

令和 7 年 6 月 27 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究

研究期間：2023～2024

課題番号：23K14376

研究課題名（和文）乳酸菌膜小胞の大量生産法とそれをベクターとする安全性の高いワクチン開発

研究課題名（英文）Methods for the mass production of lactic acid bacteria membrane vesicles and the development of highly safe vaccines using them as vectors

研究代表者

中川 知世（中村知世）（NAKAGAWA-NAKAMURA, Tomoyo）

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：70908714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、安全性の高い乳酸菌を使用した膜小胞ワクチンの開発に向けて、*Lactiplantibacillus plantarum* の膜小胞大量生産法の確立と、各種乳酸菌の膜小胞取得量の比較を行った。研究成果として、*Lb. plantarum* の膜小胞は、培地中に2%のグリシンを添加することで取得量が増加した。この時取得した膜小胞は、グリシンを添加していない時に取得した膜小胞と比較して、タンパク質などに変化がなかった。また、膜小胞取得量を15菌株で比較したところ、*Leuconostoc mesenteroides* と *Pediococcus pentosaceus* で多いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、乳酸菌の膜小胞大量生産法と膜小胞を多量に生産する乳酸菌株が明らかとなり、それらの膜小胞に含まれるタンパク質が明らかとなった。これまで乳酸菌の膜小胞は取得量が少ないという問題点があったが、乳酸菌膜小胞が多量に取得できる条件が明らかとなったため、乳酸菌膜小胞の基礎的な知見が拡がることが期待される。また、これらの結果を基に安全性の高い乳酸菌を使用した膜小胞ワクチンの開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study established a method for producing large quantities of *Lactiplantibacillus plantarum* membrane vesicles and compared the quantities acquired by various lactic acid bacteria, with the aim of developing a membrane vesicle vaccine using safe lactic acid bacteria. The study revealed that the amount of *Lb. plantarum* membrane vesicles acquired increased when 2% glycine was added to the medium. The membrane vesicles showed no change in protein content or other parameters compared to those acquired when glycine was not added. A comparison of the amount of membrane vesicles acquired by 15 strains of lactic acid bacteria showed that *Leuconostoc mesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus* had a higher abundance.

研究分野：応用微生物学

キーワード：乳酸菌 膜小胞 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

膜小胞 (Membrane vesicles) は、ワクチンとしての有効利用が期待されている。しかし現段階でワクチン利用への研究が進んでいる膜小胞は、病原微生物由来であり、毒性を有することが実用化に向けた大きな障害になっている。

乳酸菌は食品中から多く分離されることから、安全性の高い菌が多い。乳酸菌の膜小胞も食品中に含まれることが明らかとなっており、乳酸菌を使用した食品中から日常的に摂取していることから安全性が高いと考えられている。よって、乳酸菌の膜小胞はワクチンとしての利用も可能であると考えられる。一方で、乳酸菌を含むグラム陽性菌の膜小胞はグラム陰性菌と比較して少量しか取れないという問題点がある。これは膜小胞の形成過程の違いによるものであるが、少量しか取れないために、現在グラム陽性菌の膜小胞の利活用はハードルが高いものとなっている。

2. 研究の目的

本研究は、安全性の高い乳酸菌を使用した膜小胞ワクチンの開発に向け、乳酸菌の中でも比較的多量の膜小胞が取得できる *Lactiplantibacillus plantarum* の膜小胞大量生産法の確立とそのタンパク質の解析および、各種乳酸菌の膜小胞取得量の比較を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳酸菌の膜小胞大量生産系の確立とそのタンパク質の解析

これまで膜小胞を大量に回収する手法として、培地にグリシンを添加する方法 (Hirayama *et al.*, 2020) など、細菌にストレスを与える方法が行われている。そこで、*Lb. plantarum* JCM1149 株を使用し、グリシンを培地に添加する条件や、培養時間の延長により、膜小胞が大量に回収できるか確認を行った。さらに、それぞれの条件で回収した膜小胞が、従来回収していたものと性質が異なるものか確認するため、取得した膜小胞に含まれるタンパク質を解析した。これらの実験を通して、乳酸菌の膜小胞大量生産系の確立を目指した。

(2) 各種乳酸菌の膜小胞取得量の比較

食品中に存在する乳酸菌である *Leuconostoc mesenteroides*、*Pediococcus pentosaceus* など 15 菌種から膜小胞を取得した。取得した膜小胞から、タンパク質量と分子量分布、膜小胞の外観、粒子径分布を確認した。これらの実験を通して、どの乳酸菌で膜小胞が多く取得できるのか、また、膜小胞が多く取得できる菌に共通性が見られるのかを確認した。

4. 研究成果

(1) 乳酸菌の膜小胞大量生産系の確立とそのタンパク質の解析

食品中に含まれる *Lb. plantarum* JCM1149 株を使用し、膜小胞大量生産系の確立を行った。10 mL の MRS 液体培地で 24 時間前培養した後、グリシンを各濃度添加、もしくは無添加の 200 mL の MRS 液体培地で本培養を行った。本培養液の生菌数を測定し、培養上清をフィルターを通した後、超遠心分離を行い、その沈殿を PBS で懸濁したものを膜小胞懸濁液とした。膜小胞のタンパク質量と分子量分布はブラッドフォード法と SDS-PAGE により確認した。膜小胞の外観は FE-SEM にて、粒子径分布は NanoFCM にて確認した。

まず、培地中のグリシン添加濃度を 1% として、グリシン添加及び培養時間の変化により膜小胞取得量が変化するか確認を行った。生菌数は死滅期である 48 時間培養時に減少したが、培地中のグリシン添加による生菌数の減少はわずかであった。グリシン無添加 24 時間培養時の膜小胞タンパク質量と比較すると、培地中にグリシンを添加することによりタンパク質量は約 1.5 倍増加した。また、グリシンを添加せず、培養時間を 48 時間とすると、グリシン無添加 24 時間培養時の膜小胞タンパク質量と比較して、タンパク質量は約 3 倍増加した。一方、培養時間の延長と培地中のグリシン添加を組み合わせてもタンパク質量に差はみられなかったため、これらの相乗効果は確認できなかった (図)。

このことから、*Lb. plantarum* の膜小胞を大量に取得するためには、グリシンの添加もしくは培養時間の延長が有効であると考えられた。これらの膜小胞は、平均粒子径が 75 ~ 87 nm、SDS-PAGE での主要なバンドは約 40 kDa であり、膜小胞に含まれる分子量分布や外観に差はみられなかった。

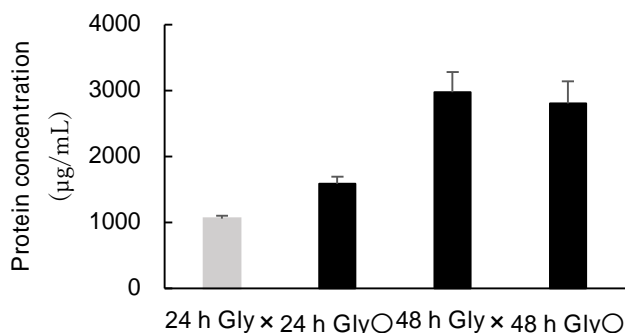


図 各膜小胞のタンパク質量

膜小胞を大量に生産するにあたり、培養時間は短い方が良いと考えられる。これまでの検討から、培地中に 1% のグリシンを添加した時の生菌数はグリシン無添加時と大きな差がみられなかった。よって、さらなるグリシンの添加が可能であると予想され、グリシンの濃度を高くすることで膜小胞取得量が増加するのではないかと考えた。培地中のグリシン濃度を 0~10% としてそれぞれ検討を行ったところ、生菌数はグリシンの濃度が増加するにつれて減少し、グリシン 5% 添加時には無添加時の 1/10 の生菌数となった。そこで、生菌数に大きな影響を与えない濃度である 3% までで膜小胞取得量が増加するか検討を行った。膜小胞タンパク質量を比較すると、グリシン 2% 添加時に膜小胞が最も取得できることが明らかとなった。また、これらの膜小胞の分子量分布に差はみられなかった。この結果から、膜小胞大量生産系において最適なグリシン濃度は 2% であると考えられた。

本研究の最終目的は、乳酸菌の膜小胞を使用したワクチン開発である。ワクチンとして利用するためには、乳酸菌膜小胞にワクチン抗原となる因子が存在する必要がある。そこで、すでに膜小胞内に多量に存在するタンパク質を、遺伝子組換えによりワクチンの標的となる物質として、多量の標的物質が膜小胞に発現できれば良いと考えた。本研究ではその前段階として、*Lb. plantarum* の膜小胞内に含まれるタンパク質の解析を行った。その結果、膜小胞には細胞内外に含まれるタンパク質が多く存在することが示唆され、特に多く含まれているタンパク質はグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素であると予想された。今後、このタンパク質に関連する遺伝子の組換えを行い、乳酸菌膜小胞がワクチンとして活用できるか検討を行っていく。

(2) 各種乳酸菌の膜小胞取得量の比較

Lb. plantarum の膜小胞取得量が多いことは知られているが、他の乳酸菌で膜小胞取得量が多いものは存在するのかに関する検討はされていない。そこで、研究室に存在する乳酸菌 15 菌種を用いて膜小胞取得量が多い菌株の探索と、膜小胞の共通性について検討を行った。使用した菌株は表に示した。膜小胞取得方法は 10 mL の MRS 液体培地で 24 時間前培養した後、200 mL の MRS 液体培地で 24 時間本培養を行った。本培養液の生菌数を測定し、培養上清をフィルターろ過した後、超遠心分離を行い、その沈殿を PBS で懸濁したものを膜小胞懸濁液とした。膜小胞のタンパク質量と分子量分布はブラッドフォード法と SDS-PAGE

表 使用菌株と生菌数、膜小胞取得量

菌の形状	属	種	生菌数 (CFU/mL)	タンパク質量 (μ g/mL)
桿菌	<i>Companilactobacillus</i>	<i>alimentarius</i>	3.2×10^9	521
		<i>kimchii</i>	4.7×10^9	148
	<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>casei</i>	2.0×10^9	125
	<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>paraplantarum</i>	4.2×10^9	416
		<i>plantarum</i>	4.6×10^9	833
	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	8.0×10^9	230
		<i>gasseri</i>	1.3×10^9	189
	<i>Lactilactobacillus</i>	<i>sakei</i>	2.4×10^9	509
	<i>Levilactobacillus</i>	<i>brevis</i>	3.2×10^9	122
	<i>Weissella</i>	<i>cibalia</i>	1.9×10^9	64
球菌	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	1.4×10^9	195
	<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>	3.3×10^9	225
		<i>mesenteroides</i>	3.4×10^9	2410
	<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	5.6×10^9	232
		<i>pentosaceus</i>	4.5×10^9	2313

により確認した。膜小胞の外観は FE-SEM にて、粒子径分布は NanoFCM にて確認した。

表より、今回使用した菌株の膜小胞取得時の生菌数はどの菌株も 10^9 CFU/mL であり、菌数に大きな差はみられなかったが、膜小胞のタンパク質量は菌株ごとに差が見られた。最も多く膜小胞を取得できた菌株は *Leu. mesenteroides* であり、次いで *Ped. pentosaceus* となった。この 2 菌株は他の膜小胞取得量と比較して特に多く、球菌であるという共通性を持っている。しかし他の乳酸球菌は少量の膜小胞しか取得できていないことから、これら 2 菌株には何らかの共通性があり、それが膜小胞取得量の増加につながったのではないかと考えられる。タンパク質の分子量分布は菌により異なったが、多くの菌が 35~45 kDa 付近に主要なタンパク質が見られた。100 kDa 以上のタンパク質が主要である菌株は 4 種類存在し、*Lb. paraplantarum*、*Leu. mesenteroides*、*Ped. acidilactici*、*Ped. pentosaceus* であった。これらの菌のタンパク質解析を行った結果、*Leu. mesenteroides*、*Ped. pentosaceus* の高分子タンパク質は共通のシグナルペプチドをもつタンパク質が存在していたが、主要なタンパク質は異なっていた。また、*Lb. paraplantarum* は高分子タンパク質がグリコシド加水分解酵素であり、上記 2 菌株とは異なるタンパク質であった。さらに属が同じ菌であっても主要なタンパク質が異なったことから、菌株ごとに膜小胞に含まれるタンパク質は異なることが示唆された。一方で外観や粒子径分布は菌株によって大きな差はみられなかった。これらの結果から、特に膜小胞取得量の多かった *Leu. mesenteroides*、*Ped. Pentosaceus* の膜小胞は、今後ワクチン開発などで利活用できるのではないかと考えられた。

本研究では、安全性の高い乳酸菌を使用した膜小胞ワクチンの開発に向けた準備段階として、*Lb. plantarum* の膜小胞大量生産法の確立と、各種乳酸菌の膜小胞取得量の比較を行った。研究成果として、以下のことが明らかとなった。

Lb. plantarum の膜小胞は培地中にグリシンを添加する、もしくは培養時間を延長することで膜小胞取得量が増加することが明らかとなった。一方、この2つの取得量増加因子に相乗効果はみられなかった。膜小胞の取得を効率的に行うには培養時間が短い方が良いと考え、培地中のグリシン添加濃度について検討を行ったところ、2%の時に最も膜小胞取得量が増加することが明らかとなった。この時に取得した膜小胞は、グリシンを添加していないときの膜小胞と比較してタンパク質分子量分布や粒子径に変化はなく、特に多く含まれているタンパク質はグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素であると予想された。したがって、培地中へのグリシン添加によって得られる膜小胞は、その特徴に変化はなく、取得量のみを増加させることが明らかとなった。

Lb. plantarum 以外の乳酸菌で膜小胞取得量の多い菌株について検討したところ、*Leu. mesenteroides* と *Ped. pentosaceus* の2菌株で特に多いことが明らかとなった。これら2菌株は膜小胞取得量が多いことから、ワクチン開発などで利用できる可能性が示唆された。

以上の結果より、乳酸菌の膜小胞大量生産法と膜小胞を多量に生産する乳酸菌株が明らかとなり、それらの膜小胞に含まれるタンパク質が明らかとなった。乳酸菌膜小胞が多量に取得できる条件が明らかとなったため、今後、乳酸菌膜小胞の基礎的な知見が拡がることが期待される。また、これらの結果を基に安全性の高い乳酸菌を使用した膜小胞ワクチンの開発に繋がると期待される。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 中村知世、塩見花歩、池田瑠亜、西野智彦
2．発表標題 乳酸菌の生産する膜小胞
3．学会等名 第76回日本生物工学会
4．発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------