

機関番号：34416

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23656534

研究課題名（和文）

腸内細菌と食物繊維の接着が腸内フローラに及ぼす影響

研究課題名（英文）

Effects of intestinal bacterial adhesion to fibers on intestinal microflora

研究代表者

片倉 啓雄 (KATAKURA YOSHIO)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：50263207

研究成果の概要（和文）：

乳酸菌表層に局在するセルロースに親和性をもつタンパク質として DnaK、GroEL、GAPDH などを同定した。組換え DnaK のセルロース、ムチン、キチン、IL1403 細胞に対する吸着定数は pH 7.0 ではそれぞれ $(2.7\pm 0.9)\times 10^6$ 、 $(2.5\pm 0.5)\times 10^5$ 、 $(3.7\pm 2.2)\times 10^5$ 、 $(8.7\pm 3.2)\times 10^5 M^{-1}$ だった。ELISA プレートに固定したムチンに対する乳酸菌の接着率はセルロース懸濁液の添加で有意に低下した。pH 4.0 では、ムチンに対する親和性が 1 桁高くなることから、乳酸菌が乳酸を生成して自身の周囲の pH を下げれば、より腸管に定着しやすくなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Surface proteins from *Lactococcus lactis* IL1403 cells purified by cellulose column were identified to be DnaK, GroEL, GAPDH and so on. The adsorption constants of the fluorescence labeled DnaK at pH 7.0 were estimated to be $(2.7\pm 0.9)\times 10^6$, $(2.5\pm 0.5)\times 10^5$, $(3.7\pm 2.2)\times 10^5$ and $(8.7\pm 3.2)\times 10^5 M^{-1}$ for cellulose, mucin, chitin and IL1403 cells, respectively. At pH 4.0, the adsorption constants for cellulose and mucin were estimated to be $(5.7\pm 0.2)\times 10^6$ and $(4.4\pm 1.0)\times 10^6 M^{-1}$, respectively. These results mean that lactic acid bacteria adhere to intestinal surface more tightly when they produce lactic acid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学、腸内細菌、DnaK、セルロース、ムチン、接着タンパク質

1. 研究開始当初の背景

人の腸内フローラは健康に深いかかわりを持ち、乳酸菌やビフィズス菌などの善玉菌を定着させ、大腸菌やウェルシュ菌などの悪玉菌を抑えることが望ましい。腸内細菌は、腸管のムチンなどに親和性をもつタンパク質をその表層に提示し、蠕動運動に抗して腸管に定着していると考えられている。

これまでに腸管のムチンに親和性をもつ接着タンパク質として DnaK、GroEL、GAPDH 等が報告されているが¹⁾、我々は、*Lactococcus lactis* IL1403 株の DnaK がマンナンを認識し、同株の細胞を酵母と接着させることを見いだしていた²⁾。

2. 研究の目的

乳酸菌の表層に局在する接着タンパク質が、腸管のムチンだけでなく、マンナン、セルロースなどの食物繊維に対しても親和性をもつなら、乳酸菌の腸管への接着を議論する場合、腸管内に豊富に存在するセルロース、マンナンなどの食物繊維との相互作用を考慮しなければならない。

そこで本研究では、乳酸菌表層に存在するセルロースに親和性をもつタンパク質を同定し、ムチンおよび食物繊維にどの程度の親和性を有するかを明らかにするとともに、食物繊維の存在がムチンとの接着にどのように影響するかを調べた。

3. 研究の方法

(1) セルロースに親和性をもつ表層タンパク質の同定

対数後期まで培養した *L. lactis* IL1403 株を、等張液中で溶菌酵素処理し (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.73 M Sucrose, 0.5 M NaCl, 2 mM EDTA, 100 nM pepstatin A, 1.6 mg/ml lysozyme, 20 units/ml mutanolysin, 0.16 mg/ml RNase A, 37°C, 2 h)、細胞表層のタンパク質を可溶化した。PBS (pH 7.4) で平衡化したセルロースカラムにアプライし、吸着したタンパク質を 0.4% 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propane sulphonate (CHAPS) を含む PBS で回収し、二次元電気泳動で分離し、ペプチドフィンガープリントによって同定した。

(2) 吸着定数の測定

IL1403 株の DnaK を pET21 にクローニングし、その C 末端側に His-tag を付加した状態で大腸菌に発現させ、ニッケルキレートカラムで精製し、2 当量の fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した。一定量のセルロース(パルプ由来, Advantec, 49005040)、キチン(エビ由来, Sigma-Aldrich, C7170)、ムチン(ブタ胃由来, 和光純薬, 137-09162)、デンプン(トウモロコシ由来, 和光純薬)に対して、0~2 mg/ml の F-DnaK を 37°C で 1 時間反応させ、遊離および吸着した F-DnaK 量を蛍光強度から測定し、Langmuir の吸着等温式に基づいて吸着定数を求めた。即ち、基質に結合した F-DnaK 量を X (mol)、飽和吸着量を S (mol)、平衡時の遊離の F-DnaK の濃度を C (M) とすれば、吸着定数 K (M^{-1}) は

$$X = SKC / (1 + KC)$$

で与えられ、片々逆数をとれば、

$$1/X = 1/SKC + 1/S$$

となるので、 $1/C$ を横軸に、 $1/X$ を縦軸に取り、その傾きから K を求めた。なお、ムチンを用いる場合、0.1% アジ化ナトリウムを含む 0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液に溶解した 1 mg/ml 溶液を 96 ウェル ELISA プレートに入れて 37°C で一晚コーティングし、0.5% 牛血清アルブミン(BSA)で 2 時間 37°C でブロッキングした。また、ターゲットに吸着した F-DnaK は 0.1% SDS を含む PBS (pH 7.4) を加えることによって溶出させ、FITC を標準物質として蛍光強度からモル濃度を求めた。

(3) 解離速度定数の測定

(2) と同様の方法で各炭水化物もしくは ELISA プレートに固定したムチンを 1 mg/ml の F-DnaK と反応させて吸着させた。過剰の F-DnaK を洗浄して除去した後、PBS 中でインキュベートし、30~60 分毎に PBS を交換すると同時に、吸着している F-DnaK を 0.2% SDS を含む PBS で回収し、蛍光強度を測定して結合量を求めた。解離は一次反応とみなせるので、結合量を X 、解離速度定数を k とすれば、 $dX/dt = -kX$ の関係があり、初期結合量

を X_0 とすれば、 $\ln X - \ln X_0 = -kt$ となる。そこで、洗浄時間に対して $\ln(X/X_0)$ をプロットし、その傾きから解離速度定数を求めた。

(4) 模擬腸管系での吸着実験

(2) に示した方法で 48 well ELISA プレートにムチンをコーティングし、BSA でブロッキングした。PBS で洗浄後、IL1403 株を 2 OD units/well となるよう添加し、37°C で 2 h インキュベートした。PBS で洗浄し遊離の菌体を除去した後、1 mg/ml のセルロースパウダー懸濁液を 100 μ L 添加し、37°C で 1 h インキュベートした。懸濁液を別の容器に回収し 5 分間自然沈降させ、遊離の乳酸菌を含む上清を回収し、0.2% となるよう SDS を加えた (画分 1)。上清を回収したあと、沈降したセルロースを PBS で更に 3 回洗浄して遊離の乳酸菌を除去した後、0.2% SDS を含む PBS 100 μ L に懸濁した (画分 2)。懸濁液を取り除いた ELISA プレートは PBS で洗浄した後、0.2% SDS を含む PBS を 100 μ L 加えた (画分 3)。画分 1~3 は、室温で 20 分間反応させた後、終濃度として 0.1 M となるように KCl を加え、氷冷した後、遠心分離することによって dodesyl sulfate を除去した。この後、各試料溶液に含まれる NAD 濃度、および、濃度既知の乳酸菌懸濁液から同様の方法で抽出した NAD を、サイクリングアッセイ³⁾によって定量した。なお、残存する SDS などによる妨害は、標準添加法によって補正し、細胞あたりに含まれる NAD 量は一定であり、系に含まれる乳酸菌は全て生菌であると仮定して、各画分に含まれる乳酸菌数を算出した。

4. 研究成果

(1) 表層タンパク質の分離と同定

L. lactis IL1403 株の表層からタンパク質を抽出し、セルロースを担体としたアフィニティクロマトグラフィーと二次元電気泳動で分離した。図 1 の 1~7 のスポットを切り出してトリプシン消化し、MALDI-TOFF Mass

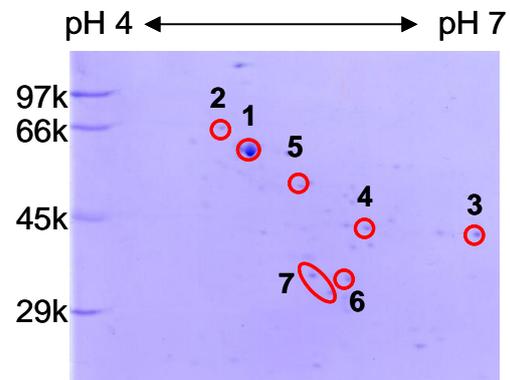


図 1. セルロースでアフィニティ精製した表層タンパク質の二次元電気泳動

で測定した断片サイズをデータベースと照合したところ、GroEL (1), DnaK (2), glycer aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, 3), malate oxidoreductase (4), 30S ribosomal protein S1 及び S2 (5 及び 6)と同定された。

(2) DnaK の各種炭水化物に対する親和性

(1)で同定されたタンパク質のうち、GroEL、DnaK、GAPDH、malate oxidoreductase、30S ribosomal protein S1 については、我々が以前、酵母マンナンをリガンドして IL1403 株の細胞表面画分からアフィニティ精製した際にも同定されている¹⁾。また、GroEL、DnaK、GAPDH についてはムチンに親和性を有することが報告されているので²⁾、これらのタンパク質は、マンナン、セルロース、ムチンに親和性をもつことになる。

(3) DnaK の各種炭水化物およびムチンに対する吸着定数

そこで、これらのタンパク質のうち DnaK について、大腸菌にクローニングして His-tag を付加した組換えタンパク質を調製し、各種炭水化物およびムチンに対する吸着定数および解離速度定数を測定した。その結果、表 1 に示すように、DnaK は *Lc. lactis* IL1403 細胞、セルロース、ムチンに対して 10^5 M^{-1} オーダーの親和性をもち、セルロースに対しては 10^6 M^{-1} オーダーの親和性を持っていた。また、解離速度定数は何れに対しても 10^{-4} s^{-1} オーダーであり、半減期に換算すると 30 分~60 分程度であった。

以上のことから、乳酸菌表面に局在する DnaK は、腸管のムチンだけでなく、食物繊維にも親和性を有し、特に、セルロースに対しては、ムチンに比べて 1 桁高い親和性を有することがわかった。

表 1. DnaK の吸着定数と解離速度定数

Target	$K_a (10^5 \text{ M}^{-1})$	$k_{\text{off}} (10^{-4} \text{ s}^{-1})$
IL1403 cell	8.7 ± 3.2	2.1 ± 0.1
Cellulose	27.0 ± 9.0	3.3 ± 0.3
Chitin	3.7 ± 2.2	2.4 ± 0.6
Mucin	2.5 ± 0.5	4.1 ± 0.3

PBS (pH 7.4), 37°C で測定

(4) セルロースとムチンに対する DnaK の親和定数に及ぼす pH の影響

消化管の pH は胃が最も低く、その後次第に高まり、大腸では 7~8 になる。乳酸菌等の腸内細菌が乳酸を生産すれば、大腸においてもその周辺の pH は局所的に低下すると考えられる。そこで、pH 4 と pH 7 において、DnaK のセルロースとムチンに対する吸着定数を測定した。その結果、表 2 に示すように、pH 7 においては、ムチンに対する親和性は、セルロースに対するそれに比べて 1 桁小さかったのに対して、pH 4 ではムチンに対する

親和性が高まり、セルロースに対する親和性とほぼ同等となった。

表 2. セルロースとムチンに対する DnaK の吸着定数に及ぼす pH の影響

$K_a (10^5 \text{ M}^{-1})$	pH 7	pH 4
Cellulose	37.8 ± 7.5	57.5 ± 2.3
Mucin	2.9 ± 0.8	44.4 ± 9.6

10 mM リン酸-クエン酸緩衝液を用い 37°C で測定

(5) ムチンへの乳酸菌の接着に及ぼすセルロースの影響

ムチンをコーティングした ELISA プレートで乳酸菌懸濁液をインキュベートした後、セルロース懸濁液を添加し、プレートに吸着した乳酸菌数の変化を調べた (表 3)。乳酸菌を吸着させた後、対照として PBS を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした場合、56% の乳酸菌が固相に留まっていたのに対して、セルロースを懸濁した PBS でインキュベートした場合には、固相に留まった乳酸菌は 38% に減少し、33% はセルロース画分に移行した。

表 3. 模擬腸管への乳酸菌の吸着に及ぼすセルロースの影響

ムチン	+	+	-
セルロース	+	-	-
上清(画分 1)	1.4 ± 0.6	2.2 ± 0.8	0.9 ± 0.6
セルロース(画分 2)	1.6 ± 0.7	n.d.	n.d.
固相(画分 3)	1.8 ± 0.7	2.8 ± 0.7	0.9 ± 0.5
計	4.8 ± 1.0	5.0 ± 1.3	1.8 ± 0.3

腸管にはセルロースをはじめとして、キチン、マンナンなどの食物繊維が存在するが、少なくとも *L. lactis* の DnaK は、これら全てに親和性を有していた。乳酸菌をはじめとする腸内細菌は、腸管上皮細胞の表面に存在するムチンに接着することによって蠕動運動に逆らって腸内に定着しようとしていると考えられるが、本研究は、その接着の一端を担うと考えられる DnaK が食物繊維に対しても親和性を有しており、しかも、食物繊維のかなりの割合を占めるセルロースに対して、最も強い親和性を有することを初めて明らかにした。これらの事実は、腸内菌叢の変化に及ぼす要因を議論する際には、それぞれの腸内細菌の増殖と腸管への吸着だけでなく、食物繊維への吸着を考慮しなければならないことを意味しており、今後の腸内菌叢の解析や制御に関する研究に間違いなく一石を投じた。

L. lactis の DnaK のムチンに対する pH 4 における吸着定数は、pH 7 におけるそれよりも 1 桁高まった。これは、乳酸菌などの腸内細

大会, 2011 年 7 月 12 日, 関西大学

[その他]

<http://microbial.life-bio.kansai-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片倉 啓雄 (Katakura Yoshio)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：50263207

菌は、乳酸などの有機酸を生産して細胞の周囲の pH が局所的に低下すれば、より強く腸壁に接着できることを意味している。これまで、フラクトオリゴ糖などは乳酸菌などの有用な腸内細菌の増殖を促進して腸内菌叢を改善する効果があるとされているが、これは、有用細菌の増殖を促進するだけでなく、増殖に伴って生産される有機酸による pH の低下によってムチンに対する親和性が高まり、より強く腸管に接着する、という可能性を示唆するものである。これらの知見は、今後のプロバイオティクス、プレバイオティクスの研究に一石を投じることになる。

現在、DnaK の他に、GAPDH、GroEL をクローン化を完了しており、今後は各種炭水化物とムチンに対する親和性を測定する予定である。また、乳酸菌の DnaK のムチンに対する親和性が低い pH で高まることは、乳酸菌にとって腸内にとどまりやすくなるが、大腸菌にとって、低い pH は例えムチンに対する親和性が高まったとしても、その増殖には不利である。とすれば、大腸菌の DnaK もムチンに対する親和性をもつなら、その親和性が高まる pH は、大腸菌にとって好ましい中性に近い pH であると予想される。そこで、*Escherichia coli* および *Bacillus subtilis* の DnaK について、そのムチンおよび食物繊維に対する親和性の pH 依存性を検討すべく、クローニングを完了している。

参考文献

- 1) Katakura, Y., *et al*: Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 319–326 (2010).
- 2) Sánchez, B., *et al* : 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).
- 3) Carl, B., *et al*: An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Analytical biochemistry*, 53, 452-358 (1973)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 片倉啓雄, "共生における接着の効果" 生物工学会誌, **89**, 465-468 (2011) 査読無
[学会発表] (計 2 件)
- ① 片倉啓雄 "乳酸菌の他細胞への接着と応答", 日本生物工学会 2011 年度大会, 招待講演, 2011 年 8 月 27 日, 東京農工大学
- ② 植松亜弥, 田中祥之, 紀ノ岡正博, 片倉啓雄, "乳酸菌と種々の炭水化物の相互作用の解析" 日本乳酸菌学会 2011 年度