

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580315

研究課題名（和文） 細胞接着性乳酸菌における新規な感染抑制機能の解析

研究課題名（英文） Studies on novel prevention mechanisms of infection by adhesive lactic acid bacteria to mucosal surface of intestine

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：本研究では、乳酸菌の新たな感染抑制機能を求め、1）乳酸菌の抗 BVDV（牛下痢症粘膜病ウイルス）活性 2）乳酸菌の *in vivo* における *C. jejuni* 感染防御効果、3）乳酸菌の *H. pylori* に対する抗付着効果機構の解析の 3 項目について検討を行った。その結果、抗 BVDV 活性を示す *Enterococcus* が見出され、過酸化水素がその活性に関与していることが示唆された。*in vitro* の結果に基づき、鶏ヒナによる乳酸菌の *C. jejuni* 感染抑制効果を検討した結果、感染抑制効果は見られなかった。さらに、*L. reuteri* の産生する翻訳伸長因子が、*H. pylori* に対する抗付着効果に寄与している可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、感染予防、*Helicobacter pylori*、*Campylobacter jejuni*、ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

プロバイオティクスが腸内での持続的な有用効果を期待するためには、腸内に定住、増殖できる性質を合わせ持つ乳酸菌株が望ましい。また、経口的に摂取された乳酸菌株が消化管内で定住し増殖するためには、胃酸、胆汁酸耐性以外に腸上皮への付着性を持つことが重要である。病原微生物の標的細胞への付着機構、すなわち菌体側の付着因子（アドヘシン）と腸上皮受容体の分子レベルでの

解析はその重要性から数多くの報告が見られる。一方、乳酸菌の腸上皮への付着機構は病原微生物に比べ詳細な検討はなされておらず、分子レベルでの解析例は一部の菌株に限られている。申請者は、乳酸菌の腸上皮への付着機構、特に病原微生物の腸上皮上の受容体との相違を明らかにすることによって、特定の病原微生物の標的部位への感染を阻止できる菌株も見出すことが可能になると考えている。

申請者はこれまで腸内由来乳酸菌から、糖

鎖結合タンパク質であるレクチンを産生する菌株が存在することを明らかにしてきた。また、最近、申請者はヒトやニワトリ腸管から見出された *Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus reuteri* や新種の乳酸菌 *Lactobacillus kitasatonis* 菌株は自身が産生するレクチンによって、腸上皮へ接着していることを明らかにするとともに、3種のレクチン産生性乳酸菌は *C. jejuni* あるいは *Helicobacter pylori* の消化管上皮への接着および増殖を抑制することを示唆してきた。

一方、予備実験の段階ではあるが、乳酸菌の中には BVDV の増殖を抑制する菌株が存在することを見出していた。これまで、乳酸菌による直接的な抗ウイルス作用に関しては、全く明らかにされていないが、間接的作用として「乳酸菌ワクチン」や「獲得免疫系を介した抗ウイルス作用」による方法が実験室レベルで検討されている状況にある。「乳酸菌ワクチン」は遺伝子組み換え技術によって、乳酸菌菌体内で病原微生物抗原を発現させ、「獲得免疫系を介した抗ウイルス作用」を期待するという戦略である。しかし、国内においては、遺伝子組み換え微生物を食品や飼料として摂取することは将来的にも困難な状況であると言わざるを得ない。また、「獲得免疫系を介した抗ウイルス作用」は下痢のような急性の感染症に関してはあまり期待できない。現在、申請者が見出しているウイルスに対する直接的感染抑制作用を持つ乳酸菌株は、これまで全く見出されておらず、その利用性を検討することは極めて大きな価値があるものと考えている。

以上から、本研究では、細胞性接着性乳酸菌による病原微生物の感染抑制とそのメカニズム明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

最近、問題化している腸管感染症は経口的に感染し、その予防は衛生対策を施す以外、確実な手段がなく、感染症予防対策は、医学領域にとどまらず幅広い領域で求められている。本研究で取り上げる牛下痢症粘膜病ウイルス (BVDV)、*Campylobacter jejuni*、*Helicobacter pylori* はいずれも消化管感染症起因菌であり、感染経路は不明な部分も多いが、動物に感染する場合は、飼育環境から、ヒトに感染する場合は食品を介して感染するケースが多いと考えられる。したがって感染予防の観点からは、ヒトの腸内からももちろんのこと、動物腸内からも両微生物を排除することが極めて重要となる。本研究では、以下の3つの検討課題について解析することとした。

- (1) 乳酸菌の抗 BVDV 活性
- (2) 乳酸菌の *in vivo* における *C. jejuni* 感染抑制効果

## (3) 乳酸菌の *H. pylori* の受容体スルファチドへの結合機構の解析

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳酸菌による抗 BVDV 活性

供試乳酸菌として 27 菌株を用いた。乳酸菌を MRS 液体培地で培養した後、遠心分離をし、上清と菌体画分に分けた。MRS 液体培地の抗 BVDV 活性を検討した結果、培地中の Tween80 による抗 BVDV 活性が認められたことから、今回は菌体とウイルスの混合培養がウイルス増殖に及ぼす影響を調べた。菌体は、MRS 培地の影響が出ないように、細胞増殖培地である MEM で洗浄した後、乳酸菌を一定菌数に調整し、菌体と BVDV をあらかじめ 37°C で 30 分間培養した (前処理)。培養後、遠心分離・フィルターろ過により菌体を取り除き、その上清を牛腎細胞以下 MDBK 細胞に添加した。1 時間培養した後、細胞を洗浄、回収し、96 穴プレートに播種した。4 日後、MTT 法で生細胞数を測定し、その値から細胞生存率を算出した。抗ウイルス活性は、乳酸菌未処理の細胞数に対する生細胞数の割合を指標とした。

#### (2) キャンピロバクター感染動物に対する *L. gasseri* の影響の検討

鶏ヒナに対する感染系を利用し実験を行った。今回の実験では、ふ化直後のヒナを 2 群に分け、一方に  $5 \times 10^8$  CFU の *L. gasseri* TM333 株を投与し、対照国は PBS を投与した。次いで投与 24 時間後に両試験区に *Campylobacter jejuni* 81-176 株を  $1 \times 10^4$  CFU 投与した。1 週間後盲腸内容物中の *Campylobacter jejuni* 81-176 株および総乳酸菌数をそれぞれ MH 培地 (Trimethoprim+, Cefoperazone+) および MRS 培地を用いて計測した。

#### (3) *L. reuteri* の *H. pylori* の受容体結合阻害機構の解析

*L. reuteri* の *H. pylori* の受容体の一つであるスルファチドへの結合性を示すタンパク質を同定するため、アフィニティークロマトグラフィーを行った。硫酸化ガラクトースを固定化したアガロースゲルに菌体表面タンパク質を流し、糖鎖結合タンパク質を吸着させ、精製したものを SDS-PAGE に供した。得られたバンドを濃縮したのち、内部のアミノ酸配列を解析するため V8 プロテアーゼにより限定分解した。限定分解で得たタンパク質断片をトリシン SDS-PAGE で分離後 PVD F 膜にブロッキングし、これらをプロテインシーケンサーに供した。得られたアミノ酸配列を基に degenerate PCR を行い、塩基破裂をデータベース検索することで遺伝子の同定を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 乳酸菌による抗 BVDV 活性

方法に記載したように、今回は、乳酸菌菌体とウイルスを前処理することによって、抗ウイルス効果が見られるか否かを検討した。図 1 に、27 菌株と BVDV の前処理による抗ウイルス効果を示した。

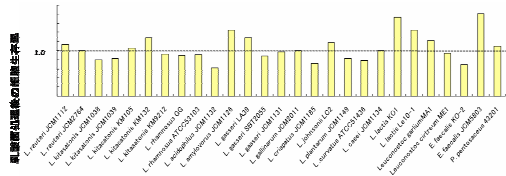


図1 乳酸菌の抗BVDV活性

抗ウイルス効果は、未処理 BVDV を感染させた際の細胞生存率に対する乳酸菌処理した BVDV を感染させた際の細胞生存率の割合で求めた。この場合、その割合が 1 を超えたものが、抗ウイルス活性を持つことが推察される。この結果、*Enterococcus faecalis*TM58 および *Lactococcus lactis*K0-1 の菌株が高い抗 BVDV 活性を示した。*Enterococcus faecalis*TM58 を取り上げ、抗 BVDV 活性の菌濃度依存性を調べた結果(図 2)、確実に本菌株が抗 BVDV 活性を持つことが示された。

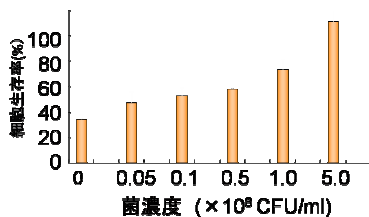


図2 *Enterococcus faecalis*TM58の抗ウイルス活性

*E. faecalis* の抗ウイルス活性のメカニズムを検討するために、加熱死菌体を用いて、抗ウイルス活性を調べた結果、活性は約 70% 減少した(結果は示さず)。そこで、本菌の代謝産物が、抗ウイルス活性に関与しているものと考え、過酸化水素に着目し、検討を加えた。

その結果、図 3 に示すように、カタラーゼを作用させることによって、抗ウイルス作用は 40% 以下まで低下した。したがって、乳酸菌の産生する過酸化水素がウイルスの増殖抑制に作用していることが推察された。そこで、過酸化水素自体の BVDV の増殖に及ぼす影響を調べるために、500  $\mu$ M 過酸化水素と BVDV を前処理したのち、BVDV の増殖を調べたところ、未添加の場合、細胞生存率は、30% 程度であったが、過酸化水素を 500  $\mu$ M 添加

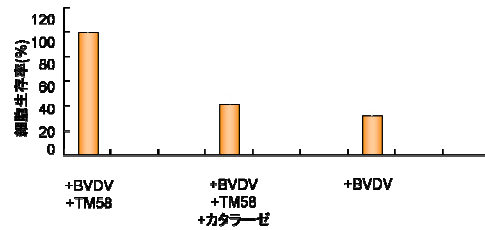


図3 *E. faecalis*の抗BVDV活性に及ぼすカタラーゼの影響

することで、70%程度まで回復した。すなわち、過酸化水素によって BVDV の増殖が抑制されることが示された。以上のことから、*E. faecalis*TM58 株が産生する過酸化水素によって、抗 BVDV 作用が示されることが明らかとなった。過酸化水素が分類される活性酸素種は、反応性が強く、タンパク質、DNA の切断や脂質過酸化による膜の損傷などを引き起こすことが示されている。BVDV は脂質二重層のエンベロープ膜を持っているので、過酸化水素がこの膜を傷つけ、BVDV を不活化したということが考えられた。また、過酸化水素は細胞膜を透過できるので、細胞を介して、ウイルスが増殖するときに何らかの作用をもたらしたという可能性も考えられた。

##### (2) キャンピロバクター感染動物に対する *L. gasseri* の影響の検討

*C. jejuni* の感染のステップの第一段階として粘膜へ付着することが挙げられるが、さらに分子レベルでは、細胞外マトリックスタンパク質の一種であるフィブロネクチンを受容体としていることが明らかにされている。したがって、本菌のフィブロネクチンへの付着を阻害することで、感染を抑制できるものと推察される。

ところで、申請者は腸内に生息している *Lactobacillus* 乳酸菌の中から腸管由来細胞 Int-407 に強く付着する *L. gasseri* TM333 株を分離してきた。図 4 は *L. gasseri* 6 株の Int-407 への付着試験の結果を示したが、*L. gasseri* TM333 株は他の菌株に比べ、著しく強い付着性を示した。

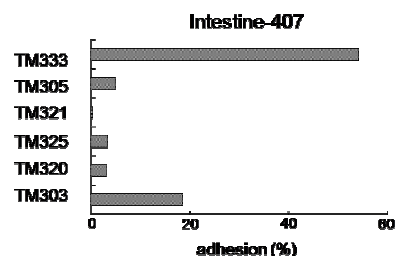


図4 *L. gasseri* のInt-407への付着

さらに本菌株のフィブロネクチンへの付着性を調べた結果、図 5 に示したように、他の細胞外マトリックスタンパク質に比較して、

顕著な付着性を示し、本菌株がフィブロネクチンへ付着性を示す特徴ある菌株であることが示された。

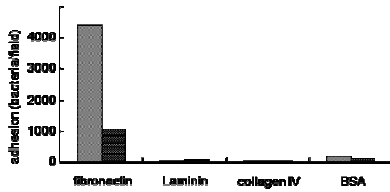


図5 *L. gasseri* TM333のフィブロネクチンへの付着性

本菌株が、*C. jejuni* と同様の受容体を認識することが示されたので、*C. jejuni* に対して感染予防効果を示すのではないかと推察された。実際、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、図 6 に示すように、*L. gasseri* TM333 株 10 の 9 乗存在下では顕著に付着を阻害した。

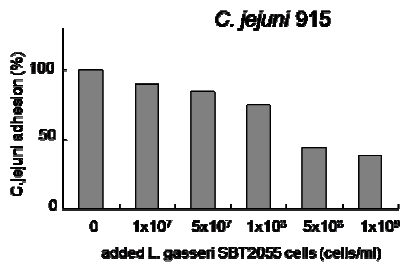


図6 *L. gasseri* TM333の*C.jejuni*のInt407細胞への付着に及ぼす影響

ここまで述べた以前の結果を踏まえ、*in vivo* における試験を試みることにした。*C. jejuni* は感染モデル動物として鶏ヒナを用いる実験系が確立しているため、実験方法に記載した方法で、*L. gasseri* TM333 株の *C. jejuni* に対する感染阻害実験を試みた。

図 7 に *C. jejuni* および総乳酸菌数を計測した結果を示した。*C. jejuni* 菌数は一部に

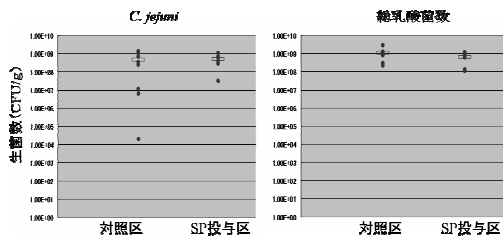


図7 盲腸内容物から検出された*C.jejuni*及び総乳酸菌数

バラつきが見られたが、両試験区とも平均すると盲腸内容物 1g あたり 10 の 8 乗から 9 乗の菌数が検出された。一方、総乳酸菌数は両試験区とも 1g あたり 10 の 9 乗前後の菌数が

得られ、両者とも統計学的に有意な差は見られなかった。この結果から今回の試験では *L. gasseri* SP 株の投与による *C. jejuni* の定着数に対する影響は見られなかった。今回は *C. jejuni* の感染 1 日前に *L. gasseri* SP 株を 1 回のみしか投与できなかった。*Campylobacter jejuni* 81-176 株はヒナへの感染系によく利用される株であり、ふ化直後に投与することで、非常に速やかにかつ高い定着性が得られることが知られている。そのため、あらかじめ乳酸菌を長期間投与したのちの効果を見ることは困難である。今回は、*L. gasseri* SP 株 1 投与区 (5×10<sup>8</sup> CFU) のみ設定であったため、今後は投与菌数を高めることなどの検討を行い、感染防御効果の結論を得たい。

### (3) *L. reuteri* の *H. pylori* の受容体結合阻害機構の解析

申請者は、これまで、*Lactobacillus reuteri* JCM1081 株は Caco-2 や Intestin-407 などの消化管由来の細胞によく付着すること、細胞側のレセプター分子としてスルファチド構造の硫酸化ガラクトースやアシアロ GM1 などの糖脂質に結合することを明らかにしてきた。

*Helicobacter pylori* は最近では良く知られるようになったが、ヒトの胃内に定着、増殖し、胃炎、胃潰瘍の原因菌であり、WHO により胃がんのリスクファクターとして認定された。*H. pylori* は図 8 に示したように複数の宿主認識因子を持ち、受容体に結合している。菌体側の BabA は血液型糖鎖を、HpaA はシアロ糖鎖を、NAP はスルホムチンおよびスルファチドに結合する。このスルホムチンおよびスルファチドには、硫酸化ガラクトースが共通構造として存在し、*H. pylori* はこの部分を認識することが示されている。このように、*H. pylori* は *L. reuteri* と同一分子を認識することが判明している。

そこで、申請者は硫酸化ガラクトースを含む受容体分子としてスルファチドを取り上げ、*L. reuteri* による *H. pylori* のスルファチドへの結合の阻害実験を試みた。図 9 には

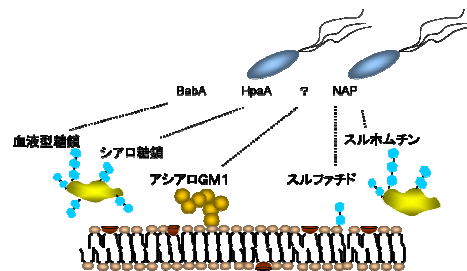


図8 *H. pylori*の受容体を認識するアドヘシン

TLC-overay 法による結合阻害実験の結果を

示した。糖脂質を TLC で展開したのち、ピロリ菌を作用させると、図のように糖脂質と結合して発色した。しかし、先に *L. reuteri* を作用させると、スポットは検出されずに、*H. pylori* の結合を阻害することが判明した。

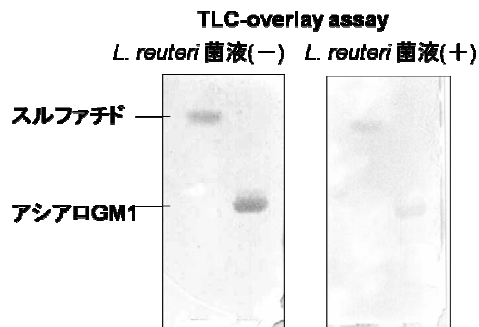


図 9 *L. reuteri* の *H. pylori* のスルファチドおよびアシアロGM1 への結合に及ぼす影響

また、*L. reuteri* が産生している *H. pylori* のスルファチドへの結合阻害因子、すなわち *L. reuteri* のスルファチド結合因子は、界面活性剤であるオクチルグルコピラノシドで可溶化されてくるタンパク質性の物質であることを明らかにしてきた。しかし、これまで、このタンパク質性の物質に関しては解明されてこなかった。

そこで本研究では、*L. reuteri*1081 株の硫酸化ガラクトースへの結合因子を明らかにするために、スルファチドを取り上げ、スルファチド結合タンパク質の同定を試みることとした。そのため、まず、遺伝子を同定することとした。

*L. reuteri* のスルファチド結合タンパク質を同定するため、アフィニティークロマトグラフィーを行った結果、アフィニティークラム結合画分には約 47kDa の単一のバンドが確認された。次いで、目的である遺伝子の同定のため、47kDa タンパク質の N 末端配列を解析した結果、AEKEHYE の N 末端アミノ酸配列が得られた。さらに 47kDa タンパク質を限定分解すると複数のバンドが得られ、それらの N 末端アミノ酸配列を解析すると、ILNPVGAPTCLK、VGLTEDVLKST、EDLLNEYDFPGDD の配列が明らかとなった。これらの配列に基づき、6 通りのプライマーセットを設計し、degenerate PCR を行った。その結果、特定のプライマーセットで、図 10 に示すように 499bp の PCR 増幅産物が得られた。

そこで Degenerate PCR で増幅された 499bp の配列を解析し、アミノ酸配列を推定すると、内部アミノ酸配列と同一の配列が見出され、本 DNA 領域が目的タンパク質遺伝子の一部であることが示された。さらに、この塩基配列をデータベース上で検索したところ、

*L. reuteri*.F275 の翻訳伸張因子 Elongation factor Tu (EF-tu) と 98% の相同性を示した。そこでこの配列を参考に ORF の周辺をさらに解析し、*L. reuteri*.JCM1081 株 47kDa タンパク質遺伝子の完全構造を決定した。

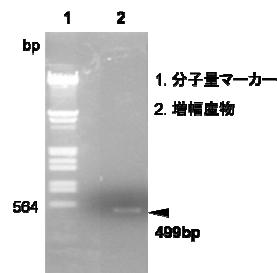


図10 degenerate PCRによる目的遺伝子のクローニング

その結果 47kDa タンパク質遺伝子は、全長 1191bp で、396 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードすることが明らかになった。また、

ホモロジー検索の結果、*L. reuteri*.F275 の EF-Tu と 98.5% の相同性を示したことから、47kDa タンパク質は Ef-tu であると結論付けた。

以上の結果から、*L. reuteri*.JCM1081 株のスルファチド結合因子は 47kDa タンパク質であり、そのタンパク質は EF-tu であることが強く示唆された。Ef-tu はシグナル配列を持たないことから、菌体外へ分泌されることはないものと考えられてきたが、ごく最近、*Lactobacillus* のある種の菌株が EF-tu を介してムチンに付着することは報告された。本研究では、Ef-tu が、スルファチドへの結合因子であることを強く示唆したが、確実に結合因子であるか否かは、Ef-tu を用いた結合試験を行うことによって、証明される。今後、組換え Ef-tu を作製することによって、この点を明らかにしていきたい。

## 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 2 件)

- ① 向井孝夫 チーズの新規保健機能 畜産の情報 8 : 58-67 2008. (査読なし)
- ② 向井孝夫 *Lactobacillus* 乳酸菌における S-layer 様タンパク質が介在する腸上皮への付着 日本乳酸菌学会誌 19(1):21-29 2008. (査読あり)

[学会発表] (計 17 件)

- ① 金子仁美ら、*Helicobacter pylori* と同一のレセプターへ接着する乳酸菌の付着機構の解析 日本畜産学会第 110 回大会 (藤沢) 2009. 3
- ② 水谷英秋ら、チーズ脂質抽出物の *Helicobacter pylori* に対する抗菌効果の

検討 日本畜産学会第 110 回大会 (藤沢)  
2009. 3

- ③小倉憂也ら, 中鉢弥伸, 山本裕司, 向井孝夫 乳酸菌を対象とした病原細菌の Quorum sensing 阻害物質の検索 日本畜産学会第 110 回大会 (藤沢) 2009. 3
- ④山本裕司ら 乳酸菌の低温生残性に対する酸素の影響と抗酸化因子の局在 日本農芸化学 2009 年度大会 (福岡) 2009. 3
- ⑤中鉢弥伸ら 乳酸菌が産生する病原細菌のクオラムセンシング阻害物質の探索 日本農芸化学会東北支部第 143 回大会 (弘前) 2008. 10
- ⑥井上亜沙美ら 乳酸菌の低温保存性に対する酸素の影響と酸素耐性因子の局在 日本農芸化学会東北支部第 143 回大会 (弘前) 2008. 10
- ⑦向井孝夫 農医連携の懸け橋としてのプロバイオティクスの可能性を探る 第 6 回北里大学農医連携シンポジウム (相模原) 2008. 10
- ⑧木村真ら, 抗ウイルス活性を持つ乳酸菌のスクリーニング 日本乳酸菌学会 2008 年度大会 (京都) 2008. 7
- ⑨青木麻智子ら, 口腔内連鎖球菌 *Streptococcus mutans* におけるレドックスセンサーの同定 日本乳酸菌学会 2008 年度大会 (京都) 2008. 7
- ⑩金子仁美ら, 乳酸菌が産生する *Helicobacter pylori* 付着阻止タンパク質の同定 第 62 回日本細菌学会東北支部総会 (十和田) 2008. 8
- ⑪木村 真ら, 抗ウイルス活性を持つ乳酸菌のスクリーニング 日本畜産学会第 109 回大会 (水戸) 2008. 3
- ⑫金子仁美ら、乳酸菌が産生する *Helicobacter pylori* 感染阻止タンパク質遺伝子の解明 日本畜産学会第 109 回大会 (水戸) 2008. 3
- ⑬川城朝子ら, *Helicobacter pylori* の自己溶菌機構の解明 日本農芸化学 2008 年度大会 (名古屋) 2008. 3
- ⑭向井孝夫 *Lactobacillus* 乳酸菌における S-layer 様タンパク質が介在する腸上皮への付着 2007 年度日本乳酸菌学会秋季セ

ミナー (東京) 2007. 11

- ⑮中鉢弥伸ら, *Helicobacter pylori* の quorum sensing における AI-2 感知システム 第 61 回日本細菌学会東北支部総会 (仙台) 2007. 8
- ⑯金子仁美ら, *Lactobacillus gasseri* SBT2055 株 における Aggregation-promoting factor の細胞付着性および菌形態変化への関与 第 61 回日本細菌学会東北支部総会 (仙台) 2007. 8
- ⑰春松 慎ら, *Lactobacillus kitasatonis* が発現するラミニン付着因子の解析 日本乳酸菌学会 2007 年度大会 (東京) 2007. 7

[図書] (計 3 件)

- ①向井孝夫、農医連携の架け橋としてのプロバイオティクスの可能性を探る、養賢堂、北里大学農医連携学術叢書 第 6 号 (印刷中)
- ②向井孝夫、乳酸菌の上皮細胞や宿主受容体分子への付着性の評価、社団法人日本食品科学工学会、食品機能性評価マニュアル集 III、(2009) 78-83
- ③向井孝夫、プロバイオティクスの家禽への利用、アイ・ケイコーポレーション、食卵の科学と機能、(2008) 232-235

## 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

### (2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者

山本 裕司 (YAMAMOTO YUJI)  
北里大学・獣医学部・講師  
研究者番号: 10453507

金子 仁美 (KANEKO HITOMI)  
北里大学大学院・学生

木村 真 (KIMURA MAKOTO)  
北里大学大学院・学生

浜野 太一 (HAMANO TAICHI)  
北里大学大学院・学生