

# 酢酸菌による外膜小胞の産生とその性質

橋本 雅仁

鹿児島大学理工学域工学系

## Production of outer membrane vesicles from acetic acid bacteria and their properties

Masahito Hashimoto

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

### Abstract

Outer membrane vesicles (OMVs) are mainly composed of lipopolysaccharide (LPS), phospholipids, and outer membrane and periplasmic proteins. Recently OMV vaccines have been developed, because their LPS act as adjuvant. However, attenuation of the toxicity of typical LPS is necessary to reduce adverse effects of OMV vaccine. Previously we found that acetic acid bacteria *Acetobacter pasteurianus* produces low immunostimulatory LPS. In this study, we separated OMVs from *A. pasteurianus* and characterized their immunostimulatory effects. *A. pasteurianus* NBRC 3283 were grown at 27°C in 804 broth. Vesicle secretion from the cell was observed after 2 days in culture by TEM imaging. The vesicles were separated from culture supernatants after 7 days in culture by ultracentrifugation. We found that the precipitation contains vesicles which can be purified by OptiPrep density gradient centrifugation. Since the vesicles composed of LPS and outer membrane proteins, we concluded they are OMVs and designated as Ap-OMV. We further found that Ap-OMV stimulated TLR2 and weakly TLR4 in TLR expressing cells and TNF- $\alpha$  production in J774A.1 cells. Furthermore the OMV-like vesicles were also found in Japanese black vinegar, kurozu. These data suggest that *A. pasteurianus* produce LPS-containing OMVs and can stimulate innate immune system.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 54~57, 2019

**Key words** : Acetobacter, LPS, OMV, TLR, 黒酢

### はじめに

細菌外膜小胞 (OMV) は, グラム陰性菌が産生する 20~300 nm 程度の小胞であり, リポ多糖 (LPS), リポタンパク質 (LP), ペプチドグリカン (PGN) をはじめとした微生物分子パターン (MAMPs), 外膜タンパク質 (OMP), 多糖などの抗原を含むことが知られている<sup>1)</sup>。近年, OMV の機能が注目されており, 宿主細胞に接触, 侵入することで免疫系を調節するなど, 細菌と宿主細胞との相互作用に関与していることがわかってきた。また, OMV のワクチンへの応用も検討されており, とくに髄膜炎菌に対してはすでに実用化されている例もある。しかし一般細菌由来の OMV は LPS の強毒性のため弱毒化などの加工が必要であるなど欠点がある。

酢酸菌は, 酢酸発酵だけでなくソルボースやバイオセルロースの生産にも使われる, 多くの菌属を含む総称で

ある。酢酸菌のうち, *Acetobacter pasteurianus* はエタノールを酸化して酢酸を生成するグラム陰性菌であり, 鹿児島県特産の醸造酢である黒酢の発酵微生物の一つとして知られている。最近われわれは, *A. pasteurianus* の LPS (Ap-LPS) がヒトの TLR4 を弱く活性化する弱毒性であることを明らかにした<sup>2)</sup>。そこで本稿では酢酸菌に着目して, OMV の産生能と免疫学的性質について述べる<sup>3)</sup>。

### 1. 酢酸菌による OMV 産生

OMV は, 菌体表面の膜が湾曲し出芽して菌から放出されることが知られている。そこで, 酢酸菌で OMV が産生されるかどうかについて, 菌体と培養上清を用いて検討した。菌株は *A. pasteurianus* NBRC3283 を用いた。804 培地 (Hipolypepton-Yeast extract-Glucose-MgSO<sub>4</sub>) を用い 27°C で振とう培養した条件下では, 菌の増殖は 5

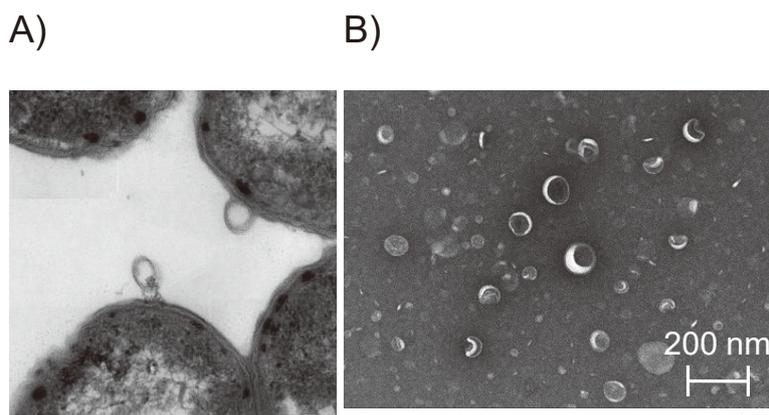


図 1 A : 培養 2 日目の *A. pasteurianus* 由来菌体の TEM 像, B : 培養 7 日目の *A. pasteurianus* 由来小胞の TEM 像

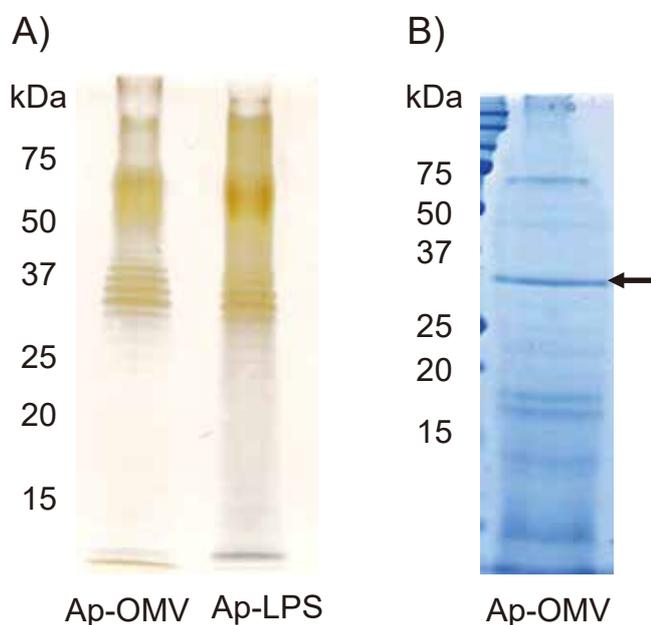


図 2 Ap-OMV および Ap-LPS の SDS-PAGE 泳動像  
A : 過ヨウ素酸—銀染色, B : CBB 染色, 矢印は OmpA のバンド

日程度で定常期に達した。培養中の菌体を TEM を用いて追跡したところ、2 日目に菌体表面からの小胞の出芽が観察され、OMV の産生が示唆された (図 1A)。そこで、培養上清をメンブランフィルター濾過後、超遠心分離し沈殿を TEM 観察したところ、培養 3 日目以降に OMV と思われる小胞を回収することがわかった (図 1B)。沈殿の SDS-PAGE 像から LPS を含有することがわかったため、ヘキソース含量を基準に沈殿の回収量を比較したところ、培養 7 日目が最も多いことがわかった。

そこで OptiPrep を用いた密度勾配遠心法により小胞の分離を試みた。7 日目の培養上清由来沈殿物を 10~45% の OptiPrep 段階密度勾配で分離したところ、20% と 25% の境界に小胞を分離することができた。小胞画分

を超遠心分離で回収したところ、2.4 L の培養から 1~2 mg 程度 (乾燥重量) の小胞を得ることができた。DLS 測定の結果、小胞は 120 nm 程度の直径を持つと推定された。TEM 測定像からの計測では、80~120 nm 程度であり、大きな矛盾はなかった。

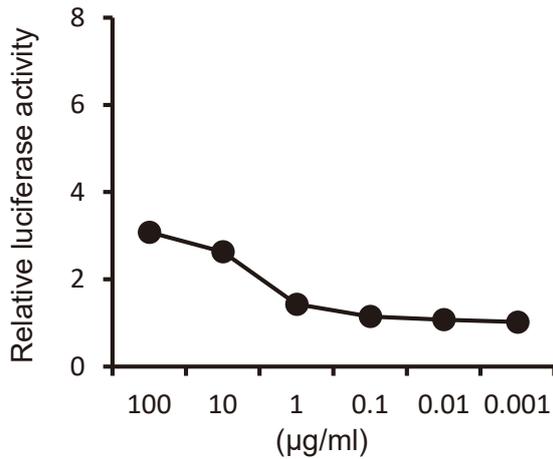
小胞を SDS-PAGE で分離後、過ヨウ素酸—銀染色で糖を可視化したところ、酢酸菌型の LPS と同様のバンドパターンを示した (図 2A)。アルジトールアセテート法による単糖定量の結果、小胞はグルコース、ラムノースを主要な構成糖とし、ガラクトースとマンノースをわずかに含むことがわかった。これは、Ap-LPS の構成糖と同様であり、小胞中に酢酸菌由来の LPS が含まれていることがわかった。また CBB 染色されたバンドを、トリプシン消化後に質量分析で解析したところ、*A. pasteurianus* の外膜タンパク質 OmpA も検出された (図 2B)。以上の結果は、酢酸菌が産生する小胞が OMV であることを示しており、本画分を Ap-OMV とした。

## 2. 酢酸菌による OMV の免疫学的性質

Ap-OMV は LPS を有することから、自然免疫を活性化しうることが期待できる。そこで、TLR2 および TLR4 の活性化を強制発現細胞を用いて検討した。その結果、TLR4 を弱く活性化することが示され (図 3A)、Ap-LPS の性質と一致することがわかった。また TLR2 も活性化しうること (図 3B) がわかった。このことは、OMV が未同定ながらリポタンパク質も含むことを示唆している。

また、サイトカインの産生誘導能も検討した。マウスマクロファージ様細胞 J774A.1 を用いたところ、TNF- $\alpha$  産生を誘導することがわかった (図 4)。Ap-OMV の誘導能は Ap-LPS よりも強い傾向にあり、LPS 以外の成分の活性への関与が示唆された。また、大腸菌由来の精製 LPS (EC-LPS) と比較すると 1/1,000 倍程度と活性が弱いことから、Ap-OMV が弱毒型の OMV であることがわかった。

A)



B)

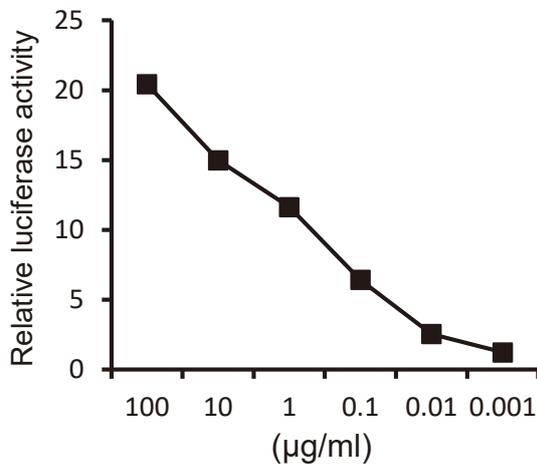


図 3 Ap-OMV の TLR 活性化能

A : Ba/mTLR4-MD2 細胞, B : Ba/mTLR2 細胞を用いた。活性は NF- $\kappa$ B 依存的ルシフェラーゼアッセイによって検出した。

### 3. 黒酢に含まれる OMV 様小胞

酢酸菌が OMV を生産することから、酢酸菌を発酵微生物とする黒酢にも OMV が含まれる可能性について検討した。黒酢は鹿児島県福山町で静置発酵にて生産された玄米黒酢を用いた。黒酢をメンブランフィルター濾過し、超遠心分離したところ、*A. pasteurianus* 培養上清と同様に沈殿が得られた。TEM で観察したところ、Ap-OMV と同様の小胞が存在することがわかった(図 5A)。そこで、OptiPrep 段階密度勾配で分離したところ、Ap-OMV と同様に小胞を分離することができた。小胞を SDS-PAGE で分離後、過ヨウ素酸—銀染色で糖を可視化したところ、酢酸菌型の LPS と同様のバンドパターンを示した(図 5B)。以上の結果は、黒酢中にも Ap-OMV と同様の構造体が存在することを示している。

#### おわりに

これまで OMV は、主に病原細菌を対象として病原性の発現機構やワクチンへの応用が研究されてきていた。しかし、OMV に含まれる LPS の毒性が問題であり免疫系の調整に用いるには加工などの手間が必要であった。一方で、本稿で示した酢酸菌が産生する OMV は、弱毒性の LPS を持つことから、自然免疫系を弱く活性化することができる。これは、LPS の毒性を減弱することなく、そのまま利用できる可能性を示すものである。また、酢酸菌を発酵細菌とする黒酢にも OMV 様の構造が含まれていた。黒酢の飲用は、免疫系を調整するとされていることから、この構造体はその活性を担っている可能性も考えられる。今後は、酢酸菌 OMV の *in vivo* での効果を明らかにし、酢酸菌の免疫調整への寄与について明らかにしたい。

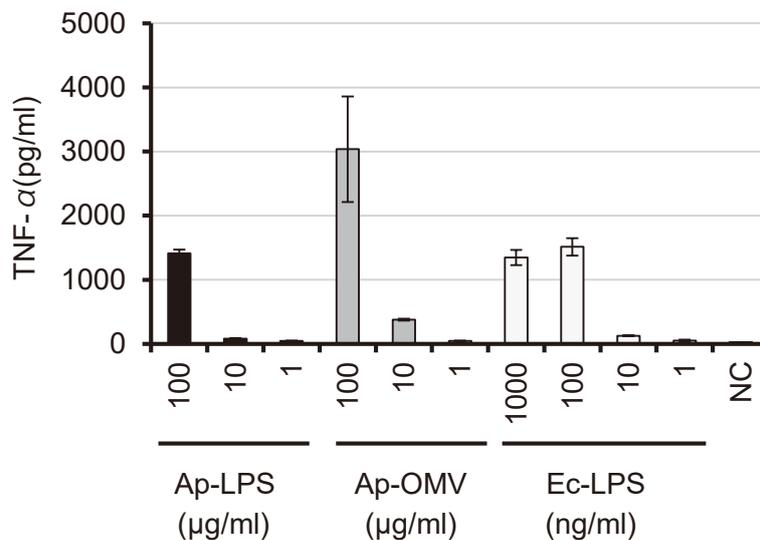


図 4 Ap-OMV の J774A.1 に対する TNF- $\alpha$  産生誘導能

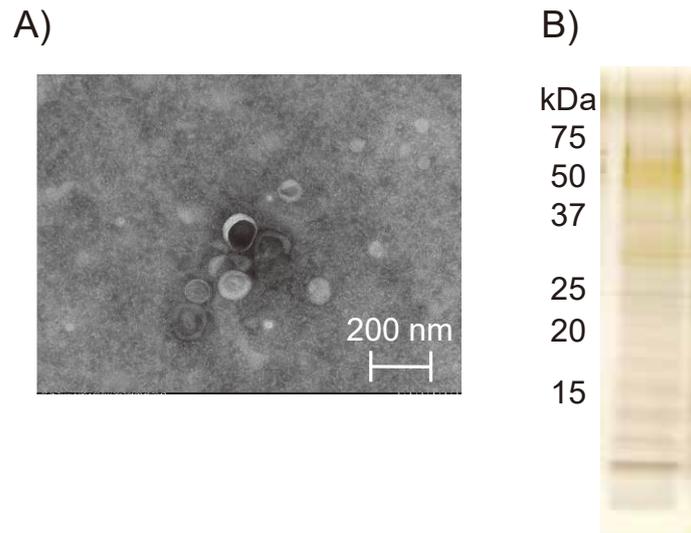


図 5 黒酢由来 OMV 様構造体の A : TEM 像, B : SDS-PAGE 泳動後の過ヨウ素酸一銀染色像

#### 文 献

- 1) Pathirana RD, Kaparakis-Liaskos M : Bacterial membrane vesicles : biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cell Microbiol* 18 : 1518-1524, 2016
- 2) 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
- 3) Hashimoto M, Matsumoto T, Tamura-Nakano M, et al. : Characterization of outer membrane vesicles of *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283. *J Biosci Bioeng* 125 : 425-431, 2018