

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25年 5月30日現在

機関番号：11301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22380144
 研究課題名（和文） プロバイオティック血液型乳酸菌による潰瘍性大腸炎（UC）予防能ヨーグルトの構築
 研究課題名（英文） Construction of anti-ulcerative colitis（UC） yogurt by probiotic blood type lactic acid bacteria
 研究代表者
 齋藤 忠夫（SAITO TADAO）
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：00118358

研究成果の概要（和文）：

ヒト大腸に棲息するプロバイオティクスに対して、とくに硫酸基とシアル酸に対する腸管付着性の高い有用細菌を探索する方法を構築し、実際に多くの微生物を単離してライブラリー構築に成功した。大腸ムチンの血液型別に結合する血液型乳酸菌に続いて、世界で初めて血液型ビフィズス菌も発見した。実際に潰瘍性大腸炎（UC）の発症候補菌であるフソバクテリウム・バリウム（バリウム菌）が血液型抗原を認識結合することを発見し、血液型乳酸菌を投与することで腸内での競合阻害により原因菌を排除する予防医学的な可能性を見出すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：

A new evaluation system to select probiotic lactic acid bacteria (LAB) with adherence to human colonic mucin (HCM) by recognizing sialic acid and/or sulfate on ABO-blood type antigens. LAB strains showing strong adhesion to human blood type-A antigen expressed on the intestinal mucosa were selected from 237 probiotic strains using the biosensor BIACORE. A similar method was used to select harmful bacteria that also recognizing the same antigen in the human intestine. *Fusobacterium varium* was detected as one of harmful bacteria from the patient of ulcerative colitics. Using a competitive adhesion experiment with a micro plate coated with the type-A antigen and the harmful bacteria, the bacteria was significantly decreased when they were added in combination with the type-A LAB. Our data suggested the blood type LAB strains may competitively inhibit pathogenic infections where this strategy may be useful in the development of improved future probiotic foods to protect human health.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：乳酸菌、プロバイオティクス、血液型乳酸菌、潰瘍性大腸炎、競合阻害、ビフィズス菌、アドヘシン、機能性ヨーグルト

1. 研究開始当初の背景

病原性細菌の動物腸管や標的器官への認識・結合性は古くから良く研究されているが、乳酸菌などの有用菌に対する消化管付着機構研究は極めて遅れている。近年、胃酸・胆汁酸耐性があり、腸管に付着性を示すことで増殖して宿主に有益な保健生理効果をもたらす「プロバイオティクス」と呼ばれる腸管に住む特殊な乳酸菌群が注目され、積極的に発酵乳・ヨーグルトに利用されヒトの健康維持に活躍している。

2004年、*Science* 誌に、*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) が胃内のヒト血液型 ABO 抗原を認識結合するという衝撃的な報告がなされた。ピロリ菌は胃炎、胃潰瘍また胃癌などの原因菌として注目され、胃の粘液ムチンに対して全ての血液型に適応できるアドヘシンという付着因子 (タンパク質 BabA) を有することで、巧みに特異的な結合性と生存性を獲得していると推定される。これら病原性細菌とヒト血液型抗原の結合性に関する研究は新しい戦略研究分野として注目されている。

我々は、これまでの10年間に、ヒトや動物腸管から単離した「プロバイオティック乳酸菌」に対して、腸管への付着性や付着因子であるレクチンの同定と付着機構の解明の解明を通して、ヒトや家畜における腸管の疾病予防や保健増強効果の検証と確立を総合的に目指してきた。

2006年、我々はヒトの ABO 式血液型抗原を認識して結合する「血液型乳酸菌」を、世界で初めてプロバイオティック乳酸菌より発見した。これらの腸管系乳酸菌は、ヒト腸管内で腸ムチンの糖鎖末端の血液型抗原 (A 型であれば N-アセチルガラクトサミン : GalNAc) に結合して、有害菌の競合排除を通して腸内環境の浄化と腸内菌叢のバランス調整および腸疾患などの防止に重要な役割を演じていることが示唆され、その利用性が期待された。とくに本研究では、我々しか有しない「血液型乳酸菌」を用いた潰瘍性大腸炎などの腸管部

位への付着性機構の解明、同抗原を共有する病原性菌の存在の有無の解明、および血液型乳酸菌を利用した病原性菌の競合的排除の作用機作の解明とその利用が研究の焦点であった。

これらの研究成果を融合して発展的に応用することにより、ヒトにおける大腸における消化管粘膜表層の常態的健康維持の仕組みが飛躍的に解明でき、結果として消化管疾患の予防・改善や全身の健康維持に有効な新機能性食品の開発 (ヨーグルトなど) などが大いに期待できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの我々のヒトおよび動物の腸管系乳酸菌に対して得られた多くの知見を基礎として、とくに「血液型乳酸菌」を用いた潰瘍性大腸炎 (UC) の原因菌の一つと考えられるフソバクテリウム・バリウム (バリウム菌) に代表される有害菌の競合的排除および大腸などの腸管内での病原性細菌の競合的排除機構、付着因子 (アドヘシン) の同定などを通して、腸管上皮細胞からインビボ試験に至るまで、プロバイオティック血液型乳酸菌の高度利用の観点から総合的に腸内健康の維持機構を解明する。最終的には、ヒト腸内健康に有効な血液型乳酸菌の選抜利用を通して、とくに大腸での消化管疾患予防能をもつ新規腸内健康維持食品の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

これまで乳酸菌の腸管付着能を判定する実験手法は確立されていなかった。我々は、腸ムチン糖鎖と菌体およびアドヘシンの結合をリアルタイムに結合性を評価できるプラズモン共鳴 (SPR) を利用したバイオセンサー BIACORE を用いた評価法を世界で初めて乳酸菌研究分野に導入した。本法で選抜された血液型乳酸菌の中から種々の有用機能 (腸管特異的付着性や抗炎症作用) を検証した。平成 21 年度は、ヒト大腸ムチンに発現する結合糖鎖の中で、とくに ABO 式血液型抗原部

位を認識して結合する「プロバイオティック血液型乳酸菌」の広域スクリーニングを行って、ライブラリーを構築した。また同時に、

「血液型有害菌」の単離同定も同時並行的に実施して病原性細菌ライブラリーも構築した。ついで、ヒト腸管の腸内細菌叢（フローラ）における腸管付着性や定住性機構を解明するために、血液型結合性菌株を善玉菌と悪玉菌から選抜して、その相互作用のBIACOREによる解析、ヒト腸管細胞培養株での相互作用確認解析、結合因子の同定と糖鎖認識部位のエピトープ解析などを実施した。

平成22年度には、これらの付着性の特性解析と付着因子の血液型認識結合性のタンパク質科学のおよび分子生物学的レベルでの機構解析および胃酸耐性、胆汁酸耐性、ガス産生の有無、安全性などの検討に入り、二次スクリーニングを行った。さらに、食品使用への安全性試験を経由して最終候補としてのプロバイオティック血液型乳酸菌を三次スクリーニングにより決定し、最終段階としての製品開発に進む道筋を付けた。平成23年度には、大腸ムチン糖鎖構造の中で、とくに硫酸基とシアル酸への結合性を区別できるBiacore評価系を構築し、硫酸還元菌などのスクリーニングを行った。大腸がんや潰瘍性大腸炎の炎症部位では硫酸還元菌の増殖が推定されており、これらを競合阻害する可能性の高い多くのビフィズス菌を単離して有効なライブラリーを構築でき、今後の予防医学および寛解維持を目指した。

4. 研究成果

高齢者の大腸がんと並んで若年層の潰瘍性大腸炎（UC）が現在日本では急増し、その予防と治療のカギを握るのは、ヒト腸管内プロバイオティック乳酸菌などの「ヒト腸管付着性機構の解明と応用」に関する基盤研究である。我々のこれまで蓄積してきたヒト腸管ムチンのABO式血液型抗原糖鎖に結合する「血液型乳酸菌」と一連の新規細胞付着因子の発見成果を基礎として、有用菌を用いて炎症性の腸疾患などの原因有害菌の特異的排除機構の解明を行い、最終的には有害菌排除能ヨーグルトの構築により、UCなどの炎症性腸疾患

（IBD）を予防することを研究目的とした。

平成 22 年度は、ヒト大腸ムチンに発現する結合糖鎖の中で ABO 式血液型抗原部位を認識して結合する「プロバイオティック血液型乳酸菌」の広域スクリーニングを行って、より優れた強力なライブラリーを構築できた。また、同じ血液型抗原に対して結合性を有する病原性細菌である「血液型有害菌」の潰瘍性大腸炎患者の腸管からの単離同定も同時並行的に実施して、優れた炎症性病原性細菌ライブラリーも構築できた。

平成 23 年度は、ヒト腸管の腸内細菌叢における腸管付着性や定住性機構を解明するために、血液型結合性菌株を善玉菌と悪玉菌から選抜して、その相互作用の BIACORE による解析、ヒト腸管細胞培養株での相互作用確認解析、結合因子の同定と糖鎖認識部位のエピトープ解析などを実施した。また、新しい Biacore 評価系として、ヒト大腸ムチンの結合糖鎖のシアル酸と硫酸基に着目し、シアリダーゼでシアル酸を、スルファターゼで硫酸基を切り出し、これらを特異的に認識するプロバイオティック乳酸菌とビフィズス菌を選抜した。

とくにプロバイオティックビフィズス菌を用いて、潰瘍性大腸炎の原因菌の一つと考えられている *Fusobacterium varium*（バリウム菌）のヒト大腸ムチン結合糖鎖への付着を阻害する菌株の存在することを発見した。これらの研究成果は、来年度のヒト臨床試験を想定した研究の最終ステップに移行できることを確約していると考えられた。

（1）ヒト大腸ムチン結合性の血液型乳酸菌ライブラリーの構築

プロバイオティクスとして有用乳酸菌の中でヒト大腸ムチンの糖鎖部分に結合性の高い菌株を、広く大腸がん手術で得られた大腸正常部位から大腸ムチンを調製し、それをセンサーチップに結合させ、そこに付着する菌株をスクリーニングした。その結果、*Lactobacillus* を中心としてまた *Bifidobacterium* を含む菌株を多数得ることに成功した。

（2）ヒト ABO 式血液型抗原を認識する血液型乳酸菌からの付着性因子（アドヘシン）の単離と同定

ヒト ABO 式血液型抗原を認識する血液型乳酸菌の細胞表層に存在する細胞付着因子を検討した結果、*L. mucosae* ME-340

株では、ABC トランスポーター (Cys 結合タイプ) を同定した。ヒト大腸ムチン糖鎖への付着性が確認されたのは初めてであった。

(3) 選抜血液型乳酸菌におけるアドヘシンの発見

乳酸菌の細胞表層に存在するアドヘシンとして、surface layer protein (SlpA), GAPDH, ABC transporterなどを単離して、同定することに成功した。これらのタンパク質成分がどうして細胞表層に存在するのかの理由は不明であるが、ある一部の特異的なタンパク質成分が細胞表層に局在し、ヒト腸管付着性を獲得して、その菌の生存に密接に関わっていることは極めて重要な指摘である。

(4) 血液型有害菌の単離同定と、血液型乳酸菌による競合的阻害

ヒト大腸より血液型抗原に結合性の高い多数の病原菌を単離し、その一部を同定した。潰瘍性大腸炎患者の炎症部位より単離されたバリウム菌のヒト大腸ムチンへの結合性を、血液型乳酸菌で検討した結果、最大で80%の競合阻害性を示した。これらの菌を用いて作成したヨーグルトは、ヒト腸管内で腸内腐敗を防ぎ、健康な腸管の維持に繋がることを示唆した。

(5) 潰瘍性大腸炎原因菌候補の血液型乳酸菌による付着阻害性とその利用

潰瘍性大腸炎 (UC) の原因菌の一つとされるバリウム菌の、ヒト大腸ムチン結合性を検討した結果、A 抗原および B 抗原に高い付着性を示した。したがって、これらの菌の腸管付着を、我々のこれまで単離した血液型乳酸菌で除去することが十分可能であることが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Honda, H., N. Yajima and T. Saito., Characterization of lactose utilization and beta-galactosidase in *Lactobacillus brevis* KB290, the

hetero-fermentative lactic acid bacterium., *Curr. Microbiol.*, 65, 679-685 (2012). DOI

10.1007/s00284-012-0216-2, 査読あり

- ② Huang, I-N., T. Okawara, M. Watanabe, Y. Kawai, H. Kitazawa, S. Ohnuma, C. Shibata, A. Horii, K. Kimura, N. Taketomo, J-Z. Xiao, K. Iwatsuki and T. Saito., New screening methods for probiotics with adhesion properties to sialic acid and sulphate residues in human colonic mucin using the Biacore assay., *J. Appl. Microbiol.*, 114, 854-860 (2012)., DOI 10.1111/jam.12063, 査読あり

- ③ Honda, H., S. Nagaoka, Y. Kawai, R. Kemperman, J. Kok, Y. Yamazaki, Y. Tateno, H. Kitazawa and T. Saito, Purification and characterization of two phosphor-beta -galactosidases, LacG1 and LacG2, from *Lactobacillus gasseri* ATCC33323T., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 58, 11-17 (2012). 査読あり

- ④ Watanabe, M., H. Kinoshita, I-N. Huang, K. Eguchi, T. Tsurumi, Y. Kawai, H. Kitazawa, K. Kimura, N. Taketomo, D. Kikuchi, T. Sase, K. Miura, H. Ogawa, C. Shibata, A. Horii and T. Saito., An adhesin-like protein, Lam29, from *Lactobacillus mucosae* ME-340 binds to histone H3 and blood group antigens in human colonic mucus., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 1655-1660 (2012)., DOI 10.1271/bbb.120150, 査読あり

- ⑤ 齋藤忠夫, 「乳酸菌」プロバイオティク乳酸菌のヒト腸管付着性機構の解明と応用、*New Diet Therapy*, 27, 13-22 (2012). 査読なし

- ⑥ 齋藤忠夫, プロバイオティクスの評価システム構築と製品化への新展開, 食品と開発, 48, 8-11 (2012). 査読なし

- ⑦ Nagasawa, C., Nishimura-Uemura, J., Tohono, M., T. Shimosato, Y. Kawai, S. Ikegami, M. Oda, T. Saito and H.

Kitazawa, Oral administration of phosphorylated dextran regulates immune response in ovalbumin-immunized mice., *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23, 106-115 (2010). 査読あり

- ⑧ Watanabe, M., H. Kinoshita, N. Nitta, R. Yukishita, Y. Kawai, K Kimura, N. Taketomo, Y. Yamazaki, Y. Tateno, K. Miura, A. Horii, H. Kitazawa, T. Saito., Identification of a new adhesin-like protein form *Lactobacillus mucosae* ME-340 with specific affinity to the human blood group A and B antigens., *J. Appl. Microbiol.*, 109, 927-935 (2010)., DOI 10.1111/j.1365-2672.2010.04719.x, 査読あり

[学会発表] (計 16 件)

- ① Saito, T., Immunogenics and survival strategy of *Lactobacillus* GG in human gut., The 3rd International Symposium on *Lactobacillus* GG of the Korean Society for Lactic Acid Bacteria (KSLAB), Grand Ballroom, The Hotel Plaza Seoul, Seoul City, Korea, May 9 (2012).
- ② Saito, T., New Functional Yogurts as FOSHU and Their Evaluation System in Japan., The 7th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Health, The 3rd Asian Symposium on Lactic Acid Bacteria, Wuxi, China, May 29-31 (2012).
- ③ Saito, T., Lactic Acid Bacteria and Dairy Foods, Inaugural Worldwide Symposium on Milk and Human Health, Organized by Korean Society for Lactic Acid Bacteria, Shilla Hotel, Seoul, KOREA, November 8 (2012).
- ④ Saito, T., New Prevention Strategy for Inflammatory Bowel Disease Using Probiotic Lactic Acid Bacteria and/or *Bifidobacterium* Yogurt. Product Development Division-Food Microbiology Division. Application of Functional Microorganisms in

Fermented Food. "Food Biosciences: Promises & Challenges in the Future", 2011 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology (KoSFoST), EXCO, Daegu, Korea, June 8-10 (2011).

- ⑤ Saito, T., Future Strategy of New Yogurts Using Adhesive Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) to Protect Our Gut from Inflammatory Bowel Disease (IBD). LAB6-6, Session 6, Technologies and Applications. The 6th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (ACLAB6), Organized by Japan Society for Lactic Acid Bacteria (JSLAB) and Asian Federation of Societies for Lactic Acid Bacteria (AFSLAB), Sapporo Convention Center & Sapporo Business Innovation Center, Sapporo, Japan, September 8-10 (2011).
- ⑥ Huang, I. N., T. Okawara, M. Watanabe, Y. Kawai, H. Kitazawa, S. Ohnuma, C. Shibata, A. Horii, T. Saito. New evaluation system using Biacore to select probiotics with high binding activity to acidic residues of human colonic mucin. *The 7th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Health, The 3rd Asian Symposium on Lactic Acid Bacteria*, Wuxi, China, May 29-31 (2012).
- ⑦ Saito, T., R. Yukishita, M. Watanabe, H. Kitazawa, Y. Kawai, A. Horii, F. Ikezawa, A. Yamamura, H. Ogawa, K. Miura, C. Shibata, I. Sasaki. New prevention strategy for inflammatory bowel disease using probiotic lactic acid bacteria and/or *Bifidobacterium* with specific adhesion to human intestine. *10th Symposium on Lactic Acid Bacteria*, Egmond aan Zee, Netherland, Aug. 28-Sep. 1 (2011). (ポスター発

- 表)
- ⑧ 佐藤優理、坂本光央、小川 仁、三浦康、柴田 近、川井 泰、北澤春樹、大熊盛也、堀井 明、齋藤忠夫。潰瘍性大腸炎の炎症緩和効果を有するプロバイオティクスに関する基盤的研究(その1)。日本農芸化学会 2012 年度大会、京都女子大学、京都、3月24-27日(2012)。
 - ⑨ 齋藤忠夫、佐藤優理、坂本光央、大熊盛也、小川 仁、三浦 康、柴田 近、川井 泰、北澤春樹、堀井 明。潰瘍性大腸炎(UC)の炎症緩和効果を示す血液型乳酸菌に関する基盤的研究(その1)。日本畜産学会第115回大会、名古屋大学、名古屋、3月28-30日(2012)。
 - ⑩ 渡辺真通、木下英樹、川井 泰、北澤春樹、三浦 康、柴田 近、堀井 明、木村勝紀、竹友直生、齋藤忠夫。*Lactobacillus mucosae*由来アドヘシン様タンパク質(Lam29)の新規ヒト大腸粘液由来結合因子の探索および同定。日本畜産学会第115回大会、名古屋大学、名古屋、3月28-30日(2012)。
 - ⑪ 黄 懿農、春田美由樹、渡辺真通、江口 慧、鶴見卓也、大川原崇、川井 泰、北澤春樹、大沼 忍、柴田 近、堀井明、木村勝紀、竹友直生、齋藤忠夫。プロバイオティック乳酸菌のヒト大腸ムチンにおけるシアル酸・硫酸基結合評価系のBiacoreによる新構築。日本畜産学会第115回大会、名古屋大学、名古屋、3月28-30日(2012)。
 - ⑫ 黄 懿農、渡辺真通、大川原 崇、川井 泰、北澤春樹、大沼 忍、柴田 近、堀井 明、木村勝紀、竹友直生、齋藤忠夫。ヒト腸内細菌の大腸ムチン結合部位決定のための酸性基に注目した新しいBiacore評価系の構築。日本乳酸菌学会2012年度大会、つくば国際会議場、つくば、7月12-13日(2012)。
 - ⑬ 渡辺真通、江口 慧、鶴見卓也、川井 泰、北澤春樹、齋藤忠夫、山村明寛、生澤史江、三浦 康、小川 仁、佐々木 巖、堀井 明、木村勝紀、竹友直生。

*Lactobacillus mucosae*由来ABCトランスポータータンパク質(Lam29)のヒト大腸粘液中の新規受容体様分子の同定。日本乳酸菌学会2011年度大会、関西大学、大阪、7月11-12日(2011)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 忠夫 (SAITO TADAO)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：00118358

(2) 研究分担者

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：10204885

川井 泰 (KAWAI YASUSHI)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：00261496

西村 順子 (NISHIMURA JUNKO)
東北大学・大学院農学研究科・
技術専門職員
研究者番号：10241556