

プロバイオティック乳酸菌の表層GAPDHの網羅的発現解析と腸管付着性に関する研究

宮城大学食産業学部：木下 英樹

要 約

プロバイオティック乳酸菌を評価する上で重要なファクターの一つに腸管付着性が挙げられるが、腸管付着性試験は操作が煩雑であり、時間とコストがかかるのが難点である。また、最近、乳酸菌の菌体表層にグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）が発現し、付着因子として作用していることが明らかになった。そこで本研究では、菌体表層GAPDHの網羅解析と酵素活性を指標とした高腸管付着性乳酸菌の新規スクリーニング法の確立を目指して研究を行った。ヒト腸管組織由来乳酸桿菌30菌株および漬物やキムチなど様々なサンプルから単離した47菌株について、GAPDH酵素活性を測定したところ、高頻度でGAPDH活性が検出された。また、SDS-PAGEにおいてもGAPDHと思われる40kDa付近のバンドが確認された。本結果から、乳酸桿菌の菌体表層には、普遍的にGAPDHが存在し、腸管付着性に寄与している可能性が示された。また、BIACORE腸管付着性試験においても、GAPDH活性とSDS-PAGEでのバンドの濃さは、ある程度付着性試験の結果と一致したことから、GAPDH活性を指標とした高腸管付着性乳酸菌のスクリーニング法の可能性が示唆された。しかしながら、GAPDHのみでは、全ての高腸管付着性乳酸菌の選抜をするのは難しく、複数の酵素を組み合わせたスクリーニング法など更なる改良の余地が残された。

キーワード：プロバイオティクス、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、GAPDH、腸管付着性、付着因子、アドヘン、酵素

緒 言

プロバイオティクスは、アンチバイオティクス（抗生物質）の対義語として作られた用語であり、1989年、Fullerによって、「腸内菌叢のバランスを改善することにより宿主動物に有益に働く生菌添加物」と定義された¹⁾。現在では、国連食糧農業機関（FAO）/世界保健機構（WHO）により、プロバイオティクスのガイドラインが作成され、「適正量を摂取することにより宿主の健康に有益な作用をもたらす生きた微生物」と再定義されている²⁾。プロバイオティクスの代表である *Lactobacillus* 属を含む乳酸菌は、発酵乳や漬物などを通じて古くから利用されており、このような菌群の多くは、FDA（Food and Drug Administration：米国食品医薬品局）により、一般的に安全と認められた食品・食品添加物として、「GRAS（Generally Recognized As Safe）」^{3, 4)}の認証を受けている。

Lactobacillus 属には、宿主に対して、整腸作用⁵⁾、血中コレステロール低減作用⁶⁾、免疫賦活化作用⁷⁾および抗腫瘍作用⁸⁾などの様々な生理的効果が報告されているが、これらの諸作用の多くは、プロバイオティック乳酸菌が腸管内に留まり増殖することで、初めて十分な生理的効果が期待できるものと考えられる。そのため、プロバイオティック乳酸菌を評価する上で「腸管付着能」は、きわめて重要なファクターの一つである。しかしながら、乳酸菌の腸管付着メカニズムはま

だまだ不明な点が多いのが現状である。また、腸管付着性の高い乳酸菌（高腸管付着性乳酸菌）を選抜するための付着性試験もお金と手間がかかり、非常に煩雑な作業である。

プロバイオティック乳酸菌の腸管付着能力を評価する場合、その評価系が重要になってくる。腸管付着性試験は、現在、ヒト腸管モデルとしてヒト腸管上皮細胞のCaco-2細胞やHT29細胞、またはムチンなどの粘液に対して行われている。細胞や粘液に菌体を添加し付着させ、洗浄後に付着能力を測定するという手法である。測定法は、光学または電子顕微鏡を用いて目視で算定する方法、菌体を放射性同位体ラベルして放射活性量または蛍光ラベルして蛍光強度により定量する研究手法が一般的である^{9, 10)}。我々は、二分子間の相互作用を表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance: SPR）で測定するバイオセンサー装置“BIACORE（ピアコア）”により腸管付着性試験を行っている¹¹⁾。本手法は、二分子を特別な標識をすることなくリアルタイムで付着量を定量的に解析できる優れた手法である。また、菌体の洗浄作業時などに人為的な操作が全く入らないために、再現性の高いデータが得られる。我々は血液型抗原プローブおよびヒト大腸ムチン（HCM）をリガンドとしてセンサーチップ表面に固定化し、菌体または菌体表層タンパク質をアナライトとして流すことで付着性を定量的に解析している。結合量はResonance Unit（以下、RU）値として表され、1 RUは1 mm²あたりにアナライト1 pgが結合したことを示す。しかしながら、上記の「腸管付着性試験」は、いずれも操作が煩雑であり、コストや時間がかかるという欠点がある。

最近、我々は、ヒト腸管組織から直接単離した高腸管付着性乳酸菌*Lactobacillus plantarum* LA318株の菌体表層に、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）が高発現していることを明らかにした。さらに、本表層GAPDHが、HCMやその糖鎖末端に発現している血液型抗原（A型およびB型）へ高い結合性を示す腸管付着因子（アドヘシン）であることを明らかにした^{12, 13)}。また、同時期にフィンランドのグループにより乳酸菌の菌体表層にGAPDHやエノラーゼなどが存在していることが明らかとなった^{14, 15)}。これまで報告されてきた腸管付着因子は、「付着性」以外に評価する指標がなかったが、上記のタンパク質は、「酵素活性を持つ」という特徴を有している。我々は、その特徴にいち早く着目し、酵素活性を利用して新たな腸管付着評価系の構築ができるのではないかと考えた。そこで本研究では、菌体表層に発現しているGAPDHにターゲットを絞り、菌体表層GAPDHの網羅的発現解析とGAPDH酵素活性を指標とした高腸管付着性乳酸菌の新規スクリーニング法の構築を目的とした。

材料と方法

1. ヒト腸管組織由来乳酸菌

ヒト腸管組織由来乳酸桿菌30菌株は、以前ヒト腸管組織の粘液層から直接単離したものをを用いた（表1）¹⁶⁾。腸管組織は、がん患者から摘出された腸管組織の患部以外の正常部位を用いた。これらは、手術前2日間の絶食や下剤処理にも耐え、腸管に強固に結合していた乳酸菌である。試験前にMRS broth（Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）に2%（v/v）で接種し、37°Cで24hr、2回継代培養を行ってから各試験に供した。

2. グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）の活性測定

グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）の活性測定は、Pancholiらの方法¹⁷⁾を参考

にして、マイクロプレートに応用して行った。サンプル50 μ Lを96穴マイクロプレートに添加した。マイクロプレートの各ウェルにグリセルアルデヒド-3-リン酸（基質）（47mg/mL, Sigma）1 μ L, 10mM NAD⁺ 25 μ L, 活性測定用バッファー（40 mM トリエタノールアミン, 50 mM Na₂HPO₄, 0.2 mM EDTA, 20 mM 2-メルカプトエタノール, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 8.6) 175 μ Lの混合溶液を添加し、泡立えないように振盪し、5分後にマイクロプレートリーダーにより340nmの吸光度を測定した。コントロールは、グリセルアルデヒド-3-リン酸の代わりに活性測定用バッファーを用い、コントロール値を引いた値を活性値とした（3連）。結果は、酵素活性をタンパク質量で除した比活性として示した。

3. タンパク質量測定

PBS抽出物のタンパク質量は、プロテインアッセイ（BIO-RAD Laboratories, CA, USA）（ブラッドフォード法）または、BCA™ Protein Assay Kit（PIERCE, IL, USA）（BCA法）を用いて、BSAにより検量線を作成し、それぞれ付属のマニュアルに従って測定した。

4. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Leammili の方法¹⁸⁾に準じて行った。ゲルは、12.5%ポリアクリルアミドゲルを調製するか、または、市販の5-20%濃度勾配ゲル（c-PAGEL、アトー（株）、東京）を購入し用いた。試料は、SDS 化試薬（1% (w/v) SDS, 2% (v/v) Tris-HCl pH6.8, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, および20% (v/v) glycerol）に溶解させ、95°Cで10min加熱してSDS 化を行った。各試料溝への試料添加量は、20 μ Lとした。電気泳動は定電圧125 mAで行い、泳動後、2.5% (w/v) Coomassie Brilliant blue (CBB, Fluka chemie AG, Buchs, Switzerland) 溶液（25% (v/v) methanol, 10% Acetic Acid 含む）を用いて染色した。分子量マーカーは、AE-1440 EzStandard（アトー（株）、東京）を用いた。

5. BIACOREを用いた付着性試験

5-1. BIACOREセンサーチップCM 5への精製HCMの固定化

表面デキストラン層の末端にカルボキシル基が導入されているセンサーチップ CM5（ピアコア（株）、東京）への精製HCMの固定化をアミンカップリング反応により行った。Running buffer, 固定化用試薬, およびメンテナンス用試薬は全てピアコア（株）の純正製品を使用した。Running Buffer としてのHBS-EP buffer（0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20, pH 7.4）は3 μ L/minで流し、BIACOREの設定温度は25°C定温とした。実験に先んじて、HBS-EP bufferでPrime操作を必須とし、必要に応じてDesorb, Sanitize, System Checkによるメンテナンスを行った。実験終了後はMilli Q水にてPrimeを行い、センサーチップは4°C下で乾燥保存した。

精製HCMのセンサーチップ CM5への固定化は、以下の通り行った。センサーチップCM5の4つの経路のフローセル (Fc) 中の1つの経路に対して EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) と NHS (N-hydroxysuccinimide) の混合 (1:1) 試薬70 μ LをInject (flow rate: 10 μ L/min, 7 min) し、デキストラン末端に導入されているカルボキシル基を活性化させた。そこへ100 μ Lの固定化用酢酸 buffer (pH 4.0) に精製HCM 0.5mgを溶解した混合

溶液を流し、共有結合させた。ついで、エタノールアミンを用いてリガンド未結合の残存活性基のブロッキングを行った。

5-2. アナライトの調製

アナライトとなる乳酸桿菌をMRS培地にて37°Cで12hrまたは18hr培養した。菌体を遠心(3,000×g, 10 min)により回収後、滅菌蒸留水を用いて遠心洗浄(8,000×g, 5 min, 4°C)を3回行い、凍結乾燥を行った。凍結乾燥菌体は、付着性試験の前にHBS-EP bufferに0.1mg/mLの濃度に懸濁し、本試料を菌体アナライト溶液とした。

5-3. BIACORE付着性試験

BIACORE 1000に装着したセンサーチップCM5上に固定化した精製HCMに対して、アナライト溶液15μLをインジェクトした(flow rate 3μL/min, 5 min)。その後、一定時間running bufferを流し、Resonance Unit (RU) 値が一定になったところで再生溶液を流し、付着した菌体の解離を行った。再生溶液は基本的に1M GHCl溶液を使用し、必要に応じて添加時間の延長、再生溶液濃度の上昇(4Mまで)を行った。アナライトのインジェクト終了後、200秒後のRU値からアナライト添加前のベースラインのRU値を引いた値を付着量とした。試験は、3回繰り返し行った。

6. 様々な単離源からの乳酸菌の単離

漬物を中心とした様々なサンプルをPBSに懸濁し、懸濁液を乳酸桿菌選択培地であるMRS寒天培地および変法LBS培地に塗抹し、嫌気条件下で37°C, 48hr培養した。MRS寒天培地はMRS培地(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)に0.8% (w/v) 寒天(Agar Bacteriological Agar No. 1, Unipath Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK)を添加して調製した。変法LBS寒天培地は、LBS agar (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)に0.8% (w/v) Lab-lemcopowder (meat extract powder; total nitrogen 12.4% (w/w), amino nitrogen 2.5% (w/w), Sodium chloride 5.7% (w/w), pH (1% solution) 7.2) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), 0.1 M 酢酸ナトリウム, 3.7% (v/v) 酢酸を添加し調製した。コロニー形成後、コロニーの色、形態、大きさの異なるものをそれぞれMRS brothで培養した。培養後、遠心分離(5,000 rpm, 10 min)により集菌し、30%グリセロールまたは、10%スキムミルクに懸濁し、-80°Cで保存した。

7. 菌種同定

保存した菌をMRS寒天培地で培養し、コロニー形成後、63f(5' -CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3')と518r(5' -ATTACCGCGGCTGCTGG-3')のプライマーセットを用い、コロニーダイレクトPCRにより16S rDNA(約450 bp)を増幅した。塩基配列解読は、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA)を用いたダイターミネーター法によって行った。プライマーは、63fを用い、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)により配列を解析した。配列解析後、DNA Data Bank of Japan (DDBJ, Mishima, Japan)のFASTAにより、相同性解析を行い、簡易同定を行った。

結 果

ヒト腸管組織由来乳酸桿菌のGAPDH発現解析と腸管付着性との相関性の検討

12時間培養時のヒト腸管組織由来乳酸桿菌30菌株のGAPDH発現解析の結果を図1に示した。菌体表層GAPDHの酵素活性は、菌株ごとに大きくことなり、培養12時間では、30菌株中21菌株からGAPDH活性が検出された。図2には、図1の結果を以前行った腸管付着性試験の結果¹⁶⁾と並べて示した。一部を除き、GAPDH活性（比活性）と腸管付着性の結果は、似たような傾向が見られ、活性の高い菌は、腸管付着性も高いという傾向が見られた。図3には、12時間培養時のPBS抽出液のSDS-PAGEの結果を示した。活性の高かったものでは、40kDa付近に明確なバンドとして検出された。

培養時間を18時間にしたところ、全ての菌でGAPDH活性が検出された（図4）。比活性は、12時間培養時と似たような傾向が見られたが、比活性の値は全体的に上昇した。また、LA305株、LA307株、LA312株、LA313株、LA314株、LA315株、LA316株、LA324株、LA327株は、比活性の値が0.3以上の高い値を示した。その中で最も高い値を示したのは、LA313株だった。LA318株は、12時間培養では2番目に高い値だったが、18時間培養では全体と比較して中程度の活性値となった。図5には活性の高い菌株（LA305株、312株、313株、316株、324株、327株）と低い菌株（301株、304株、310株、311株）のPBS抽出物のSDS-PAGEを示した。活性の高い菌株ではバンドが確認できたが、低い菌株では明確なバンドは得られなかった。図6は、選抜菌のHCMへのBIACORE付着性の結果を示した。LA313株は、腸管付着性試験でも高い付着性を示し、比活性の結果と一致した。SDS-PAGEにおけるGAPDHと思われるバンド（40kDa付近）が濃い程、付着性も高い傾向が見られた。特に、LA305株、LA313株およびLA316株は、付着性と比活性が高く、SDS-PAGEにおいても40kDa付近に明確なバンドとして検出された。

様々な単離源からの乳酸桿菌の単離および菌種同定とGAPDH発現解析

漬物やキムチを中心とした様々な単離源、計57サンプルから乳酸桿菌の単離を試みた。16S rDNA配列の相同性解析により菌種同定を行った結果、57サンプル中16サンプルから計47菌株の乳酸桿菌を単離・同定することができた（表2）。菌種別では、*L. sakei*が13菌株と最も多く、次いで*L. plantarum*5菌株となった。その他、*L. coryniformis*および*L. rhamnosus*が4菌株ずつ、*L. gasseri*が3菌株、*L. curvatus*、*L. brevis*、*L. fermentum*および*L. alimentarius*が2菌株ずつ、*L. paracasei*、*L. casei*および*L. rossiae*が1菌株ずつとなった。また、複数の候補があり、種まで完全に同定できなかった*Lactobacillus* sp. が計7菌株という結果となった（表3）。

図7には、様々な単離源の乳酸菌47菌株のGAPDH活性を示した。腸管組織由来乳酸桿菌と同様に活性は菌株によって異なる結果となった。比活性の値が0.3以上だった比較的活性の高い菌が16菌株、0.1以上0.3未満の中程度の活性を示した菌が17菌株、0.1未満の低い値を示した菌が14菌株だった。活性値が0の菌株はなかった。

考 察

腸管付着性試験は、プロバイオティック乳酸菌を評価する上で欠かせない試験であるが、操作が煩雑であり、コストと時間がかかるのが難点である。本研究では、GAPDHの網羅解析を行うと共に、GAPDH活性を指標にすることで、腸管付着性試験を行うことなく、腸管付着性の高い乳酸菌（高腸管付着性乳酸菌）をスクリーニング可能かを検証した。まず、ヒト腸管組織に強固に付

着していた乳酸桿菌30菌株のGAPDH活性を求めた。その結果、12時間培養では、21菌株から、18時間培養では、全ての菌株からGAPDH活性が検出された。酵素活性は、菌株ごとに異なっており、PBS抽出物のSDS-PAGEにおいて、CBB染色では検出できない菌株もあったが、多くの乳酸菌から菌体表層GAPDHの発現が確認された。しかしながら、詳細な解析には、ウェスタン解析やELISA解析などを行う必要があると考えられた。また、ヒト腸管組織由来乳酸菌のみならず、漬物やキムチなどを中心に様々なサンプルから単離した乳酸桿菌の多くからGAPDH活性が検出されたことから、乳酸菌において菌体表層GAPDHは普遍的に存在している可能性が示唆された。アシドフィルスグループ乳酸菌などで多く見つかった付着因子としてS-layerタンパク質があるが¹⁹⁾、S-layerタンパク質を持つ乳酸菌の割合はそれほど高くはない。本実験のように付着因子が高頻度で普遍的に存在している例はほとんどない。Hurmalainenらによって、数菌株での乳酸桿菌において、GAPDHとエノラーゼの菌体表層での発現が確認されているが¹⁴⁾、今回のように大規模解析において多くの菌から検出されたのは初めてである。LA301株、LA306株、LA308株、LA309株、LA310株、LA319株、LA323株、LA325株などは、GAPDH活性が検出されない、または低かったが、腸管付着能は有していた(図2)。このような菌株には、GAPDH以外の付着因子が存在していると考えられる。また、LA324株のような活性は高いが、付着性および抽出タンパク質が少ない菌株は、GAPDHに何らかの構造の違いがあるのではないかと推測された。これについては、X線立体構造解析などの詳細な解析が必要になるだろう。また、SDS-PAGEによるGAPDHと思われる40kDa付近のバンドが濃いものは、腸管付着性も高いという傾向が見られた(図3、5)。もちろん腸管付着性全てをGAPDHのみで語ることはできないが、本実験により、GAPDHの腸管付着因子としての役割は少なくないのではないかと考えられた。

GAPDHは、菌体内でグリセルアルデヒド-3-リン酸に作用し、1,3-ビスホスホグリセリン酸に変換する解糖系の重要な酵素である。シグナル配列を持たない菌体内酵素の菌体表層への移行メカニズムは解明されていないが、何らかの輸送システムがあり、菌体表層に移行すると思われる。菌体表層でGAPDHは、乳酸により低pHとなった外部環境で正の荷電を持ち、リポテイコ酸などの負電荷の物質と結合することで菌体表層に留まっていると推測されている¹⁵⁾。表層GAPDHは、口内病原細菌で多く発見されている。Group A *Streptococcus* (GAS)の表層GAPDHは、SDH (Streptococcal surface dehydrogenase) と呼ばれ、プラスミン (プラスミノゲン)^{20, 21)}、フィブロネクチン、リゾチーム、ミオシンおよびアクチン¹⁷⁾へのマルチバインディング特性を示すことが報告されている。また、SDHは、ヒト咽頭細胞のレセプターであるuPAR (urokinase plasminogen activator receptor)/CD87を認識し、宿主細胞への付着を媒介している²²⁾。Seifertらは、細胞骨格タンパク質および細胞外マトリックスタンパク質へgroup B *Streptococcus* (GBS)が付着することを報告した²³⁾。*Candida albicans*でも表層GAPDHの発現が報告され、フィブロネクチンおよびラミニンの結合性が示された²⁴⁾。また、*Staphylococcus aureus*および*Staph. epidermidis*の表層GAPDHは、トランスフェリンに結合することが明らかとなっている²⁵⁾。さらに、歯周病細菌である*Porphyromonas gingivalis*の繊毛は、*Strep. oralis*のGAPDHと共同凝集を起こし、ヒト口腔上皮細胞へ付着すると報告されている^{26, 27)}。また、グラム陰性細菌である*Escherichia coli* (大腸菌)においても表層GAPDHが確認されており、プラスミノゲンとフィブリノーゲンおよびCaco-2細胞への付着が報告されている²⁸⁾。

乳酸桿菌では、上記でも少し触れたがフィンランドのグループにより、様々な乳酸菌の菌体表

層にGAPDHやエノラーゼなどが存在しており、プラスミノゲンおよびプラスミンに付着性を示すことが報告されている。また、これらの酵素は、組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) を活性化することで血栓溶解に関与していることが明らかにされた^{14, 15)}。また、2008年9月に行われた第9回国際乳酸菌シンポジウム (LAB9) では、同研究グループによりGAPDH やエノラーゼのみならず、グルタミンシンテターゼ (GS) および、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (GPI) などの菌体内で働く酵素が菌体表層に発現しており、pH依存的に細胞外マトリックスの構成タンパク質であるラミニン、フィブロネクチンおよびコラーゲンに結合性を示すことが報告された。また、筆者らの研究において、LA318株の菌体表層にGAPDHが高発現していることが明らかとなり、GAPDHは、菌体表層でヒト大腸ムチンやその糖鎖末端に発現しているABO式血液型抗原、特にA抗原 {GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal-} およびB抗原 {Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal-} へ高い結合性を示すアドヘシンとして作用していることが明らかになった。菌体表層GAPDHは、単糖には結合性を示さず、結合には、特徴的な血液型三糖構造が重要であることが明らかとなり、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) およびガラクトース (Gal) を認識するレクチン様タンパク質としての特徴を備えていると考えられた^{12, 13)}。また、世界で最もよく研究されている乳酸菌の一つである *Lb. rhamnosus* GG (通称LGG) の菌体表層にもGAPDHの他にホスホグリセレートキナーゼが発現しており、付着因子としての働きが推測された¹⁷⁾。さらに、2009年12月には、*L. plantarum* LM3の菌体表層にエノラーゼが発現しており、フィブロネクチンへの結合性が報告される²⁹⁾ など、菌体内酵素群の菌体表層での発現が多く発表されてきている。

このように乳酸菌においても多くの菌株で、菌体表層に菌体内酵素群の発現が確認されているが、その全貌は明らかになっていない。本研究では、GAPDHのみにターゲットを絞り研究を行ったが、乳酸菌には、SlpA¹⁹⁾、CdpA³⁰⁾、Mub³¹⁾、FbpA³²⁾、CbsA⁹⁾、EF-Tu³³⁾、Msa³⁴⁾、CnBP (ABCトランスポーター)³⁵⁾、MapA³⁶⁾、LspA³⁷⁾、エノラーゼ¹⁴⁾、細胞壁多糖³⁸⁾、リポテイコ酸³⁹⁾ など様々な付着因子があることから、GAPDHのみで付着を論ずるのは非常に難しいと考えられる。本実験のように高腸管付着性菌を酵素活性により検出しようとする試みは誰も行っておらず、本研究が初めてである。今後は、GAPDH以外の酵素活性を有する付着因子 (アドヘシン) も考慮に入れ、酵素活性を指標とした新規スクリーニング法の確立を目指す予定である。

結 論

本研究において、GAPDH活性測定により、多くの乳酸桿菌で普遍的に菌体表層GAPDHが発現している可能性が示された。また、GAPDH発現量と腸管付着性との間には、ある程度の相関性が見られ、GAPDH活性を指標とした高腸管付着性乳酸菌の新規スクリーニング法の可能性が示された。しかしながら、GAPDHのみでは高い付着性を持つ菌株を全て網羅することはできなかった。今後、乳酸桿菌の菌体表層に普遍的に発現している有用なアドヘシン酵素を網羅解析し、複数の酵素により選抜することで、選抜漏れを極力なくし、幅広い菌株に対応可能な選抜方法の開発を行う予定である。

謝 辞

本研究でのBIACORE付着性試験は、東北大学農学研究科の齋藤忠夫教授のご協力を得て実施しました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Fuller, R., Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, **66**, 365-378 (1989).
2. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, L., Ontario, Canada. (2002).
3. Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H., Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*, **36**, 1-29 (1997).
4. Feord, J., Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 353-360 (2002).
5. Collins, E. B., and Aramaki, K., Production of Hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, **63**, 353-357 (1980).
6. Danielson, A. D., Peo, E. R., Jr., Shahani, K. M., Lewis, A. J., Whalen, P. J., and Amer, M. A., Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J Anim Sci*, **67**, 966-974 (1989).
7. Perdigon, G., Maldonado Galdeano, C., Valdez, J. C., and Medici, M., Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr*, **56 Suppl 4**, S21-26 (2002).
8. Lim, B. K., Mahendran, R., Lee, Y. K., and Bay, B. H., Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse. *Jpn J Cancer Res*, **93**, 36-41 (2002).
9. Sillanpää, J., Martínez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K., Keränen, J., Höök, M., Westerlund-Wikström, B., Pouwels, P. H., and Korhonen, T. K., Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J Bacteriol*, **182**, 6440-6450 (2000).
10. Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H. S., In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*, **67**, 207-216 (2001).
11. Uchida, H., Fujitani, K., Kawai, Y., Kitazawa, H., Horii, A., Shiiba, K., Saito, K., and Saito, T., A new assay using surface plasmon resonance (SPR) to determine binding of the *Lactobacillus acidophilus* group to human colonic mucin. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 1004-1010 (2004).
12. Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kawasaki, T., Wakahara, N., Matsuo, H., Watanabe, M., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A., and Saito, T., Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J Appl Microbiol*, **104**, 1667-1674 (2008).

13. Kinoshita, H., Wakahara, N., Watanabe, M., Kawasaki, T., Matsuo, H., Kawai, Y., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A., and Saito, T., Cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Lactobacillus plantarum* LA 318 recognizes human A and B blood group antigens. *Res Microbiol* (2008).
14. Hurmalainen, V., Edelman, S., Antikainen, J., Baumann, M., Lähteenmäki, K., and Korhonen, T. K., Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. *Microbiology*, **153**, 1112-1122 (2007).
15. Antikainen, J., Kuparinen, V., Lähteenmäki, K., and Korhonen, T. K., pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. *J Bacteriol*, **189**, 4539-4543 (2007).
16. Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kitazawa, H., Miura, K., Shiiba, K., Horii, A., and Saito, T., Quantitative evaluation of adhesion of lactobacilli isolated from human intestinal tissues to human colonic mucin using surface plasmon resonance (BIACORE assay). *J Appl Microbiol*, **102**, 116-123 (2007).
17. Pancholi, V., and Fischetti, V. A., A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med*, **176**, 415-426 (1992).
18. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
19. Hynönen, U., Westerlund-Wikström, B., Palva, A., and Korhonen, T. K., Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol*, **184**, 3360-3367 (2002).
20. D'Costa, S. S., Romer, T. G., and Boyle, M. D., Analysis of expression of a cytosolic enzyme on the surface of *Streptococcus pyogenes*. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 826-832 (2000).
21. Winram, S. B., and Lottenberg, R., The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology*, **142 (Pt 8)**, 2311-2320 (1996).
22. Jin, H., Song, Y. P., Boel, G., Kochar, J., and Pancholi, V., Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *J Mol Biol*, **350**, 27-41 (2005).
23. Seifert, K. N., McArthur, W. P., Bleiweis, A. S., and Brady, L. J., Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. *Can J Microbiol*, **49**, 350-356 (2003).
24. Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorín, I., Renau-Piqueras, J., Martínez, J. P., and Gil, M. L., The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of

- Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun*, **66**, 2052-2059 (1998).
25. Modun, B., and Williams, P., The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun*, **67**, 1086-1092 (1999).
 26. Maeda, K., Nagata, H., Yamamoto, Y., Tanaka, M., Tanaka, J., Minamino, N., and Shizukuishi, S., Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun*, **72**, 1341-1348 (2004).
 27. Sojar, H. T., and Genco, R. J., Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of epithelial cells as a second molecule that binds to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **45**, 25-30 (2005).
 28. Egea, L., Aguilera, L., Gimenez, R., Sorolla, M. A., Aguilar, J., Badia, J., and Baldoma, L., Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 1190-1203 (2007).
 29. Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R. A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., Marasco, R., and Sacco, M., Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb Cell Fact*, **8**, 14 (2009).
 30. Altermann, E., Buck, L. B., Cano, R., and Klaenhammer, T. R., Identification and phenotypic characterization of the cell-division protein CdpA. *Gene*, **342**, 189-197 (2004).
 31. Roos, S., and Jonsson, H., A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, **148**, 433-442 (2002).
 32. Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., and Klaenhammer, T. R., Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 8344-8351 (2005).
 33. Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M., and Cortesy-Theulaz, I. E., Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun*, **72**, 2160-2169 (2004).
 34. Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P. A., Lambert, J., de Vos, W. M., van der Meer, R., Smits, M. A., and Kleerebezem, M., Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol*, **187**, 6128-6136 (2005).
 35. Roos, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadstrom, T., Lindberg, M., and Jonsson, H., A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC

- transporter system? *FEMS Microbiol Lett*, **144**, 33-38 (1996).
36. Rojas, M., Ascencio, F., and Conway, P. L., Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 2330-2336 (2002).
37. van Pijkeren, J. P., Canchaya, C., Ryan, K. A., Li, Y., Claesson, M. J., Sheil, B., Steidler, L., O'Mahony, L., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D., and O'Toole, P. W., Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 4143-4153 (2006).
38. Greene, J. D., and Klaenhammer, T. R., Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 4487-4494 (1994).
39. Sherman, L. A., and Savage, D. C., Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Appl Environ Microbiol*, **52**, 302-304 (1986).

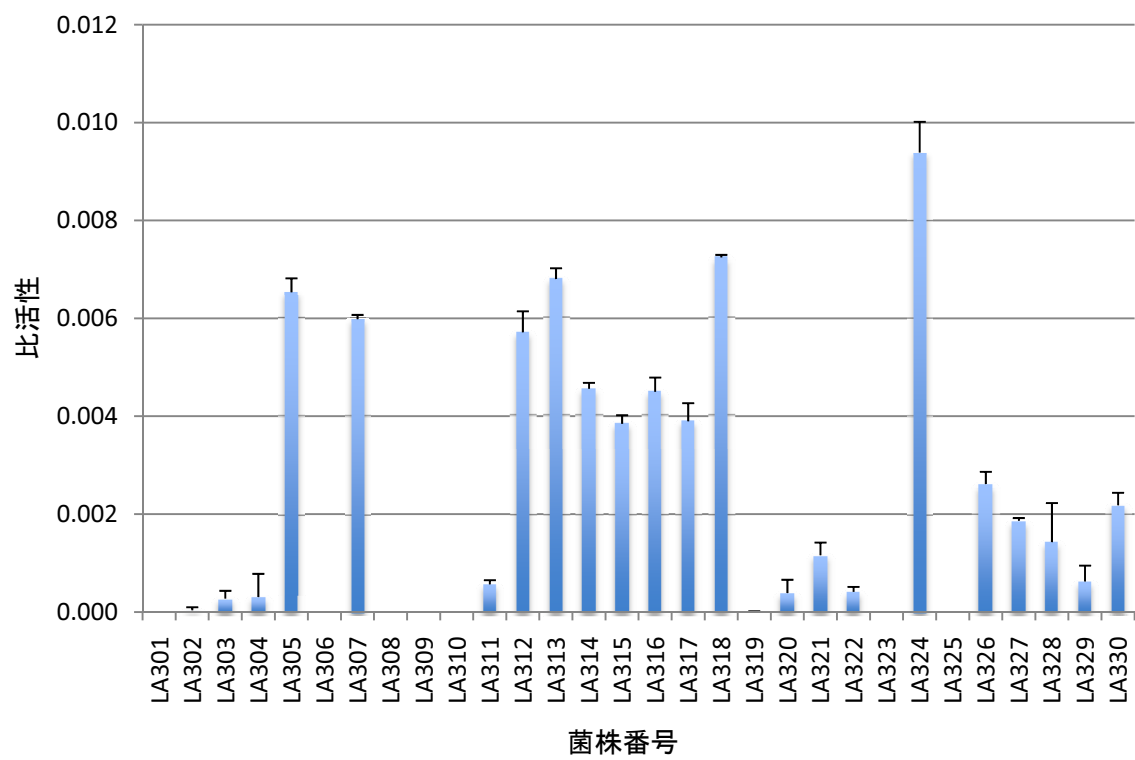


図 1. ヒト腸管由来乳酸桿菌の GAPDH 活性測定の結果 (12 時間培養)

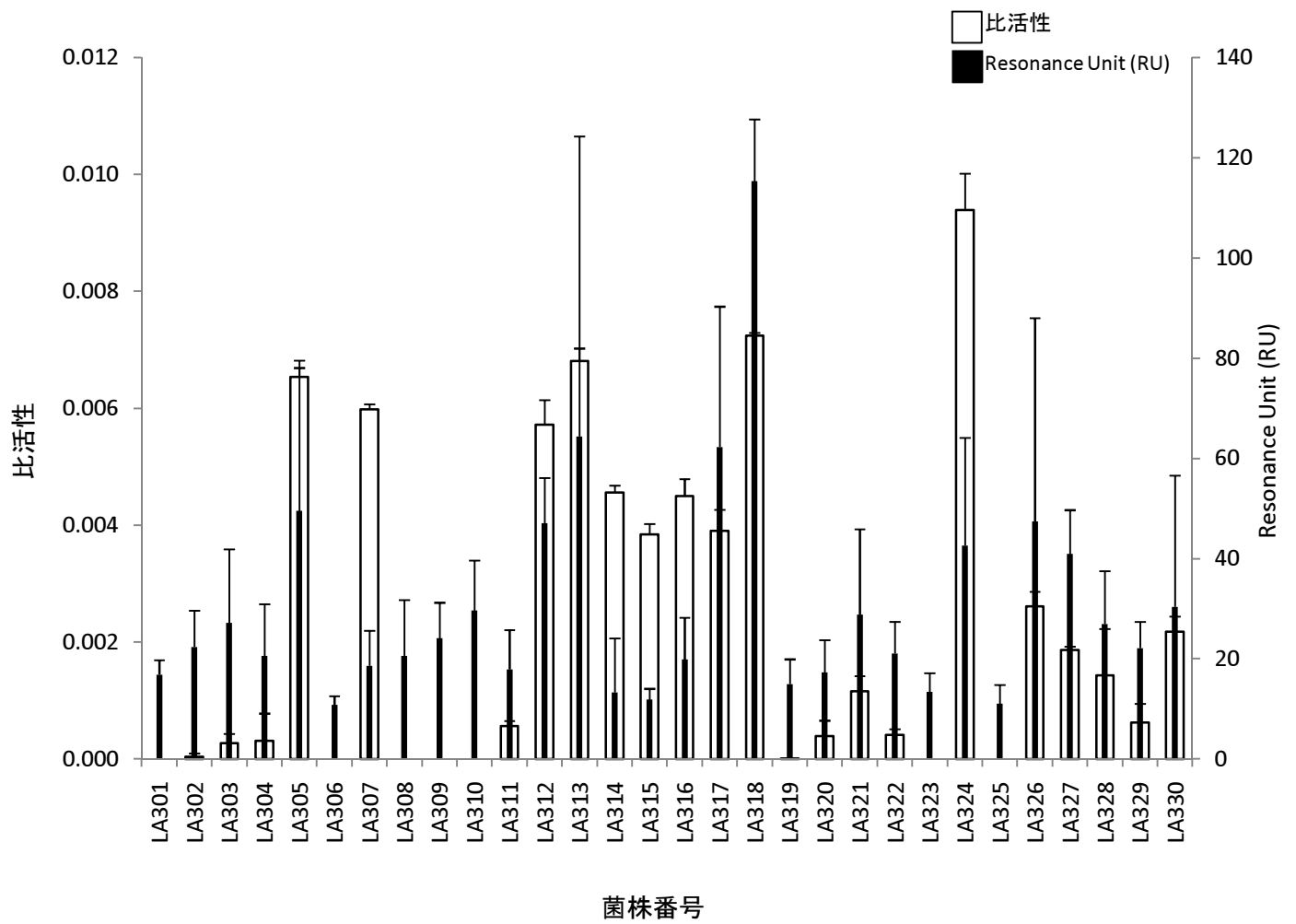


図2. ヒト腸管由来乳酸桿菌の GAPDH 活性と腸管付着性試験結果 (12 時間培養).

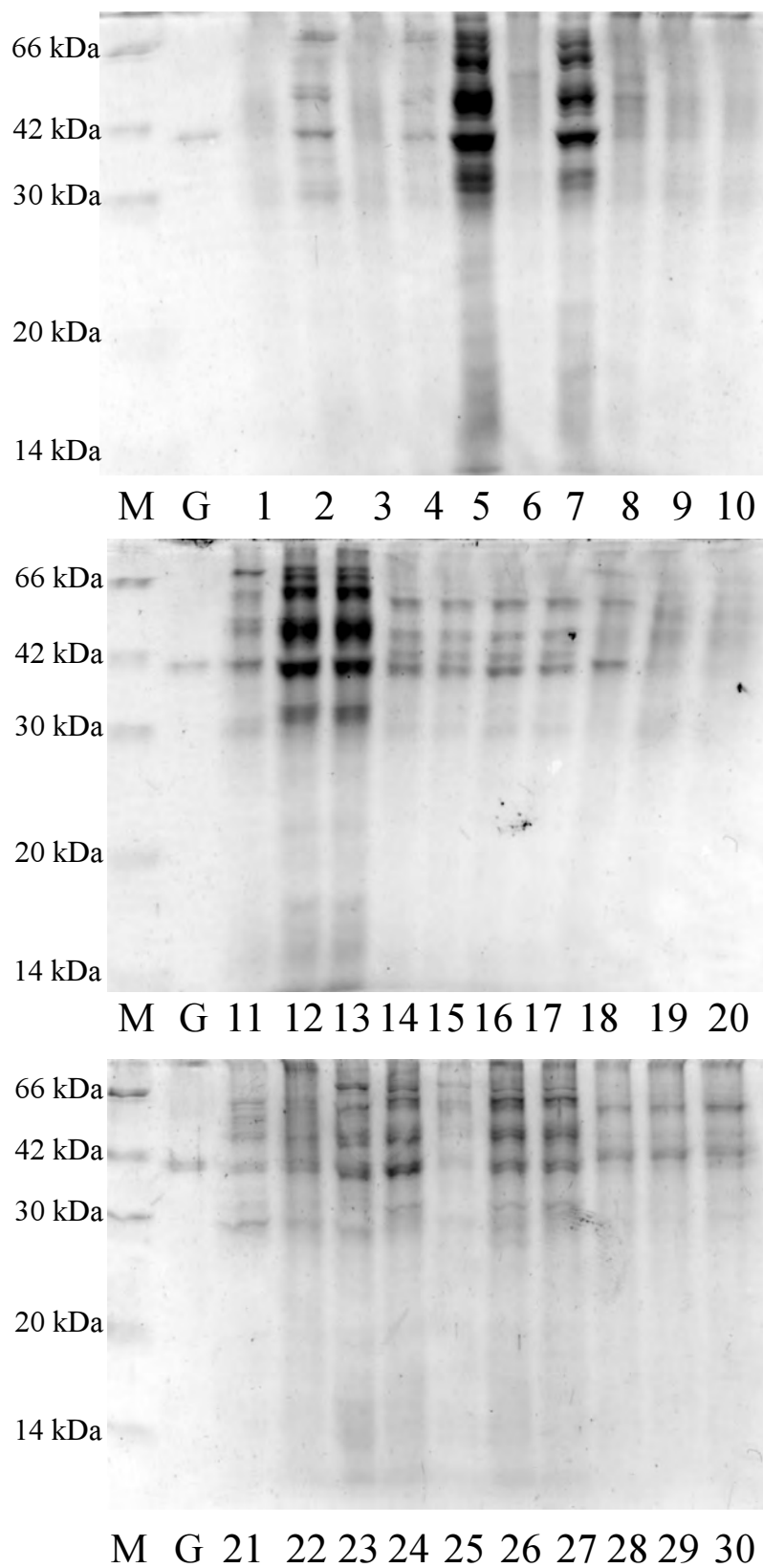


図 3. ヒト腸管由来乳酸桿菌における PBS 抽出物の SDS-PAGE 結果 (12 時間培養).

M: 分子量マーカー, G: LA318 株由来精製 GAPDH, 1-30: LA 301-LA330 株

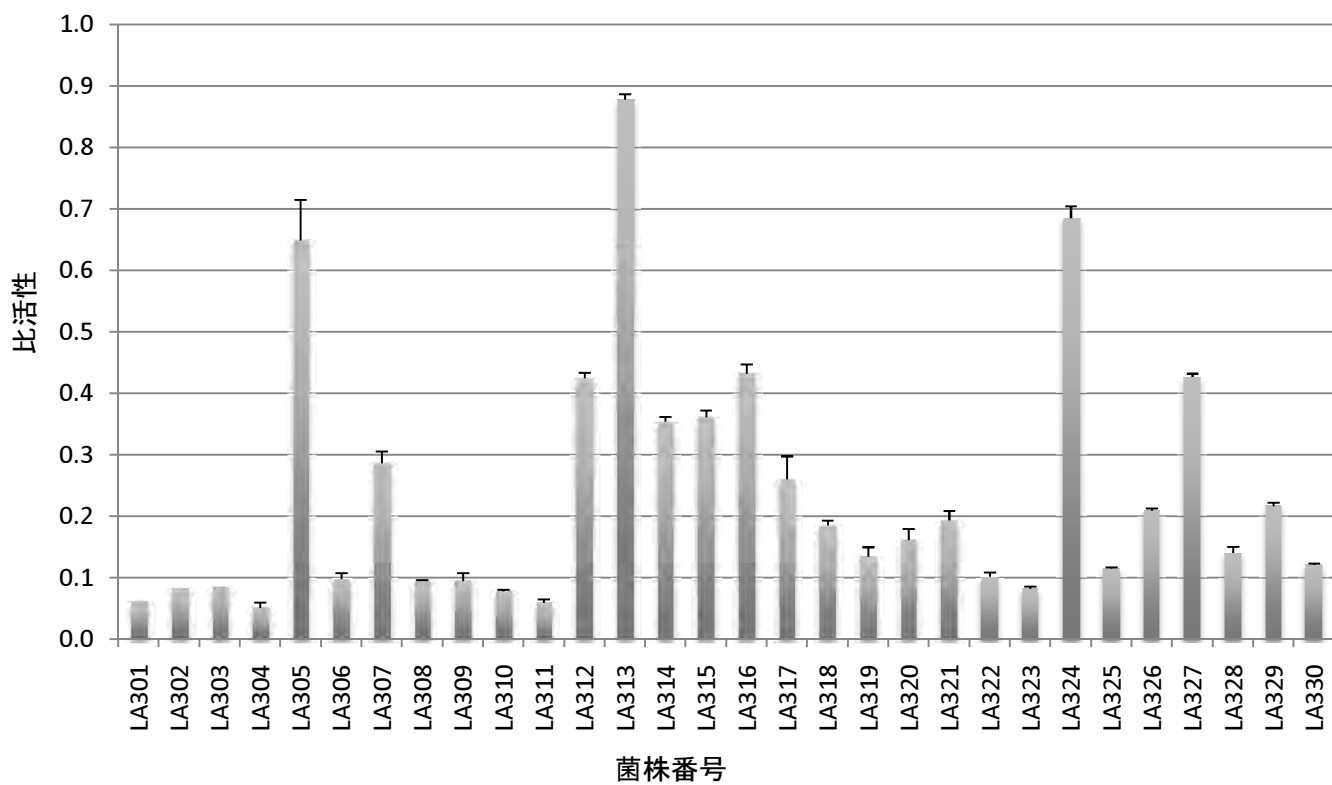


図 4. ヒト腸管由来乳酸桿菌の GAPDH 活性測定の結果 (18 時間培養).

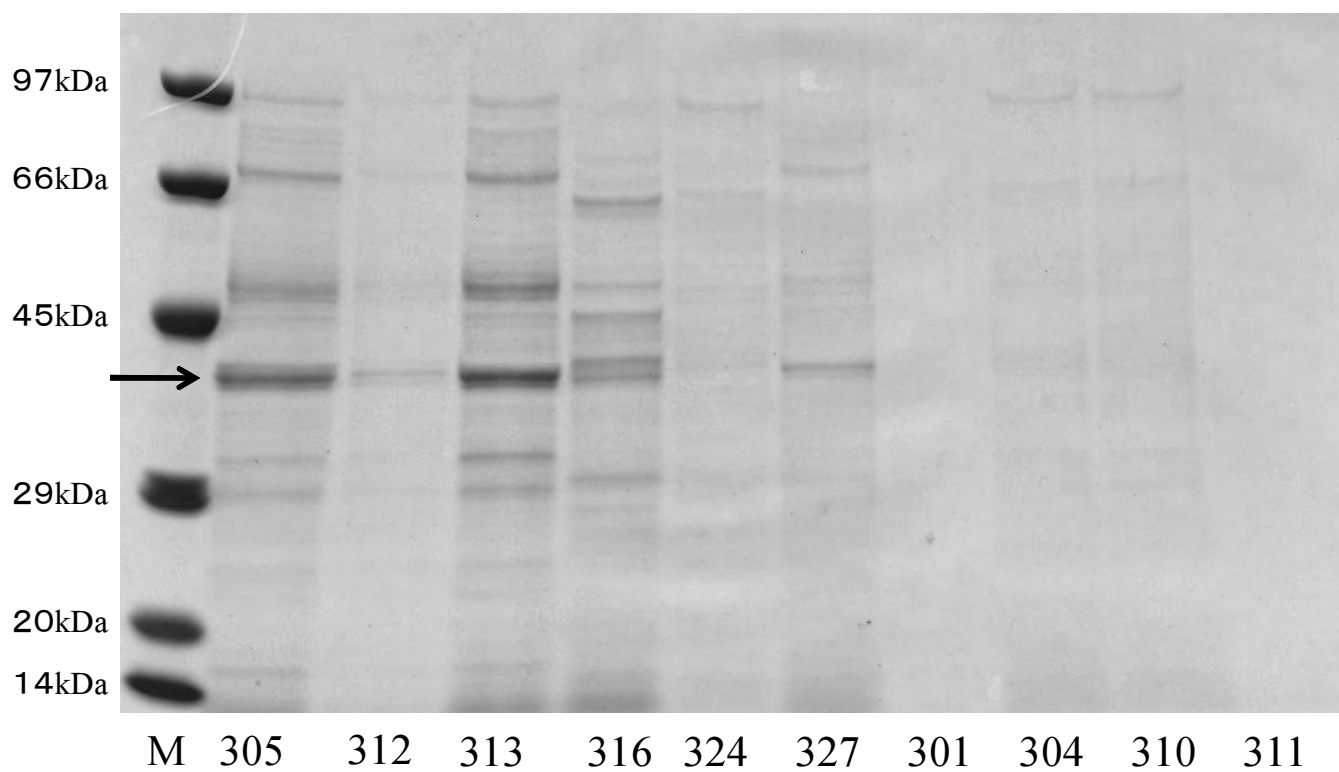


図 5. ヒト腸管由来乳酸桿菌における PBS 抽出物の SDS-PAGE 結果 (18 時間培養).

M: 分子量マーカー, 305: LA 305 株, 312: LA312 株, 313: LA313 株, 316: LA316 株,

327: LA327 株, 301: LA301 株, 304: LA304 株, 310: LA310 株, 311: LA310 株

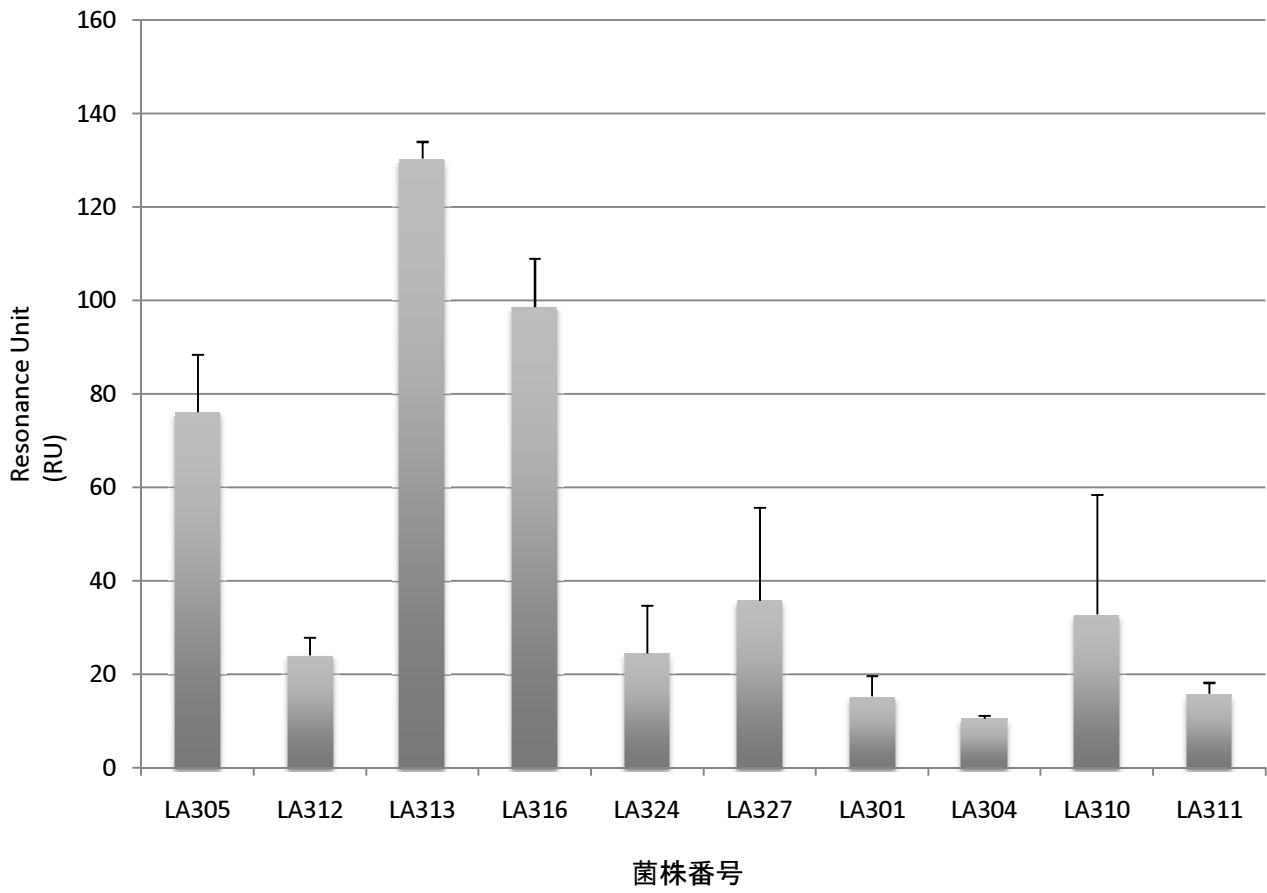


図 6. ヒト腸管由来乳酸桿菌の腸管付着性試験結果 (18 時間培養).

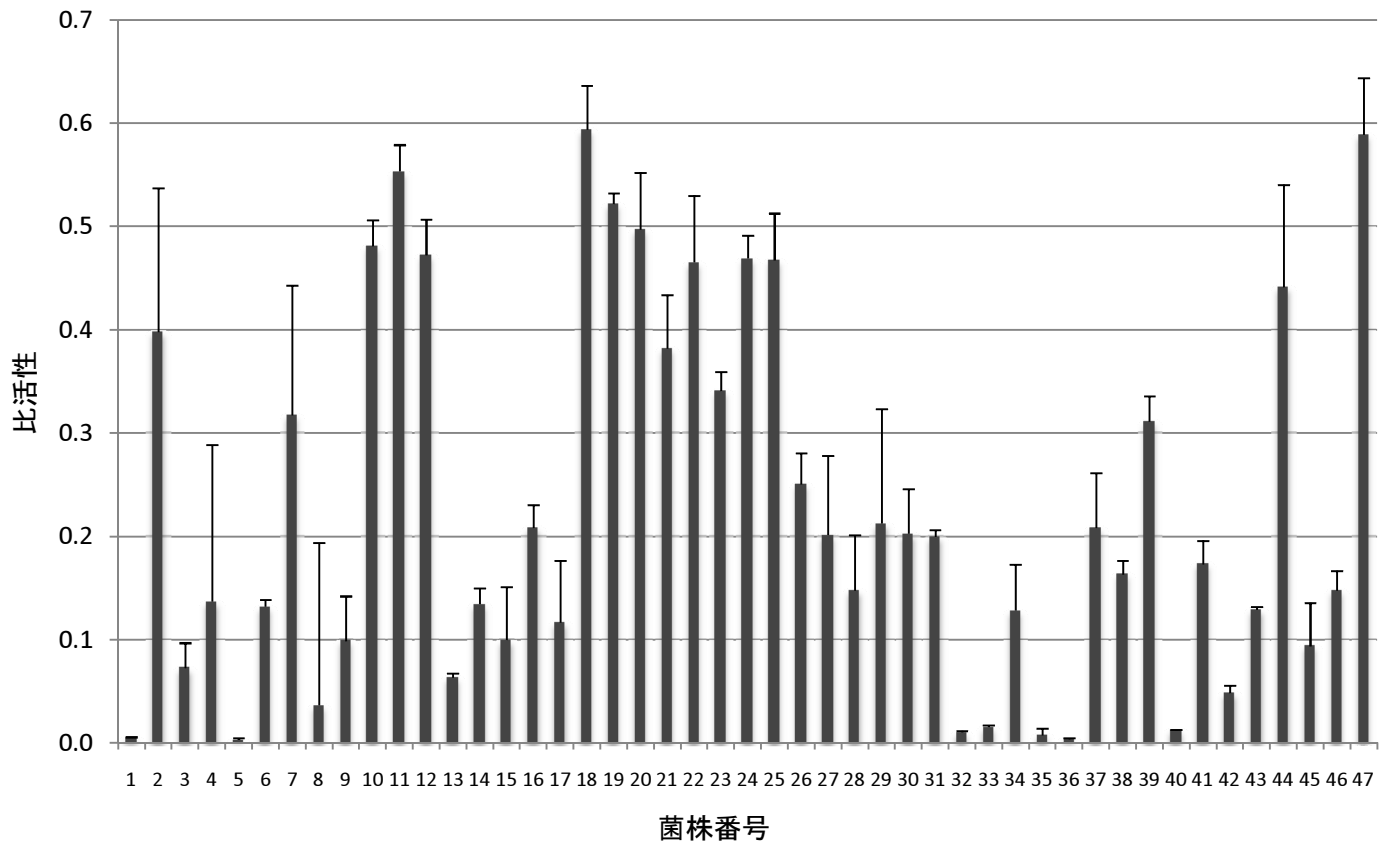


図7. 様々な単離源由来乳酸桿菌の GAPDH 活性測定結果.

表1 本試験で使用したヒト腸管組織由来乳酸桿菌

菌株番号	菌種	相同性(%)	単離源
LA 301	<i>L. salivarius</i> ¹	98.15	回腸
LA 302	<i>L. salivarius</i> ¹	98.60	回腸
LA 303	<i>L. salivarius</i> ¹	98.58	回腸
LA 304	<i>L. fermentum</i>	97.92	回腸
LA 305	<i>L. gasseri</i>	99.33	回腸
LA 306	<i>L. salivarius</i>	98.56	上行結腸
LA 307	<i>L. salivarius</i>	99.07	上行結腸
LA 308	<i>L. salivarius</i>	99.67	上行結腸
LA 309	<i>L. salivarius</i> ²	99.52	上行結腸
LA 310	<i>L. salivarius</i> ²	96.80	上行結腸
LA 311	<i>L. fermentum</i>	98.77	上行結腸
LA 312	<i>L. gasseri</i> ²	99.36	上行結腸
LA 313	<i>L. gasseri</i> ²	99.36	上行結腸
LA 314	<i>L. casei</i> ³	99.31	横行結腸
LA 315	<i>L. casei</i> ³	99.31	横行結腸
LA 316	<i>L. casei</i> ³	99.31	横行結腸
LA 317	<i>L. mucosae</i>	99.08	横行結腸
LA 318	<i>L. plantarum</i>	99.08	横行結腸
LA 319	<i>L. salivarius</i> ⁴	99.29	S状結腸
LA 320	<i>L. salivarius</i> ⁴	99.29	S状結腸
LA 321	<i>L. salivarius</i>	98.66	S状結腸
LA 322	<i>L. salivarius</i>	98.57	S状結腸
LA 323	<i>L. fermentum</i> ⁴	98.70	S状結腸
LA 324	<i>L. fermentum</i> ⁴	98.90	S状結腸
LA 325	<i>L. fermentum</i> ⁵	97.92	S状結腸
LA 326	<i>L. fermentum</i> ⁵	98.52	S状結腸
LA 327	<i>L. gasseri</i>	98.48	S状結腸
LA 328	<i>L. paracasei</i> ⁶	99.73	S状結腸
LA 329	<i>L. paracasei</i> ⁶	99.73	S状結腸
LA 330	<i>L. paracasei</i>	99.46	S状結腸

¹⁻⁶同じ番号は、同じ単離源であることを示す

表2 様々な単離源からの乳酸桿菌の同定結果

菌株番号	菌種名	相同性(%)	単離源
1	<i>L. gasseri</i>	99.8%	沢庵漬け
2	<i>L. sakei</i>	98.8%	沢庵漬け
3	<i>L. sakei</i>	98.1%	沢庵漬け
4	<i>Lactobacillus</i> sp.*	98.6%	沢庵漬け
5	<i>L. gasseri</i>	94.8%	沢庵漬け
6	<i>L. gasseri</i>	99.8%	キムチ
7	<i>L. curvatus</i>	99.6%	キムチ
8	<i>L. curvatus</i>	99.8%	キムチ
9	<i>L. sakei</i>	99.1%	キムチ
10	<i>L. paracasei</i>	100.0%	野沢菜漬け
11	<i>L. casei</i>	98.3%	野沢菜漬け
12	<i>Lactobacillus</i> sp.*	98.5%	野沢菜漬け
13	<i>L. coryniformis</i>	99.1%	キムチ
14	<i>L. coryniformis</i>	98.3%	キムチ
15	<i>L. sakei</i>	98.3%	キムチ
16	<i>L. coryniformis</i>	99.6%	キムチ
17	<i>L. brevis</i>	99.3%	キムチ
18	<i>L. rhamnosus</i>	99.8%	糠
19	<i>L. rhamnosus</i>	99.8%	糠
20	<i>L. rhamnosus</i>	100.0%	糠
21	<i>Lactobacillus</i> sp.*	100.0%	糠
22	<i>L. rhamnosus</i>	100.0%	糠
23	<i>L. coryniformis</i>	99.6%	漬物
24	<i>L. sakei</i>	100.0%	米
25	<i>L. sakei</i>	99.0%	キムチ
26	<i>L. sakei</i>	99.0%	キムチ
27	<i>L. sakei</i>	99.0%	キムチ
28	<i>L. sakei</i>	100.0%	甘酒
29	<i>L. sakei</i>	99.4%	甘酒
30	<i>L. sakei</i>	99.6%	甘酒
31	<i>L. sakei</i>	100.0%	甘酒
32	<i>L. plantarum</i>	99.6%	長芋の漬物
33	<i>Lactobacillus</i> sp.*	99.8%	長芋の漬物
34	<i>Lactobacillus</i> sp.*	99.6%	長芋の漬物
35	<i>L. fermentum</i>	99.8%	生ゴミ
36	<i>L. fermentum</i>	99.8%	生ゴミ
37	<i>L. rossiae</i>	96.6%	生姜
38	<i>Lactobacillus</i> sp.*	98.9%	生姜
39	<i>L. plantarum</i>	99.8%	漬物
40	<i>L. sakei</i>	98.8%	糠漬け
41	<i>L. plantarum</i>	99.6%	糠漬け
42	<i>L. brevis</i>	99.6%	糠漬け
43	<i>Lactobacillus</i> sp.*	99.8%	高菜漬け
44	<i>L. alimentarius</i>	99.3%	高菜漬け
45	<i>L. plantarum</i>	99.6%	高菜漬け
46	<i>L. plantarum</i>	100.0%	高菜漬け
47	<i>L. alimentarius</i>	99.8%	高菜漬け

*複数の候補があり、種まで同定できなかった菌株

表3 菌種別検出数

菌種	検出数
<i>L. sakei</i>	13
<i>L. plantarum</i>	5
<i>L. coryniformis</i>	4
<i>L. rhamnosus</i>	4
<i>L. gasseri</i>	3
<i>L. curvatus</i>	2
<i>L. brevis</i>	2
<i>L. fermentum</i>	2
<i>L. alimentarius</i>	2
<i>L. paracasei</i>	1
<i>L. casei</i>	1
<i>L. rossiae</i>	1
<i>Lactobacillus</i> sp.*	7
計	47

*複数の候補があり、種まで同定できなかった菌株