

## 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 6 月 10 日現在

機関番号：21301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22780241  
 研究課題名(和文) 酵素活性を指標とした有益プロバイオティクスの新規スクリーニング法の構築とその応用  
 研究課題名(英文) Proposal of new screening method of adhesive probiotic lactic acid bacteria by enzymic activity  
 研究代表者  
 木下 英樹 (KINOSHITA HIDEKI)  
 宮城大学食産業学部 助教  
 研究者番号：50533288

### 研究成果の概要（和文）：

本研究では、酵素活性という新たな指標の導入により高腸管付着性乳酸菌の選抜が可能かを検討した。18時間培養のヒト腸管由来乳酸菌の全てで GAPDH 活性が見られたことから、GAPDH は乳酸菌に普遍的に発現している可能性が示された。また、GAPDH の酵素活性と腸管付着性の間には高い正の相関があったことから GAPDH 酵素活性により高腸管付着性乳酸菌が選抜可能であることが示された。さらに、多くの乳酸菌にヒートショックプロテイン、GroEL が見出されたことから GroEL も GAPDH と同様、有力な付着因子である可能性が考えられた。

### 研究成果の概要（英文）：

Our aim was to construct a new screening method for highly adhesive lactobacilli based on an enzymatic activity without using the adhesion test. Thirty lactobacilli isolates from human intestinal tissues were measured for cell surface GAPDH activity. GAPDH activities were detected in all samples from 18 h cultures. This suggests GAPDH is universally expressed on the bacterial cell surfaces from many lactobacilli. The new screening method using GAPDH enzymatic activity without an adhesion test may be possible due to the positive correlation of GAPDH activity with adhesion of lactobacilli. Moreover, the heat shock protein, GroEL, was also detected in many lactobacilli. This suggests GAPDH and GroEL are a very important protein not only in the cytoplasm but also on the cell surface and may be a universal adhesin for lactobacilli.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23年度	900,000	270,000	1,170,000
24年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、腸管付着性、付着因子、アドヘシン、酵素活性

## 1. 研究開始当初の背景

プロバイティック乳酸菌は、整腸作用、病原菌の感染予防作用、抗がん作用、免疫賦活化作用、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制作用など様々な有益な保健効果が報告されている。これらの効果を十分に発揮する為には、「乳酸菌が腸管内に付着し、増殖すること」が重要である。そのため、高い腸管付着性を持つ乳酸菌を選抜することは商業利用においても極めて重要である。しかしながら、乳酸菌の腸管付着メカニズムはまだまだ不明な点が多いのが現状である。また、腸管付着性の高い乳酸菌（高腸管付着性乳酸菌）を選抜するための付着性試験もお金と手間がかかり、非常に煩雑な作業である。最近、我々はヒト腸管組織から直接単離した高腸管付着性乳酸菌、*Lactobacillus plantarum* LA318株の菌体表層に、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）が高発現していることを明らかとした。さらに、表層GAPDHが、ヒト大腸ムチン（粘液層）やその糖鎖末端に発現している血液型抗原（A型およびB型）へ高い結合性を示す腸管付着因子（アドヘシン）であることを明らかにした。また、同時期にフィンランドのグループにより乳酸菌の菌体表層にGAPDHやエノラーゼなどが存在していることが明らかとなった。このように様々な乳酸菌の菌体表層に細胞内酵素群の発現が明らかになってきている。

## 2. 研究の目的

これまで報告されてきた腸管付着因子は、「付着性」以外に評価する指標がなかったが、上記のタンパク質は、「酵素活性を持つ」という特徴を有している。我々は、その特徴にいち早く着目し、酵素活性を利用して新たな腸管付着評価系の構築ができるのではないかと

考えた。そこで本研究では、菌体表層に発現している酵素群にターゲットを絞り、酵素活性を指標とした新たな腸管付着性乳酸菌のスクリーニング法の構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) GAPDH酵素活性を指標にしたスクリーニング法

ヒト腸管由来の乳酸菌30菌株の表層GAPDHをPBSにより抽出し、96穴マイクロプレートを用いてGAPDHの酵素活性を測定した。培養時間は12時間および18時間培養で行った。同時に腸管付着能も試験し、腸管付着性の値とGAPDH活性値の相関係数を求めた。

### (2) GAPDH以外の有用付着因子の探索

ヒト腸管から菌を単離・同定し、腸管付着性試験を行った。高い付着性を示した上位5菌株についてタンパク質を塩酸グアニジンおよびPBSで抽出し、SDS-PAGEを行った。腸管付着性の高い菌株に共通して発現しているタンパク質のバンドを切り出し、N-末端ミノ酸配列解析により同定を行うことで、有力な付着因子の探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) GAPDH酵素活性を指標にしたスクリーニング法

ヒト腸管由来の乳酸菌30菌株のGAPDH酵素活性をマイクロプレート法により測定したところ、12時間培養菌体では30菌株中21菌株、18時間培養菌体では30菌株全てからGAPDH酵素活性が検出された。このことからGAPDHは普遍的に乳酸菌の菌体表層に存在している可能性が示唆された。また、BIACORE付着性試験とGAPDH酵素活性の間には強い正の相関が見られた（図1）。特に18時間培養におけるGAPDH活性と腸管付着性の間の相関係数は、0.69 ( $P < 0.01$ )と非常に高かった（図2）。少なくとも

もヒト腸管由来の乳酸菌においては、GAPDH 酵素活性を用いた腸管付着性乳酸菌の選抜が可能であることが示された。

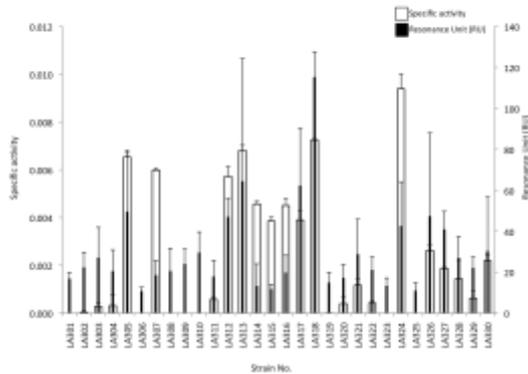


図1. GAPDH活性と腸管付着能 (12時間培養)

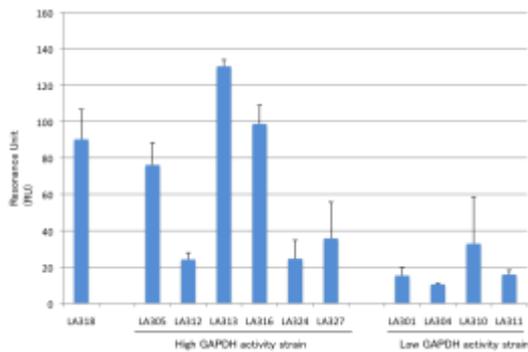


図2. GAPDH活性の高い菌株と低い菌株の腸管付着性 (18時間培養)

## (2) GAPDH以外の有用付着因子の探索

GAPDHと腸管付着性との相関は高かったが、GAPDH活性のみでは、選抜漏れも懸念された。そこで有用な付着因子を探索するために新たにブタ腸管から乳酸菌を単離した。単離した12菌株の乳酸菌の腸管付着性試験を行ったところ、*Lactobacillus acidophilus* PL1-2が  $13.5 \pm 5.34\%$ と最も高い付着率を示した。*Weissella*属の3菌株は全て8%以上と比較的高い付着率を示したが、*Lactobacillus*属はPL1-2株以外、比較的低かった。付着率が高い上位5菌株について、PBSおよび塩酸グアニジンで抽出した菌体表層タンパク質のSDS-PAGE

を行った。SDS-PAGEにおいて、全ての菌株から分子量約64kDaに共通バンドが検出された(図3)。そこで代表として*Weissella viridescens* PB3-7の約64kDaに検出されたバンドをN-末端アミノ酸配列分析に供し、相同性検索の結果を行ったところ、乳酸桿菌由来の熱ショックプロテイン、GroELと同定された。GroELは付着因子としてのいくつかの報告例があるため本菌株においても付着因子として働いている可能性が高いと考えられた。ヒト腸管由来の30菌株についても菌体表層タンパク質のSDS-PAGEを行ったところ、半数以上に発現が確認された。GroELは、PBSで容易に抽出されたことからGAPDH同様、イオン結合により負電荷物質に結合することで菌体表層に留まっていると推測された。GroELは細胞内ではGroESと巨大会合体を形成していることから菌体表層においても会合体として存在するのかわブルーネイティブPAGEを行い、検出を試みたが明確なバンドは得られなかった。GroELは多くの菌に普遍的に発現している可能性が示されたことから、GAPDHと同様有力な付着因子の候補であることが示唆された。

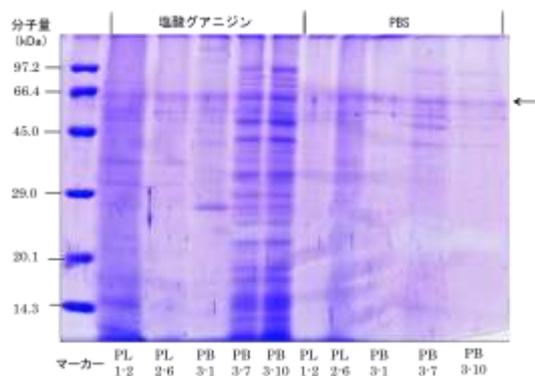


図3. GroELの検出結果 (矢印部分)

## 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7件)

- ① H. Kinoshita, S. Imoto, Y. Suda, M. Ishida, M. Watanabe, Y. Kawai, H. Kitazawa, K. Miura, A. Horii, T. Saito, Proposal of screening method for intestinal mucus adhesive lactobacilli using the enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、Animal Science Journal、査読有、84巻、2013、150-158、DOI:10.1111/j.1740-0929.2012.01054.x.
- ② M. Watanabe, H. Kinoshita, IN. 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, T. Saito, An Adhesin-Like Protein, Lam29, from *Lactobacillus mucosae* ME-340 Binds to Histone H3 and Blood Group Antigens in Human Colonic Mucus、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、査読有、76巻、2012、1655-1660、DOI:http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120150
- ③ 木下英樹、有用乳酸菌の単離と腸管付着メカニズムの解明に関する研究、ミルクサイエンス、査読無、61巻、2012、217-228、http://ci.nii.ac.jp/naid/40019556814
- ④ 木下英樹、井本瞬、須田義人、石田光晴、MRS寒天培地と変法LBS寒天培地における乳酸菌の選択的単離能の比較、査読有、60巻、2011、171-176、http://ci.nii.ac.jp/naid/40019173279
- ⑤ M. Watanabe, H. Kinoshita, M. Nitta, R. Yukishita, Y. Kawai, K. Kimura, N. Taketomo, Y. Yamazaki, Y. Tateno, K. Miura, A. Horii, H. Kitazawa and T. Saito, Identification of a new adhesin-like protein from *Lactobacillus mucosae* ME-340 with specific affinity to the human blood group A and B

antigens、査読有、Journal of applied Microbiology、109巻、2010、927-935、DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04719.x.

- ⑥ 木下英樹、プロバイオティック乳酸菌の酵素活性を有する腸管付着因子とその腸管付着メカニズム、査読有、宮城大学食産業学部紀要、4巻、2010、45-50、http://ci.nii.ac.jp/naid/40017144924

[学会発表] (計7件)

- ① 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、2012年3月28日、名古屋(名古屋大学東山キャンパス)
- ② M. Watanabe, H. Kinoshita, M. Nitta, R. Yukishita, M. Haruta, K. Eguchi, Y. Kawai, K. Kimura, N. Taketomo, K. Miura, A. Horii, H. Kitazawa, T. Saito、Discovery of a new adhesin-like protein from *Lactobacillus mucosae* ME-340 with binding activity to human blood group A and B antigens、The 14th AAAP Animal Science Congress (AAAP2010)、2010年8月27日、National Pingtung University of Science and Technology、台湾
- ③ R. Yukishita, M. Watanabe, M. Nitta, H. Kinoshita, Y. Kawai, K. Miura, A. Horii, J. Z. Xiao, T. Yaeshima, K. Iwatsuki, H. Kitazawa, T. Saito、Search for new *Bifidobacterium* adhesins with specific binding activity to human colonic mucin、The 14th AAAP Animal Science Congress (AAAP2010)、2010年8月27日、National Pingtung University of Science and

Technology、台湾

- ④ H. Kinoshita, S. Imoto, Y. Suda, M. Ishida, M. Watanabe, M. Nitta, R. Yukishita, Y. Kawai, H. Kitazawa, K. Miura, A. Horii, T. Saito, A new method to screen for lactobacilli adhesive to human colonic mucin, The 14th AAAP Animal Science Congress (AAAP2010)、2010年8月24日、National Pingtung University of Science and Technology、台湾
- ⑤ 木下英樹, 井本瞬, 須田義人, 石田光晴, 三浦康, 堀井明, 渡辺真通, 新田将光, 雪下玲奈, 川井泰, 北澤春樹, 齋藤忠夫, GAPDH 酵素活性を指標とした腸管付着性乳酸菌の新規スクリーニング法の検討、日本乳酸菌学会 2010 年度大会, 2010 年 7 月 27 日、仙台 (フォレスト仙台)
- ⑥ 渡辺真通, 新田将光, 雪下玲奈, 春田美由樹, 江口慧, 川井泰, 北澤春樹, 齋藤忠夫, 木下英樹, 三浦康, 堀井明, 木村勝紀, 竹友直生、ヒト ABO 式血液型抗原を介したプロバイオティック乳酸菌の腸管付着性機構に関する研究、日本乳酸菌学会 2010 年度大会、2010 年 7 月 26 日、仙台 (フォレスト仙台)
- ⑦ 雪下玲奈, 渡辺真通, 新田将光, 木下英樹, 川井泰, 北澤春樹, 三浦康, 堀井明, 清水(肖)金忠, 八重島智子, 岩附慧二, 齋藤忠夫、ビフィズス菌の新規ヒト腸管付着性因子 (アドヘシン) の探索と付着機構の解明、日本乳酸菌学会 2010 年度大会、2010 年 7 月 26 日、仙台 (フォレスト仙台)

[図書] (計 1 件)

- ① 木下英樹, 齋藤忠夫、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、京都大学学術出版会、2010、pp. 474-480

[その他]

ホームページ等

<http://www.myu-syoku.jp/university/faculty/Introduction/index/introductionID/51>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 英樹 (KINOSHITA HIDEKI)

研究者番号:

50533288

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

齋藤 忠夫 (SAITO TADAO)

研究者番号:

00118358

石田光晴 (ISHIDA MITSU HARU)

研究者番号:

40151386