

プロバイオティクスの分子免疫機能性評価システムの開発

北澤 春樹

(東北大学大学院 農学研究科)

研究の目的

近年、ヒトや動物の健康維持・増進に寄与する生理機能性の食品や飼料に関する研究が益々盛んに行われるようになった。1993年には、我が国独自の特定保健用食品制度(世界では FOSHU の名で知られている)が厚生労働省認可の下に発足し、現在までに約800製品以上が認可されている。中でも、整腸作用を発揮するプロバイオティクスを使用した発酵乳製品は初期の段階で認可され、大変馴染み深いものとして位置づけられている。しかしながら、プロバイオティクスを含む免疫機能性の食品創製は、その免疫機能性の評価基準がないことから実現されておらず、未だ特定保健用食品として位置づけられるまでには至っていない。そこで、本研究では、齧歯類よりもヒトに近いブタをヒトモデル系として、自然免疫に重要なパターン認識受容体に着目し、プロバイオティクスの中でも、免疫機能性を発揮するイムノバイオティクスの分子免疫評価システムの構築を目的とした。

方法

ブタパターン認識受容体(PRR)の cDNA について、成熟ブタの腸管関連リンパ組織(GALT)よりクローニングした(1-3)。具体的には、ヒトおよびマウスにおける保存領域から作成したプライマーによりブタ GALT 由来のトータルRNAからcDNAを合成後、配列およびその特徴を解析した。ヒト胎児腎臓細胞(HEK293細胞)にリポフェクション法により、得られたブタ PRR 遺伝子を導入後、そのリガンド応答性について NF- κ B レポーターアッセイにより検討した(1-3)。レポーターアッセイは、ブタ PRR 発現細胞に、ヒト NF- κ B 遺伝子 A1 および A2 をコードする pGLM-ENH-luci ベクターを導入後、各種リガンドで刺激し、定法に従い化学発光を測定する方法で行った。

結果

本研究では、ブタ GALT より、パターン認識受容体の中でも、ヌクレオチド多量体化ドメイン-1(Nod1)、Nod2 および Radioprotective 105(RP105)/MD-1 をクローニングした。それぞれの塩基およびアミノ酸残基数とマウスおよびヒトに対する相同性について Table 1 にまとめた。イムノバイオティクスの分子免疫評価システムを構築する目的から、上記のブタ PRR の遺伝子導入 HEK293 細胞を作出し、各々の目的のタンパク発現を確認した。ブタ Nod 発現細胞を用いて、イムノバイオティック乳酸菌のようなグラム陽性細菌に多く含まれるペプリドグリカン由来の低分子断片に対する応答性を評価した。その結果、ブタ Nod2 発現細胞において、ムラミルジペプチド(MDP)刺激により、顕著な NF- κ B 活性の増強が認められた。また、ブタ Nod1 導入細胞においては、

γ -D-グルタミル-メソ-ジアミノピメリン酸 (iE-DAP)の刺激により顕著な活性が認められた。さらに、メソ-ジアミノピメリン酸 (*meso*-DAP)でもその活性が認められたことから、Nod1 のリガンドの最小単位が考えられた(Figure 1)。

我々は以前に、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* が生産する菌体外多糖(EPS)が示す抗腫瘍作用や免疫賦活作用について報告したが(4, 5)、その受容体からシグナル伝達機構の詳細については解明されていなかった。本研究の PRR 遺伝子導入細胞系の解析により、EPS が RP105/MD-1 に認識され、フォスファチジルイノシトール-3-キナーゼ(PI3K)およびブルトNZチロシンキナーゼ(BTK)を介するシグナル伝達により免疫活性を發揮することが判明した(Figure 1)。

Table 1. Characterization of porcine PRRs (NOD1, NOD2, RP105 and MD-1)

PRRs	Length of ORF		Homology to human		Homology to mouse		Accession
	nu ^{*1} (bp)	aa ^{*2}	nu (%)	aa (%)	nu (%)	aa (%)	
NOD1	2862	953	86.7	83.8	80.9	79.2	AB187219
NOD2	3039	1013	84.4	81.6	77.9	76.6	AB195466
RP105	1986	661	84.1	77.6	75.3	70	AB190767
MD-1	480	159	77.7	76.5	72.8	71.1	AB190766

^{*1} nu = nucleotides, ^{*2} aa = amino acids

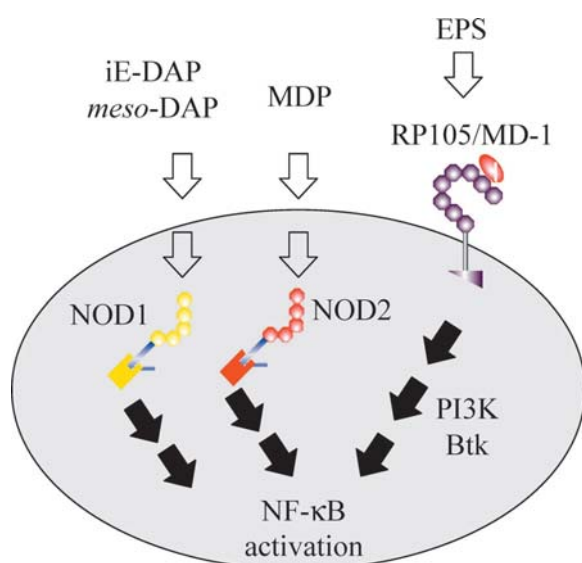


Fig. 1. Schematic representation of the recognition of immunobiotics and immunogenics by NOD1, NOD2 and RP105/MD-1.

結論

イムノバイオティック乳酸菌やその活性成分（イムノジェニックス）の免疫機能性に関する研究は、機能性の食品、サプリメントや飼料の開発に貢献するものと考えられる（6, 7）。我々の研究から、イムノバイオティクスは、GALTにおいて自然免疫細胞に発現する PRR を介して、健康維持・増進効果を発揮するものと考えられた。また、ブタ PRR はヒトに相同性が高く、そのリガンド特性もヒトに類似することから、ブタがヒトモデル系として有用であることが期待される。今後、ブタ GALT における PRR を介する免疫システムを詳細に解明することは、ヒト粘膜免疫モデルシステムを構築する上で非常に有意義である。

我々はこれまでに、ブタ PRR ファミリーのクローニングとそのリガンド特性について追究してきた(8-13)。その過程で、ブタ PRR 発現細胞の作出により、新たに幾つかのイムノジェニックスを同定することができた。これらの細胞系により、リガンドと受容体の関係を基礎としたイムノバイオティクスの的確な分子免疫評価システムが構築でき、優れたイムノバイオティクスの選抜から、イムノバイオティクスの分子免疫調節機構に関する新たな知見が得られるものと大いに期待できる。本研究の成果が、将来的には、腸管免疫を介する免疫機能性の食品・飼料や経口ワクチンの開発の一助に発展することを願いながら、さらに追究したいと考えている。

文献

- 1) Tohno, M., Shimazu, T., Ueda, W., Anzawa, D., Aso, H., Nishimura, J., Kawai, Y., Saito, Y., Saito, T., Kitazawa, H. Molecular cloning of porcine RP105/MD-1 involved in recognition of extracellular phosphopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Mol. Immunol.* **44**: 2566-2577 (2007).
- 2) Tohno, M., Ueda, W., Azuma, Y., Shimazu, T., Katoh, S., Wang, J.M., Aso, H., Takada, H., Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H. Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2). *Mol. Immunol.* **45**: 194-203 (2008).
- 3) Tohno, M., Shimazu, T., Aso, H., Uehara, A., Takada, H., Kawasaki, A., Fujimoto, Y., Fukase, K., Saito, T., Kitazawa, H. Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-1 (NOD1) recognizing minimum agonists, meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine. *Mol. Immunol.* **45**: 1807-1817 (2008).
- 4) Kitazawa, H., Yamaguchi, T., Fujimoto, Y., Itoh, T. An analysis of mitogenic response of phosphopolysaccharide, a B-cell mitogen produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, to spleen cells. *Anim. Sci. Technol.* **64**: 807-812 (1993).
- 5) Kitazawa, H., Itoh, T., Tomioka, Y., Mizugaki, M., Yamaguchi, T. Induction of IFN-gamma and IL-1 alpha production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Int. J. Food. Microbiol.* **31**: 99-106 (1996).

- 6) Clancy, R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**: 9-12 (2003).
- 7) Kitazawa, H., Saito, T. Bioactive factors from probiotics. *Antibiotics & Chemotherapy* **21**: 1575-1582 (2005).
- 8) Shimosato, T., Kitazawa, H., Katoh, S., Tomioka, Y., Karima, R., Ueha, S., Kawai, Y., Hishinuma, T., Matsushima, K., Saito, T. Swine Toll-like receptor 9 recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochimica et Biophysica Acta* **1627**: 56-61 (2003).
- 9) Shimosato T, Kitazawa H, Tohno M, Katoh S, Kawai Y, Saito T. 2004. Development of immune assay system for both CpG and non-CpG DNA from lactic acid bacteria using a transfectant of swine Toll-like receptor 9. *Anim. Sci. J.* **75**: 377-382 (2004).
- 10) Shimosato, T., Kitazawa, H., Katoh, S., Tohno, M., Iliev, I.D., Nagasawa, C., Kimura, T., Kawai, Y., Saito, T. Augmentation of T(H)-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**: 782-787 (2005).
- 11) Shimosato, T., Kimura, T., Tohno, M., Iliev, I.D., Katoh, S., Ito, Y., Kawai, Y., Sasaki, T., Saito, T., Kitazawa, H. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cell. Microbiol.* **8**: 485-495 (2006).
- 12) Tohno, M., Kitazawa, H., Shimosato, T., Matsumoto, M., Katoh, S., Kawai, Y., Saito, T. A swine toll-like receptor 2-expressing transfectant as a potential primary screening system for immunobiotic microorganisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **44**: 283-288 (2005).
- 13) Tohno, M., Shimosato, T., Kawai, Y., Aso, H., Ikegami, S., Taketomo, N., Saito, T., Kitazawa, H. Advanced molecular immunoassay system for immunobiotic lactic acid bacteria using a transfectant of Toll-like receptor 2. *Anim. Sci. J.* **78**: 195-205 (2007).