

平成22年 4月 20日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380151
 研究課題名 (和文) 強力な有害菌排除能ヨーグルトのプロバイオティック血液型乳酸菌による構築
 研究課題名 (英文) Construction of yogurt with strong exclusion ability of harmful bacteria 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、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。胃・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の発症候補菌である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、予防医学的な大き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 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. *Staphyrococcus*. ssp. and *E. coli* were detected harmful bacteria. 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
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
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、血液型有害菌、競合素材排除、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（善玉菌）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、胃潰瘍また胃ガン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。また、ノロウイルス (Norwalk virus) による血液型識別感染症としての急性胃腸炎も報告されており、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、抗菌性ペプチドであるバクテリオシンの同定や有害菌の生育抑制および食品の日持ち向上（バイオプリザーベーション）、ラクトース資化（分解利用）性酵素の同定と乳糖不耐症の軽減および乳酸菌の菌体内外成分による免疫賦活化性などの解明を通して、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一連の基礎研究のバックグラウンドを有していた。

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ている。とくに本研究では、我々しか有しない「血液型乳酸菌」を用いた胃および腸管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、ヒトや動物における胃や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」を用いた胃内でのピロリ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食中毒細菌や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、ヒトや動物に有効な血液型乳酸菌の選抜利用を通して、胃や大腸などの消化管局所で整腸効果を発揮する、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。我々は付着因子（アドヘシン）とヒト大腸粘液層との結合性を顕微鏡下で判定する「カルノア固定切片法」およびヒト大腸ムチンと結合糖鎖の酷似するラット大腸ムチンを固定化させ、ア

ドヘシンの結合性を測定する比色法を開発した。近年では、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、これが「血液型乳酸菌」の発見につながった。

我々の研究では、これらの評価法の確立と有用菌の迅速な選抜方法を開発・提案・実施した点に大きな特色と独創性があると考えられた。また、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、バクテリオシン産生、免疫賦活化能あるいは抗炎症作用) を検証した我々しか有しない貴重な菌株を利用する点は、極めて特色があると考えられた。

平成19年度は、ヒト胃ムチンおよび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、優れたライブラリーを構築した。また同時に、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」の単離同定も同時並行的に実施して優れた病原性細菌ライブラリーも構築した。次いで、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20年度および平成21年度には、これらの付着性の特性解析 (とくに共培養法による病原性菌の乳酸菌による競合的排除試験) と付着因子 (アドヘシン) の血液型認識結合性のタンパク質科学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んだ。

4. 研究成果

(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 (アドヘシン) を検討した結果、*L. mucosae* ME-340 株では、アドヘシンとして ABC トランスポーター (Cys 結合タイプ) を同定した。すでに東京農大の佐藤英一氏の研究グループからも *L. reuteri* であるが同様の成分がアドヘシンとして同定されているが、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

今回の実験を通して、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興味深い。

(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。これらの *Staphyrococcus* ssp. および *E. cloi* 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 50% 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 *Fusobacterium barium* 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

〔雑誌論文〕(計9件)

- ① 〔 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.*, **108**, in press (2010). 査読あり
- ② 〔 Shimazu, T., M. Tohno, S. Katoh, T. Shimosato, H. Aso, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa, Utilization of the porcine system to study lymphotoxin- β regulation in intestinal lymphoid tissue. *Biochem. Genet.*, **47**, 126-136 (2009). 査読あり
- ③ 〔 Kinoshita, H., H. Uchida, Y. Kawai, T. Kawasaki, N. Wakahara, H. Matsuo, M. Watanabe, H. Kitazawa, S. Ohnuma, K. Miura, A. Horii, T. Saito, Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin., *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 1667-1674 (2008). 査読あり
- ④ 〔 木下英樹、渡辺真通、齋藤忠夫、プロバイオティック乳酸菌の血液型抗原を介したヒト腸管付着性機構(総説)、日本乳酸菌学会誌, **19**, 78-88 (2008). 査読あり
- ⑤ 〔 Nagaoka, S., Honda, H., Ohshima, S., Kawai, Y., Kitazawa, H., Tateno, Y., Yamazaki, Y. and T. Saito, Identification of five phosphor-beta-glycosidases form *Lactobacillus gasseri* ATCC33323^T cultured in lactose medium., *Biosci. Biochem. Technol. Biochem.*, **72**, 1954-1957 (2008). 査読あり
- ⑥ 〔 Arakawa, K., Kawai, Y., Fujitani, K., Nishimura, J., Kitazawa, H., Komine, K., Kai, K. and T. Saito, Bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from human feces in milk-based media., *Anim. Sci. J.*, **79**, 634-640 (2008). 査読あり
- ⑦ 〔 Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi, K. and T. Saito, Microbial community analysis of food-spoilage bacteria in

commercial custard creams using culture-dependent and independent methods., *J. Dairy Sci.*, **91**, 2938-2946 (2008). 査読あり

- ⑧ 〔 H. Kinoshita, Uchida, H., Kawai, Y., Kitazawa, H., Miura, K., Shiiba, K., Horii, A. and T. Saito, 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). 査読あり
- ⑨ 〔 Honda, H., Kataoka, F., Nagaoka, S., Kawai, Y., H. Kitazawa, H. Itoh, K. Kimura, N. Taketomo, Y. Yamazaki, Y. Tateno, T. Saito, β -Galactosidase, phosphor-galactosidase and phosphor-glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces., *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**, 461-466 (2007). 査読あり

〔学会発表〕(計30件)

(1) 招待講演(5件)

- ① 齋藤忠夫、プロバイオティクスとその菌体内外成分に期待する新機能性ヨーグルトの開発研究、日本畜産学会主催シンポジウム、東京都、3月27日(2010)
- ② Saito, T., Search for probiotics with high binding activity to human colon mucin and immunomodulation activity and their applications for human health, the 10th AEARU International Molecular Biology & Biotechnology Workshop, Taiwan, 11月12日(2009).
- ③ 齋藤忠夫、ヒトABO式血液型を識別するプロバイオティック乳酸菌の発見とその将来的な利用戦略、2007年度日本乳酸菌学会秋季セミナー、東京都、11月16日(2007).
- ④ Saito, T., Discavery of new probiotic lactic acid bacteria (LAB) with specific adhesion to human blood ABO type antigen of intestinal mucosa and their application., The 4th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. The 3th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Health, October 15-16, Shanghai, China (2007).
- ⑤ Kitazawa, H., M. Tohno, and T. Saito, Immunoregulatory Factors

from Probiotics., 13th International Congress of Mucosal Immunology(Tokyo) 7月9日—12日(2007).

(2) 一般講演 (25件)

- ① 齋藤忠夫ら12名、ヒトABO式血液型抗原糖鎖結合性の新規ピフィズス菌の発見とその付着特性の解明、日本畜産学会第112回大会、東京都、3月28日(2010).
- ② 新田将光、齋藤忠夫ら14名、*Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21)によるピロリ菌のヒト胃ムチン付着阻害機構の解明、日本畜産学会第112回大会、東京都、3月28日(2010).
- ③ 藤江 瞳、齋藤忠夫ら12名、腸管細胞共培養系によるイムノバイオテック評価系構築、日本畜産学会第112回大会、東京都、3月28日(2010).
- ④ 細矢翔一、齋藤忠夫ら9名、PIE細胞による抗ウイルス性イムノバイオテックの評価系構築、日本畜産学会第112回大会、東京都、3月28日(2010).
- ⑤ 高梨直也、齋藤忠夫ら9名、ウシ対応型の抗炎症性イムノバイオテック評価、日本畜産学会第112回大会、東京都、3月28日(2010).
- ⑥ 木下英樹、齋藤忠夫ら12名、GAPDH活性を指標としてヒト腸管高付着性乳酸菌の新規スクリーニング法の確立(1)、日本畜産学会第112回大会、東京都、3月28日(2010).
- ⑦ 井本 瞬、齋藤忠夫ら12名、GAPDH活性を指標としたヒト腸管高付着性乳酸菌の新規スクリーニング法の確立(2)、日本畜産学会第112回大会、東京都、3月28日(2010).
- ⑧ 中村圭志、齋藤忠夫ら9名、改良チーズホエイ培地を用いたバクテリオシン(ガセリシンA)の調製とカスタードクリームへの腐敗抑制効果、日本農芸化学会2010年度大会、東京都、3月28日(2010).
- ⑨ 中條貴弘、齋藤忠夫ら8名、ヒト腸管由来*L.gasseri*の二成分性バクテリオシン(ガセリシンT)の特性解析、日本農芸化学会2010年度大会、東京都、3月28日(2010).
- ⑩ Kinoshita, H., T. Saito *et al.* (9), Bacterial cell surface glycerinaldehydes-3-phosphphate dehydrogenase (GAPDH) of

Lactobacillus plantarum recognizes human blood group antigens on mucin., The 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands, August 31 to September 4, C009 (2008).

- ⑪ T. Saito, Wakahara, M *et al.* (11), New strategy to exclude harmful bacreia from the human intestine using probiotic lactic acid bacteria (LAB) having specific adhesion to ABO-type human blood antigens of the intestinal mucosa., The 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands, August 31 to September 4, C006 (2008).

【図書】(計3件)

- ① 齋藤忠夫、プロバイオテックスの効能と作用機序、「医科プロバイオテックス学」(古賀泰裕 編集) pp. 131-150、シナジール(2009).
- ② Saito, T., Potential for improving Health: Immunomodulation by Dairy Ingredients. In Bioactive Comoponents in Milk and Dairy Products (ed. by Y. W. Park). pp. 347-362, Wiley-Blackwell (2009)
- ③ Saito, T., Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. In Bioactive Components of Milk. (ed. by Z. Mosze), pp. 295-317. (2008).

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