

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580397

研究課題名(和文) ムチン付着性を介した乳酸菌の感染予防機構の解析

研究課題名(英文) Evaluation for the prevention of infection by lactic acid bacteria possessing the adhesion ability to mucin

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌やビフィズス菌の宿主に対する有益な効果は、腸粘膜へ付着することが重要である。本研究では、1) Lactobacillusにおいて翻訳伸張因子であるEF-Tuが腸上皮に存在するムチンに付着すること、2) その結合エピトープは硫酸化糖鎖であること、3) Ef-TuはBifidobacteriumにおいてもムチンへの付着因子であること、4) シグナル配列を持たないEF-Tuが細胞外へ確実に分泌されていること、5) Ef-Tu発現株はCampylobacterやピロリ菌の感染を一定のレベルで抑制すること、6) ムチン付着因子とされてきたSpaCとEF-Tuのムチン糖鎖への結合様式は異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of Lactobacillus adhesion have not been fully studied. For the adhesion studies, we firstly demonstrated that the degree of mucin purification influenced adhesion properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains and that several strains had the ability to recognize sulfated and/or sialylated carbohydrates in mucins. Next, we examined the adhesion mechanisms of the bacteria to mucin. As a result, the present study demonstrated that EF-Tu from Lactobacillus and Bifidobacterium strains could bind to sulfated carbohydrate moieties of mucin. It was also shown that EF-Tu is probably secreted to the cell surface through a certain specific mechanism. The strain expressing Ef-Tu on the cell surfaces could partially prevent adhesion or invasion of Campylobacter or Helicobacter to the intestinal cells. Our results provide a promising basis for further characterization of adhesion properties of Lactobacillus and Bifidobacterium to mucosal surfaces of intestine.

研究分野：農学

キーワード：乳酸菌 ビフィズス菌 付着 ムチン 翻訳伸張因子 感染予防 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

食経験のある発酵食品や腸管に由来する細菌の中で、積極的に摂取することで直接的または間接的に腸内フローラを改善し、とくにヒトや動物に対して健康維持効果が期待されるものは、プロバイオティクス (Probiotics) として定義されている。なかでも *Lactobacillus* 属乳酸菌や、*Bifidobacterium* (ビフィズス菌) のもつ生体恒常性の維持あるいは保健的生理機能は、多くの報告例があり、菌株レベルで整腸作用、免疫の活性化、感染予防、アレルギー予防など多岐にわたる効果が明らかにされている。このような観点から乳酸菌やビフィズス菌は、「予防医学」への応用が期待されている状況にある¹⁾。

乳酸菌やビフィズス菌が宿主に対する有益な効果を発揮するためには、まず消化管に定着することが必要とされているが²⁾、そのためには消化管での増殖性と腸上皮に対する付着性が重要な過程である。病原細菌の場合、消化管上皮細胞に付着すると、多くの場合、下痢や嘔吐などの症状を引き起こすことから、その感染機序が詳細に調べられてきた。しかし、乳酸菌やビフィズス菌の付着機構に関する研究は、非常に遅れている状況にある。乳酸菌やビフィズス菌の主な棲息域である十二指腸から大腸の腸粘膜は、ムチンと呼ばれる粘性の糖タンパク質で覆われており、これらを消化管での定着の足掛かりとしていると考えられている。これまで我々は、乳酸菌による病原細菌の付着部位の競合を想定し、感染予防へムチン付着性を有する乳酸菌の利用に関する研究に取り組んできた。特定の乳酸菌株を用いて解析を進めた結果、菌体表層に存在する約 47kDa のタンパク質 (P47) が硫酸化ムチンに結合性を示すことを見出してきた^{3, 4)}。

2. 研究の目的

本研究では、(1) *Lactobacillus* において見出してきた P47 を同定するとともに硫酸化ムチンへの付着機構を明らかにすること、(2) P47 が乳酸菌やビフィズス菌に広く存在し、腸上皮への付着に関与していること、(3) P47 発現株の *Campylobacter* やピロリ菌に対する感染阻止能 (4) ムチン付着因子とされてきた SpaC と P47 のムチン糖鎖への結合様式相違などを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ムチンへの付着性を評価するにあたり、ブタとラットの胃及び結腸(大腸)からムチンを精製することとした。特に精製方法の確立にあたっては、大量に採取できるブタ胃ムチンを用いて行った。精製 P47 タンパク質のアミノ酸配列に基づき degeneratePCR および InversPCR によりクローニングすることで、P47 遺伝子の同定を行った。また、His タグあるいは GST 融合タン

パク質として、同定された遺伝子および SpaC 遺伝子の組換えタンパク質を発現した。発現タンパク質や菌体のムチンや細胞マトリックスタンパク質への結合性は BIACore による表面プラズモン共鳴法あるいは ELISA 法によって評価した。また、付着因子のムチン糖鎖の認識機構は、ムチン糖鎖モノクローナル抗体およびムチン糖鎖共存下におけるムチン結合に対する競合阻害試験、ならびにムチン糖鎖の各種糖鎖分解酵素処理前後の結合性を比較することで、評価した。感染阻害実験には、対象微生物として、*Campylobacter jejuni* および *Helicobacter pylori* とし、前者は *in vitro* およびニワトリに対して、後者は *in vitro* にて感染阻害性を評価した(後者に関しては、研究協力者との共同研究で *in vivo* での評価も行ったが、本報告書で一部引用し結果を提示している)。

4. 研究成果

(1) ムチンの精製レベルが菌株のムチン付着性に及ぼす影響

ブタ消化管由来ムチンは乳酸菌の付着性の評価に広く用いられるが、粘性の性質ゆえに多くの英雑物を含む。本研究では、ブタの消化管からムチン層を剥離し、ゲル濾過クロマトグラフィーと密度勾配超遠心分離を組み合わせた手法により、精製を試みた。その結果、高純度なムチンを精製することに成功した。また、種々のレクチンおよび抗ムチンモノクローナル抗体を用いた ELISA 法により、ブタ大腸ムチンに硫酸化血液型糖鎖あるいは Sd^a タイプ血液型糖鎖構造を含むスルホムチンやシアロムチンが含まれることを明らかにした。

次に、粗精製ムチン(ゲル濾過処理)と精製ムチン(密度勾配超遠心分離処理)に対する *Bifidobacterium* の付着性の評価を検討した結果、ムチンの精製純度が大きな影響を及ぼすことが示された(図1)。

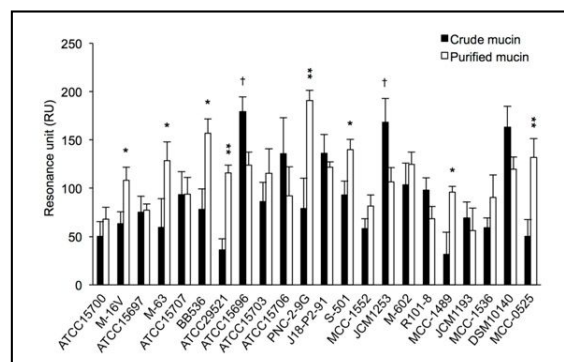


図1 *Bifidobacterium* の純度の異なるブタ結腸ムチンに対する付着性

すなわち、純度の高いムチンに比べ純度の低いムチンに高付着性を示す菌株が存在した。このような菌株の付着性には、ムチンより核酸やタンパク質など夾雑物に対して付

着性を示したことによるものと考えられた。以上から、菌株のムチンへの付着性を評価するためには、密度勾配超遠心分離処理により調製したムチンを供すべきとの結論に至った。

(2) *Lactobacillus reuteri* 産生する P47 タンパク質の同定

P47 の N 末端アミノ酸および内部配列に基づき遺伝子をクローニングし塩基配列を解析した結果、P47 は翻訳伸長因子 (EF-Tu) であることが明らかになった。次に、組み換え EF-Tu タンパク質 (His₆-EF-Tu) を作製し、His₆-EF-Tu の複合糖脂質に対する結合特性を解析した。表面プラズモン共鳴による解析から、His₆-EF-Tu は、非還元末端が硫酸化ガラクトシル基の複合糖脂質に結合すること、スルファチドに対してナノモルオーダーの解離定数を示したこと、非還元末端がガラクトシル基あるいは負の電荷をもつシアル酸には結合しないこと、スルファターゼ処理した硫酸化糖鎖への結合性は未処理糖鎖に比べ著しく結合性が低下することが示された。以上から、EF-Tu は硫酸化糖鎖と特異な相互作用を示すことが示唆された。

ムチンオリゴ糖を競合体としてムチンへの His₆-EF-Tu の結合を競合 ELISA により評価した。酸性オリゴ糖画分の添加は His₆-EF-Tu の結合を濃度依存的に阻害したが、中性オリゴ糖画分による阻害は認められなかった (図 2 左)。また、硫酸化血液型 H タイプ 2 構造をエピトープとする PGM34 モノクローナル抗体あるいは血液型 H タイプ 1 構造をエピトープとする RGM21 モノクローナル抗体を用いた際の結合性を評価すると、His₆-EF-Tu のムチンへの結合性は PGM34 抗体喉依存的に低下した (図 2 右)。

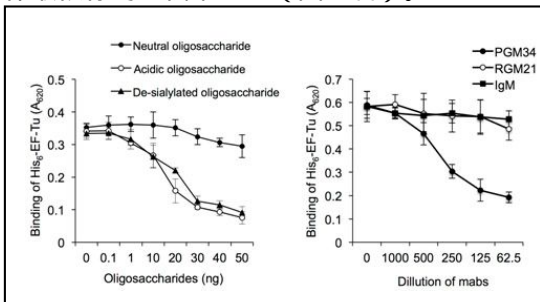


図 2 ムチンに対する His₆-EF-Tu の結合阻害

(左) 競合 ELISA によるブタ胃ムチンに対する His₆-EF-Tu の結合性の評価。(右) 硫酸化血液型 H タイプ 2 構造をエピトープとする PGM34 モノクローナル抗体あるいは血液型 H タイプ 1 構造をエピトープとする RGM21 モノクローナル抗体を用いた際の結合性評価。

次にブタ胃底部粘膜組織への結合性を免疫組織化学的染色および硫酸化糖鎖を染色する HID 染色で染色性を比較することで検討した。その結果、His₆-EF-Tu の反応部位が類似した (図 3)。

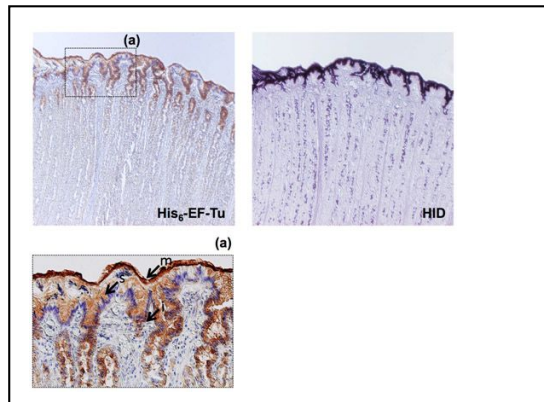


図 3 組織化学的手法による His₆-EF-Tu の結合性の評価

ブタ胃底部粘膜切片に対する His₆-EF-Tu の結合性を評価した。メタノール-カルノア固定した粘膜組織を His₆-EF-Tu (写真・左) または HID (写真・右) により染色した。His₆-EF-Tu (写真・左) の点線部分を 200 倍率で検鏡した写真が (a) である。矢印で示した、粘液ゲル層 (m; mucous gel layer)、表面粘液細胞 (s; surface mucous cells)、胃腺狭部粘液細胞 (i; mucous cells around the isthmus) に対して反応性を示した。

さらに、*L. reuteri* における EF-Tu の局在と付着因子としての機能を評価した。抗 EF-Tu 抗体を用いたウエスタンブロットにより、多くの *L. reuteri* 菌株において EF-Tu が細胞表面に局在することが確認された。EF-Tu は確実に菌体表面に存在することを明らかにすることができたが、菌体表面には pH 依存的に静電的作用で結合していること、特異的な分泌機構で菌体外に分泌されていることが強く示唆された。また、*L. reuteri* 菌体のムチンへの付着性は、抗 EF-Tu 抗体の処理により濃度依存的に阻害され、EF-Tu は、*L. reuteri* の付着因子として機能することが示された。以上より、*L. reuteri* において、EF-Tu はムチンの硫酸化糖鎖に対して特異な結合性をもつ付着因子として機能することが明らかとなった。

(3) スルホムチン付着性を有する乳酸菌やビフィズス菌の検索

EF-Tu を介した付着機構からスルホムチンは確かな乳酸菌の受容体であることが明らかになった。そこで、*Lactobacillus gasseri* をはじめとする乳酸菌およびビフィズス菌のムチンへの付着性を評価した。その結果、多くの菌株がスルホムチンに付着性を示すことを見出した。また、これらの菌株においても EF-Tu の細胞表面局在が確認され、付着因子として機能することが推察された。

(4) 乳酸菌による *Helicobacter* および *Campylobacter* の感染阻害活性の評価

H. pylori は硫酸基に修飾された糖鎖を介して感染することが報告されている。一方、ここまで述べてきたように、硫酸化糖鎖に付着性を示す乳酸菌とその付着因子である EF-Tu

を用いて *H. pylori* の競合阻害を試みた。EF-Tu の組換えタンパク質を用いて臨床分離株を含む複数の *H. pylori* の *in vitro* での付着阻害試験を行ったところ、EF-Tu タンパク質の添加により *H. pylori* のムチンへの付着性は阻害された。また、硫酸化ムチン糖鎖をエpiteop とする PGM34 モノクローナル抗体処理したものと同程度の *H. pylori* の阻害率であることから、EF-Tu による硫酸基を介した *H. pylori* の競合阻害の可能性が強く考えられた。

次に、白色レグホーンの新生雛を感染モデルとした *Campylobacter* の感染抑制試験を試みたところ、腸上皮への付着性を示す *L.gasseri* の投与により、盲腸における *C. jejuni* の定着を減少させることを確認した。また、ヒトモデルとして上皮細胞を用いた実験系においても、*C. jejuni* の定着と細胞侵入を減少させることを確認し、宿主を問わず効果を発揮することが期待された (図 4)。

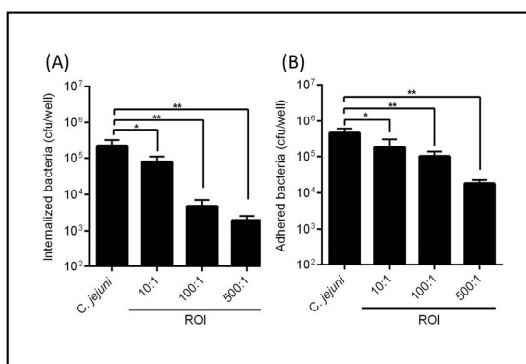


図 4 *Lactobacillus gasseri* による *C. jejuni* 81-176 の Caco-2 細胞への付着 (A) と侵入 (B) に及ぼす影響

次に、感染阻害の作用機序を解析したところ、乳酸や抗菌物質などの代謝産物ではなく、乳酸菌の細胞表面タンパク質の受容体への付着または *C. jejuni* との共凝集性が関与することが示唆された。おそらく EF-Tu や他の表面タンパク質が *C. jejuni* の腸上皮への付着を阻害することで感染を抑制しているものと推察された。

<引用文献>

- 1) 山本裕司, 向井孝夫. ヨーグルト乳酸菌の生態学と人類への恩恵. ビオストーリー, 19: 39-40(2013).
- 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: 21-29 (2008).
- 3) Mukai T., Asasaka T., Sato E., Mori K., Matsumoto M., Ohori H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 31:105-100(2002).
- 4) Mukai T, Kaneko S, Hashizume W, Ohori H. Cell surface-associated proteinaceous substances of *Bifidobacterium bifidum* are

involved in binding to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. Int. J. Food Microbiol. 90:357-362(2004).

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) Nishiyama K, Ueno S, Sugiyama M, Yamamoto Y, Mukai T. *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaC pilin subunit binds to the carbohydrates moieties of intestinal glycoconjugates. Animal Science Journal. 査読あり (Accepted for publication).
- 2) Matsui H, Takahashi T, Øverby A, Murayama SY, Yoshida H, Yamamoto Y, Nishiyama K, Seto Y, Takahashi T, Mukai T, Nakamura M. Mouse Models for Assessing the Protective Efficacy of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against *Helicobacter suis* Infection Associated with the Development of Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. Helicobacter, 査読あり (in press).
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/hel.12203/epdf>
- 3) 西山啓太, 向井孝夫. 乳酸菌とムチンの相互作用 - 糖鎖を介した乳酸菌の腸粘膜への付着機構 -. 応用糖質科学 査読あり. 5(1):61-65(2015).
- 4) Nishiyama K, Nakamata K, Ueno S, Terao A, Aryantini NP, Sujaya IN, Fukuda K, Urashima T, Yamamoto Y, Mukai T. Adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* mucus-binding factor to mucin and extracellular matrix proteins. Biosci Biotechnol Biochem. 査読あり 78:271-279(2015)
- 5) Nishiyama K, Seto Y, Yoshioka K, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. PLoS One. 査読あり, 9: e108827 (2014).
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108827>
- 6) Nishiyama K, Kawanabe A, Miyauchi H, Abe F, Tsubokawa D, Ishihara K, Yamamoto Y, Mukai T. Evaluation of bifidobacterial adhesion to acidic sugar chains of porcine colonic mucins. Biosci Biotechnol Biochem. 査読あり, 78: 1444-1451(2014)
- 7) Nishiyama K, Ochiai A, Tsubokawa D, Ishihara K, Yamamoto Y, Mukai T. Identification and characterization of sulfated carbohydrate-binding protein from *Lactobacillus reuteri*. PLoS One, 査読あり,

8: e83703 (2013).

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0083703>

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 上野慎太郎, 西山啓太, 仲又幸一, Sujaya I. Nengah, 福田健二, 浦島匡, 山本裕司, 向井孝夫. *Lactobacillus rhamnosus* 由来 Mucus-binding factor の消化管粘液成分への付着における役割の評価. 日本畜産学会第 119 回大会. 2015 年 3 月. 宇都宮大学 (宇都宮市).
- 2) 西山啓太, 山本裕司, 向井孝夫, *Lactobacillus rhamnosus* 由来 Spa 線毛の糖鎖結合特性の解析. 日本畜産学会第 119 回大会. 2015 年 3 月. 宇都宮大学 (宇都宮市).
- 3) 西山啓太, 吹谷智, 横田篤, 山本裕司, 向井孝夫. ビフィズス菌におけるシアリダーゼは付着因子として機能する. 2014 年度酪農科学シンポジウム 2014 年 9 月. 昭和女子大学 (東京).
- 4) Nishiyama K, Yamamoto Y, Mukai T. Typical signal sequence-independent export mechanism of elongation factor Tu in *Lactobacillus reuteri*. 11th Symposium on Lactic Acid Bacteria. 2014 年 8 月. Egmond aan Zee, Netherlands.
- 5) 西山啓太, 山本裕司, 向井孝夫. *Lactobacillus reuteri* における Elongation factor Tu のシグナル配列非依存的な分泌機構に関する研究. 日本乳酸菌学会 2014 年度大会. 2014 年 7 月. メルパルク広島 (広島市).
- 6) 向井孝夫, 西山啓太, 山本裕司, 瀬戸康幸. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 の腸内への定着と *Campylobacter jejuni* の競合阻害における aggregation-promoting factor (APF) の役割. 日本乳酸菌学会 2014 年度大会. 2014 年 7 月. メルパルク広島 (広島市).
- 7) 西山啓太, 南條早由利, 遠藤紗耶, 小菅晴香, 山本裕司, 向井孝夫. *Lactobacillus reuteri* における Elongation factor Tu のシグナル配列非依存的な分泌機構に関する研究. 日本農芸化学会 2014 年度大会. 2014 年 3 月. 明治大学 (川崎).
- 8) 向井孝夫. 腸内細菌のはたらきと私たちの健康. ユニコムプラザさがみはら オーサーズカフェ. 2013 年 10 月. ユニコムプラザ相模原 (相模原).
- 9) 西山啓太, 瀬戸康幸, 山本裕司, 向井孝夫. フィブロネクチン付着性乳酸菌による *Campylobacter* の感染予防への活用に向けた研究. 日本乳酸菌学会 2013 年度大会. 2013 年 7 月. 北海道大学 (札幌市).
- 10) 西山啓太, 坪川大悟, 中光貴之, 山本裕司, 市川尊文, 五艘行信, 石原和彦, 向井孝夫. *Lactobacillus reuteri* JCM1081 の EF-Tu の硫酸化糖鎖に対する結合特性の

評価. 日本畜産学会第 115 回大会. 2012 年 3 月. 名古屋大学 (名古屋市).

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) 研究協力者

山本 裕司 (YAMAMATO, Yuji)
北里大学・獣医学部・講師
研究者番号: 10453507

松井 英則 (MATSUI, Hidenori)
北里大学・生命科学研究所・講師
研究者番号: 30219373

西山 啓太 (NISHIYAMA, Keita)
北里大学・獣医学系研究科・大学院生