

Bacteroides fragilis の莢膜多糖画分中の TLR2 活性化物質

脇 純平¹⁾, 今大路浩之²⁾, 大菌 まみ¹⁾, 橋口 周平¹⁾, 桑原 知巳²⁾, 橋本 雅仁¹⁾

¹⁾鹿児島大学大学院理工学研究科, ²⁾香川大学大学院医学研究科

TLR2 activating substance in the capsular polysaccharide fraction of *Bacteroides fragilis*

Junpei Waki¹⁾, Haruyuki Nakayama-Imahiji²⁾, Mami Ozono¹⁾, Shuhei Hashiguchi¹⁾, Tomomi Kuwahara²⁾,
Masahito Hashimoto¹⁾

¹⁾Department of Chemistry, Biotechnology, and Chemical Engineering, Kagoshima University

²⁾Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kagawa University

Abstract

Bacteroides fragilis is a member of normal intestinal flora and is known as an opportunistic infectious bacterium causing intraperitoneal abscess or septicemia. It has been shown that the bacterium activates the intestinal innate immune system via Toll-like receptor 2 (TLR2), and the relation with intestinal disease has been drawing attention.

The cell surface of this bacterium is composed of capsular polysaccharide (CPS), lipopolysaccharide (LPS) and lipoprotein (LP). Capsular polysaccharide A (PSA), a type of CPS, is a zwitterionic polysaccharide and is known to induce regulatory T cells in the intestinal tract and inhibit enteritis. In recent years, it has been reported that PSA activates TLR2 which is an innate immune receptor. However, the structure of PSA is largely different from the general recognition structure of TLR2, and the possibility of contamination could be considered. In this study, we separated the PSA fraction from *B. fragilis* and examined the substances involved in TLR2 activation.

B. fragilis cells were subjected to hot water-phenol extraction and followed by hydrophobic chromatography separation to obtain a PSA fraction having the ability to activate TLR2. The fraction was further subjected to SDS-PAGE separation based on their molecular weight. TLR2-stimulating activity was scarcely observed in the high molecular mass area where PSA was present, and high activities were observed in the low molecular mass area. The active substances were found to be proteins because they were digested with proteolytic enzymes. These results indicate that contaminating proteins are substances responsible for TLR2 activation in the PSA fraction derived from *B. fragilis*.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 18~22, 2018

Key words : *Bacteroides fragilis*, Toll-like receptor, capsular polysaccharide, lipopolysaccharide, lipoprotein

はじめに

Bacteroides fragilis は、腸内に常在する偏性嫌気性グラム陰性菌であり、腹腔内膿瘍や敗血症などを引き起こす日和見感染菌として知られている。本菌は、Toll-like receptor 2 (TLR2) を介して腸内の自然免疫系を活性化することが示されており、腸内疾患との関係が目ざされている¹⁾。

本菌の細胞表層は、Capsular polysaccharide (CPS), Lipopolysaccharide (LPS), Lipoprotein (LP) などから構成されている。このうち LP は、以前の研究から

TLR2 リガンドであることが示されており、病原因子の一つと考えられている²⁾。一方、LPS と CPS についても TLR2 リガンドと報告されているが、その活性中心の構造から議論の余地がある。そこで本研究では、CPS に焦点を当てて検討することにした。

B. fragilis の CPS は、他菌にはない多くの種類を合成するという特徴を有している。そのうち 2 種類の polysaccharide A (PSA) と polysaccharide B (PSB) が構造決定されており (図 1)、とくに PSA は両性イオン多糖であり、腸管において制御性 T 細胞を誘導し、腸炎を抑制することが報告されている³⁾。また、TLR2 の活性

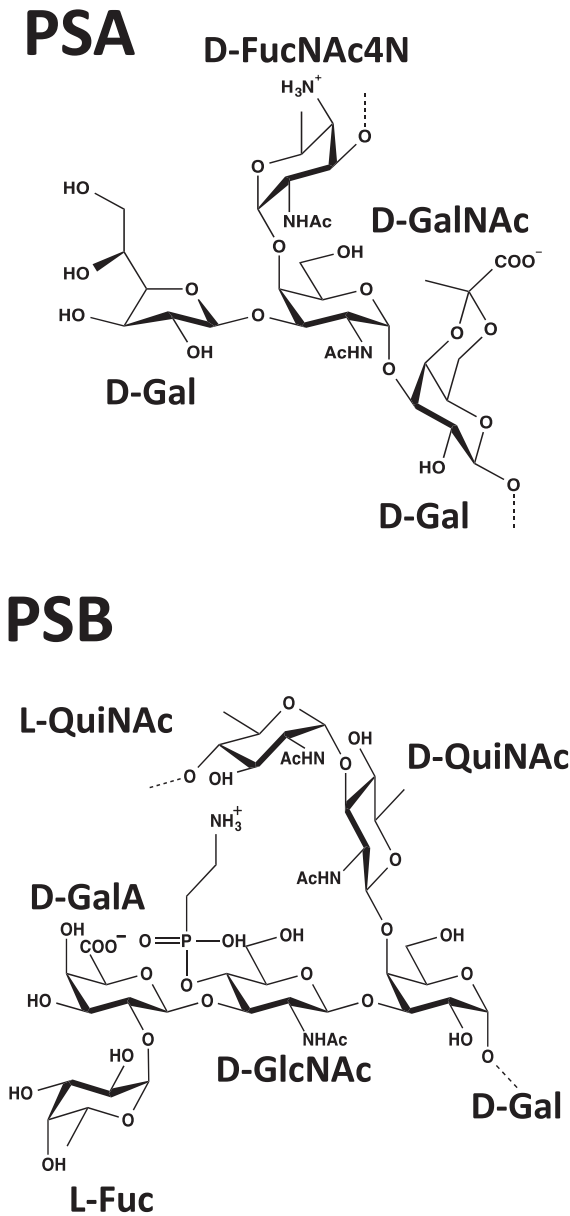


図 1 PSA と PSB の構造

化に参与する可能性も示唆されている^{4,5)}。しかし、PSA の構造は一般的な TLR2 の認識構造と大きく異なっており、夾雑物の混入の可能性が考えられた。そこで本研究では、*B. fragilis* から CPS 画分を分離し、PSA の TLR2 活性化能について検討した。

1. CPS 画分の抽出と分離

B. fragilis は NCTC9343 の野生株 (WT) と PSA 欠損株 (Δ PSA) を用いた。菌体は、リゾチーム、および DNA, RNA 分解酵素で消化後、温水-フェノール法を用いて抽出することで、*B. fragilis* 由来の複合糖質画分を得た。複合糖質画分は、疎水性クロマトグラフィーで分離し、ヘキソースはアントロン硫酸法、リンはモリブデン酸アンモニウム法を用いて、それぞれ比色定量

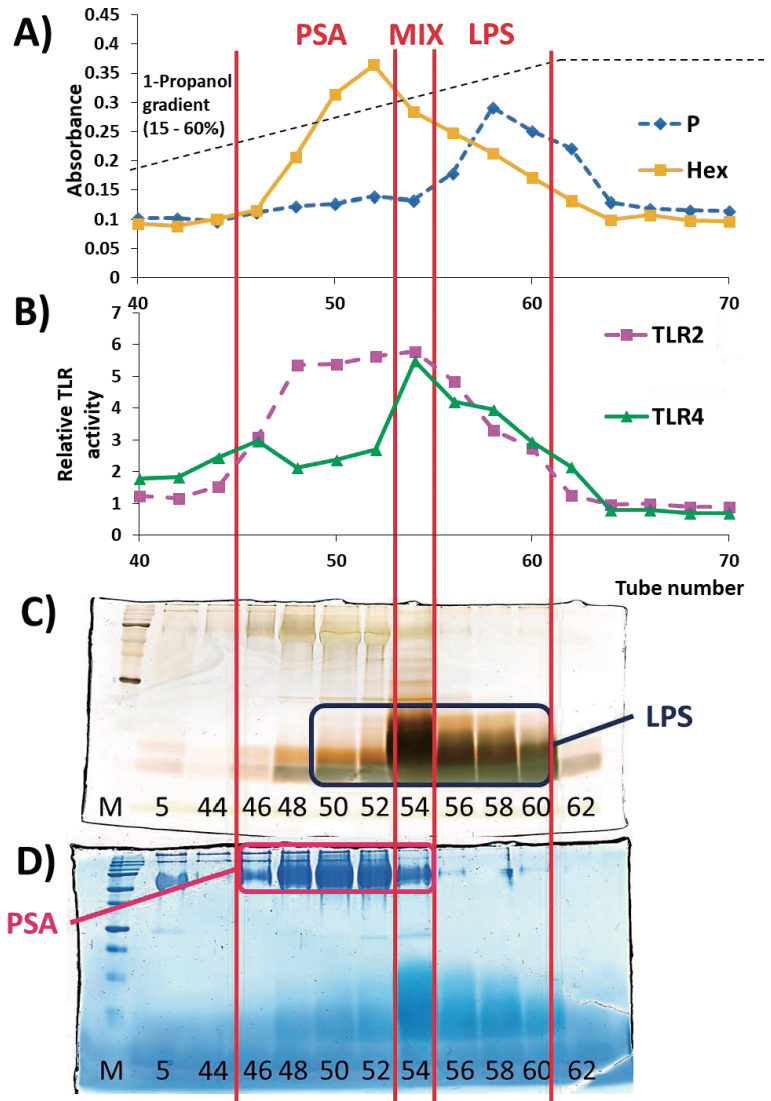


図 2 WT 由来自然免疫活性化物質の分離

をした。

WT では、ヘキソースとリンで異なる溶出曲線を示し、複数の成分が含まれていることが分かった(図 2A)。また、TLR2, TLR4 の強制発現細胞を用いて NF- κ B 活性化能を測定したところ、TLR2 と TLR4 で異なる溶出曲線を示した (図 2B)。そこで、SDS-PAGE で成分を検討した。過ヨウ素酸銀染色、および CBB 染色で可視化した結果、前半に高分子量のバンドが、後半に低分子量のバンドがそれぞれ溶出していることが分かった (図 2C, D)。そこで、これらの結果を基に 3 分画した。このうち一つ目の画分は、アルジトールアセテート法を用いた単糖分析の結果、GalN, Gal が検出され、PSA を主に含んでいることが示唆された。また、3 つ目の画分は TLR4 活性が高いことから LPS を主に含むと考えた。そこで、それぞれを PSA 画分、LPS 画分とした。

また、 Δ PSA においても、同様に分離・画分できた(図 3)。このうち、一つ目の画分は単糖分析の結果、Gal, GluN,

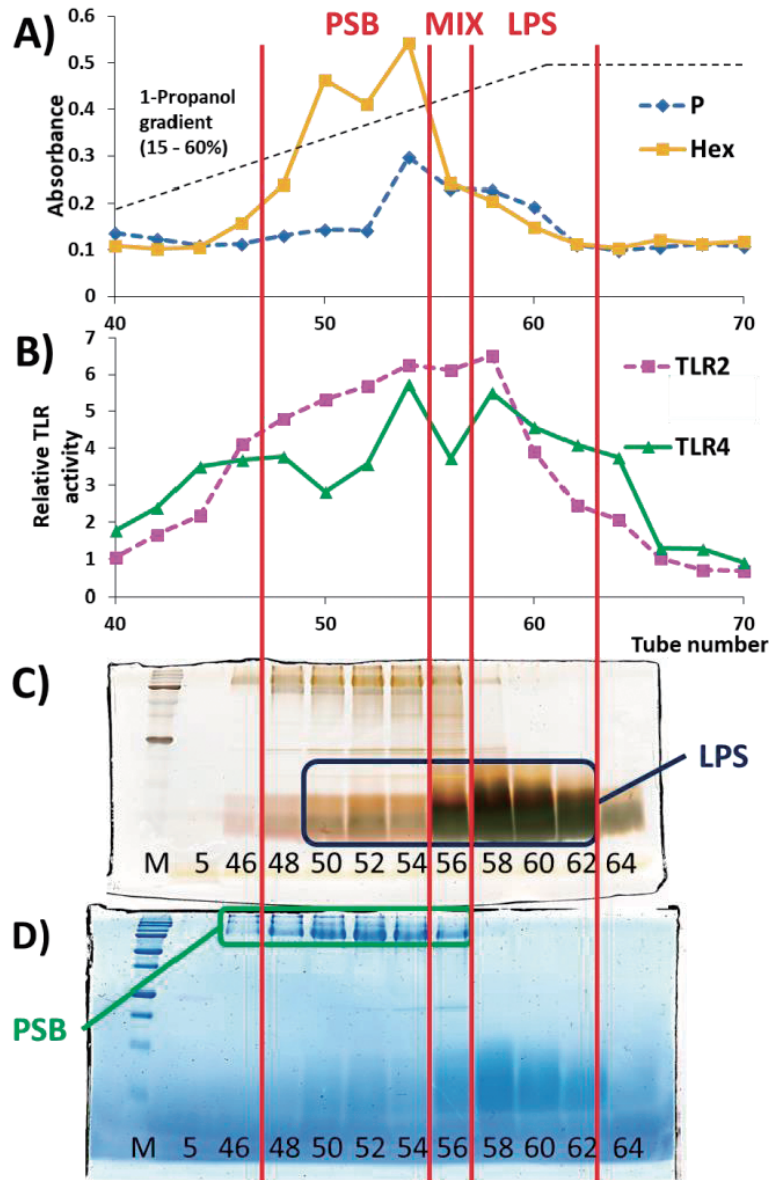


図 3 Δ PSA 由来自然免疫活性化物質の分離

Fuc, QuiN が検出されたため、PSA の代わりに PSB を含んでいることが分かった。そこで、この画分を PSB 画分とした。

2. PSA と PSB の TLR2 活性化能の測定

WT 由来の PSA 画分を SDS-PAGE で分離後、ゲルを均等に切断して破碎し、分子量ごとの TLR2 活性化能を測定した。PSA と思われる高分子側では TLR2 活性化能は低く、15~40 kDa 付近で TLR2 活性化能が高くみられた (図 4A)。

Δ PSA 由来の PSB 画分も同様の操作で TLR2 活性化能を測定した結果、PSB と思われる高分子側では活性が低く、15~40 kDa 付近で活性が高かった (図 4B)。これらの結果は、TLR2 活性化物質は PSA でないことを示している。

3. 酵素消化による TLR2 活性化能測定

15~40 kDa 付近の TLR2 活性化能を有する物質は、LPS または LP の可能性がある。このうち、LPS は TLR4 アゴニストと予想されており、また疎水性クロマトグラフィーで分離しているため、可能性が低い。そこで、LP である可能性が高いと考え、CPS 画分をタンパク質分解酵素である Proteinase K で消化した。分子量別の TLR2 活性化能を測定したところ、WT と Δ PSA とともに活性が低分子側にシフトした (図 5)。

これらの結果は、TLR2 活性化物質がタンパク質性であることを示しており、LP である可能性を強く示唆している。

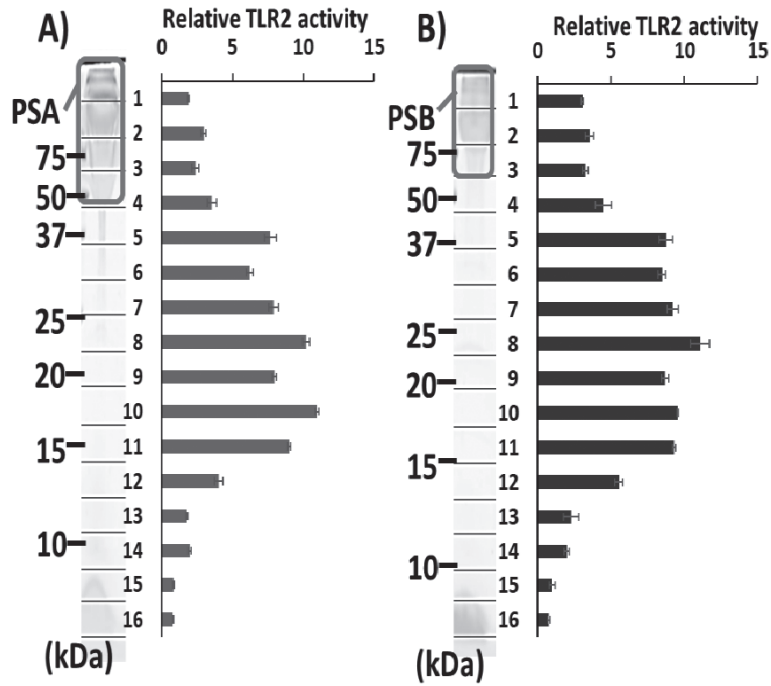


図 4 PSA 画分 (A) と PSB 画分 (B) の TLR2 活性化能

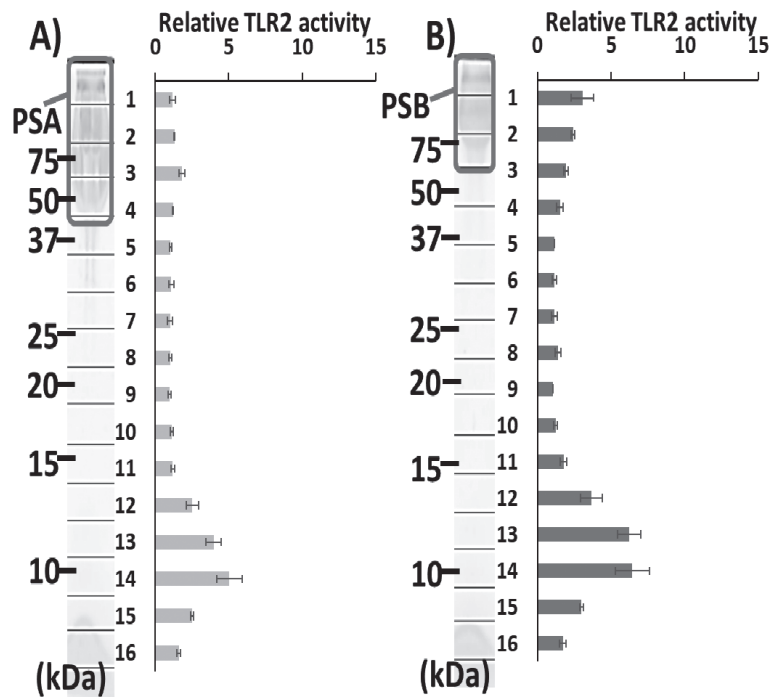


図 5 PSA 画分 (A) と PSB 画分 (B) の酵素消化後の TLR2 活性化能

おわりに

これまで *B. fragilis* の産生する PSA は、TLR2 の活性化に関与する可能性が示唆されてきた。しかし、本研究では *B. fragilis* 由来の PSA が TLR2 活性化に関与しておらず、夾雑しているタンパク質が TLR2 活性化物質であることを明らかにした⁶⁾。

今後は、CPS 画分中に存在するタンパク質の同定と、PSA とタンパク質をそれぞれ分離することで、宿主との免疫調節に関与する真の分子、機構を解明したい。加えて、本タンパク質は、*B. fragilis* の病原因子として機能している可能性もあるため、今後の治療予防への応用を目指していきたい。

文 献

- 1) Mancuso G, Midiri A, Biondo C, et al. : *Bacteroides fragilis*-Derived Lipopolysaccharide Produces Cell Activation and Lethal Toxicity via Toll-Like Receptor 4. *Infect Immun* 73 : 5620-5627, 2005
- 2) Hashimoto M, Eguchi H, Tawaratsumida K, et al. : Identification of a TLR2-stimulating lipoprotein in *Bacteroides fragilis* JCM 11019 (NCTC 9343). *Innate Immun* 19 : 132-139, 2013
- 3) Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL : A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453 : 620-625, 2008
- 4) Wang Q, McLoughlin RM, Cobb BA, et al. : A bacterial carbohydrate links innate and adaptive responses through Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 203 : 2853-2863, 2006
- 5) Round JL, Lee SM, Li J, et al. : The Toll-Like Receptor 2 Pathway Establishes Colonization by a Commensal of the Human Microbiota. *Science* 332 : 974-977, 2011
- 6) Hashimoto M, Waki J, Nakayama-Imahiji H, et al. : TLR2-stimulating contaminants in glycoconjugate fractions prepared from *Bacteroides fragilis*. *Innate Immun* 23 : 449-458, 2017