報　文

菌体外多糖を産生する阿波晩茶由来乳酸菌の加熱死菌体による マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞の活性化

Activation of Macrophage-like Raw264.7 Cells by Heat-treated Lactic Acid Bacteria that Produce Exopolysaccharide Isolated from Awa-bancha

西岡　浩貴[*1]，吉本　春奈[*1]，安部　博子[*2]，中島　芳浩[*2]
NISHIOKA Hiroki, YOSHIMOTO Haruna, ABE Hiroko and NAKAJIMA Yoshihiro

抄　録

菌体外多糖（Exopolysaccharides，EPS）を産生する阿波晩茶由来乳酸菌 *Lactiplantibacillus pentosus* AWA1922 と *L. pentosus* AWA1955 の加熱死菌体について，細胞に対する免疫活性を評価した．免疫活性は，発光レポーター遺伝子を導入したマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞を使用して，発光測定による Nuclear factor-κB（NF-κB）活性と ELISA 法による Tumor necrosis factor-α（TNF-α）の検出により評価した．この結果，EPS を産生する AWA1922 と AWA1955 は，他の菌株よりも NF-κB を活性化した．特に，莢膜 EPS を産生する AWA1922 が最も強く NF-κB を活性化した．また，EPS 産生乳酸菌は TNF-α 産生を促進させたものの，産生量は他の菌株と同程度だった．さらに免疫活性化の作用機序を検討したところ，AWA1922 と AWA1955 による NF-κB 活性化と TNF-α 産生には Toll 様受容体 4（Toll-like receptor 4，TLR4）は関与しないことが示唆された．

1　はじめに

乳酸菌は健康に良いと考えられ，生菌と死菌のどちらも様々な製品に利用されている．生菌での利用はヨーグルトや漬物等の発酵食品が挙げられ，生理活性としては整腸作用等がよく知られている[1) 2)]．また，乳酸菌は死菌で利用した場合でも菌体成分による免疫活性作用等，様々な生理活性が報告されている[3) 4)]．生菌で利用する場合は発酵が伴うことが多いので風味が変化するが，死菌での利用は風味への影響が少なく，幅広い製品に適用しやすい．一方で，死菌の生理活性やその作用機序は菌株により異なるので，検証する必要がある．

著者らはこれまでに，後発酵茶の阿波晩茶[5) 6)]から乳酸菌を分離し，食品等への利用に適した菌株を検討してきた．分離菌株の中に，MRS 液体培地で培養時，振盪すると菌体が凝集する AWA1922 と，培養時に粘性物質を産生する AWA1955 が確認された[7)]．これらの菌株は EPS を産生していると考えられ，AWA1922 は細胞膜と共有結合した莢膜 EPS，AWA1955 は菌体から遊離したスライム EPS であることが推測される[8)]．乳酸菌が産生する EPS は免疫活性作用等の生理活性が報告されているが，EPS の特性は菌株により異なり，阿波晩茶由来乳酸菌については明らかになっていない．

本研究では，EPS を産生する阿波晩茶由来乳酸菌の加熱死菌体の免疫活性作用を検討するため，マクロファージ細胞を使用して，様々な生体免疫反応に関与することが知られている転写因子 NF-κB[9)] の活性化と，サイトカインの TNF-α[10)] の産生を評価した．また，免疫活性の作用機序についても検討した．

2　実験方法

2・1　加熱死菌体の調製

Yamashita らの方法[11)] を参考にした．試験に使用した菌株を表 1 に示す．乳酸菌を MRS 液体培地（Merck KGaA）を使用して 35℃で 24 時間培養した．培養液を 8,500×g，4℃で 10 分間遠心して上清を除き，菌体を滅菌超純水で 2 回洗浄し，凍結乾燥した．乾燥した菌体に滅菌超純水を加えて 10 mg/mL とし，80℃で 30 分間の加熱殺菌処理を行った．

*1 食品・応用生物担当，*2 産業技術総合研究所

表１　供試乳酸菌

菌株	菌種	分離源
AWA1922*	*Lactiplantibacillus pentosus*	阿波晩茶
AWA1955**	*Lactiplantibacillus pentosus*	阿波晩茶
AWA1915	*Lactiplantibacillus pentosus*	阿波晩茶
NBRC106467^{T}	*Lactiplantibacillus pentosus*	Corn silage

*：莢膜EPSを産生
**：スライムEPSを産生

２・２　発光培養細胞によるNF-κB活性の評価

NF-κBの活性は，NF-κB応答配列，チミジンキナーゼプロモーター，および赤色発光ルシフェラーゼ遺伝子（SLR3）を連結したレポータープラスミドを安定的に導入したマウスマクロファージ様RAW264.7細胞（NF-κB-RAW264.7細胞）によるレポーターアッセイ法により測定した．この細胞はNF-κBの活性化をSLR3の発光増加により評価できる．

試料には加熱死菌体と，比較としてグラム陰性菌由来のリポ多糖（Lipopolysaccharide，LPS，Merck KGaA）を使用した．発光培地（DMEM（phenol red free，富士フイルム和光純薬），10%ウシ胎児血清（FBS，Merck KGaA），1×Glutamax（Thermo Fisher Scientific），25 mM HEPES（ナカライテスク），400 μM D-ルシフェリン（Resem BV））を用いて，加熱死菌体を100 μg/mLに，LPSを100 ng/mLに希釈した．また，コントロールは試料の代わりに1%滅菌超純水を使用した．24ウェルプレート（Visiplate-24TC，PerkinElmer）にNF-κB-RAW264.7細胞を5×10^{5} cells/wellで播種し，37℃，5% CO_2，湿度飽和状態下で24時間培養した．培養後に上清を除き，試料を含む発光培地を加え，発光測定装置（WSL-1565 Kronos HT，アトー）を用いて20時間リアルタイム発光測定を行った．

２・３　TNF-α産生量の測定

NF-κB-RAW264.7細胞の発光測定後の上清を試料とし，TNF alpha Mouse Uncoated ELISA Kit（Thermo Fisher Scientific）を使用してマニュアルに従い測定した．

２・４　細胞生存率の測定

NF-κB-RAW264.7細胞の発光測定後に上清を除き，細胞毒性アッセイキットCell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を使用して，マニュアルを参考に24ウェルプレートに適した試薬量で試験を行った．

２・５　TLR4阻害剤を使用した免疫活性評価

NF-κB-RAW264.7細胞を使用し，2･2，2･3，2･4の方法に準じてNF-κB活性の評価，TNF-α産生量の測定，細胞生存率の測定を行った．試料は加熱死菌体とLPSを用い，1 μM TAK-242（MedChemExpress）を含む発光培地を使用して，加熱死菌体は100 μg/mLに，LPSは100 ng/mLに希釈した．また，コントロールは試料の代わりに1%滅菌超純水と0.1%ジメチルスルホキシド（DMSO）を使用した．

２・６　TLR4を発現しない発光培養細胞によるNF-κB活性の評価

細胞にはNF-κBの活性化に伴い発光するヒト肝癌由来細胞株HepG2細胞（NF-κB-HepG2細胞）を使用した[12]．この細胞は赤色発光ルシフェラーゼSLR3によりNF-κB活性を，緑色発光ルシフェラーゼELucにより細胞生存率を測定することができる．

試料には加熱死菌体を使用した．試料を発光培地（DMEM（phenol red free），10%FBS，1×Glutamax，1×NEAA（Thermo Fisher Scientific），1 mMピルビン酸（Thermo Fisher Scientific），25 mM HEPES，400 μM D-ルシフェリン）を用いて，最高濃度50 μg/mLから公比2で6段階希釈した（50，25，12.5，6.25，3.13，1.56 μg/mL）．また，コントロールは試料の代わりに0.1%DMSOを使用した．96ウェルプレート（96 Well White/Clear Bottom Plate, TC Surface，Thermo Fisher Scientific）にNF-κB-HepG2細胞を3×10^{4} cells/wellで播種し，37℃，5% CO_2，湿度飽和状態下で24時間培養した．培養後，上清を除き，試料を含む発光培地に置換して，発光測定装置を用いて72時間リアルタイム発光測定を行った．得られたSLR3の発光キネティクスの面積をコントロールの面積で補正し，NF-κB活性とした．また，ELucの発光キネティクスの面積をコントロールの面積で補正した値を細胞生存率とした．

２・７　統計解析

TNF-αの産生は，一元配置分散分析とTukey法にて多重比較を行った（異なるアルファベット間で有意差，$p<0.05$）．また，細胞生存率とNF-κB-HepG2細

胞の NF-κB 活性は，一元配置分散分析と Dunnett 法にて多重比較を行った（コントロールに対する有意差，*p<0.05，**p<0.01）.

3　結果

3・1　加熱死菌体の免疫活性

加熱死菌体の免疫活性作用を，NF-κB-RAW264.7 細胞の NF-κB 活性と TNF-α 産生により評価した.

EPS 産生株である AWA1922 と AWA1955 は他の菌株よりも NF-κB を活性化し，特に AWA1922 は最も活性化した（図 1A）．AWA1955 については，AWA1915 と NBRC106467^{T} と比較すると NF-κB を活性化したものの, AWA1922 よりは活性化しなかった. また，どの菌株でも TNF-α 産生を促進したが，NF-κB 活性ほどは菌株間の差が認められなかった（図 1B）. なお, 本試験において細胞毒性は検出されなかった（図 1C）.

3・2　免疫活性の作用機序

微生物がマクロファージ細胞の NF-κB を活性する場合，EPS や LPS がマクロファージ細胞表面に発現する TLR4 を活性化する例が多い[13) 14)]．そこで，EPS 産生乳酸菌の NF-κB 活性化の作用機序を検証するため，TLR4 阻害剤である TAK-242 を使用したときの NF-κB-RAW264.7 細胞の NF-κB 活性と TNF-α 産生を評価した．また，TLR4 を発現していない NF-κB-HepG2 細胞を用い，NF-κB 活性を評価した.

NF-κB-RAW264.7 細胞における LPS による NF-κB 活性化は TAK-242 により著しく低下したが（図 2A），AWA1922 と AWA1955 はほとんど低下しなかった（図 2B，2C）．TNF-α の産生量も NF-κB 活性と同様の傾向を示し，LPS による TNF-α 産生量の増加は TAK-242 により著しく減少したが（図 2A'），AWA1922 と AWA1955 では TAK-242 の影響は認められなかった（図 2B'，2C'）．なお，本試験において細胞毒性は検出されなかった（図 2D）.

続いて，TLR4 が発現していない NF-κB-HepG2 細胞を用い, AWA1992 と AWA1995 の NF-κB 活性化について検討した．その結果，興味深いことに，AWA1922 と AWA1955 の双方で濃度依存的な活性化が認められた（図 3A，3B）．細胞毒性は，双方とも 25 μg/mL 以上で検出された（図 3A'，3B'）.

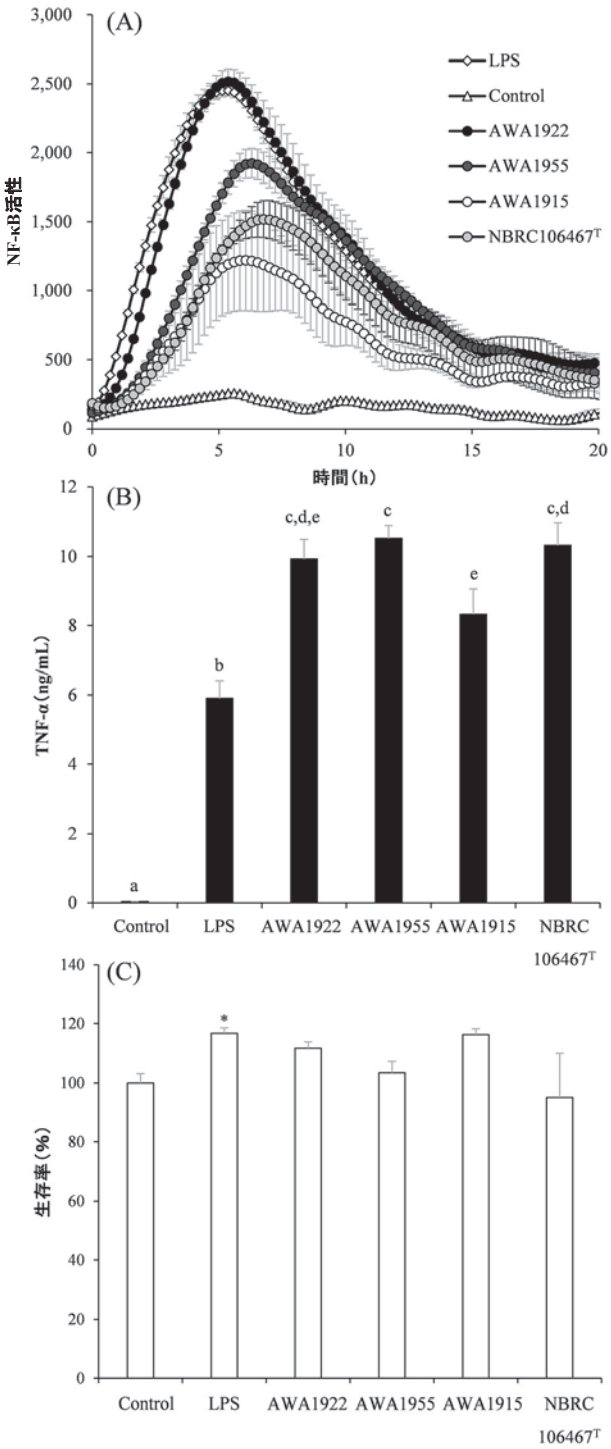

図 1　NF-κB-RAW264.7 細胞による加熱死菌体の免疫活性評価
（A）NF−κB 活性，（B）TNF-α 産生，
（C）細胞生存率

4　考察

加熱死菌体による NF-κB-RAW264.7 細胞の NF-κB 活性化と TNF-α の産生増加は全ての菌株で認められたが，その中でも EPS を産生する AWA1922 と AWA1955 は，他の菌株よりも強く NF-κB を活性化

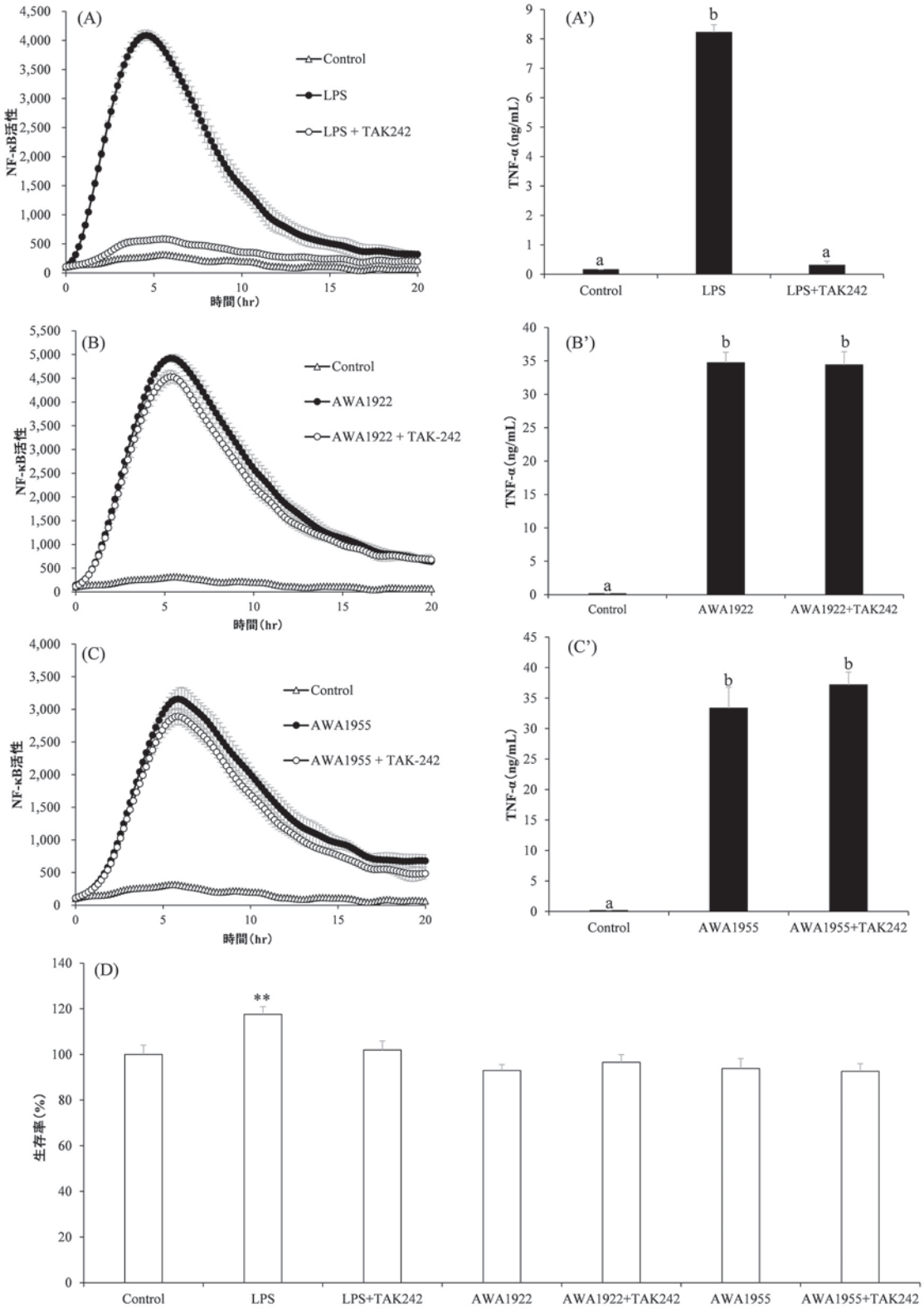

図２　TAK-242 が免疫活性作用に及ぼす影響

（A）LPS の NF-κB 活性，（A'）LPS の TNF-α 産生，（B）AWA1922 の NF-κB 活性，（B'）AWA1922 の TNF-α 産生，（C）AWA1955 の NF-κB 活性，（C'）AWA1955 の TNF-α 産生，（D）細胞生存率

した（図 1A）．この結果から，活性本体には，菌体成分と EPS が関与していることが示唆された. また，特に莢膜 EPS を産生する AWA1922 は試料にも EPS が含まれていることが考えられ，最も強く NF-κB を活性化した. AWA1955 については，スライム EPS が試料調製の工程で多くが除かれたので，NF-κB の活

性化能はAWA1922より低かったことが予想される．また，EPSはTNF-α産生への影響が小さいことが考えられる（図1B）．NF-κBはTNF-αの他にもインターロイキン-12 等の産生にも関与しているので [9]，TNF-α以外のサイトカインの産生についても確認する必要がある．

加熱死菌体による免疫活性の作用機序を検討したところ，TLR4 阻害剤の影響はほとんど認められず（図 2B，2B’，2C，2C’），TLR4 を発現していないNF-κB-HepG2 の NF-κB を活性化したことから（図3A，3B），AWA1992 と AWA1995 による NF-κB 活性化と TNF-α の産生促進には TLR4 が関与しないことが示唆された．他に考えられる作用機序としては，DNA 等の菌体成分が Toll 様受容体 9 等を活性化している可能性がある [13]．EPS については，精製してNF-κB 活性作用や，その作用機序を検証する必要がある．

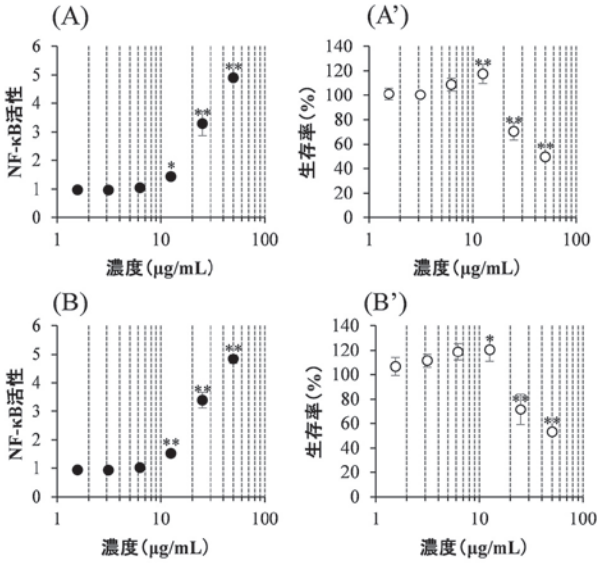

図３　NF-κB-HepG2 細胞による加熱死菌体の免疫活性評価

（A）AWA1922 の NF-κB 活性，（A’）AWA1922 の細胞生存率，（B）AWA1955 の NF-κB 活性，（B’）AWA1955 の細胞生存率

５　結言

本研究では，EPS を産生する阿波晩茶由来乳酸菌の加熱死菌体の免疫活性とその作用機序について検討した．EPS を産生する AWA1922 と AWA1955 は，他の菌株よりマクロファージ細胞の NF-κB を強く活性化した．特に，AWA1922 は NF-κB 活性化能が高く，免疫活性作用の観点からは最も期待できる菌株である．今後は *in vivo* 実験にて，免疫活性作用についてさらに検証していく必要がある．また，NF-κB の活性化には，TLR4 はほとんど関与しないことが示唆された．作用機序を明らかにするため，他のレセプターについても検証が必要である．

EPS 産生乳酸菌について，本報の成果を基に今後も免疫活性作用について検証していくことで，乳酸菌の生理活性を活用した製品開発への応用が期待される．

参考文献

１）Fuller, R. “Probiotics: Probiotics in man and animals”. J. Appl. Bacteriol., 1989, Vol, 66, No. 5, p. 365-378.

２）辨野義己. “プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能”. モダンメディア, 2011, Vol. 57, No. 10, p. 277-287.

３）Jounai, K., Ikado, K., Sugimura, T., Ano, Y., Braun, J. and Fujiwara, D. “Spherical lactic acid bacteria activate plasmacytoid dendritic cells immunomodulatory function via TLR9-dependent crosstalk with myeloid dendritic cells”. PloS one, 2012, Vol. 7, No. 4, e32588.

４）弘田辰彦. “殺菌された乳酸菌のはたらき”. 生物工会誌, 2019, Vol. 97, No. 7, p. 426-429.

５）Nishioka, H., Mizuno, T., Iwahashi, H. and Horie, M. “Changes in lactic acid bacteria and components of Awa-bancha by anaerobic fermentation”. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2020, Vol. 84, No. 9, p. 1921-1935.

６）Nishioka, H., Ohno, T., Iwahashi, H. and Horie, M. “Diversity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of Awa-bancha”. Microbes Environ., 2021, Vol. 36, No. 4, ME21029.

７）西岡浩貴，岩橋均，堀江祐範. “阿波晩茶から分離された乳酸菌の特性”. 美味技術学会誌, 2022, Vol. 21, No. 1, p. 12-19.

８）福田健二. “乳酸菌の菌体外多糖”. 応用糖質科学, 2015, Vol. 5, No. 1, p. 31-37.

９）Hayden, M., S. and Ghosh, S. “NF-κB in immunobiology”. Cell Res., 2011, Vol. 21, No. 2, p. 223-

244.

１０） Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. J. 免疫生物学-免疫系の正常と病理-第 5 版, 南江堂, 2007, 751p.

１１）Yamashita, M., Ukibe, K., Uenishi, H., Hosoya, T., Sakai, F. and Kadooka Y. “*Lactobacillus helveticus* SBT2171, a cheese starter, regulates proliferation and cytokine production of immune cells”. J. Dairy Sci., 2014, Vol. 97, No. 8, p. 4772-4779.

１２）Takeda, H., Nakajima, Y., Yamaguchi, T.,Watanabe, I., Miyoshi, S., Nagashio, K., Sekine, H., Motohashi, H., Yano, H. and Tanaka, J. “The anti-inflammatory and anti-oxidative effect of a classical hypnotic bromovalerylurea mediated by the activation of NRF2”. J. Biochem., 2023, Vol. 174, No. 2, p. 131-142.

１３）Kawai, T. and Akira, S. “Signaling to NF-κB by Toll-like receptors”. Trends Mol. Med., 2007, Vol. 13, No. 11, p. 460-469.

１４）He, C., Lin, H. Y., Wang, C. C., Zhang, M., Lin, Y. Y., Huang, F. Y., Lin, Y. Z. and Tan, C. H. “Exopolysaccharide from Paecilomyces lilacinus modulates macrophage activities through the TLR4/NF-κB/MAPK pathway”. Mol. Med. Rep., 2019, Vol. 20, No. 6, p. 4943-4952.