

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510259

研究課題名(和文)発酵食品由来アレルギー抑制成分の分離と機能解析

研究課題名(英文)Separation and functional analysis of allergy inhibitor in fermented foods

研究代表者

橋本 雅仁 (HASHIMOTO, Masahito)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：30333537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アレルギー患者が増加しており、社会的に問題となっている。この原因として、細菌成分への暴露機会の現象が影響するという「衛生仮説」が提唱されている。そこで、人為的に細菌成分に暴露させ免疫応答を制御することが考えられ、プロバイオティクス食品等に利用されている。しかし、その有効成分についての情報は少ない。そこで本研究ではアレルギー抑制効果が示されている発酵食品として乳発酵食品及び黒酢に注目して、その有効成分について検討した。本研究では、主にこれらの食品の発酵に関与する細菌である乳酸菌と酢酸菌をターゲットにして研究をすすめ、免疫系を調整する成分の分離、化学構造解析、アレルギー抑制機構を実施した。

研究成果の概要(英文)：Recently, allergy patients are increasing in Japan and they are emerging as a social problem. According to the "hygiene hypothesis", decreasing bacterial exposure is responsible for the increasing allergic diseases. Since the hypothesis indicates artificial administration of bacterial components may modify immune system to decrease allergy, probiotic foods, which contain fermentation bacteria, are utilized for controlling allergic diseases. However, active components in the probiotic foods are scarcely clarified. In this study, we investigated to characterize active components in probiotic foods, such as fermented milk products and Japanese traditional black vinegar. We used lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the foods. We separated components for modifying immune system, determined their chemical structure, and analyzed their mechanisms to decrease allergic diseases.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：アレルギー 自然免疫 発酵食品 微生物

1. 研究開始当初の背景

近年、花粉症やアトピー性皮膚炎等のアレルギー患者が急増しており、疾患による日常生活への影響が社会的に問題となっている。これまでにアレルギー患者の増加の原因として、患者の疫学的調査を元にした「衛生仮説」が提唱されている。これは、衛生環境の改善や乳幼児期の感染症罹患の減少に伴う微生物成分への暴露機会の減少が、アレルギー患者の増加に影響するという仮説で、先進国でのアレルギー患者の急増をうまく説明するものとして受け入れられている。

近年、免疫系全体の制御に自然免疫が関与することが明らかになってきている。アレルギー性疾患も免疫系の異常によって発症することから、その制御には自然免疫が関与すると考えられており、衛生仮説との関係が注目されている。現在、自然免疫とアレルギー発症の関係は次のように説明されている。ヒトにとって異物である微生物成分はヒトの初期生体防御システムである自然免疫を活性化して炎症を引き起こす。この際、微生物成分は自然免疫レセプターである Toll-like receptor (TLR) や NOD-like receptor (NLR) 等に認識され、自然免疫を活性化する。さらに自然免疫の活性化が、抗原特異的防御を司る獲得免疫を制御する。獲得免疫応答は、関与する T 細胞のサブセットによって、微生物やウイルスなどの感染防御に関わる Th1 型や、B 細胞からの抗体産生を強力に誘導する Th2 型などのサブセットに分類できる。健康体では、これらのサブセットは相互に抑制し合いバランスを取っている。しかし、アレルギー患者では、Th2 の過剰応答が起こり、サブセット間のバランスが崩れているため、IgE 抗体の産生が促進されアレルギー反応につながっている。微生物成分はこのような T 細胞の働きを自然免疫活性化を通じて制御していると考えられている。すなわち衛生仮説は、微生物成分への暴露の減少が、自然免疫を介して、T 細胞の制御を乱し、アレルギー状態へ導くことを示唆している。

そこで、人為的に微生物成分を暴露させ獲得免疫応答を制御する試みが研究されている。細菌由来の非メチル化 DNA は、TLR9 を介して自然免疫を活性化し、Th1 型の獲得免疫を誘導する。また、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) も TLR4 を介して Th1 を誘導する。Th1 サブセットは Th2 サブセットへの分化を抑制することからアレルギーを抑制しうる。また、細菌細胞表層成分であるペプチドグリカン誘導体のレセプターである NOD1 がアレルギーに関与するとの知見も得られている。しかし、これら成分を化学的に合成し医薬品として用いることは、安全性の確認などハードルが高い。このため、

できるだけ安全性の担保された化合物を用いることが求められる。そこでプロバイオティクスと呼ばれる食用微生物を摂取し、免疫系を制御しアレルギーを抑制しようとする試みが行われている。例えば乳酸菌摂取によるアレルギー抑制作用は良く知られている。この際、乳酸菌が自然免疫に作用して機能を発現していることは確実である。しかし、これらについて物質レベルにおける機能発現機構はほとんど研究されておらず、その全容は不明なままである。

2. 研究の目的

前述のように、微生物の投与によってアレルギー性疾患を抑制できることが分かっている。一般に、アレルギー性疾患の抑制作用を示す乳酸菌等は生菌であることが必須であると宣伝されている。しかし自然免疫は微生物由来成分によって活性化されることから、必ずしも生菌であることが必要とは限らない。さらに最近、乳酸菌をはじめ腸内常在菌の死菌がアレルギーや腸内炎症などの抑制機能を発揮することも報告されてきており、菌体成分を物質レベルで検討する必要性が高まっている。

そこで本研究では、アレルギー抑制作用を示す発酵食品および発酵に関与する微生物に注目し、そこに含まれるアレルギー抑制作用を持つ物質を分離し、その構造と機能発現機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、近年アレルギー抑制作用が注目されている黒酢や乳酸発酵食品、およびその発酵細菌である酢酸菌や乳酸菌を用いる。これまでの検討から、黒酢では、TLR2、TLR4、NOD1 を活性化する物質が含まれていることが、また、乳酸菌では、TLR2 を活性化する成分が含まれていることがわかっている。そこでまず、自然免疫活性化能やアレルギー抑制作用を指標にして活性成分を分離し、ついで各種機器分析法を用いて活性成分の構造を同定を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、発酵食品やその発酵に関与する細菌に含まれるアレルギー抑制性菌体成分の分離、構造解析と機能解析を実施した。

- (1) 黒酢由来アレルギー抑制成分の分離
黒酢をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した後、疎水性クロマトグラフィーを用いて吸着する疎水性成分を分離した。また、黒酢をそのまま用い、トリトン X-114 (TX114) を用いた二層分配に供試し、TX114 層に疎水性成分を分離した。
- (2) 酢酸菌由来アレルギー抑制成分の分離

酢酸菌を用い、温水フェノール抽出により水層に水溶性の粗成分を抽出した。核酸消化酵素、タンパク質分解酵素を用いて酵素消化した後、疎水性クロマトグラフィーを用いて吸着する疎水性成分を分離した。

(3) 乳酸菌由来アレルギー抑制成分の分離

乳酸菌を超音波破碎後、TX114 と水を用いた二層分配に供試し、TX114 層に疎水性成分を分離した。

(4) TLR2、TLR4 活性化能の検討

TLR2 または TLR4-MD2 と NF- κ B 結合性ルシフェラーゼレポーターを強制発現した細胞を用いて、各サンプルで4時間刺激し、発光基質を添加し TLR 活性化能を検討した。

(5) サイトカイン産生誘導能の検討

マウス由来の脾臓細胞を、各サンプルで4時間、24時間または72時間刺激し、細胞上清を得た。TNF- α 、IL-12 p70、IFN- γ の ELISA キットを用い上清中のサイトカイン量を測定した。

(6) 分析法

SDS-PAGE は Tris-glycine 法を用いて泳動した後、CBB 染色、銀染色、過ヨウ素酸酸化-銀染色を用いて可視化した。

タンパク質は、トリプシン消化後、MALDI-TOF-MS/MS 測定し、MASCOT データベース検索することで、同定した。

糖は、アルジトールアセテートに誘導後 GC-MS を、または 4 - aminobenzoic acid ethyl ester 化した後に HPLC で測定した。脂肪酸は、メチルエステルに誘導後 GC-MS を用いて測定した。

化学構造は、1次元、2次元 NMR および ESI-MS/MS データから解析した。

4. 研究成果

(1) 黒酢由来アレルギー抑制成分の分離と活性

黒酢を疎水性クロマトグラフィーで分離し、吸着する疎水性画分 (FK-OS2) を得た。FK-OS2 は TLR4 活性化能とともに TLR2 活性化能を有していた。脾臓に対するサイトカイン誘導活性を検討したところ、FK-OS2 は TNF- α とともに IFN- γ を誘導した。(Fig. 1)

一方、TX-114 二層分配法で分離したところ、TX-114 層に疎水性画分 (FK-TX) を抽出した。FK-TX はおもに TLR2 を活性化し、TLR4 活性化能は弱かった。また FK-TX は FK-OS2 に比べて強い IFN- γ 誘導能を示した。(Fig. 2)

FK-OS2 の SDS-PAGE は LPS 様のパターンを示し、画分中に LPS の存在が予想された。

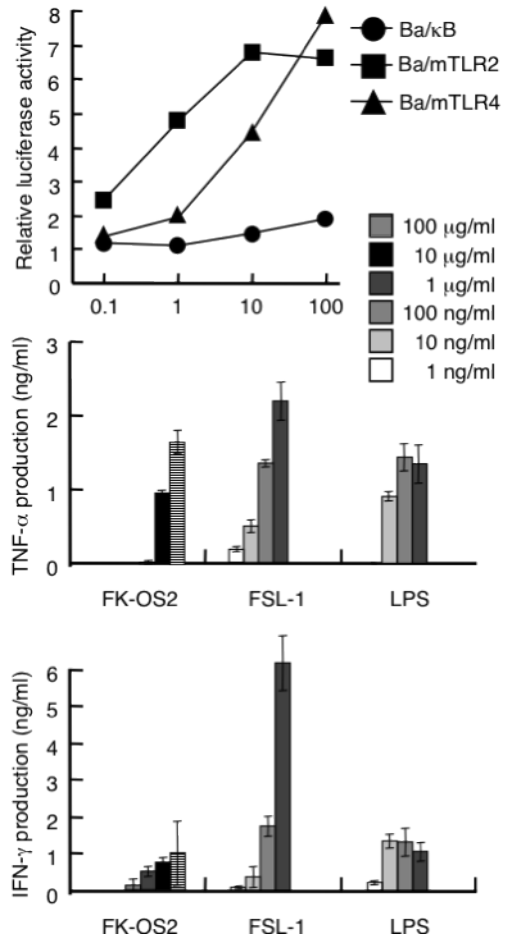


Fig. 1 Activity of FK-OS2.

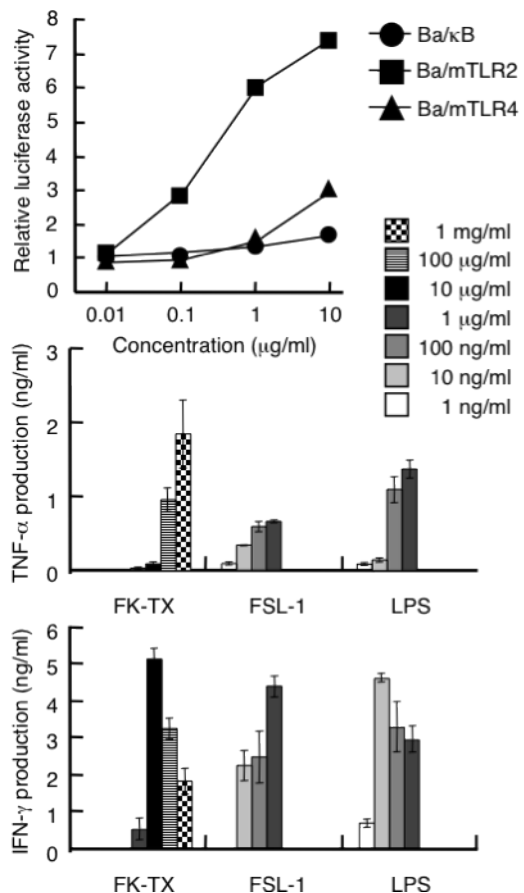


Fig. 2 Activity of FK-TX.

また、FK-TXのTLR2活性化能はSDS-PAGEで10-27 kDa付近に分布していた。タンパク質分解酵素で消化した後は、10-15 kDa付近に低分子化されたため、画分中に活性タンパク質の存在が示唆された。

(2) 酢酸菌由来アレルギー抑制成分の分離と構造解析

酢酸菌を温水フェノール抽出し、疎水性クロマトグラフィーで分離し、吸着する疎水性画分 (Ap-LPS) を得た。Ap-LPS は、大腸菌型 LPS に比べ 1/100 程度の TLR4 活性化能、1/1000 程度の TNF- α 、IFN- γ 誘導活性を示した。(Fig. 3)

Ap-LPS の SDS-PAGE は、30 kDa 付近にラダーパターンを、60 kDa 付近にスメアなバンドを示し、LPS 様の構造であることが予想された。Ap-LPS は、弱酸加水分解することで、一部が糖脂質部分 lipid A と多糖部分に分解できた。このうち lipid A は MS/MS 及び NMR 解析より、新規の構造を持つことが分かった。(Fig. 4)

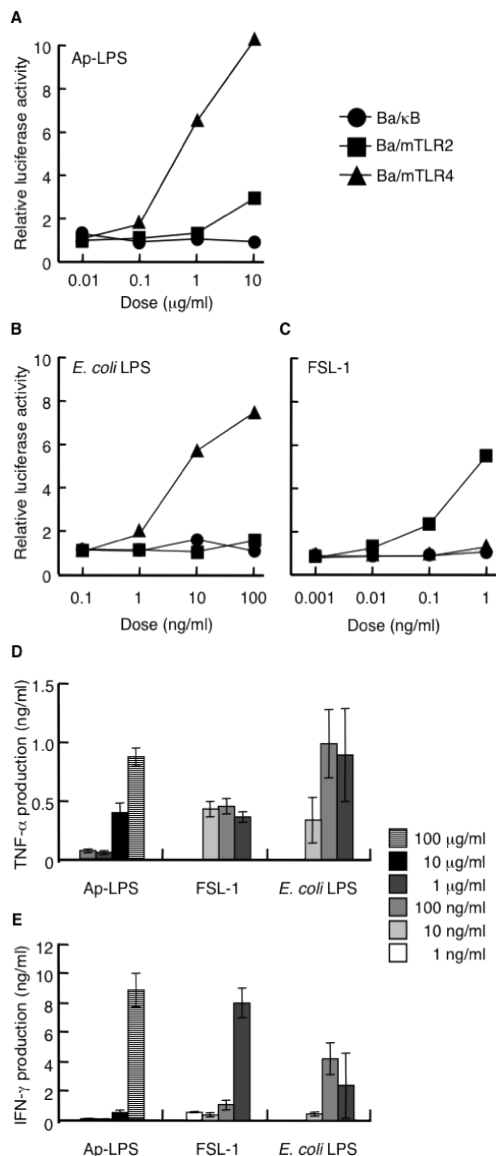


Fig. 3 Activity of Ap-LPS

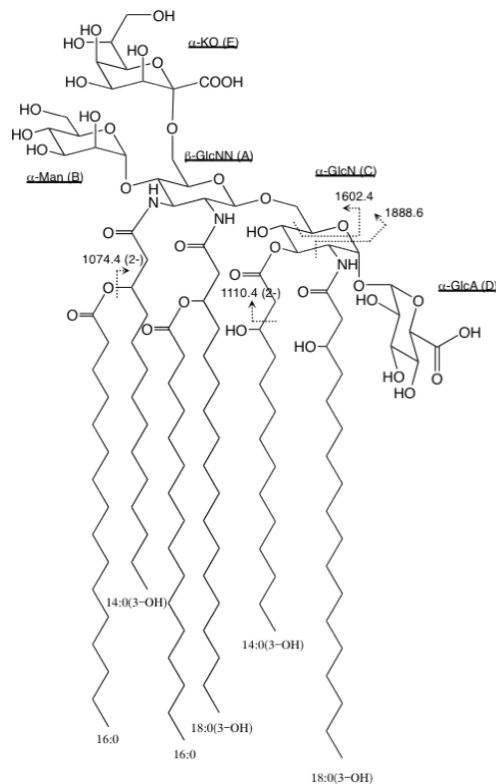


Fig. 4 Structure of lipid A in Ap-LPS.

(3) 乳酸菌由来アレルギー抑制成分の分離と構造解析

乳酸菌は TX-114 二層分配法を用いて抽出し、TX-114 層に疎水性画分 (La-TX) を抽出した。La-TX はおもに TLR2 活性化能を示した。La-TX の SDS-PAGE は数本のタンパク質性のバンドを示した。タンパク質はゲル内トリブシン消化法を用いて断片化し、MS 分析することで同定した。

SDS-PAGE ゲルからバンドを切り出し、TLR2 活性化能を測定したところ、数本のバンドが活性化能を示した。TLR2 活性化タンパク質は、分取 SDS-PAGE を用いて単離した。トリブシン分解後に、HPLC 分離することで、小分子量活性成分が分離できた。現在構造を解析中である。

(4) 考察

アレルギー抑制には、Th2 の抑制が重要であると考えられている。Th2 は Th1 によって抑制されることから、Th1 の分化を促進する IL-12 が鍵分子となっていると考えられ、IL-12 誘導活性を指標にした乳酸菌のスクリーニングなどが行われている。一方、分化した Th1 が分泌する IFN- γ も Th2 を抑制することから、IFN- γ 誘導分子もアレルギー抑制に寄与するものと考えられる。本研究では、黒酢から IFN- γ を誘導しうる画分を分離することができた。このうち LPS 様の成分は、今回の抽出結果から黒酢発酵に関与する酢酸菌由来の LPS と考えられた。しかし、酢酸菌由来 LPS の IFN- γ 誘導活性はそれほど強力ではなかった。もう一方のタンパク質成分は、LPS よ

りも強い IFN- γ 誘導活性を持つと考えられる。しかし酢酸菌の TX114 二層分配では TLR2 活性化画分を得られなかったことから、その他の発酵に關与する菌が原因であるものと考えられた。現在のところ由来は判明していないが、可能性の一つは乳酸菌である。黒酢発酵にも乳酸菌が重要な働きをしていることがすでに分かっており、また今回の結果でも乳酸菌からは TLR2 活性化能を持つタンパク質成分が単離されている。今後、IFN- γ 誘導活性成分の構造同定を進め、微生物によるアレルギー抑制機構の解明につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hashimoto M, Obara K, Ozono M, Furuyashiki M, Ikeda T, Suda Y, Fukase K, Fujimoto Y, Shigehisa H, "Separation and characterization of the immunostimulatory components in unpolished rice black vinegar (kurozu)." *J. Biosci. Bioeng.*, 2013 Dec, **116** (6), 688-696. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

橋本雅仁、小原恭子、大園まみ、古屋舗舞子、池田剛、隅田泰生、深瀬浩一、藤本ゆかり、重久浩、「黒酢中に含まれる自然免疫活性化リガンドの分離」、第 19 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、12 月 7 日、W2-1 (ロイヤルオークホテル スパ&ガーゲーンズ、大津市、滋賀、2013 年 12 月 6~7 日)

Masahito Hashimoto, "Immunological and structural studies of components in Japanese traditional vinegar, Kurozu." Japan-Taiwan Bilateral Workshop on Nano-Science 2013, Oct 4, D-1 (Inamori Auditorium, Kagoshima Univ., Kagoshima, Oct. 2-5, 2013)

橋本雅仁、「L-92 乳酸菌の免疫システムに及ぼす影響」、環境・生活習慣型アレルギーケアフォーラム「アトピーの現状と乳酸菌によるアトピー改善の可能性」、2013/6/13 (東京、品川プリンスホテル アネックスタワー 5 F プリンスホール)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 雅仁 (HASHIMOTO, Masahito)
鹿児島大学・理工学研究科・准教授
研究者番号：30333537