

アドヘシン酵素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

宮城大学食産業学部：木下 英樹

要 約

ブタ腸管から乳酸菌を分離・同定した。全部で 20 菌株の乳酸菌を分離・同定することができた。属別で見ると *Lactobacillus* 属が 11 菌株、*Weissella* 属が 7 菌株、*Streptococcus* 属が 2 菌株であった。また、乳酸菌以外の属としては、*Caulobacter* sp.、*Deinococcus* sp. / *Staphylococcus* sp.、*Klebsiella* sp. および *Escherichia* sp. / *Shigella* sp. が分離された。レセプターオーバーレイ分析 (RO 分析) の結果、*Lactobacillus gallinarum* PL2-5 の PBS 抽出タンパク質 (約 45kDa) がムチンに対して付着性を示すバンドとして検出された。この付着は濃度依存的であり、さらに pH8.2 よりも pH5.0 で濃いバンドとして検出された。本タンパク質の N-末端アミノ酸配列解析の結果、ADAIG の 5 残基を決定したが、同定することはできなかった。また、ムチンへの付着性試験の結果、本菌株は 18%の付着率を示し、腸管への付着性を証明できた。最も高い付着率を示したのは、PB2-8 であり付着率は 69%だった。20%以上の付着率を示した菌は、PB2-8 以外では PB2-4、PB3-1、PB2-9、PB3-9 および PL2-3 であり、それぞれ 61%、42%、32%、28%および 20%だった。

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、アドヘシン、酵素

緒 言

現在、一般消費者の健康への関心の高まりの中、プロバイオティクスが注目されている。乳酸桿菌を中心としたプロバイオティック乳酸菌は生きたまま腸管に達し、整腸作用、病原菌の感染予防作用、免疫賦活化作用など様々な有用な効果を発揮する。その中で最も基本的で重要な特性の一つとして腸管に留まる能力、すなわち、「腸管付着性」が挙げられる。我々は、これまでの研究において、ヒト腸管組織の粘液層から乳酸菌を直接単離・同定し、ヒト大腸ムチンへの付着性試験より、最も高い付着性を示した *Lactobacillus plantarum* LA 318 株を選抜した。本選抜菌の腸管付着因子 (アドヘシン) を探索したところ、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) が菌体表層に発現していることが分かった。興味深いことに GAPDH は、ヒト大腸ムチンおよびムチン糖鎖の非還元末端に発現している血液型抗原 (A 型および B 型) に高い結合性を示した。また、昨年度の貴協会の受託研究では、本 GAPDH が酵素活性を持つ点に着目し、乳酸菌における菌体表層 GAPDH の発現解析および腸管付着性解析を行い、酵素活性を利用した新規な高腸管付着性乳酸菌のスクリーニング法を提案した。すなわち、一部例外はあるものの菌体表層 GAPDH 活性が高い菌は、腸管付着性も高い傾向にあることが明らかになり、本手法により、GAPDH 酵素活性測定のみで腸管付着性の高い乳酸菌を簡便かつ安価に評価できる可能性が示唆された。しかしながら、GAPDH 以外の付着因子を持つ乳酸菌については、本手法は適応できないため、更

なる改良の余地が残された。そこで本研究では、GAPDH 以外の菌体表層酵素群にも着目し、数種の酵素を組み合わせた高腸管付着性乳酸菌の選抜法の確立のため腸管付着因子の探索を試みた。

材料と方法

1. ブタからの乳酸菌の分離

ブタ腸管のムチン層をスライドグラスで掻き取り、滅菌PBSに懸濁した。懸濁液を乳酸桿菌選択培地であるMRS寒天培地、変法LBS寒天培地および非選択培地であるBL寒天培地に塗抹し、嫌気条件下で37℃、48hr培養した。MRS寒天培地はMRS培地 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) に1.5% (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 (mLBS) は、LBS agar (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) に0.8% (w/v) Lab-lemco powder (meat extract powder; total nitrogen 12.4% (w/w), amino nitrogen 2.5% (w/w), Sodium chloride 5.7% (w/w), pH 7.2)、0.1 M 酢酸ナトリウム、3.7% (v/v) 酢酸を添加し調製した。BL寒天培地は、BL寒天培地に5%馬脱繊維血液を加えて調製した。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、30%グリセロールに懸濁し、-80℃で保存した。

2. 菌種同定

2-1. 16S rDNA 配列解析

保存した菌をMRS寒天培地で培養し、コロニー形成後、27f (5' -GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と1525r (5' -AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-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、27f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。

2-2. 糖資化性試験 (API-50CHL)

16S rDNA シーケンス解析によって同定されなかった菌株について、API 50CHL を用いて菌種の同定を行った。API 50CHL のマニュアルに従って以下の操作手順で菌種同定を行った。試料菌株をMRS培地中にて2回継代培養 (37℃、24 hr) した後、MRS培地に本培養 (37℃、18 hr) を行った。培養液を遠心分離 (8,000 rpm、4℃、10 min) し、上清を捨て、得られた沈殿物を滅菌蒸留水で3回洗浄し、2mLのサスペンションメディアに懸濁した。さらに、本菌液を5mLのサスペンションメディア3本に異なる滴数ずつ滴下し、OD₅₅₀の吸光度を測定した。ここから、マクファーランド2 (6×10^8 cells / mL : OD₅₅₀=0.50) となる菌液滴数 (=n) を算出し、2n滴の菌液をAPI 50 CHL培地アンプルに添加して攪拌後、接種菌液とした。次に、API 50 CH添付の培養容器に約10 mLの滅菌蒸留水を入れて培養プレートセットした後、気泡が入らないように注意しながらプレート上の全カップに接種菌液を充填し、ミネラルオイルを重層した。最後に培養容器に専用蓋をして、37℃、48 hr培養した。

細菌が生育を開始すると、培地中の糖が資化されて培地が酸性化されることで、従来のプロモクレゾールパープルから緑色を経て黄色（No. 25 のカップのみ黒色）に変化する。この変化過程を 0（陰性）～5（陽性）の 5 段階で評価し、培養開始後、24 hr および 48 hr の時点で全項目の成績を専用プロファイルシートに書き込んだ。本プロファイルに対して、アピラボソフト（日本バイオメリュー(株)）によるデータの評価を行い、菌種同定を行った。

2-3. 形態観察

16S rDNA シーケンス解析、糖資化性試験によって同定されなかった菌株について顕微鏡観察し、菌種同定を行った。

3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、Leammili の方法¹⁾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-melcaptoethanol, 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を用いた。

4. 菌体表層タンパク質の調製

保存菌株からつまようじで釣菌し、5mL MRS 培地で 24 hr 継代培養を行い、80mL MRS 培地で 18 hr 本培養を行った。菌液を遠心分離 (8,000 rpm、10 min、4°C) し、その上清を捨て冷水で 3 回洗浄した。上清を捨て PBS を添加し、氷中で 30 分間放置した。抽出物を遠心分離し、透析、凍結乾燥を行った。

5. ムチンの抽出および精製

5-1. ムチンの脱脂

ブタ消化管よりムチン層をガラスプレートで掻き取り、クロロホルム：メタノール (2:1 v/v) 混合溶液を加え、攪拌した。次いで遠心分離 (8,000 rpm、4°C、20 min) を行い、上清を除去した。本脱脂操作は 3 回行った。次いで沈殿画分についてジエチルエーテル中で攪拌後、遠心分離 (8,000 rpm、4°C、20 min) により上清を除去した。本脱脂操作も 3 回行った。

5-2. ムチンの精製

調製したムチン 100mg を 4M GHCl 溶液中で静かに振とうしながら、ムチン層を抽出(37°C、2 hr)した。その後、遠心分離 (8,000 rpm、4°C、10 min) により得た上清を 4M GHCl 溶液で平衡化した Toyopearl HW-65f カラム (2.5×100 cm、Fine grade, Toso, Tokyo) に供し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。溶出は同 GHCl 溶液で行い、5mL ずつに分画した。それぞれの画分については、タンパク質画分を 280 nm の吸光度で、中性糖をフェノール硫酸法（後述）で測定した。ゲル濾過での回収画分は蒸留水に対して 4°C で 2 日間透析し、凍結乾燥を行った。

5-3. フェノール-硫酸法

分画した試料 200 μ L を 2 本おきに試験管に取り、5% (v/v) フェノール溶液 200 μ L を加えて十分に攪拌後、さらに濃硫酸 1mL を激しく加えて密栓後、攪拌した。次いで、沸騰水浴中で正確に 10 分間加熱した。試料溶液を流水中で 30 分間冷却後、試料溶液の吸光度 (490nm) を分光光度計により測定した。コントロールとして 4M GHCl 溶液を用い、試料の数値からコントロール値を引いた値を試料中の中性糖含量とした。

6. Biotin-X-NHS 試薬を用いたレセプターオーバーレイ分析 (RO 分析) による付着因子の検出

レセプターオーバーレイ分析 (RO 分析) は Ilver らの方法²⁾に変更を加えて行った。SLP を 1 mg/mL ~ 10 mg/mL で SDS 化試薬 (ME-) に溶解し、SDS-PAGE、エレクトロブロッティング後、PVDF 膜に転写した。5% スキムミルクを添加した TBS-T buffer を用いて 30 min ブロッキングした後、TBS-T により洗浄し、Biotin-X-NHS 試薬により標識したムチンを TBS-T buffer (pH8.2) で希釈し (終濃度 1.0 g/mL)、メンブレンに添加して一晩室温で反応させた。TBS-T による洗浄後、ExtrAvidin Alkaline Phosphatase Conjugate を加えて反応させ、ECF による発色後、化学蛍光検出した。タンパク質への非特異的な付着を検出するためにムチンの代わりに BSA を用いた。また、ネガティブコントロールとしてムチンの代わりに buffer を用いた。

また、PL2-5株についてTBS-T bufferの代わりに酢酸buffer (pH5.0) でも同様に試験を行った。

7. N-末端アミノ酸配列解析

7-1. エレクトロブロッティング (電気転写)

PVDF 膜 (HybondTM) を、100%メタノール中で 10 秒間、MilliQ 水中で 10 分間、transfer buffer 中で泳動終了まで洗浄した。SEMI-PHORTM の陰電極装置上に、transfer buffer に漬した濾紙を 2 枚のせ、洗浄済みの PVDF 膜を濾紙上にのせた後、transfer buffer を重層した。ついで、SDS-PAGE 電気泳動を行った直後のゲルを PVDF 膜上にのせ、さらに濾紙 2 枚をのせて transfer buffer を重層した。各操作の際は、膜および濾紙間の気泡の除去を十分に行った。SEMI-PHORTM の陽電極装置をセットし、定電流 (100 mA) で 90 分間エレクトロブロッティングを行った。転写終了後、ゲルと PVDF 膜を回収し余分な部分を切除した後、MilliQ 水で洗浄後、Rapid CBB KANTO 中にて 10 分間振盪、染色した。脱色は、50%メタノール中で 10 分間振盪の操作を 2 回行い、ついで MilliQ 水中にて数回洗浄を行い、キッチンペーパーにはさみ、一晩乾燥した。

7-2. N-末端アミノ酸配列解析

試料がブロットされた PVDF 膜を切り出し、自動エドマン分解によりペプチドの N-末端からアミノ酸を逐次切断し、PTH (Phenylthio-hydantoin) 誘導体として自動検出する ABI 473 A 型気相プロテインシーケンサーに供し、オンラインデータコレクトシステム Model 610A を用いて分析した。得られた結果は、NCBI (The National Center for Biotechnology Information) の BLAST にて解析した。

8. 腸管付着性試験

8-1. CFDA による菌の標識化

5mL MRS 培地で18時間培養した菌を遠心分離(3,000rpm, 10min)により回収し、蒸留水で3回遠心洗浄(8,000rpm, 5min, 4°C)を行った。菌体を1mLのPBSに懸濁し、PBSで希釈した1mM CFDA(Carboxyfluorescein Diacetate)を100 μ L添加した。ピペティング後、遮光状態で37°C、30分間インキュベートし、菌体内にCFDAを取り込ませた。その後、蒸留水で3回遠心洗浄(8,000rpm, 5min, 4°C)し、CFDA標識化を行った。

8-2. マイクロプレートを用いた腸管付着性試験

マイクロプレート試験に用いるムチンの固定化量を検討するために、ムチンを0.3mg/mLとなるようにPBSに懸濁し、タンパク質のアミノ基との共有結合が可能な無水マレイン酸プレートに100 μ Lずつ添加した。PBSに溶かした3%スキムミルク250 μ Lを添加し、1時間、室温でブロッキングを行った後、0.05%Tween 20を含むPBSで3回リンスした。CFDA 標識LA318株 10^8 cells/mL (OD₆₀₀にて調製)を各ウェルに100 μ Lずつ添加し、37°Cで1時間反応させた。反応後、250 μ LのPBSで3回洗浄した。洗浄後、HCMへ結合した菌を1%SDS/0.1M NaOH 100 μ Lを加え、60°Cゆっくり振盪しながら1時間反応させることで溶菌し、蛍光強度(Ex: 485nm, Em: 538nm)を測定した。コントロールとしてはHCMの代わりにPBSを用いた。HCM固定化プレートの値からコントロールの値を引いた値をHCM付着量とし(3連)、付着量/添加した菌の蛍光強度 \times 100で付着率を算出した。

結 果

1. ブタ腸管からの菌の分離・同定

16S rDNA 配列解析、糖資化性試験および形態観察により同定された乳酸菌について結果を表1にまとめた。全部で20菌株の乳酸菌を分離・同定することができた。属別で見ると *Lactobacillus* 属が11菌株、*Weissella* 属が7菌株、*Streptococcus* 属が2菌株であった。また、乳酸菌以外の属としては、*Caulobacter* sp.、*Deinococcus* sp./*Staphylococcus* sp.、*Klebsiella* sp. および *Escherichia* sp. /*Shigella* sp. が分離された。これらの分離菌は分離培地によって検出率が大きく異なった(表2)。MRS 寒天培地で分離された64%が *Weissella* 属であり、その他に *Caulobacter* sp. および *Deinococcus* sp./*Staphylococcus* sp. が分離された。mLBS 寒天培地では75%が *Lactobacillus* 属残りの25%が *Streptococcus* 属であり分離した全ての菌が乳酸菌だった。また、BL 寒天培地では *Lactobacillus* 属と *Deinococcus* sp./*Staphylococcus* sp. が36%と同率であり、その他、*Escherichia* sp. /*Shigella* sp. と *Klebsiella* sp. が分離された。

2. PBS 抽出物の SDS-PAGE

PBS で抽出したタンパク質の SDS-PAGE の結果を図1に示した。タンパク質のバンドは複数見られるもの、ほとんど見られないもの、PB2-5のようにほぼ単一なものと同様であった。また、40kDa~65kDa 付近に共通のバンドが多く見られた。バンドパターンが濃く明確に見られた PL2-2、PL2-3、PL2-5、PB2-4、PB2-9、PB2-11、PB3-2 および PB3-10 を選抜した。尚、PB3-2 および PB3-10 と似たような泳動パターンを示した PB3-6 は選抜から除外した。

3. ムチンの精製

ムチンの精製結果を図 2 に示した。タンパク質 (280nm) のピークとフェノール硫酸法での中性糖 (490nm) のピークが重なる画分が得られ、Fraction No. 47-61 をムチン画分として回収した。

4. 付着因子の探索

SDS-PAGE においてははっきりとタンパク質が検出された菌株 (PL2-2、PL2-3、PL2-5、PB2-4、PB2-9、PB2-11、PB3-2、PB3-10) について RO 分析を行った結果を図 3 に示した。PL2-2 と PL2-3 は明確なバンドは得られなかった。PL2-5 は SDS-PAGE において約 45kDa に単一バンドを示したが、本試験においても明確なバンドが得られた。本タンパク質は、BSA でもわずかにバンドが検出されたもののネガティブコントロールでは全く検出されなかった。また、PB2-4 では BSA やネガティブコントロールでは見られない薄いバンドが数本検出された。また、PB2-9、PB2-11、PB3-2 および PB3-10 は、BSA やネガティブコントロールと共通のバンド、BSA と共通の濃さのバンドおよび BSA よりもムチンの方が濃く出たバンドが検出された。

BSA や buffer と比較してムチンで特にバンドが強く出た PL2-5 株について、タンパク質濃度を振って RO 分析試験に供した結果を図 4 に示した。その結果、ムチンでは、2mg/mL 以上でバンドが検出されたが、BSA では 5mg/mL 以上ではバンドが見られたものの 2mg/mL 以下では検出されなかった。また、ネガティブコントロールでは全くバンドは見られなかった。さらに PL2-5 について酢酸バッファー (pH5) で同様に試験を行ったところ、ムチンは BSA やネガティブコントロールと比べ明確に濃いバンドが検出された (図 5)。ムチンでは、1mg/mL でもうっすらとバンドが確認でき、10mg/mL で最も強くバンドが現れた。BSA では 5mg/mL および 10mg/mL の濃度では薄いバンドを確認できた。2mg/mL ではわずかにバンドが見られた。ネガティブコントロールではバンドは確認されなかった。

5. N-末端アミノ酸配列解析

PL2-5 株の約 45kDa タンパク質について、N-末端アミノ酸配列解析を行った。その結果、ADAIG の 5 残基を決定した。相同性解析を行ったところ多くの候補が挙げられたが、分子量などから考えて該当するタンパク質が見当たらず同定することができなかった。また、候補の中に *Lactobacillus* 属由来のタンパク質はなかった。

6. 腸管付着性試験

図 6 には、付着性試験の結果を示した。最も高い付着率を示したのは、PB2-8 であり付着率は 69%だった。20%以上の付着率を示した菌は、PB2-8 以外では PB2-4、PB3-1、PB2-9、PB3-9 および PL2-3 であり、それぞれ 61%、42%、32%、28%および 20%だった。PL2-5 株は 18%と中程度の付着率だった。また、PB3-5 や PB3-10 のような付着率が 0%のものもあった。

考 察

乳酸菌の様々な健康保健効果を十分に発揮するためには腸管付着性が重要である。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) やエノラーゼなどの細胞内酵素が発現しており、様々な物質に結合性を示す付着因子として働いていることが明らかになってきた^{3,4,5)}。そこで本実験では、ブタ腸管からの乳酸菌の分離・同定と腸管付着因子の探索を目的とした。

ブタ腸管から乳酸菌を分離・同定した結果、20 菌株の乳酸菌を分離できたが、分離培地によってその検出率は大きく異なった。MRS 寒天培地では 64%が乳酸菌であり、全て *Weissella* 属であった。mLBS 寒天培地では 75%が *Lactobacillus* 属、残りの 25%が *Streptococcus* 属であり、分離した全ての菌が乳酸菌だった。また、BL 寒天培地では *Lactobacillus* 属 36%と低かった。これは培地の選択性が大きく関わっていると考えられる。MRS 寒天培地と mLBS 寒天培地は乳酸桿菌の選択培地であるが、MRS 寒天培地の選択性は低い。筆者らの以前の研究で mLBS に酢酸を加えない場合、選択性が落ちたことから (非公開データ)、この選択性は培地の pH によるもの大きいと考えられた。本実験では MRS 寒天培地で乳酸桿菌 (*Lactobacillus* 属) は分離されなかったが、それはサンプルにたまたま存在していなかったか、他の菌が優勢で釣菌できなかった可能性が考えられた。また、筆者らが以前に行ったヒト腸管ムチンからの乳酸桿菌の単離試験においても、MRS 寒天培地では、乳酸桿菌の検出率は僅か 12%であり、*Enterococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Escherichia/Shigella* 属および *Staphylococcus* 属の菌が多く検出されたが、mLBS 寒天培地では単離した菌全てが乳酸桿菌だった⁶⁾。本実験においても mLBS 寒天培地での乳酸桿菌の検出率は高く、以前の実験を支持する結果となった。しかしながら、我々の研究において mLBS 寒天培地でも生育できない乳酸菌も多くいることが分かっており (非公開データ)、様々な乳酸菌を分離するには複数の培地を使うのが望ましいと考えられる。また、BL 寒天培地は腸内細菌分離用の非選択培地であるため様々な菌種が生育するが、乳酸菌以外では *Deinococcus* sp. / *Staphylococcus* sp.、*Escherichia* sp. / *Shigella* sp. および *Klebsiella* sp. が生育した。乳酸菌の検出率が 36%と比較的高かったのでは、サンプルに存在する菌種にある程度偏りがあったのではないかと考えられた。

分離した 20 菌株の乳酸菌について RO 解析を行い、付着因子の網羅解析を行ったところ、ムチンに特異的に付着するタンパク質バンドが数本検出された。これにより PBS 抽出タンパク質の中に確かに腸管付着因子が存在していることが明らかになった。中でも *Lactobacillus gallinarum* PL2-5 の PBS 抽出タンパク質 (約 45kDa) がムチンに対して付着性を示した。この付着は pH8.2 よりも pH5.0 で濃いバンドとして検出されたことから酸性側で強い付着力があると考えられた。このことから付着にイオン結合が関連している可能性が示唆された。このような pH 依存的な付着性は、熱ショックタンパク質である GroEL¹⁷⁾ や GAPDH、エノラーゼ⁷⁾ などでも報告されている。また、ムチンだけではなく BSA でもバンドが現れたが、これはイオン結合による非特異的なものである可能性が考えられた。乳酸菌は自身が産生する乳酸によって周囲環境が酸性になるため、酸性側で付着力が高まるタンパク質を付着因子として持つことは理に適っていると思われた。次いで、45kDa タンパク質の N-末端アミノ酸配列解析の結果、ADAIG の 5 残基を決定したが、同定することはできなかった。*Lactobacillus* 属で相同性が高いものが候補として出てこなかったこと、また候補に挙げられたタンパク質と分子量が異なることや配列が一致した位置が異なること (N-末端側ではないこと) から本タンパク質は新奇なものであるか、配列解析がうまく行かなか

ったかのどちらかだと考えられる。これについては再試の必要があると考えられた。ムチンへの付着性試験の結果、PL2-5 株は 18%の付着率を示し、腸管への付着性を確認できたことから 45kDa タンパク質が腸管付着因子として働いている可能性が高いと考えられるが、PBS で抽出できないタンパク質も関わっている可能性があるため本タンパク質がメインの付着因子かどうかは判断できなかった。本タンパク質を精製後、二分子間相互作用検出装置である BIACORE 付着性試験を行うか、PBS での抽出後に菌体の付着性がどのように変化するかを試験するなど、改めて証明が必要だろう。

本試験では、ムチンに特異的に結合する付着因子や BSA にも非特異的に結合する付着因子がいくつか見られたが、タンパク質の同定には至らなかった。これらの酵素は、PBS により抽出されたことより、GAPDH やエノラーゼと同様に乳酸菌の代謝により排出される乳酸により低 pH となる外部環境で正荷電を持ち、リポテイコ酸などの負荷電の物質とイオン結合することにより菌体表層に留まっていると考えられる⁵⁾。PBS での抽出は、塩酸グアニジンのようなタンパク質変性剤を使わずに抽出できるため、細胞表層にイオン結合で留まっているタンパク質のみを抽出できる利点がある。さらに数多く存在する菌体表層タンパク質を絞り、効率的に付着因子を検出することができる点で優れていると思われる。

菌体表層の酵素タンパク質は、GAPDH で良く研究されている。筆者らは、以前の研究により、*Lb. plantarum* LA 318 の菌体表層に GAPDH が存在し、ヒト大腸ムチンや血液型抗原 (A 型および B 型) へ結合することを初めて見いだした^{3, 4)}。本結合には、特徴的な血液型抗原の三糖構造が重要であることが示され、GAPDH は、GalNAc (N-アセチルガラクトサミン) および Gal (ガラクトース) 認識性レクチン様タンパク質であると考えられた。また、*Lb. crispatus* ST1 は、表層に GAPDH およびエノラーゼを持ち、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し、アルカリ pH よりも酸性 pH で高い結合性が見られることが報告されている⁷⁾。さらにこれらの酵素は、プラスミノゲンに結合し、組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) によるプラスミノゲン活性化を促進させる作用があることが分かっている⁵⁾。Saad らは、*Lactobacillus plantarum* 299v 株において、GAPDH は培養時間に伴い菌体外へ放出され、表層に蓄積されていくことを報告した⁸⁾。また、細胞内と細胞外の GAPDH は同一のものであることを、タンデム質量分析 (LC-MS/MS) によって決定した。さらに、細胞膜の透過性が増すことにより GAPDH の表層への移行が起こることを示した。つまり、培養時間が経過すると膜構造が弱くなり、GAPDH が菌体外に放出されると結論づけた。また、グルコース添加で菌体外への GAPDH の放出が抑制されたことから、グルコースの添加により菌の活動が活発になり、膜構造が修復されたためではないかと推察された。

最近、GAPDH 以外でも菌体表層で様々な酵素群の発現が報告されている。Katakura らは、酵母のマノプロテインと結合性を示すタンパク質として熱ショックタンパク質 (DnaK、GroEL および GrpE)、ピルビン酸キナーゼ、フォスフォグリセレートキナーゼ、リンゴ酸酸化還元酵素、GAPDH、6-フォスフォフルクトキナーゼ、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ、フォスホグリセレートムターゼ、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ、グルタミル-tRNA シンテターゼ、30S リボソームタンパク質 S1、エロンゲーションファクターTs (EF-Ts) およびシステインシンテターゼを見出している⁹⁾。また、Castaldo らはフィブロネクチン結合タンパク質として、*Lb. plantarum* LM3 の

表層タンパク質からエノラーゼ、D-アラニン移送タンパク質 (DltD)、GTP シクロヒドラーゼ II、ビルビン酸脱水素酵素複合体などの細胞内タンパク質を同定している¹⁰⁾。また、上記の報告例以外でも、GAPDH¹¹⁾、エノラーゼ¹¹⁾、ヒートショックプロテイン GroEL¹¹⁾、エロンゲーシオンファクター Tu (EF-Tu)¹¹⁾、フォスフォグリセレートキナーゼ¹²⁾などの細胞内タンパク質が細胞表層に存在していることが報告されており、徐々にその全容が明らかになってきている。これらのタンパク質は腸管付着因子など一部機能が分かっているものもあるがまだまだ不明な点が多く、更なる解析と研究の発展が望まれる。本試験においては付着因子の同定まではいかなかったが、今後同定を進めていくことで酵素活性を指標として腸管付着性の高い乳酸菌のスクリーニングが可能になるのではと考えている。

結 論

本試験ではブタ腸管から 20 菌株の乳酸菌を分離・同定した。RO 分析によりムチンに特異的に付着するタンパク質バンドが数本検出された。これにより PBS 抽出タンパク質の中に確かに腸管付着因子が存在していることが明らかになった。中でも PL2-5 株は強い結合を示し、酸性側でその結合は強くなった。タンパク質の同定までは至らなかったが、本試験のように PBS により抽出される腸管付着因子の網羅解析を進めることで、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ができると確信している。

文 献

1. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
2. Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., and Borén, T., *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 279, 373-377 (1998).
3. 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).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
 8. Saad, N., Urdaci, M., Vignoles, C., Chaignepain, S., Tallon, R., Schmitter, J. M., and Bressollier, P., *Lactobacillus plantarum* 299v surface-bound GAPDH: a new insight into enzyme cell walls location. *J Microbiol Biotechnol*, 19, 1635-1643 (2009).
 9. Katakura, Y., Sano, R., Hashimoto, T., Ninomiya, K., and Shioya, S., Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 319-326 (2010).
 10. Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R. A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., Marasco, R., and Sacco, M., Surface displaced alpha-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb Cell Fact*, 8, 14 (2009).
 11. Sánchez, B., Bressollier, P., and Urdaci, M. C., Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54, 1-17 (2008).
 12. Sánchez, B., Schmitter, J. M., and Urdaci, M. C., Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG grown in de Mann-Rogosa-Sharpe broth. *Lett Appl Microbiol*, 48, 618-622 (2009).

表1. ブタ腸管由来乳酸菌の同定結果

菌株名	分離培地	菌種名	相同性
PL1-1	LBS	<i>Lactobacillus ruminis</i>	99%
PL1-2	LBS	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	99%
PL2-1	LBS	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	99%
PL2-2	LBS	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99%
PL2-3	LBS	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%
PL2-4	LBS	<i>Lactobacillus reuteri</i>	98%
PL2-5	LBS	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	99%
PL2-6	LBS	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	98%
PB2-3	BL	<i>Lactobacillus reuteri</i>	98%
PB2-4	BL	<i>Lactobacillus reuteri</i>	96%
PB2-8	BL	<i>Lactobacillus mucosae</i>	99%
PB2-9	BL	<i>Lactobacillus mucosae</i>	98%
PB2-11	BL	<i>Lactobacillus agilis</i>	99%
PB3-1	MRS	<i>Weissella paramesenteroides</i>	92%
PB3-2	MRS	<i>Weissella viridescens</i>	98%
PB3-5	MRS	<i>Weissella viridescens</i>	99%
PB3-6	MRS	<i>Weissella viridescens</i>	99%
PB3-7	MRS	<i>Weissella viridescens</i>	98%
PB3-9	MRS	<i>Weissella viridescens</i>	99%
PB3-10	MRS	<i>Weissella viridescens</i>	99%

表2. 培地ごとの分離菌の比較

分離培地	属名	分離菌株数	培地ごとの検出率(%)
MRS agar	<i>Weissella</i> sp.	7	64
	<i>Caulobacter</i> sp.	1	9
	<i>Deinococcus</i> sp./ <i>Staphylococcus</i> sp.	3	27
	計	11	100
mLBS agar	<i>Lactobacillus</i> sp.	6	75
	<i>Streptococcus</i> sp.	2	25
	計	8	100
BL agar	<i>Lactobacillus</i> sp.	5	36
	<i>Deinococcus</i> sp./ <i>Staphylococcus</i> sp.	5	36
	<i>Escherichia</i> sp. / <i>Shigella</i> sp.	3	21
	<i>Klebsiella</i> sp.	1	7
	計	14	100

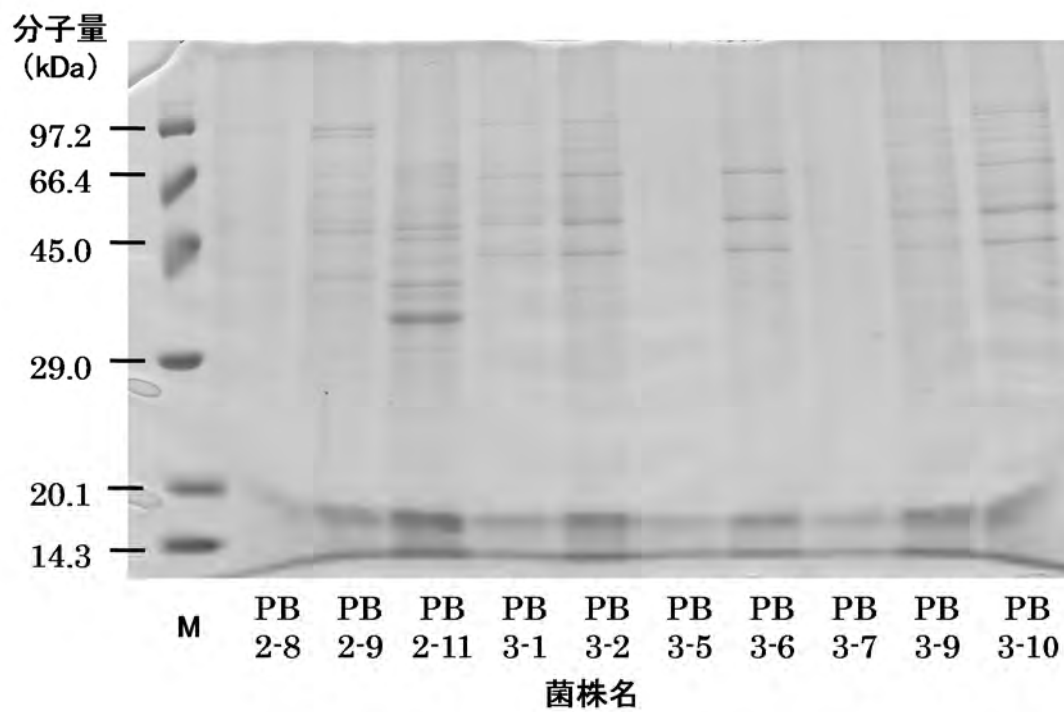
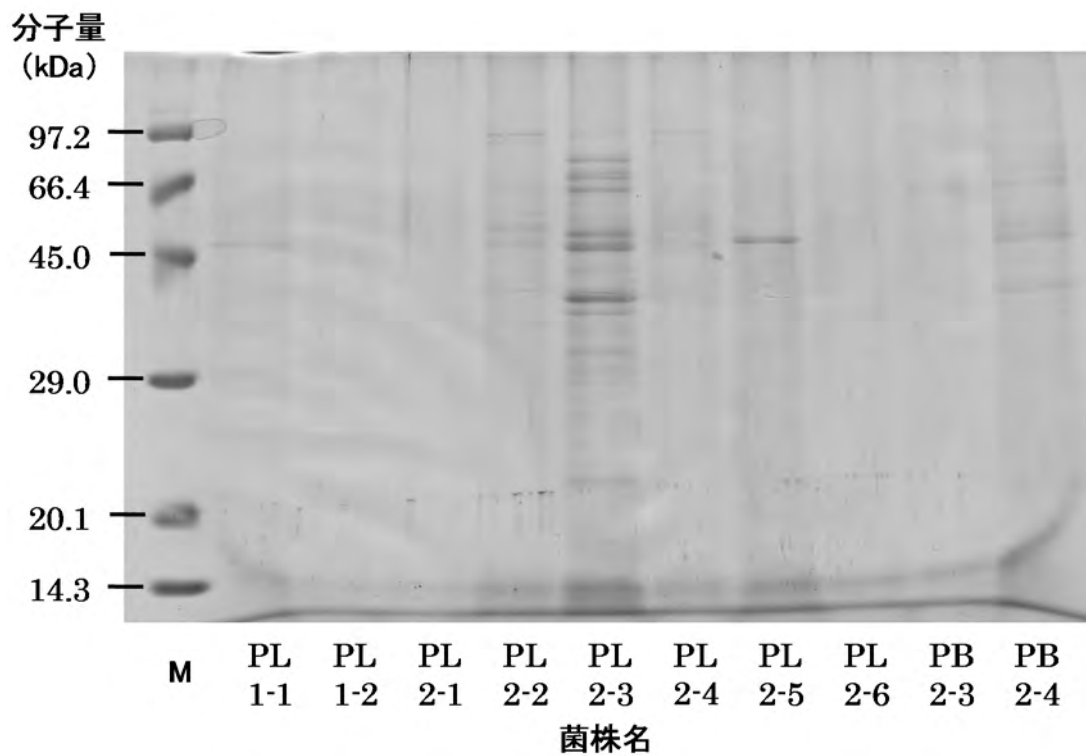


図 1. PBS 抽出物の SDS-PAGE.

M: 分子量マーカー

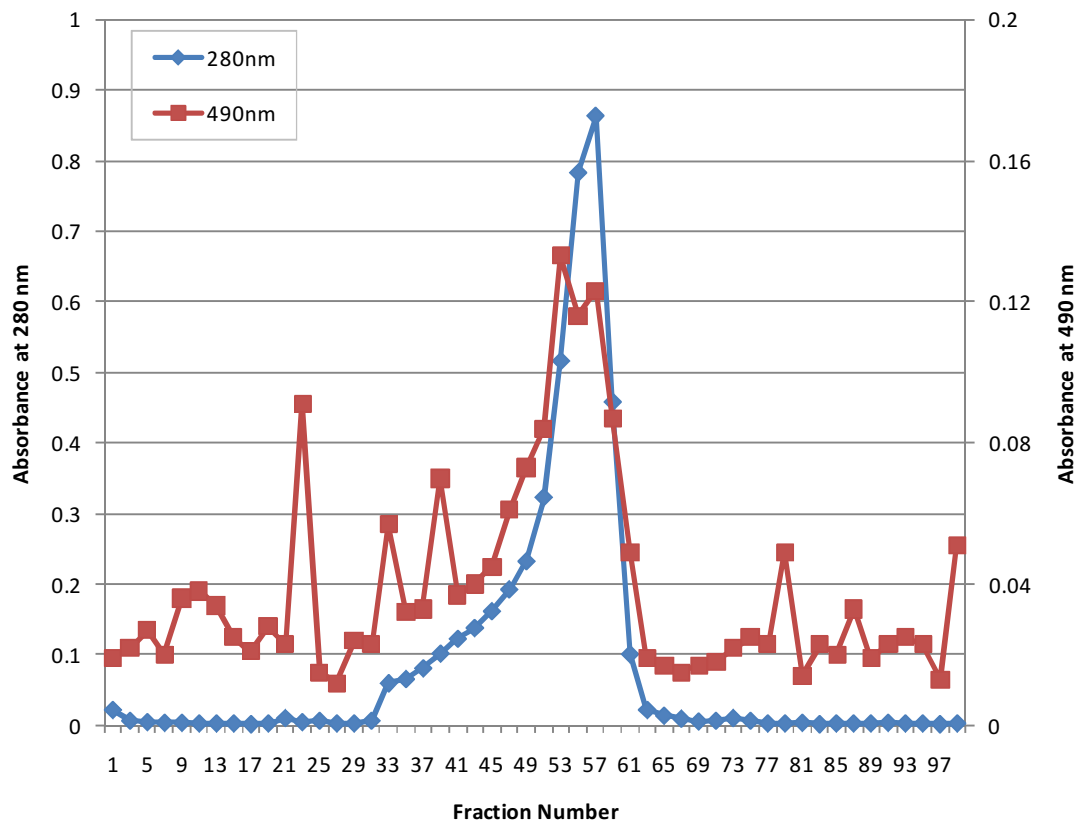


図2. ムチンのゲル濾過クロマトグラフィー。
タンパク質 (280nm)、中性糖 (490nm)

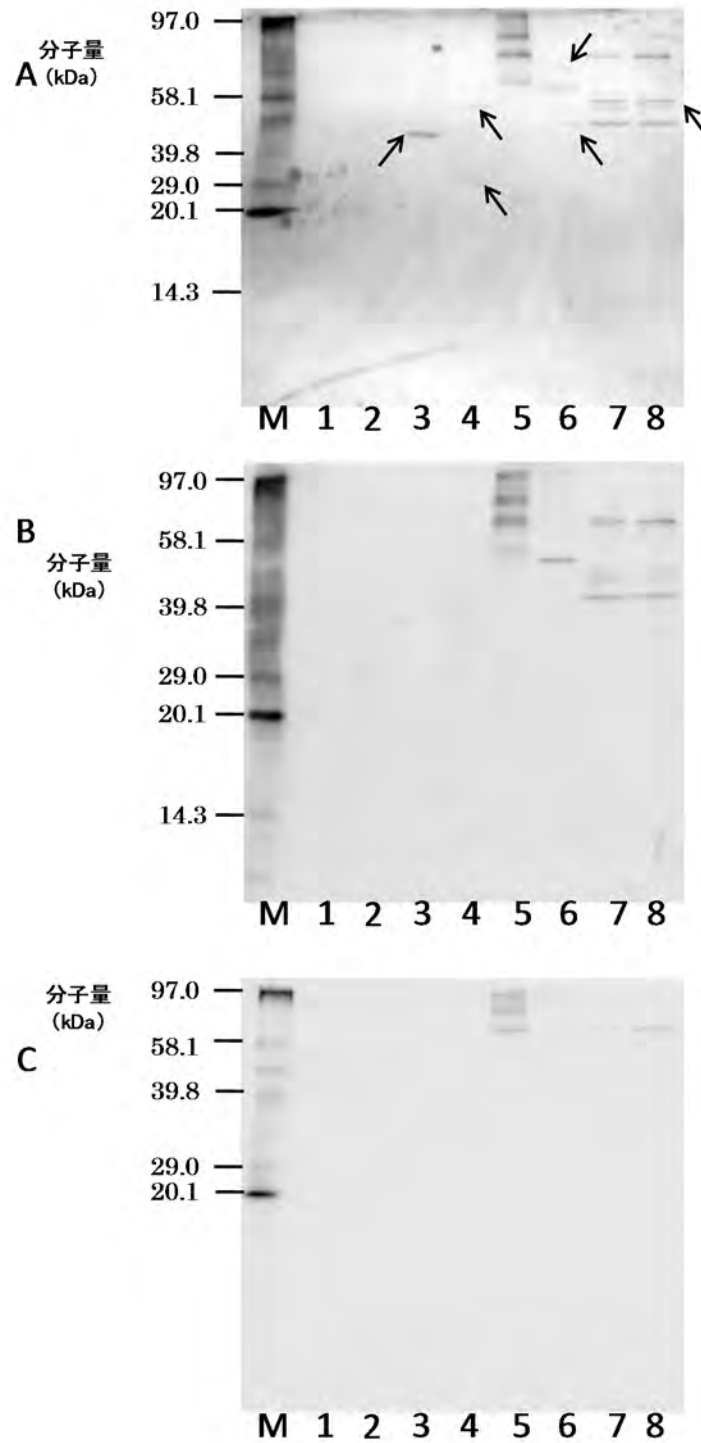


図 3. R0 分析による腸管付着因子の検出.

M: ビオチンマーカ、1: PL2-2, 2: PL2-3, 3: PL2-5, 4: PB2-4, 5: PB2-9, 6: PB2-11, 7: PB3-2, 8: PB3-10

1mg/mL の表層タンパク質について標識ムチン (A), 標識 BSA (B), (C) buffer (ネガティブコントロール) との付着をそれぞれ検出した。反応時の溶媒は TBS-T (pH8.2) を用いた。

矢印はムチンに対して強く結合性を示したタンパク質。

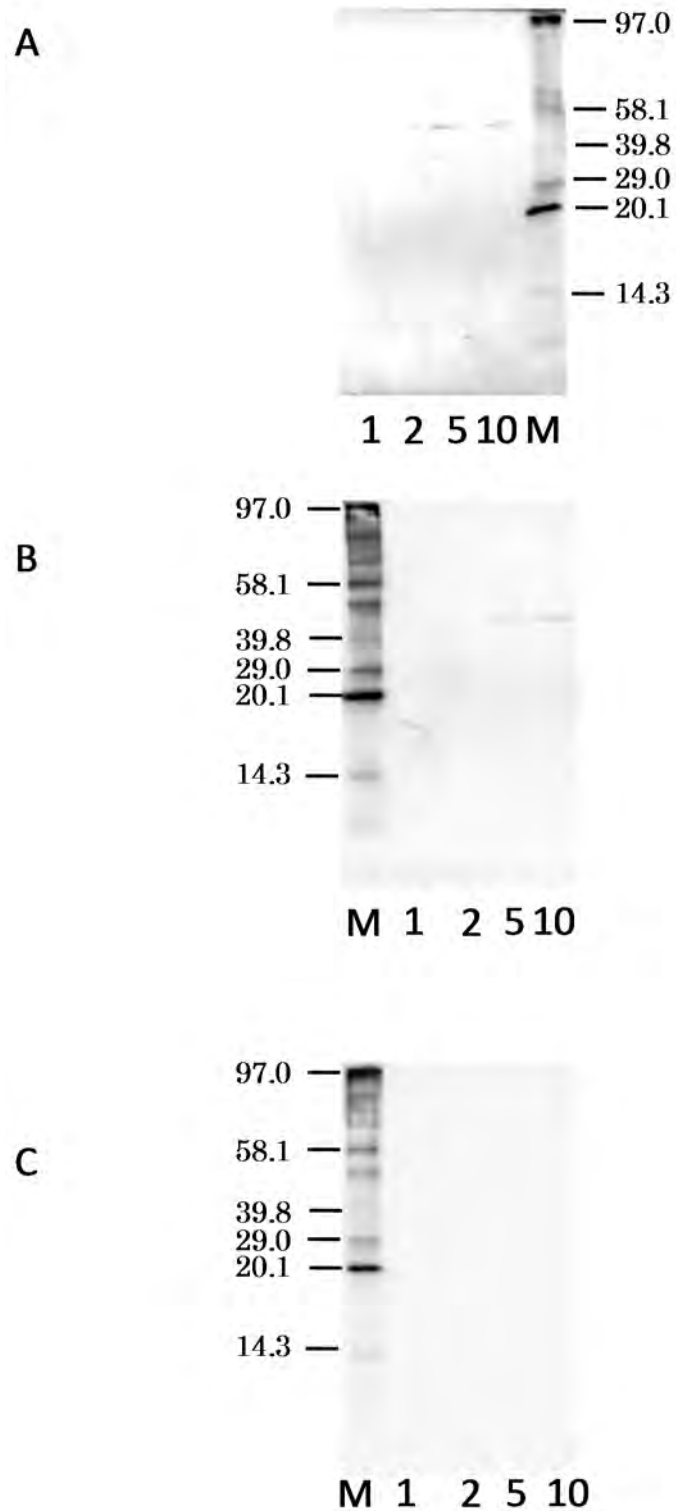


図4. 様々な濃度における PL2-5 株の腸管付着因子の検出.

M: ビオチンマーカール, 1:1mg/mL, 2:2mg/mL, 5:5mg/mL, 10:10mg/mL

各濃度の PL2-5 株の表層タンパク質を (A) 標識ムチン, (B) 標識 BSA, (C) buffer (ネガティブコントロール) との付着を検出した。反応時の溶媒は TBS-T (pH8.2) を用いた。

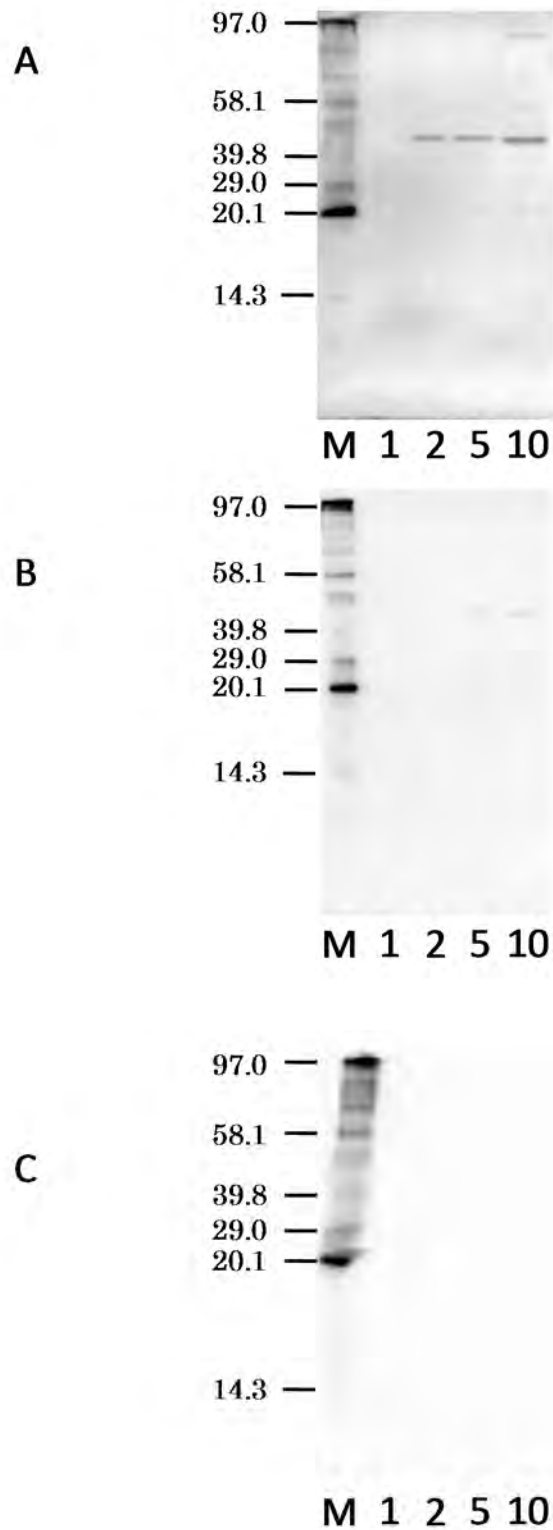


図 5. 酸性条件下での PL2-5 株の腸管付着因子の検出.

M: ビオチンマーカール, 1: 1mg/ml, 2: 2mg/ml, 5: 5mg/ml, 10: 10mg/ml
 各濃度の PL2-5 株の表層タンパク質を (A) 標識ムチン, (B) 標識 BSA, (C) buffer
 で検出した。反応時の溶媒は酢酸 buffer (pH5.0) を用いた。

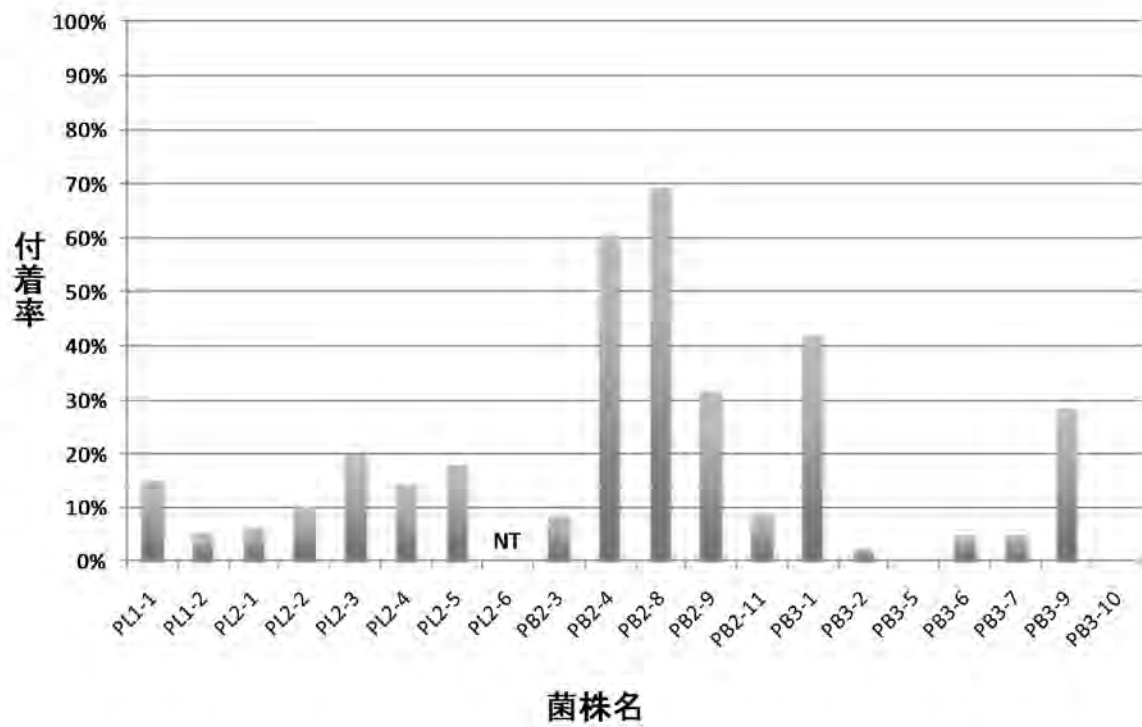


図 6. 分離乳酸菌の腸管付着性試験.

NT: Not Tested