

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580334

研究課題名（和文） 乳酸菌の新規感染阻害因子の解析

研究課題名（英文） Characterization of inhibitory factors of lactic acid bacteria against gastrointestinal pathogens

研究代表者

向井 孝夫（MUKAI TAKAO）

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：20229917

研究成果の概要（和文）：

本研究では、消化管感染症起因菌に対する *Lactobacillus reuteri* および *Lactobacillus gasseri* の競合排除能力を明らかにすることを最大の目的とした。この目的のため、第一に、*L. reuteri* JCM1081 の *H. pylori* の受容体であるスルファチドの硫酸化糖鎖への付着因子を解析したところ、Ef-Tu が本菌株のスルファチドへの新規付着因子であることが強く推察された。第二に、フィブロネクチン付着性を示す *L. gasseri* TM333 の *C. jejuni* に対する鶏ヒナにおける定着阻害能力を検討した。本菌株を連続7日間経口投与したところ、盲腸内の *C. jejuni* 菌数は98%減少し、本菌株が鶏ヒナからの *C. jejuni* の排除に有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The goal of our study was to elucidate the capacity of the *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus gasseri* to competitively exclude gastrointestinal pathogens. On the basis of the previous results, this study was firstly conducted to determine the adhesion factor of *L. reuteri* JCM1081 to the sulfated sugar chains of sulfatide, which was recognized as a receptor moiety of *Helicobacter pylori*. The potential adhesion factor, Ef-Tu was expressed as a recombinant protein followed by kinetics studies. Ef-Tu of the strain was shown to be a high affinity for sulfatide and to be retained tightly on the cell surface at pH 4.0 but not to pH 6.0. The findings strongly suggested that Ef-Tu is a novel adhesion factor the sulfated sugar chains of sulfatide to in *Lactobacillus* strains.

Secondly, the capacity of fibronectin-adherent *L. gasseri* TM333 selected previously to competitively exclude *Campylobacter jejuni* 81-176 in chicks was examined. Chicks were given daily oral doses of *L. gasseri* TM333 for 7 days after oral infection with *C. jejuni* 81-176. The chicks treated with *L. gasseri* TM333 showed 98% inhibition of cecum colonization by *C. jejuni* 81-176. The findings indicate the fibronectin-adherent *L. gasseri* TM333 effectively inhibited *Campylobacter* colonization of the chick cecum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：乳酸菌、プロバイオティクス、付着

### 1. 研究開始当初の背景

プロバイオティクスとは「腸内フローラのバランスを改善することで宿主動物に有利に働く生菌添加物」と定義される。最近ではプロバイオティクスのメカニズムが必ずしも腸内フローラ間における作用に限定されるものではなく、宿主に対する免疫調節作用なども含むことから「十分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」と再定義された。代表的なプロバイオティクスとして *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Enterococcus* などが挙げられ、これらを利用した食品、乳酸菌製剤、飼料などが世界中で開発されている。プロバイオティクスに期待される機能の一つとして、感染予防効果が挙げられる。

申請者は、プロバイオティクス乳酸菌による消化管感染症に対する予防効果を明らかにすることを最大の目的として研究を遂行してきた。特に感染症起因菌の感染の第一ステップである標的細胞（受容体）での付着の競合による感染予防方法に着目し、*Lactobacillus* 乳酸菌の *Helicobacter pylori* および *Campylobacter jejuni* に対する腸上皮への付着の競合阻害に適する菌株の探索を行ってきた。その結果、*Helicobacter pylori* に対しては、硫酸化糖鎖に対して付着性を示す *Lactobacillus reuteri* を見出し、また翻訳伸張因子 Ef-Tu が付着因子であることが示唆されてきたが、Ef-Tu はシグナル配列を持たない細胞内タンパク質として知られ、細胞外に存在すべき付着因子として機能しているか否か不明であった。一方、*Campylobacter jejuni* に対しては、フィブロネクチンに付着性を示す *Lactobacillus gasseri* を見出してきた。また、*L. gasseri* の *C. jejuni* に対する感染阻害に関する予備実験を鶏雛に対して行ったが、実験方法における問題点が浮上し、再試験を要する状況にあった。

### 2. 研究の目的

研究開始の当初の背景に基づき、本研究では、(1) *Lactobacillus reuteri* の硫酸化糖鎖に対する付着因子が Ef-Tu であることの確証を得ること、(2) Ef-Tu が *H. pylori* の受容体への結合を阻止することを確認すること、(3) *L. gasseri* の *C. jejuni* に対する *In vivo* 感染阻害効果を示すか否かをそれぞれ検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) *Lactobacillus reuteri* の硫酸化糖鎖に対する付着因子の解析

#### ①菌株

*L. reuteri* JCM1081 (理化学研究所微生物系統保存施設より分譲) は MRS 寒天培地にて、37°C、24 時間嫌気培養 (アネロパック：三菱ガス化学) した前培養菌を MRS 液体培地に接種し、37°C、12~14 時間嫌気培養したものを用いた。

プラスミド構築時の宿主として *E. coli* DH5 と pGEM-T プラスミド (Promega) を、組み換えタンパク質の作出に *E. coli* BL21 (Novagen) と pET28-a プラスミド (Novagen) を用いた。

*E. coli* は LB 寒天培地にて 37°C、16 時間好気培養後、LB 液体培地で 37°C、12 時間振とう培養した。

*H. pylori* ATCC43504 は Brucella 寒天培地にて 37°C、48 時間好気培養 (アネロパック好気：三菱ガス化学) した前培養菌を Brucella 液体培地に接種し、37°C、24~48 時間培養したものを用いた。

#### ②組み換えタンパク質の発現

*L. reuteri* JCM1081 ゲノム DNA を鋳型にして PCR 反応を行い、目的タンパク質遺伝子の全長を増幅した。増幅した DNA 断片は GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE healthcare) を用いてアガロースゲルから溶出し、LigaFast™ Rapid DNA Ligation System を用いて pET28-a (Novagen) にクローニングした。構築したプラスミドをタンパク質発現用大腸菌である *E. coli* BL21 (Novagen) へ導入した。1 コロニーの BL21 を LB broth ( $Km^+ 50 \mu g/ml$ ) で 16 時間前培養し、新たな LB broth ( $Km^+ 50 \mu g/ml$ ) に 2% 接種して OD<sub>600</sub> が 0.5~1.0 となるまで 37°C で振とう培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5~1.0 となった菌液に IPTG (sigma) を終濃度 1mM になるように加え、37°C で 4 時間振とう培養してタンパク質の発現を誘導した。

#### ③ 組み換えタンパク質の精製

組み換えタンパク質を His-Tag タンパク質として発現させ、ニッケルカラムで精製した。タンパク質発現を誘導した BL21 培養液を遠心分離 (3,000rpm、4°C、5 分間) して集菌した後、ペレットを得た。湿重量 1g あたり 5ml の BugBuster (Takara) を加えて懸濁し、10mg/ml リゾチーム、100mM ベンズアミド、1M PMSF、Benzonase を加えて低速で振とうしながら室温で 20 分間インキュベートした。インキュベートが終わった懸濁液から細胞残渣を除き、得られた抽出液をニッケルカラムアフィニティークロマトグラフィーを用いて、精製タンパク質を得た。タンパク質濃度は BCA-Protein Assay (Thermo) で測定し、

それぞれ適量分注して使用するまで-80℃で保存した。

#### ④抗体の作成

組換えタンパク質に対する抗体の作出はウサギ (Clea japan) にフロイントアジュバントを用いて免疫することで作製した。精製した組換えタンパク質 500  $\mu$ g を 500  $\mu$ g/500  $\mu$ l になるように PBS で希釈し、エマルジョンを調製した。免疫は抗体が形成されるまで 1 週間に 1 度、4 回程度行った。採血は耳の静脈から行い、採取した血液はエッペンドルフチューブに分注し 37℃で 30 分インキュベートした後、遠心分離 (10,000rpm、4℃、10 分間) を行い、血清を回収した。回収した血清は少量ずつ分注し、使用するまで -80℃で保存した。

#### ⑤組換えタンパク質とスルファチドの結合性の検討

組換えタンパク質とスルファチドの結合性は TLC-overlay Assay および Biacore で行った、

TLC-overlay Assay は Mukai らの方法 (1997) を参考にして行った。TLC-上で作用後、anti-polyhistidine 抗体 (Dako) 抗体/PBS (1:6,000, v/v) を加え、室温で 2 時間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄後、二次抗体として AP 標識 anti-mouse 抗体 (Dako) 抗体/PBS (1:1,000, v/v) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、基質液 (BCIP/NBT Liquid; sigma) を加えて糖脂質に結合したタンパク質を検出した。

Ef-Tu とアナライトの結合性を試験するもう一つの方法として、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーである BiacoreX (GE Healthcare) を用いた。今回はリガンドとして組換えタンパク質をチップに固定化し、アナライトとしてスルファチドを用いた。実験条件は、常法に従った。

アナライトは流速 20  $\mu$ l/min で 40  $\mu$ l インジェクトした。結合の特異性を確認するため、リガンドセルで得たセンサーグラムからレファレンスセルで得たセンサーグラムを差し引いて結果とした。

#### ⑥培養時間および pH の変化が目的タンパク質の局在性に及ぼす影響

培養時間の変化が及ぼす Ef-Tu の局在性への影響を検討するため、菌培養液を経時的に回収し、菌体内・菌体表層・菌体外の目的タンパク質をウエスタンウエスタンブロッティングで検出した。OD<sub>600</sub>1.0 に調整した菌液を 30ml の MRS 液体培地に 2%接種した。接種した地点を 0 時間とし、2 時間ごとに培養液を回収した。回収した培養液は遠心分離

(13,000rpm、4℃、1 分間) し、上清はもう 1 度遠心分離し、上澄みを上清のサンプルとして使用した。残った菌体から菌体表層用サンプル、細胞破碎液用のサンプルとして処理

した。菌体表層用サンプルはペレット 10mg に対して 1ml の 5M 塩酸グアニジンを加えて懸濁し、30 分間インキュベートした。インキュベート後、遠心分離 (13,000rpm、4℃、1 分間) し、菌体が混入しないよう注意して上清を回収した。回収した上清 3 倍量の冷アセトンを加え -80℃で 1 時間または -20℃で一晩放置した後、遠心分離 (13,000rpm、4℃、1 分間) し、上清を取り除いた。真空乾燥機でアセトンを蒸発させ、当初回収した培養液と等量、すなわち 1ml の SDS-PAGE 試料用緩衝液で懸濁したものを菌体表層画分のサンプルとした。また、細胞破碎液用のサンプルは、リゾチーム (Wako) (終濃度 1mg/ml)、5000U/ml ムタノリシン (Sigma) (終濃度 250U/ml) を加えてよく混合し、37℃で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、遠心分離 (13,000rpm、4℃、1 分間) し上清を破棄した。ペレットに回収した培養液と等量、すなわち 1ml の SDS-PAGE 試料用緩衝液を加え、懸濁したものを細胞破碎液のサンプルとした。すべてのサンプルは泳動前に 100℃で 5 分間加熱して用いた。

ウエスタンブロッティングは、自作した抗 Ef-Tu 抗体を用いて、バンドの有無を検索した。

#### (2) *L. gasseri* の *C. jejuni* に対する *In vivo* 感染阻害効果

白色レグホーンの雛を用いた *L. gasseri* TM333 株による *C. jejuni* の感染阻害実験を試みた。孵化後 24 時間以内に *C. jejuni* 81-176 株を  $1 \times 10^6$ CFU 投与し、その後 7 日間にわたり *L. gasseri* を  $1 \times 10^8$ CFU 投与した。*C. jejuni* 感染後 3 日目および 7 日目の盲腸内容物中の *C. jejuni* の菌数をリアルタイム PCR を用いて測定した。内容物からの DNA は、10%SDS およびフェノール存在下、0.1-mm zirconia-silica beads (Bio Spec Products, USA) で激しく攪拌し抽出したのち、フェノール、クロロホルム処理および QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) で精製した。リアルタイム PCR は、Botteldoorn (2008) らが示した *Campylobacter* 特異的検出方法に従って、サイバークリーンを用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Lactobacillus reuteri* の硫酸化糖鎖に対する付着因子の解析

すでに申請者は、*L. reuteri* JCM1081 の産生する Ef-Tu が *H. pylori* の受容体の一つとして明らかにされているスルファチドへの付着因子であることを推定してきた (2007~2008 年度科学研究費)。スルファチドは硫酸化ガラクトースを糖鎖に持つ脂質である。そこで、本研究では、本菌株が産生する Ef-Tu の組換えタンパク質を作製し、スルファチ

ドとのアフィニティー解析を行うこととした。

まず、本菌株 Ef-Tu の配列について調べたところ、*Lactobacillus* 属の乳酸菌では 85% 前後、*E. coli* でも 70% 程度の相同性をもつことが明らかとなった。*E. coli* の Ef-Tu は比較的よく研究されており、ドメイン解析も行われている。*E. coli* の Ef-Tu は大きく 2 つの領域に分けられる。一つはドメイン I と呼ばれる N 末端から 200 アミノ酸残基の領域で G ドメインと呼ばれる。この領域は GTP 加水分解を行う触媒領域である。もう一つはドメイン II とドメイン III で構成されるそれぞれ 100 アミノ酸残基からなる非触媒領域である。ドメイン III は EF-Ts や tRNA との結合に関与していることが報告されている。このように Ef-Tu の翻訳伸長因子としての機能は研究されているが、Ef-Tu が糖鎖を認識するレクチンであることや、レセプター認識ドメインなどは報告がない。そこで遺伝情報処理ソフトウェアである GENETYX を用いて配列が公開されている *Lactobacillus* 属における Ef-Tu の相同性を解析し、*L. reuteri* JCM1081 の Ef-Tu に特異的な配列があるか検討した。*L. reuteri* JCM1081 の Ef-Tu と比較した相同性は *L. johnsonii* (87%)、*L. gasseri* (86%)、*L. delbrueckii* (85%)、*L. acidophilus* (85%)、*L. helveticus* (85%)、*L. brevis* (89%)、*L. sakei* (83%)、*L. casei* (88%)、*L. plantarum* (89%)、*L. salivarius* (87%) であった。ドメイン I の前半は特に相同性が高いが、C-末端の一部で種により多様性に富む部位があることがわかった。また、非触媒領域であるドメイン II、III においても種により配列の相違が集中する部位が見受けられた。このようなアミノ酸配列の違いが Ef-Tu の硫酸化ガラクトースへの結合性とどのように関与するかは不明であるが、他の付着因子においてアミノ酸の一次構造や置換が結合性大きな影響を与える因子であることが示唆されていることや、糖脂質への結合性が株依存的事であることが報告されていることを考慮すれば、種や株によりアミノ酸配列の異なる部位の硫酸化ガラクトース結合性を調べていくことで結合ドメインが明らかとなる可能性があった。

まず、組み換え Ef-Tu を作製した。その結果を図 1 に示す。推定通り 47kDa のタンパク質の発現を確認した。次いで、Ef-Tu とスルファチドの結合性を検討するため、組み換え Ef-Tu タンパ

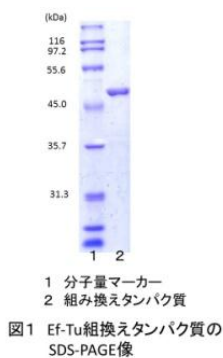


図1 Ef-Tu組み換えタンパク質の SDS-PAGE像

ク質を精製し、TLC に展開した糖脂質との結合性を試験する TLC-overlay assay を行った。結果は示さないが、ネガティブコントロールでも発色し、良好な結果を得ることができなかった。したがってこの結果から Ef-Tu とスルファチドの結合性の有無を断定することは危険であると判断し、分子間の結合をラベルなしでリアルタイムに観察することが可能な表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーである BiacoreX を用いてさらに解析することとした。

本実験では、pH 4 と 6 でのアフィニティーを検討した。その結果を図 2 に示した。 $K_D$  値を調べたところ、pH 6 では  $1.6 \times 10^{-6}$  M であったのに対して、pH 4 では  $6.4 \times 10^{-8}$  M で、酸性条件下で約 25 倍強い結合性を示した。実際生体内では、乳酸産生により、菌体の微小環境は pH 4 程度まで低下している可能性があり、Ef-Tu が付着因子として機能している可能性が強く示唆された。

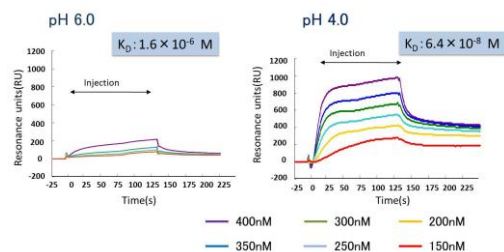


図2 異なるpHにおけるスルファチドと組換え Ef-Tuのアフィニティー解析

結果は示さないが、Ef-Tu の *H. pylori* の細胞 (Int-407) への付着性に及ぼす影響を調べたところ、付着菌数は 87% 減少した。今回は使用した細胞に硫酸化糖鎖が発現していることを確認しなかったが、Ef-Tu が *H. pylori* の細胞への付着性の抑制作用を示すことが示唆された。

*L. reuteri* JCM1081 において Ef-Tu がスルファチドへのアドヘンシであることが示唆されたが、Ef-Tu がアドヘンシとして消化管細胞表層に発現しているレセプターであるスルファチドに結合するには、Ef-Tu が菌体表層に発現していなくてはならない。Ef-Tu には分泌シグナルペプチドが存在しないため、Ef-Tu は菌体外には存在しない細胞質タンパク質であると考えられた。そこで Ef-Tu がアドヘンシとして機能しているのか検討するため、ウエスタンブロッティングにより、Ef-Tu が菌体にどのように存在するのか観察した。

培養時間の変化が及ぼす Ef-Tu 局在性への影響を検討するため、菌培養液を経時的に回収し、菌体内・菌体表層・菌体外の Ef-Tu を検出した (図 3)。その結果、菌体内の Ef-Tu 量は菌濁度の増加に伴い増加した。また菌体

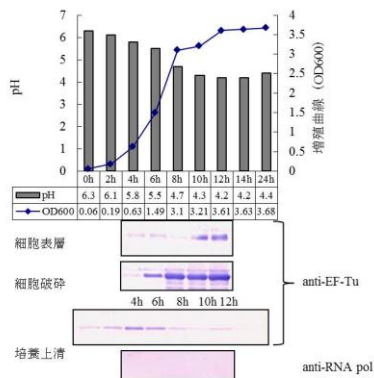


図3 培養時間がEf-Tuの局在性に及ぼす影響

表層にも Ef-Tu が検出され、その量は菌濁度の増加に伴い増加した。さらに興味深いことに、菌体細胞外面分である培養上清にも Ef-Tu が検出され、その量は菌濁度の上昇に伴って増加するが、定常期に入ると検出されなくなることが明らかとなった。菌の細胞表層や培養上清中で検出された Ef-Tu が細胞質由来のものである可能性を排除するため、同一のサンプルを anti-RNA polymerase 抗体を用いたウエスタンブローティングで解析したが、細胞質タンパク質である RNA polymerase は検出されなかった。乳酸菌は増殖の過程で乳酸を産生するため、培養上清中の pH が減少する。この pH の変化が Ef-Tu の菌体外への放出と関係する可能性を考え、次に意図的に pH を変化させて Ef-Tu の局在がどのように変化するか観察した。pH5.0 と pH8.0 の Tris-HCl で洗浄を行い、洗浄液を回収してウエスタンブローティングで解析した。その結果、pH5.0 では洗浄液中に Ef-Tu の存在が確認されなかったが、pH8.0 では Ef-Tu が洗浄液中に放出され、洗浄回数が増すごとにその量が減少していく様子が観察された (図 4)。3 回洗浄後の菌体表層の Ef-Tu は pH8.0 よりも pH5.0 で量が多い傾向が観察された。この結果から、溶液中への Ef-Tu の放出は pH 依存的であり、瞬間的に起こる反応であることが

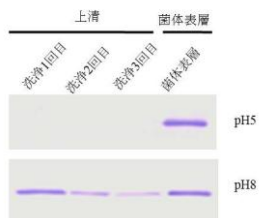


図4 Tris-HCl洗浄がEf-Tuの局在性に及ぼす影響

示唆された。また、菌体表層の Ef-Tu が pH8.0 Tris-HCl 洗浄後に減少することから、Ef-Tu は低 pH では菌体表層に結合し、高 pH になると溶液中に遊離することが推察された。

そこで次に pH5.0 と pH8.0 の Tris-HCl で懸濁後 1 時間インキュベートした培養液を菌体内・菌体表層・菌体外の画分に分け、ウエ

スタンブローティングで解析した。その結果、菌体内画分である細胞破碎液中の Ef-Tu 量は pH5.0 と pH8.0 で大きな違いは観察されないのに対し、菌体外画分である上清中の Ef-Tu は pH5.0 で観察されなかった。一方、細胞表層の Ef-Tu は上清中との局在とは逆に pH8.0 で減少する様子が観察された。したがって、*L. reuteri*JCM1081 の Ef-Tu は低 pH では菌体表層に結合し、高 pH になると溶液中に遊離することが重ねて示唆された。そこで、pH5.0 ~ 8.0 まで段階的に変化させ、どの時点で Ef-Tu が遊離するのか検討することにした。pH5.0 から 8.0 まで段階的に変化させた Tris-HCl に懸濁後、37°C で 1 時間インキュベートしたものを培養上清と菌体表層画分に分け、ウエスタンブローティングで解析したところ、菌体表層の Ef-Tu は pH5.0、6.0、7.0 よりも pH8.0 で減少する傾向が観察された。また、上清中の Ef-Tu は pH5.0 では検出されず、pH6.0 以上になると観察された。さらに pH4.5 から 5.3 まで細かく段階的に変化させ、上清をウエスタンブローティングで解析した。その結果 pH4.9 以上で Ef-Tu の放出が観察された。この値は Ef-Tu の等電点 pH4.9 と非常に近い値であった (結果は示さない)。

これらの結果から、*L. reuteri* JCM1081 の Ef-Tu は菌体内には勿論のこと、シグナルペプチドを持たないにも関わらず、菌体表層や培養上清にも存在することが示唆された。また RNA polymerase が検出されなかったことから、菌体表層画分や菌体外画分で検出された Ef-Tu は細胞質由来 Ef-Tu のコンタミネーションではないことも明らかとなった。

## (2) *L. gasseri* の *C. jejuni* に対する *In vivo* 感染阻害効果

申請者はすでに、*C. jejuni* の受容体の一つとして知られているフィブロネクチンへ付着する乳酸菌として *L. gasseri*333 株の取得に成

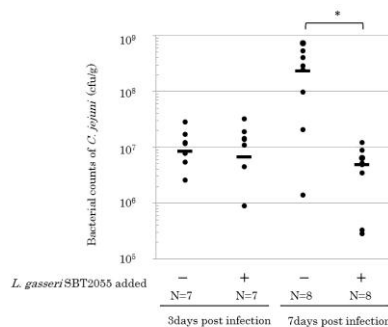


図5 鶏ヒナにおける*L.gasseri*TM333株の*C.jejuni*増殖抑制効果

功している。また、本菌株は、Int-407 細胞を用いて *C. jejuni* に対して競合付着阻害試験を試みると、*L. gasseri* TM333 株 10 の 9 乗

存在下では顕著に付着を阻害することを見出ししてきた。さらに、鶏雛を用いた感染阻害実験を試みたが、コントロール群で菌数が上昇しなかった。そこで、本研究ではコントロール群の投与量を増加させ、再検討することとした。その結果、図 5 に示すように、*L. gasseri* TM333 投与群は、7 日目において、コントロール群に比べ *C. jejuni* 菌数は有意に減少した ( $p < 0.05$ )。

### (3) 今後の展望

本研究では、*Lactobacillus* 乳酸菌の *Helicobacter pylori* および *Campylobacter jejuni* に対する腸上皮への付着の競合阻害に適する菌株の探索を行うため、乳酸菌の付着機構を明らかにするとともに、一部、*in vivo* での効果を明らかにしてきた。

*H. pylori* の感染予防効果を期待される *L. reuteri* JCM1081 株に関しては、硫酸化糖鎖を含むスルファチドへの付着因子が翻訳伸張因子である Ef-Tu であることが強く示唆された。本研究では、受容体候補としてスルファチドを対象としたが、スルファチドは細胞上皮に発現しており、実際の胃の環境を考えた場合、乳酸菌はスルファチドより、粘液ムチンに接することが考えられる。粘液ムチンには、スルファチド同様、硫酸化糖鎖を持つスルホムチンが医には大量に存在することから、今後、本菌株のスルホムチンへの付着性を検討したうえで、*in vivo* での *H. pylori* に対する感染予防効果を検討する必要があるだろう。

一方、*L. gasseri* TM333 の抑制効果は 90% 程度にとどまったことから、単独投与の効果期待するより、他の有効なプロバイオティクス製剤と混合させ投与することで有効であると推察された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 11 件)

(1) 西山啓太、坪川大悟、中光貴之、山本裕司、市川尊文、五艘行信、石原和彦、向井孝夫：*Lactobacillus reuteri* JCM1081 の EF-Tu の硫酸化糖鎖に対する結合特性の評価，2011，日本畜産学会，第 115 回大会講演要旨；224 2012. 3. 29，名古屋大学

(2) 西山啓太、中里彩季子、山本裕司、瀬戸泰行、中島肇、向井孝夫：*L. gasseri* SBT2055 の Aggregation-promoting factor のフィブロネクチンの付着特性，2011，日本酪農科学学会，60 周年記念大会講演要旨；34. 2011. 9. 22，フォレスト仙台

(3) 西山啓太、角田 勤、高井伸二、山本裕司、瀬戸泰幸、中島 肇、向井孝夫：

*Campylobacter* と同一のレセプターに結合する *Lactobacillus gasseri* による *in vivo* 感染阻害，2011，日本畜産学会，第 114 回大会講演要旨；74. 2011. 8. 26，北里大学

(4) 西山啓太、浜野太一、金子仁美、山本裕司、向井孝夫：*Lactobacillus reuteri* JCM1081 の Elongation Factor-Tu の胃腸粘膜への付着因子としての評価，2010，日本乳酸菌学会，2010 年度大会講演要旨集；20. 2010. 7. 26，フォレスト仙台

(5) 西山啓太、浜野太一、金子仁美、山本裕司、向井孝夫：*L. reuteri* の推定付着因子である EF-Tu の pH 依存的な付着特性の変化，2010. 3. 29，日本畜産学会，第 112 回大会講演要旨；117.，明治大学

[図書] (計 2 件)

向井孝夫 *Lactobacillus* の腸粘膜への付着に関する菌体表層糖質 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス pp463-468 京都大学学術出版会 2010

[その他]

ホームページ等

<http://d.hatena.ne.jp/bunshi/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向井 孝夫 (MUKAI TAKAO)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：20229917