

12. 黒酢中の自然免疫活性化物質と酢酸菌由来リポ多糖

橋本 雅仁¹⁾, 馬場梨沙子²⁾, 大菌 まみ²⁾, 橋口 周平¹⁾, 隅田 泰生¹⁾
深瀬 浩一³⁾, 藤本ゆかり⁴⁾

¹⁾鹿児島大学理工学域工学系, ²⁾同 大学院理工学研究科
³⁾大阪大学大学院理学研究科, ⁴⁾慶應義塾大学理工学部

はじめに

黒酢は、鹿児島県特産の醸造酢であり、玄米を用いて静置発酵法で製造されることを特徴としている。経験的に黒酢は血液の循環不良による病気の改善、コレステロールや中性脂肪の減少、アトピーやアレルギーの改善に有効であるとされている。同時に、黒酢の科学的な研究も進んでおり、黒酢および抽出成分が抗酸化作用、血圧低下、抗がん作用などを示すことが報告されている。

黒酢は発酵食品であり、麴による糖化、酵母によるアルコール発酵、酢酸菌による酢酸発酵を数週間から数カ月程度で並行複発酵し、その後さらに1年以上の間静置し熟成することで製造される。この際、発酵微生物の多くは死滅するため、黒酢には微生物由来成分が豊富に含まれていると考えられる。しかし、これら黒酢中の微生物由来成分についてはこれまで検討されていない。そこで本稿では、黒酢中の微生物由来成分の免疫学的性質と、黒酢に含まれる酢酸菌由来の成分の性質と構造について述べる。

1. 黒酢中の微生物由来成分の分離と免疫学的性質

黒酢の醸造には、麴カビや酵母といった真菌、乳酸菌などのグラム陽性菌や酢酸菌などのグラム陰性菌が関与している¹⁾。これら微生物の細胞構成成分の一部は、哺乳類の自然免疫系レセプターに認識され、免疫系を調整することが知られている。例えば、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) は TLR4 に、細菌のリポタンパク質 (LP) は TLR2 に、細菌の DNA は TLR9 に、ペプチドグリカンの部分構造は NOD1/2 にそれぞれ認識される²⁾。そこでまず黒酢に自然免疫レセプター活性化能を持つ成分が含まれているかどうかについて検討した。TLR2, TLR4, TLR9, NOD1, NOD2 を強制発現させた細胞を用いて、凍結乾燥した黒酢の活性を調べたところ、TLR2 および NOD1/2 に対して活性化能を持つことがわかった³⁾。

黒酢には、有機酸、アミノ酸などの成分が多量に含まれている。そこで黒酢中の自然免疫活性化成分のうち

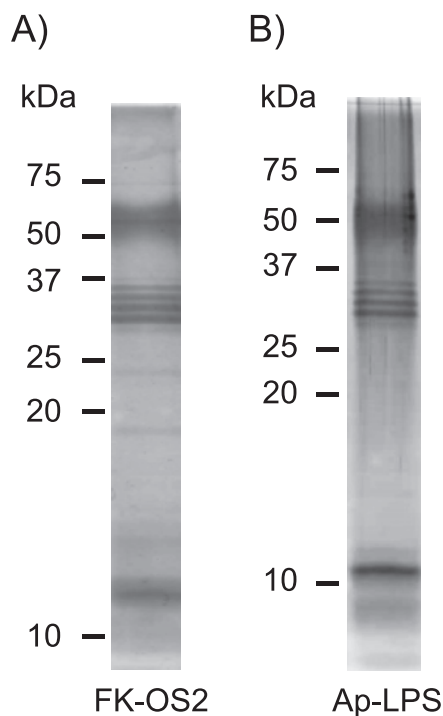
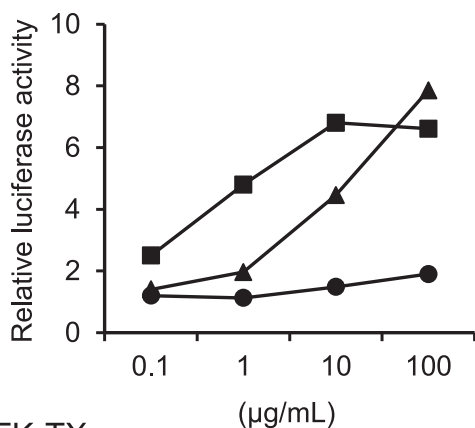


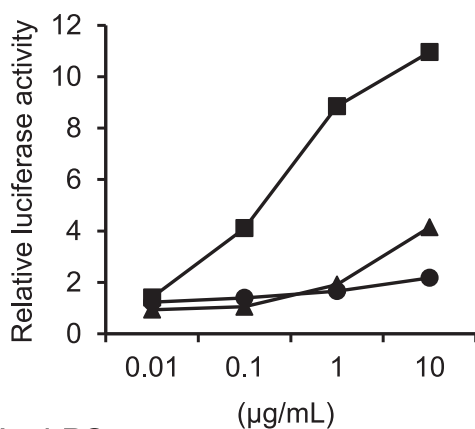
図 1 A: 黒酢疎水性成分 (FK-OS2)
B: *A. pasteurianus* 由来リポ多糖 (Ap-LPS) の SDS-PAGE 泳動像

疎水性の成分に注目して分離を試みた³⁾。まず、オクチルセファロースを用いた疎水性クロマトグラフィーによって黒酢 (900 mL) を分離し、非吸着画分 (FK-OS1; 20.3 g) と吸着画分 (FK-OS2; 1.8 mg) を得た。両画分を SDS-PAGE で分離し過ヨウ素酸銀染色で糖を可視化すると、FK-OS1 はほとんど可視化されなかったものの、FK-OS2 にはラダー状の LPS に特徴的なパターンが存在することがわかった (図 1A)。両画分の活性を検討したところ、TLR2 活性化能は FK-OS2 に濃縮されており (図 2A)、FK-OS1 には存在しないことがわかった。また、FK-OS2 は TLR4 活性化能も有しており、LPS による活性が濃縮によって検出可能になったと考えられた。一方、FK-OS2 画分は NOD1 活性化能を持たないこともわかった。これらの結果は、黒酢中の疎水性成分は TLR2, TLR4 活性化能を有する LPS

A) FK-OS2



B) FK-TX



C) Ap-LPS

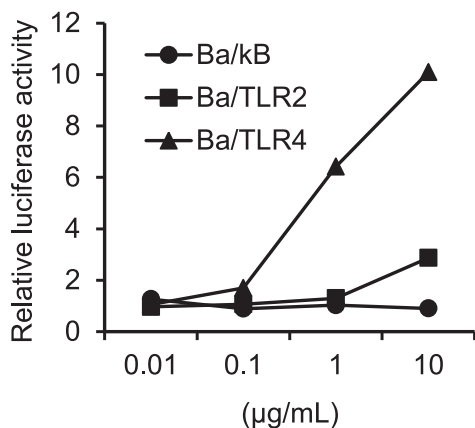


図 2 黒酢中の活性化成分
A: FK-OS2, B: FK-TX, C: Ap-LPS
の TLR 活性化能
活性は NF- κ B 依存的ルシフェラーゼ
アッセイによって検出した。

や LP 様の細菌由来成分であることを示唆している。

ついでトリトン X-114 による二層分配によって黒酢 (400 mL) を抽出し、疎水性の抽出物 (FK-TX; 2.5 mg) を得た。FK-TX は、主に TLR2 活性化能を有しており (図 2B)、LP 様成分が優先して濃縮されたことがわかった。

以上の結果は、黒酢中には発酵微生物由来と考えられる微生物由来自然免疫活性化成分が含まれていることを示している。しかし、黒酢中に含まれる疎水性成分の量は、アミノ酸などの主要成分に比べてごく微量であった。また黒酢の発酵微生物が多様であるため、活性化成分も複数の成分の混合物であったため、単離が困難であり構造決定には至らなかった。

2. 酢酸菌由来 LSP の性質とそのリピド A 構造

LPS は、グラム陰性菌の細胞表層に存在する自然免疫活性化複合糖質である。一般に LPS は、多糖繰り返し構造を持つ O-抗原多糖部分、コアオリゴ糖部分、糖脂質であるリピド A 部分から構成されている⁴⁾。このうちリピド A 部分が活性を持つ最小構造であり、TLR4 に認識されて自然免疫系を活性化することが合成化学的に証明されている。大腸菌などに存在する典型的な構造のリピド A は、強力に TLR4 を活性化することが知られている。一方で、バクテロイデス類縁菌のリピド A は構造の一部が異なっており TLR4 活性化能が弱いことが知られている。黒酢に含まれる LPS は酢酸菌由来であると考えられるため、酢酸菌の LPS の活性と構造を検討し黒酢中の成分と比較することで、その性質を明らかにすることにした。

黒酢中では、*Acetobacter pasteurianus* が酢酸発酵に関与することが知られている。そこで、*A. pasteurianus* NBRC 3283 を供試菌として用いて検討した⁵⁾。菌体を温水フェノール抽出後、粗抽出物をオクチルセファロースを用いた疎水性クロマトグラフィーによって分離し、吸着画分として LPS 画分 (Ap-LPS) を得た。SDS-PAGE の結果、Ap-LPS もラダー状のパターンを示すことがわかった (図 1B)。またこのパターンは、FK-OS2 のものと同様であったことから、黒酢に含まれる LPS 様成分は *A. pasteurianus* 由来の LPS であることが強く示唆された。また、Ap-LPS の TLR4 活性化能は、大腸菌 LPS に比べて 1/100 程度であり (図 2C)、活性が弱いことがわかった。

そこでリピド A の構造について検討した⁵⁾。一般に LPS は弱酸で処理すると LPS 中の糖である Kdo のグリコシド結合が加水分解され、多糖部分とリピド A に分離できる。しかし Ap-LPS は弱酸処理でほとんど加水分解されず、酸に強い構造を持つことがわかった。一部分解されたリピド A を、単糖分析、質量分析、NMR により解析したところ、図 3 に示す新規の構造を持つことがわかった。大腸菌のリピド A と比較すると、リン酸基が存在せず、脂肪酸の鎖長が長いことから、構造の差異が TLR4 に対する低活性の原因であると考えられた。また、グリコシド結合が酸に強い Ko を持つことから、Kdo から Ko への置換が Ap-LPS の耐酸性

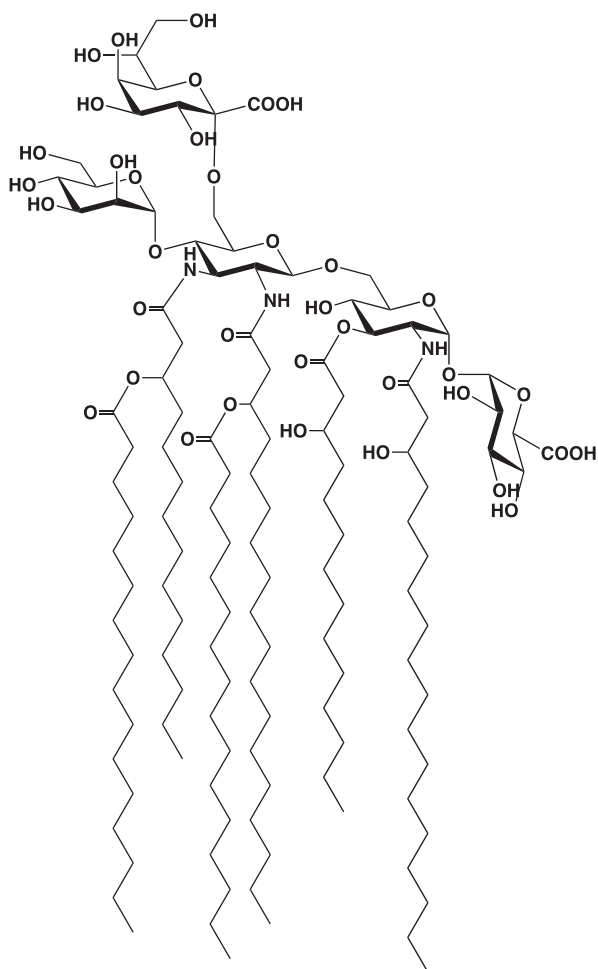


図3 *A. pasteurianus* リピドAの構造

の原因であると推測された。さらに、LPSが黒酢中で1年以上もの間安定に存在する理由も、この耐酸性構造が関与している可能性がある。

おわりに

これまで黒酢の生物活性成分としては、アミノ酸や抗酸化物質などが明らかにされてきている。本研究では、それ以外の活性成分として微生物由来自然免疫活性化成分が含まれていることを明らかにした。とくに酢酸菌由来のLPSについては酸性環境下でも長期間構造が維持されるなど特異な構造を持つことも明らかとなった。今後は、黒酢中のLPSなどの成分の黒酢の効能に対する寄与について検討するとともに、LPをはじめその他の成分の構造について明らかにしたい。

文 献

- 1) Murooka Y, Nanda K, Yamashita M : Rice vinegars. In "Vinegars of the world." eds Solieri I, Giudici P, Springer-Verlag, Milan, Italy, 2009, p121-133
- 2) Kawai T, Akira S : Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34 : 637-650, 2011
- 3) Hashimoto M, Obara K, Ozono M, et al. : Separation and characterization of the immunostimulatory components in unpolished rice black vinegar (kurozu). *J Biosci Bioeng* 116 : 688-696, 2013
- 4) Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. : Bacterial endotoxin : molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8 : 217-225, 1994
- 5) Hashimoto M, Ozono M, Furuyashiki M, et al. : Characterization of a Novel D-Glycero-D-talo-oct-2-ulosonic acid-substituted Lipid A Moiety in the Lipopolysaccharide Produced by the Acetic Acid Bacterium *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283. *J Biol Chem* 291 : 21184-21194, 2016