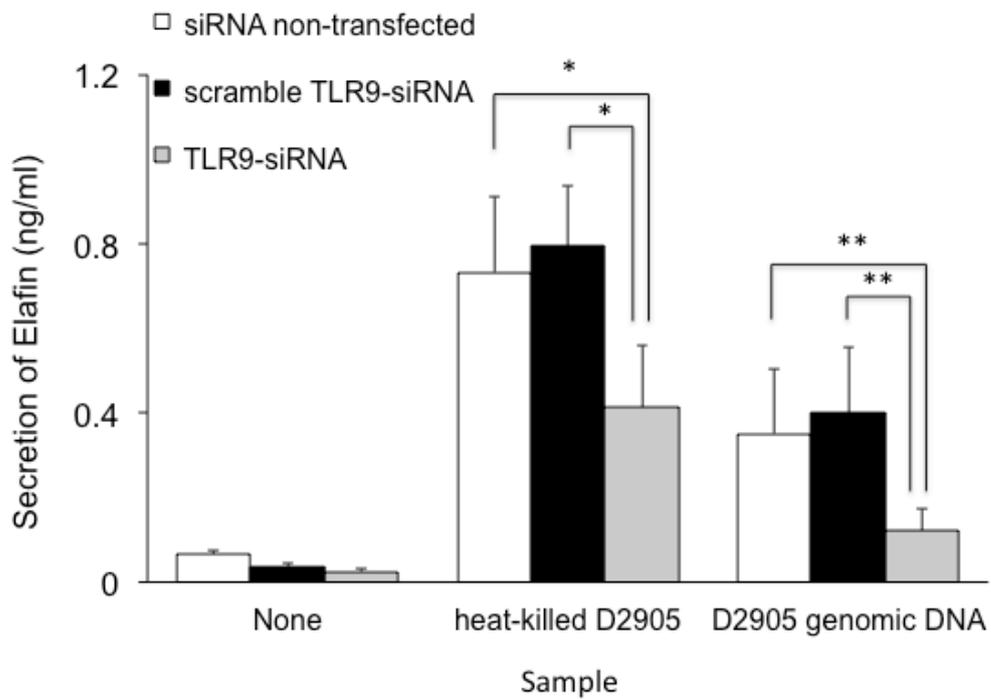


図 6-1. siRNA による Caco-2 細胞内の TLR9 の発現抑制

Caco-2 細胞に TLR 9-siRNA あるいは scramble TLR9-siRNA をトランスフェクションし、その後、D2905 株死菌体あるいはゲノム DNA を曝露して細胞内の TLR9 の発現をウエスタンブロット法で確認した。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ [one-way ANOVA followed by Tukey's test]

図 6-2. Caco-2 細胞における D2905 株死菌体およびゲノム DNA の elafin 分泌促進作用におよぼす TLR9 発現抑制の影響

Caco-2 細胞に TLR 9 -siRNA あるいは scramble TLR9-siRNA をトランスフェクションした後、D2905 株死菌体 (5.0×10^9 CFU/mL) あるいはゲノム DNA (17 μ g/mL)を曝露させ、Caco-2 細胞からの elafin 分泌量を測定した。

第2節 Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を持つ D2905 株のゲノム DNA に含まれる ODN の特定

前節までの結果で、D2905 株のゲノム DNA は Caco-2 細胞からの TLR9 を介した elafin 分泌促進作用を有することが示された。D2905 株のゲノム DNA は 3Mbp 以上の環状 DNA であり、このゲノム DNA 中に elafin の分泌を促進する塩基配列が存在するのではないかと予想した。そこで本節では D2905 株のゲノム DNA に含まれる elafin 分泌を促進する DNA の塩基配列を決定し、オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) の特定を試みた。

2-1. Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を示す D2905 株ゲノム中の DNA の塩基配列の決定

D2905 株のゲノム DNA 中において、Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用に関与する DNA の塩基配列の特定を行った。まず D2905 株のゲノム DNA のライブラリーを作製した。D2905 株のゲノム DNA を制限酵素 *Sau3AI* で切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて、100~1,000bp の DNA 断片を抽出した。これらの断片を pUC19 の *Bam*HI サイトに挿入し、大腸菌 DH-5 α に形質転換した (図 7-1)。その結果、177 個の形質転換体を得ることができた。これらの形質転換体をコロニー PCR 法にかけ、100~1,000bp の D2905 株ゲノム由来の DNA 断片が挿入された 100 個のクローンを選択し、ゲノム DNA ライブラリー

を構築した（図 7-2 の赤色数字で示した No. 1~100）。

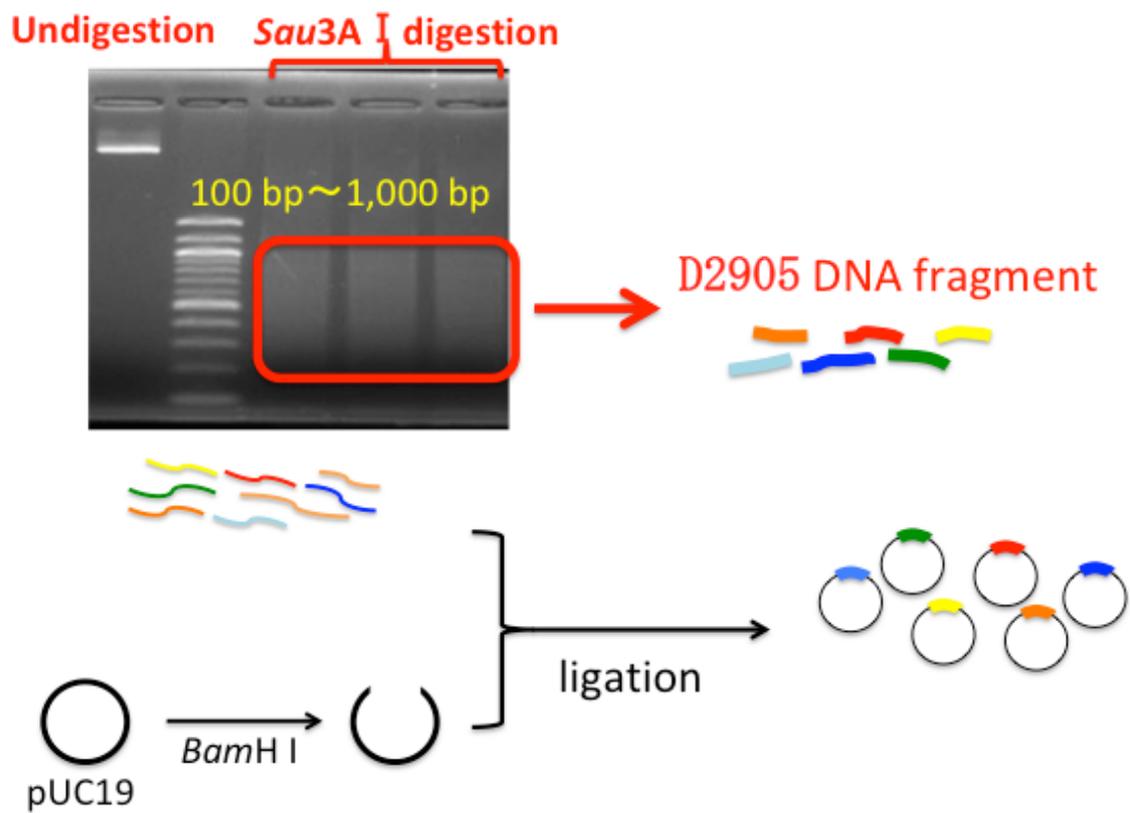


図 7-1. D2905 株のゲノム DNA ライブラリーの作製の概略図

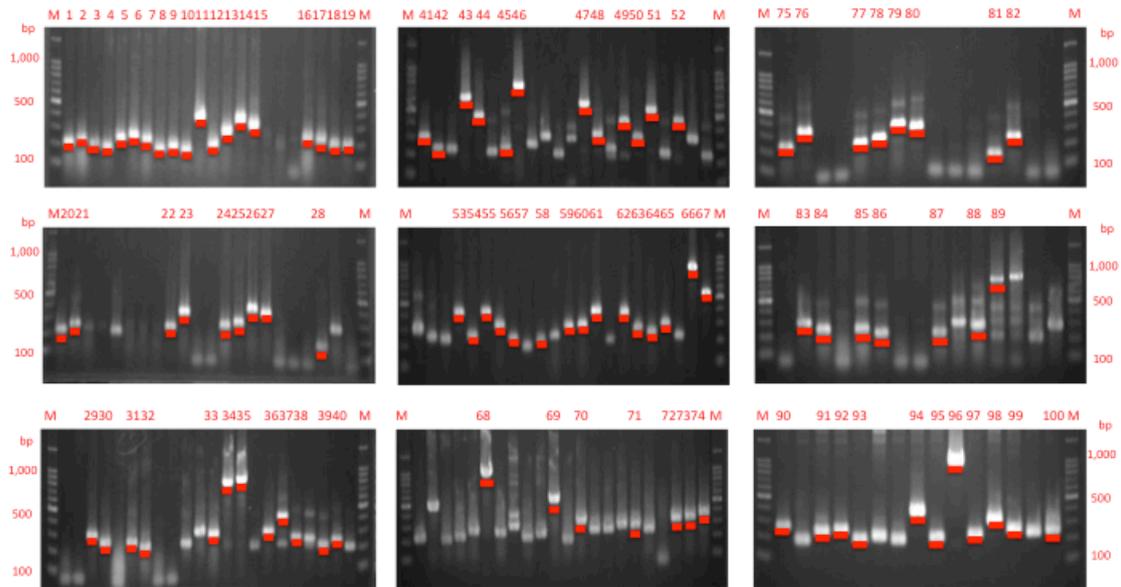
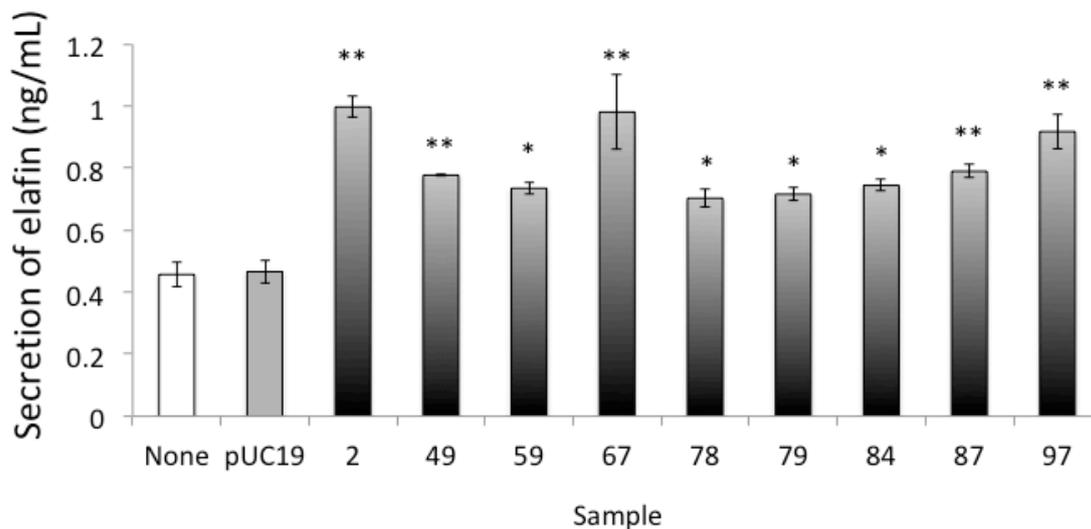


図 7-2. 選出した 100 個の D2905 株のゲノム DNA ライブラリー

縦軸 : DNA 断片長さ (bp)、 横軸 : DNA クローン、 M: 100bp マーカー。選出した DNA クローンをそれぞれ No.1-100 とした。

次に、構築した 100 個のゲノム DNA ライブラリーを 10 μ g/mL の濃度に調整し、5 μ L を Caco-2 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の elafin 量を測定した。その内、9 個 (No.2, 49, 59, 67, 78, 79, 84, 97) のゲノム DNA ライブラリー DNA をトランスフェクションした場合に、Caco-2 細胞から elafin の分泌が、何もトランスフェクションしない場合 (None) やベクター (pUC19) をトランスフェクションした場合に比較して有意に増加した (図 8)。



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs None [one-way ANOVA followed by Tukey's test]

図 8. D2905 株ゲノムライブラリーDNA の Caco-2 細胞からの elafin 分泌におよぼす影響

D2905 株ゲノムライブラリーの DNA サンプル (50ng) を Caco-2 細胞にトランスフェクションし、elafin 分泌量を比較した。

次に Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用が確認された 9 種類のゲノムライブラリー中の D2905 株由来挿入 DNA 断片の塩基配列をサンガー法で決定した。シークエンスプライマーとして、ライブラリー構築に用いた pUC19 プラスミド上に存在する共通配列にアニーリングするように、pUC19-Fw (5'-GCCAAGCTTGCATGCCTGCAG-3') および pUC19-Rv (5'-GAATTCGAGCTCGGTACCCG-3') を使用した。その結果、Caco-2 細胞からの elafin 分泌作用を示した D2905 株由来挿入 DNA 断片の塩基配列を表 1 に示す。決定した DNA 塩基配列は 「*Lactobacillus plantarum* D2905 DNA, induces elafin secretion DNA fragment digested by *Sau3AI* (*Lactobacillus*

plantarum D2905 株 DNA を *Sau3AI* で切断することで得られ elafin の分泌誘導を促進させる DNA 断片)」として DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録し、Accession No.を得た。

表 1. Caco-2 細胞から elafin の分泌を促進させる DNA 断片の塩基配列

Plasmid No.	Accession No.	Sequence (5'→ 3')
2	LC507199	GCCATATACTTCAAAGCCTGTCGGAAAGCTGGTCAACTA ATCCCGTTGCGTTATTTGTTGGTGTGTTGAAGCTACCAAC GTCTGCCACTCTATTTGCTGCTGACAATCAGCTGGTATAA ATTGGTTGGTTAACCAGATTGTCGTTGCGCTACTCGCG
49	LC507200	AGCGGTCTCTTTGGCACCCCTTCTTACTTGTTC AATGGAA ATCGTCTTGGCAGCACCCGCAACGGCAGCAGCAGCCGTA ACCCCATTTTCCTGGCTAAACAAGTTCAAGACCGTCTTAC CTTGCAATTTCGGCTCCGGCCAACCATTCCCGGATGGGAC GCATATCTAATAGTAACCCGGTCGTAAATCATCAGCAA GGTGTAATGGATACGTCACCGCGCCTTCAGTCACTAATA ACGGCTCTGGTGCTGCTTCACCCGTGACGAGTTGACTCT TTAAGTTAGCTTCTTCGACATTAAATCGTAATTTTCGCATA GATGCCTTTAAATTGATGTTTCAGTAGCCGCTTCAAAGCC GCATA
59	LC507201	AAAACGCTACCTATATAAAGGAGTAGTTCAAATGCTCAG GGATGGAACGAATATTGCACAAATTGCAAGGAGTACTGG CGTACAACGACGACAAATTTATCGCATTAAAGAATATGCT TTAAAAGTTGGAGACTTAGGCACTCCCAAAGGGGAAGTG AATAGCTAGAGCCCACAGGACAAGTTAGTGTTTTTTAGG GACCACCGGTCAAATAATAATACTTACATT
67	LC507202	GGTCAAGCGGTGTCTGTATTTGTTTCGGTTCGATGCCTAC AACGGCTGGCCGGATTCCCTGCCAATGTTTTTACTAAACC AACGGCAGTTCCAGATGACTACCTTCTTGTGTTGATTACAG TCTATTCTTTATTTCAATTTTGGCTGATTATGAGGCGTTT AGTTCTGATAAAAACAGTTTTTGAATGATTTATATCGTGTTG

		CTAAAAAGCAAATGGATTTGGCGTTGGCACAAGTACTT CTGAAGGTAAATTGAAATTGACTGAAGAAAATCCGGTTT TCATCGACTGGTCAAATGATTTTGACAAAAGAAACGGCTG GGCAGGCCATTATTATTTATACGCTAAAACAATTTATTAC GCTTGCGGAACCTGGTTAATGATACAAGCTTAGAGACCTA TACAGCGATACTGCGTAAATTAACCAGTACGCTAAAAC TCAATTGTTTGATTTCGCAATCGGGGTTATTTGTCTCAGGG
78	LC507203	AGTTTCAGAAACGTTTCGCATGGAATGGGAGGTATGGCGC AAAAGCTGGTACCCCAAATGTCATCCACATAATCGCGCT TTGTTCTGCTGGTACGTCATTCCGCACTTGCATAACGTGT GAATTCTGCGTCCGATTCATTGAAATTGGCCGAAACTTTT TAGCTTCTGGTGTATTCAAGAAGG
79	LC507204	ATCGTTGGTGAATTTGATGCTTATACGTTTCGATGAGTTGT TTGAAAAGACCCTCGCATTGCCATGGGACCAGTTATTGC CGATGGACGCTGAATTTCCAGTTGAAGGTAAATCGCGCA ACTCTAAACTCCACAGTGTTCCCGACGTGCAATCTATCGT CAAAAAGGC
84	LC507205	GATTGTCCCGCAGTTAAATGATAAATGGTGCCTTCAATC GTAATTTCCGCTTCTCCACTTAAAATATTGACCATCGCAT CGCCCTGGGCAGAATGGCCGCCAATCTCTTGGTTCGGTTG CGACTGAAAATAGCGTCATACTTAAATCATCCCGTTGAAC CAGTGTCCGGCTATTAACTT
87	LC507206	TTTTCGTTTAACCATTCTCCGATTATCTCTTCATTTCCGT TGCCGAACGTAAAGAATATAGTGGAGAAGGTAAGGACAA AGTCGATAAAAAGATTTGACAATTCTATTGTCGGCCGA AACGTTGATGGTCATTGTTCGCAATGTTCTTTGTTATTAGT TGTACATTGGCGTTGACTCCA
97	LC507207	CTTCTTTTGTTGCTCGAAACGGTACTTCCCATAATCCATA ATTCTGGCCACGGGTGGTTTCGCTTTCGGCGCAACCAAT ACTAGATCTAAACTAGCGTCTTCAGCAATCTGCATTGCTT CTTGTCGTGACTTGACACCTAATTGTTACCATCGCTGGC

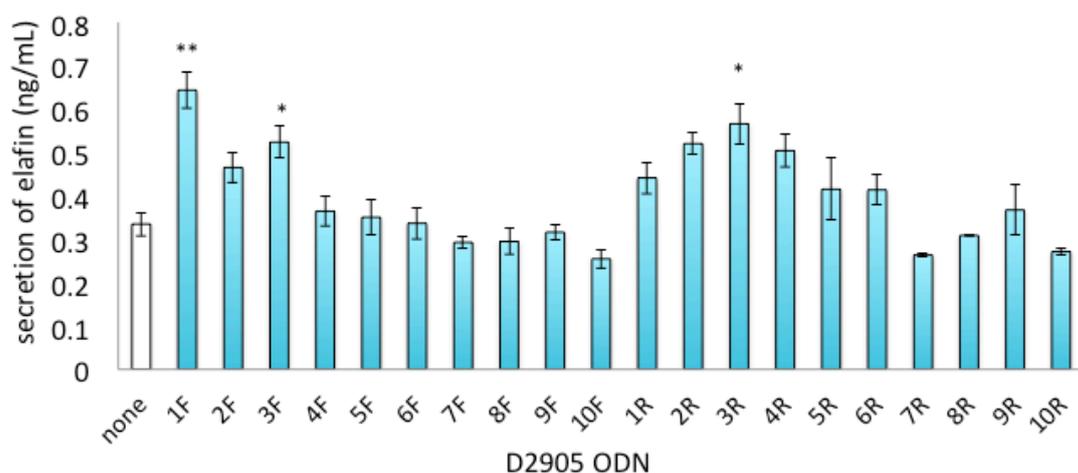
2-2. Caco-2細胞からの elafin 分泌促進作用を持つ D2905 株のゲノム DNA 由来 ODN の特定

表 1 で決定した 9 種類の塩基配列から 7-8 塩基の長さで共通して存在する配列を遺伝子配列解析ソフトウェアである GENETYX ver. 20 を用いて探索し、D2905 株の Caco-2 細胞から elafin の分泌を促進する ODN 候補とした。その結果、10 種類の共通塩基配列 Sense 鎖 (F) と、それに対応する Anti-sense 鎖 (R) を合わせて 20 個の ODN 候補 (1~10F,R) を特定した (表 2)。

表 2. elafin の分泌を促進させる ODN 候補の塩基配列

ODN	Sequence (5'→3')	ODN	Sequence (5'→3')	Plasmid
1F	GAAGGTAA	1R	TTACCTTC	No.67, 79, 87
2F	GGTTGCG	2R	CGCAACC	No.84, 87, 97
3F	ATTTGCT	3R	AGCAAAT	No.2, 67
4F	TATAAAT	4R	ATTTATA	No.2, 67,
5F	TATTTGTT	5R	AACAAATA	No.2, 67
6F	ATTGGTTG	6R	CAACCAAT	No.2, 97
7F	GTTGCGC	7R	GCGCAAC	No.2, 97
8F	CTTCTTGT	8R	ACAAGAAG	No. 67,97
9F	GAAACGG	9R	CCGTTTC	No.67, 97
10F	AATTGTT	10R	AACAATT	No.67, 97

次に、この 20 種類の ODN 候補 (表 2) を 30 μ M の濃度で Caco-2 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の elafin 分泌量を測定した。その結果 20 種類の ODN 候補のうち 1F (5'-GAAGGTAA-3')、3F (5'-ATTTGCT-3')、3R (5'-AGCAAAT-3') の 3 種類の ODN が Caco-2 細胞からの elafin の分泌を有意に促進した (図 9)。



*p<0.05, **p<0.01 vs None [one-way ANOVA followed by Tukey's test]

図 9. D2905 株ゲノム DNA 由来 ODN の Caco-2 細胞からの elafin 分泌におよぼす影響

各種 ODN を 30 μ M の濃度で Caco-2 細胞に曝露し、48 時間後の elafin 分泌量を測定し比較した。

第3節 小括

本章ではまず D2905 株の生菌体と死菌体の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の比較検討を行ったところ、D2905 株の死菌体で elafin の分泌が促進された。この要因の 1 つとして、D2905 株の死菌体作製過程における熱処理によってゲノム DNA が細胞外に漏出し、これが Caco-2 細胞からの elafin の分泌を促進させたのではないかと推察された。そこで、DNase I で DNA 分解処理をした D2905 株死菌体の Caco-2 細胞からの elafin の分泌促進作用を検討したところ、DNase I による DNA 分解処理を行わなかった D2905 株の死菌体と比較して elafin の分泌が有意に抑制された。一方で、DNaseI 処理を行った場合も、死菌体を加えない場合と比較すると有意に elafin の分泌が認められたため、ゲノム DNA 以外にも elafin 分泌促進作用を持つ成分が存在する可能性もある。

さらに D2905 株のゲノム DNA について Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を検討した結果、elafin の分泌を濃度および時間依存的に有意に促進した。細菌由来成分を認識する受容体には、パターン認識受容体の 1 つである TLR がある。このうち TLR9 は細菌のゲノム DNA を認識する受容体であり、エンドソームに局在していることがわかっている【32-35】。そのためゲノム DNA が TLR9 に認識されるためには細胞内にゲノム DNA が移行する必要がある。本研究でも、D2905 株のゲノム DNA を Caco-2 細胞にトランスフェクションを行うことで Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用が認められた。さらに TLR9 の発現を抑制した Caco-2 細胞に D2905 株のゲノム DNA をトランスフェクションしたところ elafin の分泌促進は認められなかった。この結果から、D2905 株の

ゲノム DNA を Caco-2 細胞の TLR9 が認識して elafin 分泌促進作用を示している可能性が示された。しかし、D2905 株の死菌体でも Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を示しているため、D2905 株のゲノム DNA の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用が TLR9 の認識だけでは説明できないが、本研究では解明できていない。

次に、D2905 株のゲノム DNA 中に Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進させる塩基配列が存在すると予想し、elafin 分泌促進作用を持つ塩基配列の探索を行ったところ、9 種類の異なる塩基配列を見いだした。さらに 9 種類の塩基配列を遺伝子配列解析ソフトウェアである GENETYX ver. 20 を用いて探索し、共通して存在する 20 個の 7-8 塩基の長さの塩基配列が Caco-2 細胞から elafin の分泌を促進する ODN 候補となった。これら 20 種類の ODN を合成して Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を検討したところ、3 種類の ODN、1F (5'-GAAGGTAA-3')、3F (5'-ATTTGCT-3') および 3R (5'-AGCAAAT-3') が Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を示した。

近年の研究で、elafin は抗菌、抗炎症ペプチドであり、*in vivo* 試験において抗炎症作用を示すことが報告されている【15, 17, 36-38】。また、elafin による炎症保護作用も明らかになっており、遺伝子組換えによって作出された elafin 分泌作用を持つ乳酸球菌が IBD モデルマウスの腸管内の炎症保護作用が抗炎症サイトカインとして知られる IL-10 や TGF- β よりも優れていたという報告もある【21】。

乳酸菌のゲノム DNA は乳酸菌の抗炎症作用を示す成分の 1 つであり、ゲノム DNA の抗炎症作用は主に TLR-9 を介して作用を示すことがわかっており、

ODN も TLR9 が認識することが報告されている【9, 10, 39】。そのため、今回特定した ODN も Caco-2 細胞の TLR9 を介して elafin の分泌促進作用を示していると考えられる。

5'-TTAGGG-3'や 5'-TCAAGCTTGA-3'などの乳酸菌のゲノム DNA に存在する ODN が抗炎症作用を示す報告はいくつかある【39】。また、*Lactobacillus casei* のゲノム DNA 由来の ODN 5'-TTTTGCCG-3'は Caco-2 細胞から炎症生サイトカインである IL-8 の分泌を抑制している【10】。本章で特定した elafin の分泌を促進する 3 種類の ODN (1F, 3F, 3R) の塩基配列は上述の ODN とは異なっていた。また、*L. casei* 株由来の ODN 5'-TTTTGCCG-3' をデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎モデルマウスに経口投与した結果、その症状を改善したという報告がある【10】。そのため、本章で特定した elafin の分泌を促進した ODN 1F, 3F, 3R も生体内で同様に elafin の分泌を促進すると思われる。よって D2905 株のゲノム DNA から特定した抗炎症作用を示す elafin の分泌を促進する ODN が腸管内の抗炎症治療に貢献できる可能性があると考えられる。

第2章 D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin の分泌促進作用

第1節 D2905 株が産生する EPS の抽出・精製

第1章では D2905 株の成分のうち、ゲノム DNA が Caco-2 細胞から elafin の分泌促進作用を持つことがわかった。しかし、DNase I で DNA の分解処理を行った D2905 株の死菌体では、Caco-2 細胞からの elafin の分泌は完全には抑制できていなかった (図 3)。この結果から、D2905 株にはゲノム DNA 以外にも Caco-2 細胞からの elafin の分泌促進作用を持つ D2905 株由来成分が存在することが示唆された。そこで D2905 株の特徴的な性状の1つである、EPS について着目した。D2905 株が産生する EPS の生理作用は、これまでほとんど解明されていない。本章では D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌に対する影響について検討を行った。

1-1. D2905 株が産生する EPS の抽出

まず、D2905 株を MRS 培地で 27°C、24 時間本培養した。培養物を遠心分離にて菌体を除去し、上清を回収した。菌体に付着し EPS も回収する目的で PBS で菌体を懸濁後、再度、遠心分離にて菌体を除去して上清を回収した。回収した上清にエタノール沈殿を行い、得られた沈殿物に対して DNase I、RNase、Proteinase K による酵素処理を行い、DNA、RNA、タンパク質を除去した。再

度エタノール沈殿を行い、得られた沈殿物を滅菌超純水に溶解し、透析・凍結乾燥を行った。得られた試料を D2905 株が産生する EPS サンプルとした【26, 27】。その結果、培養菌体 1kg から約 155mg の EPS を得た。

1-2. D2905 株が産生する EPS の陰イオン交換クロマトグラフィー

得られた EPS を 20mM Tris-HCl (pH8.6) に溶解して、HiTrap DEAE FF カラムを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムを通過した画分を中性多糖画分 (NPS)、カラムに吸着した画分を酸性多糖画分 (APS) とし、カラムに吸着した APS は 0.05 - 0.4M の NaCl を用いてステップワイズ法にて回収した【40】。糖の検出はフェノール・硫酸法【41】を用いて行った。その結果、図 10 で示すように D2905 株が産生する EPS は NPS と 3 種類の APS で構成されていることがわかった。

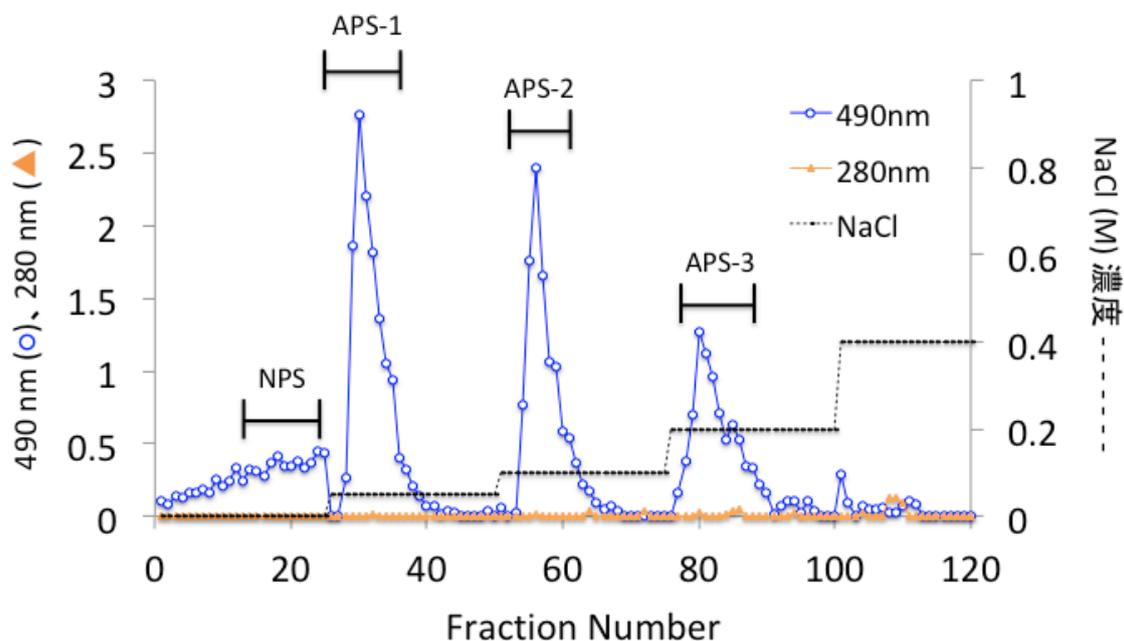


図 10. D2905 株が産生する EPS の陰イオン交換クロマトグラフィー

NPS : カラムを通過した画分 (Fraction No. 10-25)、

APS-1 : カラムに吸着し、0.05M NaCl で溶出した画分 (Fraction No. 28-37) 、

APS-2 : カラムに吸着し、0.1M NaCl で溶出した画分 (Fraction No.52-64) 、

APS-3 : カラムに吸着し、0.2M NaCl で溶出した画分 (Fraction No. 77-88)。

各画分 (1mL) 中の糖濃度をフェノール・硫酸法を用いて 490nm の吸光度で測定した。また、タンパク質濃度を 280nm の吸光度で測定した。

第2節 D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌誘導の促進作用の検討

2-1. D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞の生存への影響

D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討を行うため、まず EPS の Caco-2 細胞の生存に与える影響を検討した。EPS を 20-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製し、Caco-2 細胞に曝露して、24 時間後、48 時間後、72 時間後の Caco-2 細胞の生存率を測定した。その結果、全ての濃度及び時間でも Caco-2 細胞の生存に影響を与えないことがわかった (図 11)。

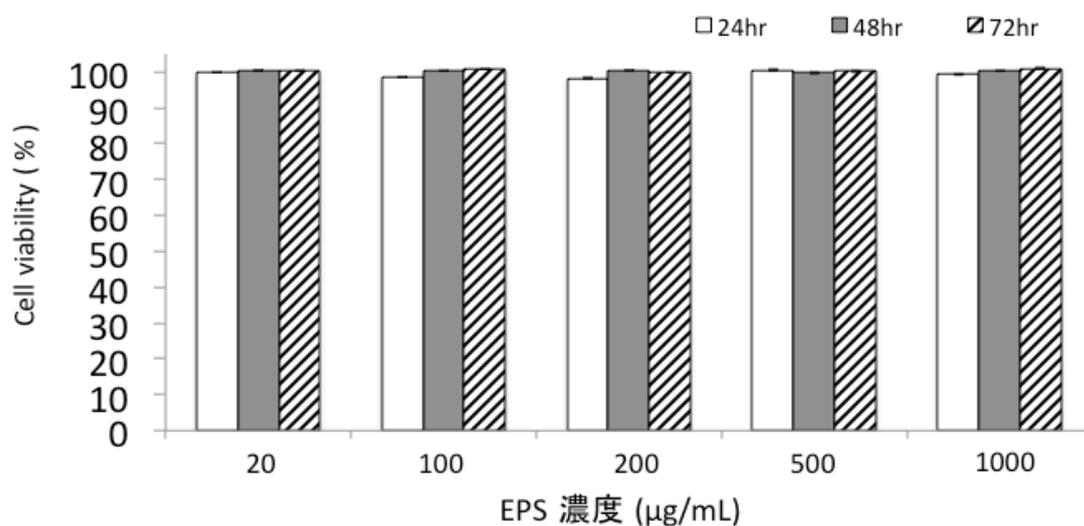


図 11. D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞の生存への影響

D2905 株が産生する EPS を 20-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でそれぞれ Caco-2 細胞に曝露し、経時的に Caco-2 細胞の生存率を測定した。

2-2. D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討

12-well の plate 中で、EPS を 50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL の濃度で Caco-2 細胞 (4.0×10^5 cells/well) に曝露して、48 時間後の elafin 分泌量を測定した。その結果、EPS を曝露しなかった場合 (0 μ g/mL) の Caco-2 細胞からの elafin 分泌量に対して、50 μ g/mL 濃度の EPS を曝露した場合の elafin の分泌量に有意差は認められなかった。一方で、100 μ g/mL、200 μ g/mL の濃度の EPS を曝露した場合、elafin 分泌量はそれぞれ有意に促進された (図 12)。

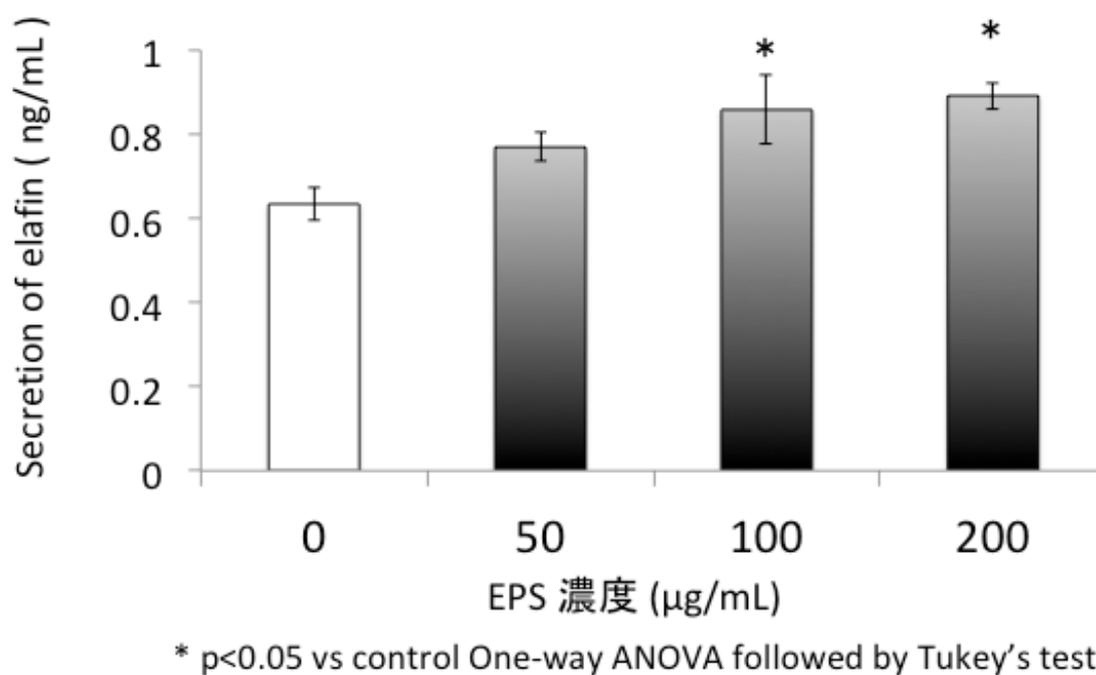


図 12. D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討

D2905 株が産生する EPS を 50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL の濃度で Caco-2

細胞 (4.0×10^9 cells/well) に曝露して、48 時間後の elafin 分泌量を測定した。

2-3. D2905 株が産生する EPS 分画の elafin 分泌促進作用

D2905 株が産生する EPS には $100\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用があることがわかった。しかし、D2905 株が分泌する EPS は第 1 節で示したように NPS と 3 種類の APS が混合した多糖体であった。そのため、D2905 株の EPS の elafin 分泌促進作用の活性本体が、この 4 種類の多糖体分画のどの成分であるかは不明である。そこで D2905 株が産生する EPS の各多糖体分画それぞれの Caco-2 細胞 (4.0×10^5 cells/well) に対する elafin 分泌促進作用を検討した。 $100\mu\text{g/mL}$ の NPS、APS-1、APS-2、APS-3 をそれぞれ Caco-2 細胞に曝露して、48 時間後の elafin の分泌量を測定したところ、EPS の各多糖体分画を曝露しなかった場合 (None) の Caco-2 細胞からの elafin の分泌量と比較して、NPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌が有意に促進された。それに対し、APS-1、APS-2、APS-3 は Caco-2 細胞からの elafin の分泌の促進は認められなかった。この結果から、EPS の各多糖体分画のうち、NPS のみに Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用が認められた (図 13-1)。さらに、 $50\mu\text{g/mL}$ 、 $100\mu\text{g/mL}$ の濃度の NPS を Caco-2 細胞に曝露して、48 時間後の elafin 量を測定したところ、分画前の EPS では有意差が認められなかった $50\mu\text{g/mL}$ の濃度でも有意な分泌促進作用が認められた (図 13-2)。

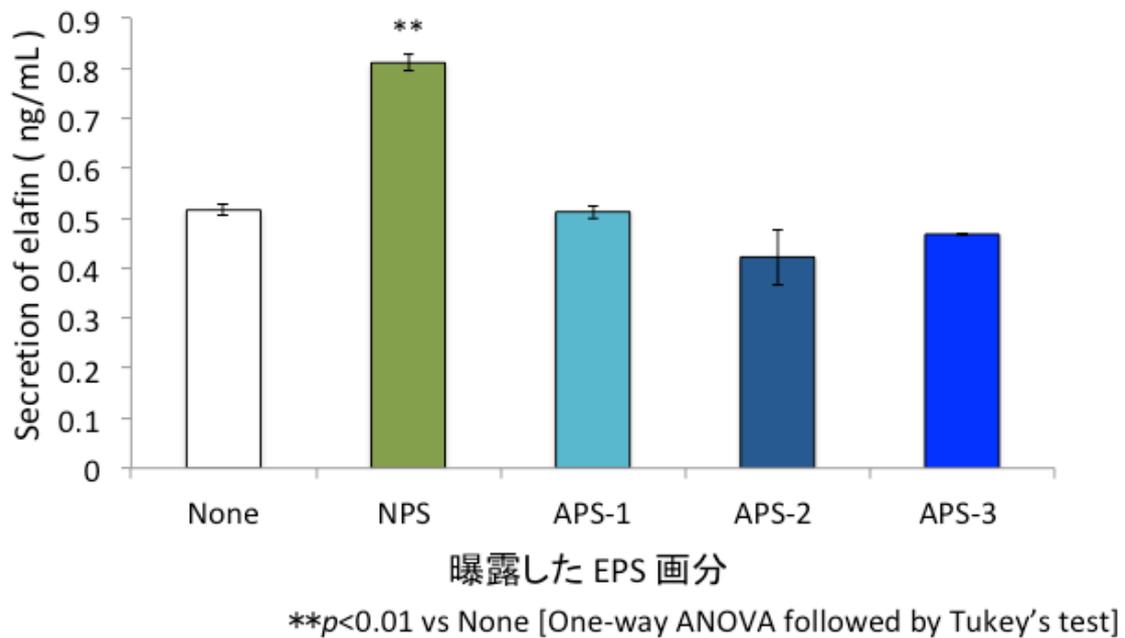


図 13-1. D2905 株の各多糖体画分の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討

D2905 株由来の各 EPS 画分を 100 μ g/mL の濃度で Caco-2 細胞 (4.0×10^5 cells/well) に曝露して、48 時間後の elafin 分泌量を測定した。

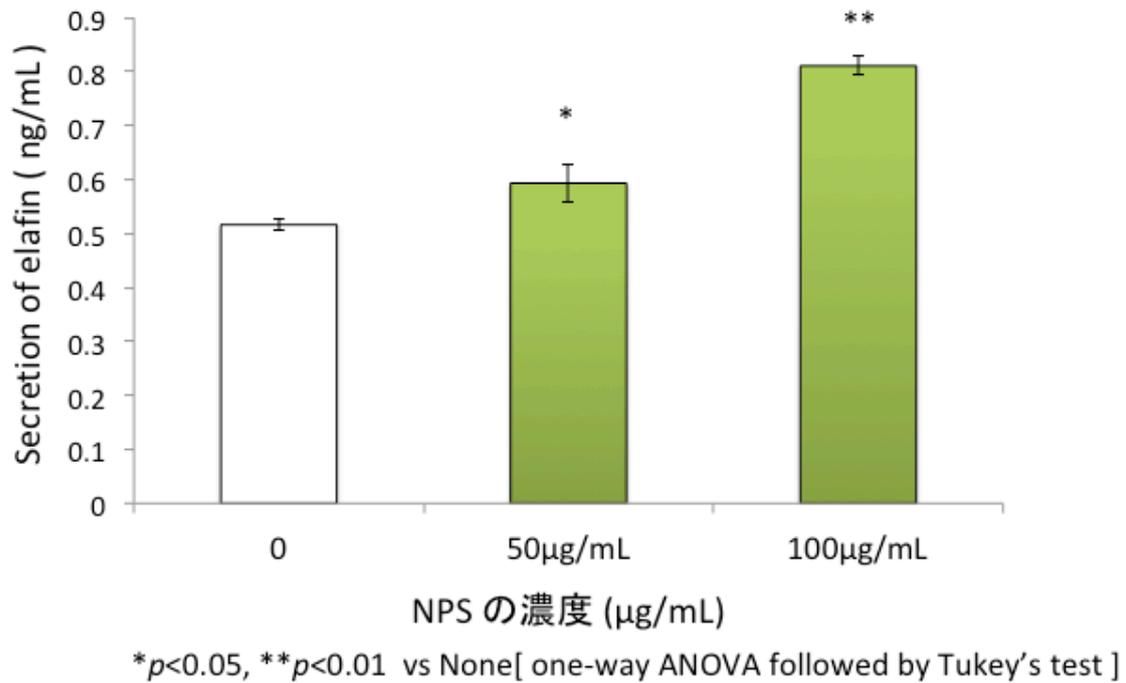


図 13-2. Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用に及ぼす NPS 濃度の影響

D2905 株が産生する NPS を 50µg/mL、100µg/mL の濃度で Caco-2 細胞 (4.0 × 10⁵ cells/well) に曝露して、48 時間後の elafin 分泌量を測定した。

第3節 D2905 株が産生する NPS の糖組成解析

前節までに D2905 株が産生する EPS には濃度依存的に Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用が確認され、さらにその活性の本体が NPS であることがわかった。そこで Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を持つ NPS の糖組成の解析を試みた。D-グルコース (Glc) の存在比を 1.00 とした時の NPS の構成糖比率は表 3 の通りになった。

表 3. D2905 株が産生する NPS の構成糖比率

EPS	構成糖比率 (モル比)						
	Glc	Gal	Man	Ara	Fuc	GlcNAc	GalNAc
NPS	1.00	0.50	0.65	0.02	0.08	0.28	0.11

Glc : D-グルコース、Gal : D-ガラクトース、Man : D-マンノース、Ara : D-アラビノース、Fuc : D-フコース、GlcNAc : N-アセチル-D-グルコサミン、GalNAc : N-アセチル-D-ガラクトサミン

第4節 小括

本章では D2905 株が産生する EPS を抽出・精製し、EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討を行った。まず、D2905 株から EPS を抽出したところ、D2905 株の培養物 1kg から約 155mg の EPS を得ることができた。さらに得られた D2905 株の EPS を陰イオン交換クロマトグラフィーで分離したところ、D2905 株が産生する EPS は 1 種類の NPS と 3 種類の APS で構成されていることがわかった。

これまでも 様々な乳酸菌から EPS が抽出されており【24, 25】、*L. delbrueckii* subsp. *buigaricus* OLL1073R-1 株が産生する EPS は 1 種類の NPS と 2 種類の分子量の異なる APS で構成されている【26, 27】。他にも、*L. plantarum* No.14 株の産生する EPS は 2 種類の NPS と 2 種類の APS で構成されており【40】、また、*L. plantarum* SN35N 株の産生する EPS は 2 種類の APS のみで構成されているとの報告がある【42】。本章で抽出した D2905 株が産生する EPS の構成と既知の乳酸菌が分泌する EPS の構成とは異なっていた。

乳酸菌が産生する EPS の生理活性作用はこれまでも報告がある。前述した *L. delbrueckii* subsp. *buigaricus* OLL1073R-1 株が分泌するリン酸基を有する高分子 APS は IFN- γ の産生を促進し、NK 細胞を活性化してウイルス感染の予防を有する他【28-30】、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* FC 株の APS による B 細胞を活性化する作用が報告されている【31】。さらに細胞に対する免疫賦活作用以外にも *L. plantarum* SN35N 株の APS にはヒアルロニダーゼ活性阻害作用があり、抗アレルギー作用を示す可能性があるといった報告がある【42】。本

章で抽出した D2905 株が産生する EPS は 20-1,000 μ g/mL の濃度で Caco-2 細胞の生存に影響を与えなかった。D2905 株が産生する EPS を Caco-2 細胞に曝露したところ 100 μ g/mL 以上の濃度で濃度依存的に elafin の分泌が有意に促進した。さらに D2905 株が産生する EPS の構成多糖のうち、NPS にのみ濃度依存的に Caco-2 細胞からの elafin の分泌を有意に促進し、他の多糖体画分の 3 種類の APS には Caco-2 細胞からの elafin 分泌の促進が認められなかった。この結果から D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の活性本体が NPS であることが本研究で特定された。

さらに D2905 株が産生する NPS の糖組成の解析を行ったところ、その糖組成は、Glc、Gal、Man、Ara、Fuc、GlcNAc、GalNA であった。これまでに報告されている乳酸菌の NPS の構成糖は、*L. delbrueckii* subsp. *buigaricus* OLL1073R-1 株の NPS で Glc、Gal、Man、Xyl であり【27】、同じ *Lactobacillus plantarum* である *L. plantarum* No.14 株の NPS の構成糖は Glc、Gal、Man、Rha、であり【40】 D2905 株が産生する NPS と異なる糖組成であった。

乳酸菌が産生する EPS で生理活性作用を示すのは APS がほとんどであり、NPS で Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用が認められたのは D2905 株が産生する EPS の特徴的な性質であると考えられる。また、D2905 株には 3 種類の APS が存在するが、elafin 分泌促進作用は 3 種類とも認められなかった。既知の乳酸菌が産生する APS の生理活性作用の例から、D2905 株が産生する APS にも生理活性作用がある可能性があるが、本研究では Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用を示さなかった。他の生理活性作用を有する可能性があるが、本研究では D2905 株が産生する APS の生理活性作用の解明には至っていない。

また、D2905 株が産生する EPS および NPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の作用機序については本章では解明には至らなかった。

今後、D2905 株が産生する EPS および NPS の Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の詳細を解明することで腸管内の elafin の分泌誘導の促進による抗炎症治療に貢献することができるのではないかと期待される。

総括

本研究ではクルマエビの腸管から単離された乳酸菌 D2905 株のゲノム DNA および D2905 株が産生する EPS についての Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用の検討を行った。

第 1 章では、Caco-2 細胞から elafin の分泌を促進させる *Lactobacillus plantarum* D2905 株乳酸菌のゲノム DNA およびゲノム DNA 由来 ODN の特定を行い、その作用はパターン認識受容体の 1 つである TLR9 を介して elafin 分泌促進作用を示すことを明らかにした。第 1 章の結果から D2905 株のゲノム DNA には TLR 9 を介した Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用があり、このゲノム DNA に含まれる 3 種類の ODN が elafin 分泌促進作用の活性の中心であることが示唆された。

第 2 章では、D2905 株が産生する EPS の Caco-2 細胞からの elafin の分泌促進作用の検討を行った。D2905 株培養菌体 1kg から、約 155mg の EPS が得られ、その EPS は 1 種類の NPS と 3 種類の APS から構成されていた。第 2 章の結果から D2905 株が産生する EPS の内、NPS が Caco-2 細胞からの elafin の分泌を促進することがわかった。しかし、本研究では D2905 株が産生する EPS および NPS による Caco-2 細胞からの elafin 分泌促進作用のメカニズムの解明までには至らなかった。D2905 株が産生する EPS、特に NPS について Caco-2 細胞への作用の詳細な解明が必要である。

elafin は腸管粘膜内で産生され、腸管内の炎症の防御に関与している抗炎症ペプチドの 1 つである。よって本研究で特定された D2905 株の ODN 1F (5'-

GAAGGTAA-3'), 3F (5'- ATTTGCT-3'), 3R (5'- AGCAAAT-3') および D2905 株が産生する NPS が elafin の分泌を促進させることで腸管内の炎症の予防・治療に繋がり、新たな薬物の開発へと応用できる可能性があると期待される。

実験の部

1) 使用した菌と培養条件

1-1) 乳酸菌

クルマエビの腸管由来の乳酸菌 *L. plantarum* D2905 株を使用した。培養は MRS 培地 (10g/L ポリペプトン、10g/L カツオ肉エキス、5g/L 酵母エキス、1g/L Tween 80、2g/L クエン酸水素二アンモニウム、5g/L 酢酸ナトリウム三水和物、2g/L リン酸二カリウム、0.1g/L 硫酸マグネシウム、0.05g/L 硫酸マンガン、20g/L グルコース、pH6.5) 中、27°Cで行った。

1-2) 大腸菌

Escherichia Coli K12 株由来の DH5 α を使用した。培養は LB 培地でアンピシリン (50mg/mL) 存在下、非存在下で 37°C、振とう培養で行った。

2) 使用した細胞と培養条件

Caco-2 細胞

72 歳男性由来のヒト大腸癌由来細胞株である。培養は MEM 培地 (Minimum Essential Medium, GIBCO) に 10% FBS (Biowest)、0.1mM NEAA (GIBCO)、100U/mL Penicillin、100 μ g/mL Streptomycin (GIBCO) を加えた培地を用いて、37°C、5% CO₂ で行った。

3) D2905 株の死菌体の作製と死菌体の DNase I による DNA 分解処理

D2905 株を一晩培養後、 $OD_{600} = 0.05$ となるよう培地で希釈し、8 時間、 27°C で培養した。培養液を遠心 ($7,000 \times g$, 4°C , 15 分) し、培養上清を除去し沈殿物を PBS で 2 回洗浄した。その後 65°C 、10 分間熱処理を行うことで死菌体を作製した。DNA 分解処理には作製した D2905 株の死菌体に $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の DNase I (Roche) を加えて、 37°C 、16 時間インキュベートすることで処理した。

4) 培養上清中の elafin 濃度の測定

サンプルの曝露後の Caco-2 細胞の培養液を遠心 ($15,000 \times g$, 4°C , 5 分) 後、上清を回収した。Caco-2 細胞の培養上清中の elafin の濃度は human Trappin-2/elafin ELISA kit (R&D systems) を使用した。

5) D2905 株からのゲノム DNA 抽出

一晩培養した D2905 株を遠心 ($7,000 \times g$, 4°C , 15 分) し、培養上清を除去し沈殿物を PBS で 2 回洗浄した。ゲノム DNA の抽出は Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit (QIAGEN) を用いて行った。

6) D2905 株のゲノム DNA の Caco-2 細胞へのトランスフェクション

$5\mu\text{L}$ の D2905 株ゲノム DNA 溶液 (3.5 , 7 , $17\mu\text{L}/\text{mL}$) に 1% FBS を添加した MEM 培地 $245\mu\text{L}$ を加えた。さらに siLentFect Lipid Reagent (Bio-Rad Laboratories) $1.25\mu\text{L}$ を加えた MEM 培地を $250\mu\text{L}$ 添加して室温で 30 分インキュベートした。作製したトランスフェクション 試薬 Mix を 24-well plate 上の Caco-2 細胞 (2.0×10^5 cells/ $500\mu\text{L}/\text{well}$) に曝露して 37°C 、5% CO_2 でインキ

ュベートした。

7) RNAi 法による Caco-2 細胞の TLR9 の発現抑制

TLR9-siRNA、scramble TLR9-siRNA は株式会社ボナック社に合成を依頼した (下表)。100 μ M siRNA に 0.25 μ L MEM 培地を 250 μ L を加えて 5 分間インキュベートした。この siRNA 溶液に siLentFect Lipid Reagent (Bio-Rad Laboratories) 5 μ L と MEM 培地を 250 μ L 添加して室温で 30 分間インキュベートした。作製したトランスフェクション 試薬 Mix を 24-well plate で培養した Caco-2 細胞 (2.0×10^5 cells /well) に曝露して、24 時間インキュベートすることで、TLR9 の発現を抑制した。

siRNA		Sequence(5'→3')
TLR9-siRNA	Sense	GAGCUAAACCUGAGCUACAdTdT
	Anti-sense	UGUAGCUCAGGUUUAGCUCdTdT
Scramble TLR9-siRNA	Sense	CGAUAUCGUAACGAACAGdTdT
	Anti-sense	CUGUUGCGUUACGAUAUCGdTdT

8) ウエスタンブロット法

10-18%のアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離した。ゲル上のタンパク質は Hybound-P OVDf 膜 (GE Healthcare) に転写した。PVDF 膜をブロッキング溶液 (5% スキムミルク、TBS) 中 1 時間インキュベートしてブ

ロッキングを行い、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体中で 4℃、一晩インキュベートした。TBS-T (0.05% Tween-20, TBS) で洗浄後、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体 (AP labeled anti-rabbitk IgG, Cell Signaling Technology) 中、室温で 1 時間インキュベートした。TBS-T で洗浄後、CDP-Star Reagent を用いて化学発光を検出した。また、ImageJ ソフトウェア (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を使用し、発現量の数値化を行った。

9) D2905 株のゲノム DNA ライブラリーの作製

D2905 株のゲノム DNA (1mg/mL) に *Sau3AI* (TaKaRa Bio) を加えて、37℃、一晩インキュベートし、DNA の切断を行った。2%アガロースゲル電気泳動により DNA を分離し、100-1,000bp の断片部分のゲルを切り取った。その後、MonoFas DNA purification Kit (GL Sciences) を用いてゲルから DNA 断片を抽出した。次に pUC19 を *BamHI* (TaKaRa Bio) により制限酵素処理を行い、CIAP (TaKaRa Bio) を用いて脱リン酸化を行った。そして ligation kit (TaKaRa Bio) を用いて、D2905 株の DNA 断片を pUC19 の *BamHI* サイトに挿入した。このプラスミドを DH-5 α に形質転換し、下表のプライマー、および KOD Fx Neo (TOYOBO) を用いてコロニー PCR を行った。

Primer	Sequence(5'→3')
pUC19-Fw	GCCAAGCTTGCATGCCTGCAG
pUC19-Rv	GAATTCGAGCTCGGTACCCG

10) 大腸菌からのプラスミドの抽出

アンピシリン含有 LB 培地で形質転換体を一晩培養した。プラスミドは、Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega) を用いて抽出した。また、混入したエンドトキシンを除去するために MiraCLEAN Endotoxin Removal Kit (TaKaRa Bio) を用いてプラスミドを精製した。

11) D2905 株の EPS の抽出

D2905 株は MRS 培地で 27°C、一晩培養後、OD₆₀₀ = 0.05 となるよう MRS 培地で希釈し 27°C、24 時間培養した。培養液に 10w/v%量のトリクロロ酢酸を加え、16,000×g, 4°C, 30 分間遠心し上清を回収した。菌体表層に付着した EPS も回収するため PBS で沈殿物を懸濁して再度 16,000×g, 4°C, 30 分間遠心し上清を回収した。この作業を 2 回繰り返す、回収した上清の 1.5-2 倍量の 99%冷エタノールを加えてエタノール沈殿を行った。エタノール沈殿は 2 回行った。回収した沈殿物を 50mM Tris-HCl (1 mM MgCl₂, pH8.0) で溶解し、DNase (Sigma)、RNase (Sigma) を最終濃度が 7µg/mL となるように添加し、37°C、6 時間インキュベートした。その後、Proteinase K (Sigma) を最終濃度が 200 µg/mL となるように添加して 37°C、16 時間インキュベートした。加えた酵素を失活させるために反応液を 90°C、10 分間インキュベートさせた後、2 倍量の 99%冷エタノールを加えてエタノール沈殿を 2 回行った。回収した沈殿物を滅菌超純水で溶解し、超純水に対して透析を 48 時間行い、凍結乾燥した。凍結乾燥後に得られた試料を D2905 株が分泌する EPS とした。

12) NPS、APS の精製

EPS を 20mM Tris-HCl (pH8.6) に溶解し、Hi-Trap DEAE-sepharose カラムを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムを通過した画分を NPS とした。カラムに吸着した画分は、0、0.05、0.1、0.2、0.4M の NaCl を使ってステップワイズ法で段階的に溶出させた。得られたそれぞれの多糖体画分をエタノール沈殿後、超純水に対して透析を行い、凍結乾燥した。

13) 糖の検出

糖の検出にはフェノール・硫酸法を用いた。多糖体溶液 100 μ L に等量の 5% フェノールを混合し、濃硫酸 500 μ L 加えた。室温で 10 分間インキュベートした後、ボルテックスで混合しさらに室温、30 分間インキュベートした。反応後 490nm の吸光度を測定した。

14) WST-1 試薬を用いた EPS 曝露後の Caco-2 細胞の生存率の測定

12-well plate 上で EPS を曝露した Caco-2 細胞を培養後、培養上清を除去し、well を PBS で洗浄後、10%量の premix WST-1 試薬を加えた MEM 培地を添加した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 2 時間インキュベート後、OD₄₅₀ および OD₆₃₀ の値を測定した。Caco-2 細胞の生存率は $OD_{450}\text{-}OD_{600}(\text{sample})/OD_{450}\text{-}OD_{600}(\text{non-treated sample}) \times 100 (\%)$ で算出した。

15) D2905 株が産生する NPS の糖組成

解析は医化学創薬株式会社に依頼した。凍結乾燥させたサンプルを 1mg/mL

に調製し、加水分解、蛍光ラベル化して単糖解析を行った。糖標準品は Glc, Gal, Man, Ara, Rib (D-リボース), Xyl (D-キシロース), Rha (D-ラムノース), Fuc, ManNAc (Nアセチルマンノサミン), GlcNAc, GalNAc の 11 種類を用いた。

16) 統計処理

データは平均値±標準誤差 (SEM) 表し、統計解析は Origin Pro 8.1 (OriginLab) を用いて行った。全ての解析において、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

引用文献

- 【1】 Metchnikoff E. The prolongation of life. William Heinemann. London. 1907.
- 【2】 日本乳酸菌学会. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス. 京都大学学術出版会. 2010.
- 【3】 Haras MV, Koninky JF, Vos JG, Huis in't Velt JH, van Dijk JE. Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Int J Food Microbiol* 2005;103:143-155
- 【4】 Hart AL, Stagg AJ, Kamma MA. Use of probiotics in the treatment of inflamematory bowel disease. *J Clin Gastoroenterol* 2003;36:111-119
- 【5】 Laffineur G, Lescut D, Vincent P, Quandalle P, Wurtz A, Colombel JF. Bacterial translocation in Crohn disease. *Gastroenterol Clin Biol* 1992;16:777-781
- 【6】 Porras M, Correlation between cyclical epithet barrier dysfunction and bacterial translocateion in the relapses of intenstinal inflamemation. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:843-852
- 【7】 Noh SY, Kang S-S, Yun C-H, Han SH. Lipoteichoic acid from *lactobacillus plantarum* inhibits Pam2CSK4-induced IL-8 production in human intenstinal epithelial cells. *Mol Immunol* 2015;64:183-189.
- 【8】 Hiramatsu Y, Satho T, Irie K, Shiimura S, Okuno T, Sharmin T, Uyeda S, Fukumitsu Y, Nakashima Y, Miake F, Kashige N.

- Differences in TLR9-dependent inhibitory effects of H₂O₂-induced IL-8 secretion and NF-kappa B/I Kappa B-alpha system activation by genomic DNA from five *Lactobacillus* species. *Microbes Infect* 2013;15:96-104.
- 【9】 Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takebayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in experimental colitis. *Gastroenterology* 2004;126:520-528.
- 【10】 Hiramatsu Y, Satho T, Hyakutake M, Irie K, Mishima K, Miake F, Kashige N. The anti-inflammatory effects of a high-frequency oligodeoxynucleotide from the genomic DNA of *Lactobacillus casei*. *Int Immunopharmacol* 2014;23:139-47.
- 【11】 Yi-zhen Zhang, Yong- Yu Li. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2014;20:91-99
- 【12】 Khor B, Gardet A, Xavier RI. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:307-317.
- 【13】 Triantfillidis JK, Merikas E, Georgopoulos F. Current and emergeng drugs for the treatment of inflamematory bowel disease. *Drug Des Devel ther* 2011;5:185-210.
- 【14】 Motta J-P, Bermúdez-Humarán LG, Deraison C, Martin L, Rolland C, Rousset P, Boue J, Dietrich G, Chapman K, Kharrat P, Vinel J-P,

- Alric L, Mas E, Sallenave J-M, Langella P, Vergnolle N. Food-Grade Bacteria Expressing Elafin Protect Against Inflammation and restore colon homeostasis. *Sci Transl Med* 2012;4:158raa144-158.
- 【15】 Motta J-P, Magne L, Descamps D, Rolland C, Squarzoni-Dale C, Rousset P, Martin L, Cenac N, Balloy V, Huerre M, Fröhlich LF, Jenne D, Wartelle J, Belaaouaj A, Mas E, Boue J, Vinel J-P, Alric L, Chingnard M, Vergnolle N, Sallenave J-M. Modifying the protease, antiproteases pattern by elafin overexpression protects mice from colitis. *Gastroenterology* 2011;140:1272-1282.
- 【16】 Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, FerrazJGP, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007;117:636-647.
- 【17】 Schmid M, Fellermann K, Fritz P, Wiedow O, Stange EF, Wehkamp J. Attenuated incubation of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 2007;81:907-915.
- 【18】 Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* 2008;57:1222-1229.
- 【19】 J. M. Sallenave, Secretory leukocyte protease inhibitor and

- elafin/trappin-2: Versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 2010;42:635-43.
- 【20】 L. Shaw, O. Wiedow, Therapeutic potential of human elafin. *Biochem. Soc. Trans* 2011;39(5):1450-1454.
- 【21】 Bermúdez-Humarán LG, Motta J-P, Aubry C, Kharrat P, Rous-Martin L, Sallenave J-M, Deraison C, Vergnolle N, Langella P. Serin protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- β anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb Cell Fact* 2015;14(10):26.
- 【22】 Maeda M, Shibata A, Biswas G, Korenaga H, Kono T, Itami T, et al. Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. *Mar Biotechnol (NY)*. 2014;16:181-192.
- 【23】 Welman AD, Maddox IS. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol*. 2003;21:269–274.
- 【24】 Laws A, Gu Y, Marshall V. Biothintesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. 2001;19:597-625.
- 【25】 M. Nikolic, P. Lopez, I. Strahinic, A. Suarez, M. Kojic, M. Fernandez-García M, Topisirovic L, Golic N, Ruas-Madiedo P.

- Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;158:155-162.
- 【26】 Kitazawa H, Harata T, Uemura J, Saito T, Kaneko T, Itoh T. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.*1998;40:169-175.
- 【27】 Makino S, Ikegami S, Kano H, Sashihara T, Sugano H, Horiuchi H, Saito T, Oda M. Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J. Dairy Sci.*2006;89:2873-2881.
- 【28】 Makino S, Sato A, Goto A, Nakamura M, Ogawa M, Chiba Y, Hemmi J, Kano H, Takeda K, Okumura K, Asami Y. Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharide derived from yogurt fermented with *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J Dairy Sci.* 2016;99:915-923
- 【29】 Nagai T, Makino S, Ikegami S, Itho H, Yamada H. Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

- bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharide against influenza virus infection in mice. *Int. Immunopharmacol.*2011;11:2246-2250.
- 【30】 Makino S, Ikegami S, Kume A, Horiuchi H, Sasaki H, Orii N. Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yogurt fermented with *L. delbrueckii* ssp. *buigaricus* OLL1073R-1. *Br. J. Nutr.* 2010;104:998-1006.
- 【31】 Kitazawa H, Yamaguchi T, Itoh T. B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.*1992;75:2946-2951.
- 【32】 Matsumoto M, Funatani K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto M, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic. *J. Immunol.* 2003;171:3154-3162.
- 【33】 Nishiya T, Kajitani E, Miwa S, DeFranco A. TLR3 and TLR7 Are Targeted to the Same Intracellular Compartments by Distinct Regulatory Elements. *J. Biol. Chem.* 2005;280:37107-37117.
- 【34】 Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald K.A, Monks B.G, Knetter C.F, Lien E, Nilesen N, Espeevik, T, Golenbock D.T. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunol.* 2004;5:190-198.
- 【35】 Varrier T, Solhonne B, Sallenave J-M, Garcia-Verdugo I. The WAP

- protein Trappin-2/Elafin: A handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *The International Journal of Biochem & Cell Biolo.* 2012;44:1377-1380.
- 【36】 Wiedow O, Lüademann J, Utecht B. Elafin is a potent inhibitor of protease 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;174:6-10.
- 【37】 Wiedow O, Schröder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Bio Chem.* 1990;265:14791-14795.
- 【38】 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptors recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-745.
- 【39】 Bouladoux N, Hall JA, Graiger JR, dos Santos LM, Kann MG, Nagarajan V, Verthelyl D, Belkaid Y. Regulatory role of suppressive motifs from commensal DNA. *Mucosal Immunol.* 2012;5:623-634.
- 【40】 Hashiguchi K, Nagata Y, Yoshida M, Murofusi Y, Kitazawa H. Chemical and immunological characterization of extracellular polysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* No.14. *Japanese J. of Lactic Acid Bacteria.* 2011;22:100-105.

- 【41】 Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebrs PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 1956;28:350-356.
- 【42】 Noda M, Shiraga M, Kumagami T, D Narandalai, Sugiyama M. Characterization of the SN35N Strain-Specific Exopolysaccharide Encoded in the Whole Circular Genome of a Plant-Derived *Lactobacillus plantarum*. *Biol. Pharm. Bull.* 2018;41:536-545.

謝辞

本稿を終わるにあたり、本研究に終始懇切なご指導ならびにご鞭撻を賜りました福岡大学薬学部微生物薬品化学教室の鹿志毛信広 教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、多くのご助言とご協力をいただきました当研究室の佐藤朝光 准教授、中島幸彦 助教、福岡大学薬学部生体機能制御学教室の入江圭一 助教に深謝いたします。さらに共同研究として懇切丁寧にご助言いただきました大阪大学微生物病研究所の平松征洋 博士、株式会社九州メディカルの前田稔 博士に厚く御礼申し上げます。

また、様々な形で本研究にご協力いただきました福岡大学薬学部微生物薬品化学教室の萩原大樹 氏、後藤圭介 氏、松永佑也 氏に心より感謝の意を表します。最後に、学生生活を通じ、精神的、経済的支援を賜りました両親および家族をはじめ、多くの友人に心から感謝いたします。