

氏 名(本籍)	うち 内	だ 田	ひで 英	あき 明
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 9 1 0 号			
学位授与年月日	平 成 19 年 3 月 27 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科生物産業創成科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	ヒト血液型抗原認識性乳酸菌の発見とその腸管付着性機構に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	齋 藤 忠 夫	
	(副 査)	教 授	駒 井 三千夫	
		教 授	池 田 郁 男	
		助教授	北 澤 春 樹	

論文内容要旨

第一章 序論

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は胃炎, 胃潰瘍また胃ガンなどの原因菌として注目され, 本菌の発見者である Warren と Marshall は 2005 年のノーベル医学生理学賞を受賞した. また, 2004 年には, Science 誌にて, ピロリ菌が胃内のヒト血液型 ABO 抗原を認識し, 結合するという報告がなされた. ピロリ菌は, 胃の粘液ムチンに対して全ての血液型に適応できる BabA という付着タンパク質(アドヘシン)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. その他の血液型識別感染症として, ノロウイルス(Norwalk virus)による急性胃腸炎も報告されており, 病原性細菌とヒト血液型抗原の結合性に関する研究が進展している.

1989 年に Fuller により提唱された“プロバイオティクス”の概念は, 宿主に対して有用な健康効果をもたらす微生物の総称として認められつつある. しかしながら, プロバイオティクスの胃酸耐性・胆汁酸耐性に加えて重要な定義の一つである「腸管への付着性」は, 未だ十分にその機構が解明されていない. そこで本研究では, プロバイオティクスの代表である乳酸菌のヒト腸管への付着性について, “ヒトの血液型を認識する”という新たな視点から研究を試みた.

第二章 BIACORE を用いたヒト ABO 式血液型抗原を認識する 乳酸菌の新規選抜方法の開発

1991 年, Amano らにより, ヒト腸管ムチンを構成する糖鎖構造は血液型により異なるという報告がなされた. この科学的事実, 血液型が異なれば各人の消化管ムチンの糖鎖構造も異なり, そこに付着増殖するプロバイオティック乳

酸菌の種類も異なることを強く示唆している。そこで、我が国で最も人口比率の高いA型(ABO式)に注目し、A型健常人のヒト大腸ムチン(human colonic mucin from blood type-A : HCM-A)と、その糖鎖構造の非還元末端に見いだされるA抗原が付与された“A抗原プローブ”を用いた乳酸菌の新規選抜方法の構築を試みた。これまでの腸管付着性試験において、代表的な手法である生菌数測定法は洗浄による測定結果の差異が生じるなどの問題点が多いため、新たにSurface plasmon resonance (SPR)原理を利用したBIACORE 1000という分析装置を導入した(Fig. 1, 2)。本手法は、特別な成分標識をすることなくリアルタイムで付着量を定量的に解析できる装置である。

A抗原およびB抗原プローブに対する*L. acidophilus*グループ乳酸菌21菌株(Table 1)の付着性を測定した(Fig. 3)。*L. crispatus* JCM8778(A₂)はB抗原プローブよりもA抗原プローブに対して強い結合性が確認され、ラムノースプローブに対しては付着性が全く認められなかった(Fig. 4)。*L. crispatus* SBT265およびSBT266株はAおよびB抗原プローブおよびラムノースプローブに対して非常に高い結合性を示した。また、*L. acidophilus* SBT2060(A₁)、*L. amylovorus* SBT281(A₃)の2菌株にはA抗原プローブに対して微量の結合性が確認されたが、他の菌株には全く付着性が見られなかった。A抗原プローブに比べて付着率の減少が認められたものの、HCM-Aに対しても*L. crispatus* JCM8778株は付着性を示した(60RU)。

類似したセンサーグラムを示した*L. crispatus* SBT265と266株はサンプル添加を停止するまでRU値が上昇し続け、通常、菌体が結合したと判断する100~500RU値を大幅に上回った。本現象はA抗原、B抗原プローブおよびラムノースプローブの全てに認められた。本結果より、この2菌株は非特異的結合が非常に強い乳酸菌であると考えられた。一方、これら2菌株と異なり、*L. crispatus*

JCM8778株はA抗原プローブに対しB抗原プローブよりも強く結合したことから、*L. crispatus* JCM8778株はA型認識性乳酸菌“A-type LAB”であることが判明した。また、A抗原プローブを用いた場合と同様に、HCM-Aを用いた場合にも付着性が各菌株で確認されたことから、BP-probeを用いた*in vitro*モデル系とHCMを用いた*in vivo-like*モデル系を組み合わせた本手法は、血液抗原認識性乳酸菌を広くスクリーニングする際に極めて有効であると考えられた。

第三章 ヒト ABO 式血液型認識性乳酸菌のマスクリーニング

本章ではまず始めに、血液型別ヒト大腸ムチン(HCM)を精製後、血液抗原の発現およびムチン様成分の確認をすること、次に、試験する乳酸菌を238菌株(Table 2)にまで増やすことで、まだ存在が確認されていないB型、O型認識性乳酸菌を探索し、ABO式血液型認識性乳酸菌の存在を明らかにすることを目的とした。

血液型別にHCMを調製後、ゲル濾過およびフェノール硫酸法に供し、中性糖含量(OD₄₉₀)およびタンパク質含量(OD₂₈₀)の高い画分で分画した(Fig. 5)。A、B、O型のそれぞれのムチンにおいて、分子量2,000kDa付近の画分に抗原決定基(A型: GalNAc, B型: Gal, O型: Fuc)含量が高く、以降の試験には本精製ムチンを用いた。また、Fig. 6-8に238菌株の各血液型抗原プローブおよび各HCMに対する付着性試験の結果を示した。

BIACOREを用いた実験において、一般に乳酸菌や病原菌などがレセプターや、細胞に接着したと考えられるResonance Unit値(>100RU)に注目して、各血液型認識性乳酸菌の選抜を行い、A-type LABを3菌株(*L. brevis* OLL2772株, OLL2775株および*L. gasseri* OLL2804株)、B-type LABを2菌株(*L. gasseri*

OLL2877およびOLL2901), O-type LABを1菌株(*L. gasseri* OLL2827)を選抜した。

一般的に、ムチンは分子量数百万の高分子の糖タンパク質と考えられるが、本実験で調製した各血液型別ムチンの分子量(HCM-A, HCM-B, HCM-O)は共通して約2,000kDaに存在し、また各種抗原決定基の存在も確認出来たことから、各血液型ムチンは精製されたと考えられた。これまで、ヒト小腸および大腸ムチンの糖鎖構造に“血液型”の面から取り組んでいる研究は非常に少なく、同じ大腸粘膜であっても血液型により、構成糖の組成比が異なるという興味深い知見が得られた。

Table 3に世界中の血液型分布を示したが、世界中ではABO式血液型の分布に偏りが生じており、日本ではA型優勢国となっている(内訳はA型: 38%, B型: 22%, O型: 31%, AB型: 9%)。本章での乳酸菌のスクリーニング結果から、国や地域ごとに各人の腸内に生息している乳酸菌には差異があり、生育しやすい乳酸菌も血液型により異なることが示唆された。本研究で今回使用した菌株も、日本人の糞便由来菌であるため、A型を認識する乳酸菌が多数存在したものと考えられた。

第四章 ヒト A 抗原認識性乳酸菌の腸管付着因子の検討

菌体表層タンパク質(SLP: surface layer protein)が、ヒト腸管付着能力を有することは多数の論文で報告されているが、血液型抗原への結合性については全く調べられていない。前章で選抜した A 抗原認識性乳酸菌 3 菌株(*L. brevis* OLL2772 株, *L. brevis* OLL2775 株および *L. gasseri* OLL2804 株)の SLP を調製し、A 抗原プローブに対する結合性の測定から、付着因子の検討を試みた。

調製したA抗原認識性乳酸菌のSLPをSDS-PAGEに供したところ、*L. brevis* OLL2772株において、約46kDa付近に「単一バンド」が確認された(Fig. 9). また、本バンドのN-末端アミノ酸配列分析により、9残基(KSYATAGAY-)を決定した。DNA Data Bank of Japan (DDBJ)を利用した相同性解析により、本タンパク質は*L. brevis* ATCC8287^T由来のSlpA(S-layer protein)と100%の相同性を示した。*L. brevis* OLL2772株から調製したChromosomal DNAとSlpA特異的プライマーを用いてPCRを行い、*slpA* (ORF)の全塩基配列を決定した(Fig. 10). N-末端アミノ酸配列と同様に、塩基配列についてもATCC8287^T由来の*slpA*と完全に一致した。また、SlpAのA抗原結合特異性を検討するために、抗Aレクチンを用いたA抗原ブロッキング試験を行い、A抗原の特異性を確認した(Fig. 11).

*L. brevis*はヒト腸内に生息するプロバイオティクスとしても知られており、それらが作り出す菌体表層タンパク質が腸内への定着および定住に密接に関わっていることが報告されている。現在、*L. brevis*で報告されているSLPは、*L. brevis* ATCC8287^TのSlpAおよび*L. brevis* ATCC14869のSlpB, SlpC, SlpDの4種類が存在し、いずれも単一の構成成分(タンパク質)から成り立っている。一般的に、この様な特徴を示すSLPを特に「S-layer protein」と呼びSLPと区別している。現在までに、SlpAが細胞外マトリックスを構成するフィブロネクチン、ラミニン、あるいはコラーゲンに対して結合性を有することは明らかにされているが、SlpAの血液型認識・結合性については全く報告されていない。

SlpAの遺伝子情報を基に、細胞膜貫通領域予測ソフト(SOSUI program)を用いて膜貫通領域を予測したところ、30残基からなるシグナルペプチドと435残基から構成される成熟型SlpAが存在し、膜領域をシグナルペプチド領域が1回貫通していることが予測できた(Fig. 12). 本予測において、細胞外に誘導される成熟型SlpAのアミノ酸配列はK(リシン)から始まっており、SDS-PAGEで検出

されたバンドの N-末端アミノ酸配列と完全に一致した。従って、4M のグアニジン塩酸塩による SLP の抽出により、成熟型の SlpA のみが *L. brevis* OLL2772 から調製できたと考えられた。

第五章 ヒト A 抗原識性乳酸菌の腸管付着因子の同定と特性解析

前章の研究成果から、*L. brevis* OLL2772 株の A 抗原結合因子は SlpA であることが判明した。SlpA は Gabriele *et al.* らの報告にもある様に、分子量 46,000 の S-layer protein を形成している。現在までに、フィブロネクチンやラミニンなどに対して結合性を有することが明らかにされてきたが、結合力(親和性)の強さや、結合部位の特定までは至っていない。本章では、BIACORE 測定によるアフィニティー解析を試み、SlpA の A 抗原結合に対する親和性の解明を試みた。

Lactococcus lactis 由来の発現ベクター(pIL253-P32)へ *slpA* を導入し、*Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 株での異種発現を行った(エレクトロポレーション法)。*Lc. lactis* IL1403^{*slpA*} をエリスロマイシン選択培地で 2 回培養後、3 つのコロニーを選抜してダイレクト PCR を行ったところ、全てに *slpA* の導入を確認することができた(Fig. 13)。SDS-PAGE での発現 SlpA を確認後、その凍結乾燥菌体および SLP を調製し A 抗原プローブとの相互作用を測定したところ、*Lactococcus lactis* IL1403^{*slpA*} の凍結乾燥菌体および SLP はコントロールの *Lc. lactis* IL1403^{pIL253-P32} に比べて、共に高い結合性を示した(Fig. 14)。

既存の植物由来の GalNAc 認識レクチンおよび、報告例の少ない動物性の GalNAc 認識レクチン(アメーバ、エスカルゴ等)との相同性解析の結果、共通性の高い保存領域は確認されなかった。

エレクトロトランスフォーメーション法では、目的の遺伝子だけではなく

DNA断片や、供雑DNAの混入が生じることから、一般的には Selection 培地(抗生物質添加培地)に生育したコロニーを Direct PCR し、目的の DNA の存在を確認するが、本実験では、一度 Selection 培地で生育したものを、さらに Selection 培地で生育させ、確実に生育したコロニー中の *slpA* の存在を確認することでセレクション効率の上昇を試みた。*Lactococcus lactis* IL1403^{*slpA*} と *Lactococcus lactis* IL1403^{*pIL253-P32*} を用いた付着試験では、一般的に相互作用があると考えられる付着量(100RU)を *Lactococcus lactis* IL1403^{*slpA*} 由来の SLP において確認することができた。

SlpAのA抗原プローブへの結合センサーグラムからBIA evaluation software を用いて解離定数(K_D)を測定したところ、K_D = 3.6 × 10⁻⁴ という値が得られ、一般的に接着因子として報告されている数値に近い値を示した。また、既存の GalNAc認識レクチンとの相同性解析より、SlpAは既存のレクチン様には見られない、新規な結合様式を持った付着因子であることが判明した。

第六章 結合考察

現在、プロバイオティクスの胃酸耐性・胆汁酸耐性に加えて重要な定義の一つである「腸管への付着性」は、未だ十分にその機構が解明されていない。そこで本研究では、プロバイオティクスの代表である乳酸菌のヒト腸管への付着性について、“ヒトの血液型を認識する”という新たな視点からの研究を試みた。

本研究では、血液型抗原プローブと血液型別のヒト大腸ムチンを用いた新規な乳酸菌のスクリーニング方法の構築に成功した。表面プラズモン共鳴を用いたリアルタイム解析装置である BIACORE を用いることで、従来の手法の難点である再現性の問題や、人為的操作のミスを取り除くことが可能となった。ま

た、大きな母集団のプロバイオティック乳酸菌(238 菌株)に本手法を効果的に用いることが、A-type LAB を 4 菌株(*L. crispatus* JCM8778 株, *L. brevis* OLL2772 株, OLL2775 株および *L. gasseri* OLL2804 株), B-type LAB を 2 菌株(*L. gasseri* OLL2877 および OLL2901), O-type LAB を 1 菌株(*L. gasseri* OLL2827)を発見することに繋がった。日本人に一番多い血液型である A 型に注目して、菌体の表層成分である SLP を調製後に SDS-PAGE に供した結果、*L. brevis* OLL2772 株が単一の表層タンパク質を持つ可能性が示唆された。さらに、A 抗原プローブに対する付着能力測定と遺伝子クローニングの結果から、*L. brevis* OLL2772 株由来の SlpA(S-layer protein)が A 抗原を認識し、結合することが判明した。また SlpA は既存の GalNAc レクチンと比較して高次に保存された領域は無く、既存のレクチン様とは異なる新規な結合様式を持った付着因子であることが判明した。

現在、ピロリ菌やノロウイルスと同じレセプター(血液抗原)を介してヒト腸管に定着する乳酸菌の選抜に取り組んでおり、将来的にはこれらの感染症に対して血液型乳酸菌を用いることで、消化管での特定の疾病などに対して予防や治療医学の観点からヒトの腸内健康にアプローチが可能と考えられる。今後、これら腸内有害菌による感染症の防御なども視野に入れた、各人の血液型に応じた食品やプロバイオティック製剤など夢のある商品群の創成が期待される。

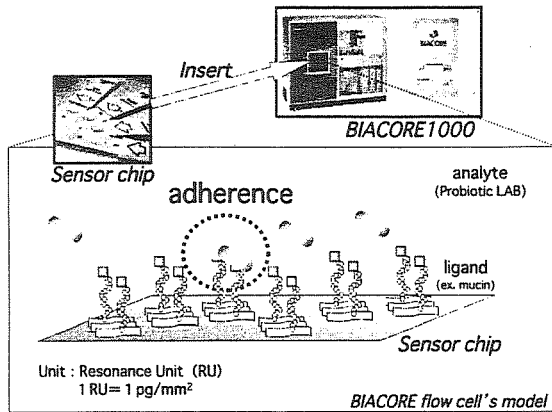


Fig. 1 The screening model of LAB using the BIACORE

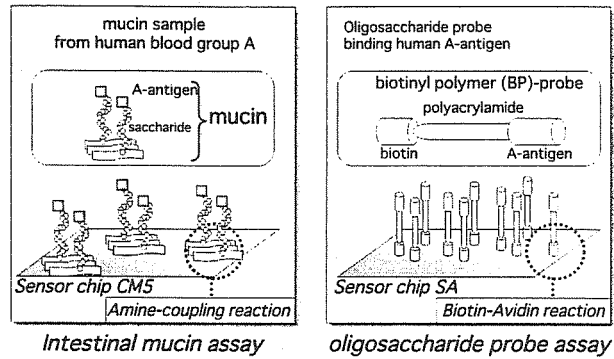


Fig. 2 Preparation of Sensor chips (immobilized two ligands)

Table 1 *L. acidophilus* group bacteria used in this study

Strain	Source	Strain	Source
<i>L. acidophilus</i> (A ₁)		<i>L. gallinarum</i> (A ₊)	
JCM1132 [*]	a		
JCM1229	b		
LA67	a		
SBT280	a	<i>L. gassen</i> (B ₁)	
SBT2060	a	JCM1131 [†]	b
SBT2062	d	F191	a
<i>L. crispatus</i> (A ₂)		LA2	c
JCM8778	a	LA39	c
SBT265	a	LA46	c
SBT266	a	SBT296	a
<i>L. amyloversus</i> (A ₃)		SBT2055	a
JCM2125	b	<i>L. johnsonii</i> (B ₂)	
LA60	c	SBT277	a
SBT281	a	SBT1768	a

a: human feces b: human intestine
c: infant feces d: unknown (Total 21 strains)

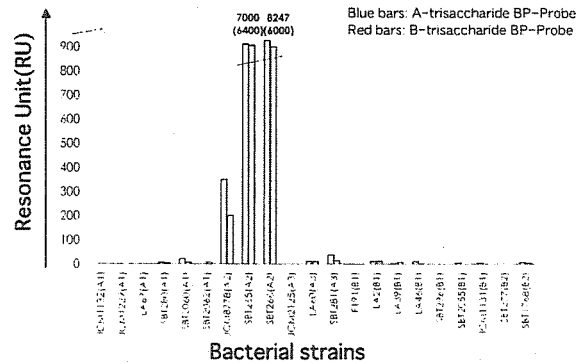


Fig. 3 Total RU values of *L. acidophilus* group adhering to two ligands using BIACORE analysis

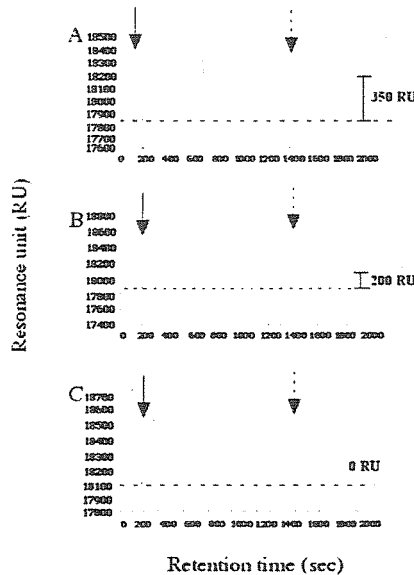


Fig. 4 The measured RU value (adherence) of *L. crispatus* JCM8778 (A₂) to each BP-Probe

A: A-trisaccharide BP-Probe, B: B-trisaccharide BP-Probe
C: α-L-Rhamnose BP-Probe
injection → End injection → →

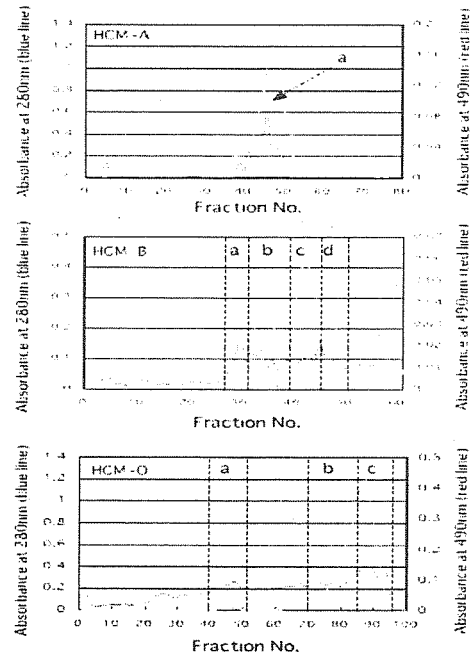


Fig. 5 Purification of A, B and O-type human colonic mucin (HCM) by gel filtration chromatography and phenol-sulfuric acid method

Fractions collected each 5ml were monitored at absorbances of 280nm for protein and 490nm for neutral sugar.

Table 2 Lactobacilli used in this study

No.	Strain	No.	Strain	No.	Strain	No.	Strain	No.	Strain	No.	Strain
OLL2741	<i>L. amylovorus</i>	OLL2781	<i>L. mucosae</i>	OLL2821	<i>L. crispatus</i>	OLL2861	<i>L. gasseri</i>	OLL2901	<i>L. gasseri</i>	OLL2940	<i>L. johnsonii</i>
OLL2742	<i>L. mucosae</i>	OLL2782	<i>L. mucosae</i>	OLL2822	<i>L. crispatus</i>	OLL2862	<i>L. vrs</i>	OLL2902	<i>L. gasseri</i>	OLL2941	<i>L. gasseri</i>
OLL2743	<i>L. mucosae</i>	OLL2783	<i>L. mucosae</i>	OLL2823	<i>L. casei</i>	OLL2863	<i>L. gasseri</i>	OLL2903	<i>L. gasseri</i>	OLL2942	<i>L. gasseri</i>
OLL2744	<i>L. mucosae</i>	OLL2784	<i>L. mucosae</i>	OLL2824	<i>L. salivarius</i>	OLL2864	<i>L. gasseri</i>	OLL2904	<i>L. gasseri</i>	OLL2943	<i>L. fermentum</i>
OLL2745	<i>L. mucosae</i>	OLL2785	<i>L. mucosae</i>	OLL2825	<i>L. fermentum</i>	OLL2865	<i>L. gasseri</i>	OLL2905	<i>L. gasseri</i>	OLL2944	<i>L. gasseri</i>
OLL2746	<i>L. mucosae</i>	OLL2786	<i>L. mucosae</i>	OLL2826	<i>L. gasseri</i>	OLL2866	<i>L. gasseri</i>	OLL2906	<i>L. gasseri</i>	OLL2945	<i>L. gasseri</i>
OLL2747	<i>L. mucosae</i>	OLL2787	<i>L. gasseri</i>	OLL2827	<i>L. gasseri</i>	OLL2867	<i>L. gasseri</i>	OLL2907	<i>L. gasseri</i>	OLL2946	<i>L. fermentum</i>
OLL2748	<i>L. mucosae</i>	OLL2788	<i>L. salivarius</i>	OLL2828	<i>L. fermentum</i>	OLL2868	<i>L. gasseri</i>	OLL2908	<i>L. gasseri</i>	OLL2947	<i>L. gasseri</i>
OLL2749	<i>L. mucosae</i>	OLL2789	<i>L. salivarius</i>	OLL2829	<i>L. crispatus</i>	OLL2869	<i>L. gasseri</i>	OLL2909	<i>L. gasseri</i>	OLL2948	<i>L. gasseri</i>
OLL2750	<i>L. amylovorus</i>	OLL2790	<i>L. salivarius</i>	OLL2830	<i>L. gasseri</i>	OLL2870	<i>L. vrs</i>	OLL2910	<i>L. fermentum</i>	OLL2949	<i>L. gasseri</i>
OLL2751	<i>L. mucosae</i>	OLL2791	<i>L. gasseri</i>	OLL2831	<i>L. gasseri</i>	OLL2871	<i>L. fermentum</i>	OLL2911	<i>L. gasseri</i>	OLL2950	<i>L. gasseri</i>
OLL2752	<i>L. mucosae</i>	OLL2792	<i>L. salivarius</i>	OLL2832	<i>L. fermentum</i>	OLL2872	<i>L. salivarius</i>	OLL2912	<i>L. gasseri</i>	OLL2951	<i>L. gasseri</i>
OLL2753	<i>L. gasseri</i>	OLL2793	<i>L. gasseri</i>	OLL2833	<i>L. fermentum</i>	OLL2873	<i>L. gasseri</i>	OLL2913	<i>L. gasseri</i>	OLL2952	<i>L. vaarnalis</i>
OLL2754	<i>L. vrs</i>	OLL2794	<i>L. gasseri</i>	OLL2834	<i>L. fermentum</i>	OLL2874	<i>L. gasseri</i>	OLL2914	<i>L. fermentum</i>	OLL2953	<i>L. gasseri</i>
OLL2755	<i>L. gasseri</i>	OLL2795	<i>L. casei</i>	OLL2835	<i>L. salivarius</i>	OLL2875	<i>L. gasseri</i>	OLL2915	<i>L. gasseri</i>	OLL2954	<i>L. reuteri</i>
OLL2756	<i>L. mucosae</i>	OLL2796	<i>L. salivarius</i>	OLL2836	<i>L. gasseri</i>	OLL2876	<i>L. fermentum</i>	OLL2916	<i>L. gasseri</i>	OLL2955	<i>L. vrs</i>
OLL2757	<i>L. reuteri</i>	OLL2797	<i>L. casei</i>	OLL2837	<i>L. gasseri</i>	OLL2877	<i>L. gasseri</i>	OLL2917	<i>L. salivarius</i>	OLL2956	<i>L. lactifer</i>
OLL2758	<i>L. reuteri</i>	OLL2798	<i>L. casei</i>	OLL2838	<i>L. rhamnosus</i>	OLL2878	<i>L. amylovorus</i>	OLL2918	<i>L. vrs</i>	OLL2957	<i>L. gasseri</i>
OLL2759	<i>L. gasseri</i>	OLL2799	<i>L. casei</i>	OLL2839	<i>L. rhamnosus</i>	OLL2879	<i>L. gasseri</i>	OLL2919	<i>L. gasseri</i>	OLL2958	<i>L. fermentum</i>
OLL2760	<i>L. vrs</i>	OLL2800	<i>L. casei</i>	OLL2840	<i>L. rhamnosus</i>	OLL2880	<i>L. amylovorus</i>	OLL2920	<i>L. gasseri</i>	OLL2959	<i>L. gasseri</i>
OLL2761	<i>L. casei</i>	OLL2801	<i>L. casei</i>	OLL2841	<i>L. fermentum</i>	OLL2881	<i>L. mucosae</i>	OLL2921	<i>L. mucosae</i>	OLL2960	<i>L. gasseri</i>
OLL2762	<i>L. salivarius</i>	OLL2802	<i>L. gasseri</i>	OLL2842	<i>L. gasseri</i>	OLL2882	<i>L. mucosae</i>	OLL2922	<i>L. gasseri</i>	OLL2961	<i>L. gasseri</i>
OLL2763	<i>L. salivarius</i>	OLL2803	<i>L. fermentum</i>	OLL2843	<i>L. salivarius</i>	OLL2883	<i>L. mucosae</i>	OLL2923	<i>L. vrs</i>	OLL2962	<i>L. gasseri</i>
OLL2764	<i>L. salivarius</i>	OLL2804	<i>L. gasseri</i>	OLL2844	<i>L. fermentum</i>	OLL2884	<i>L. gasseri</i>	OLL2924	<i>L. gasseri</i>	OLL2963	<i>L. gasseri</i>
OLL2765	<i>L. gasseri</i>	OLL2805	<i>L. gasseri</i>	OLL2845	<i>L. fermentum</i>	OLL2885	<i>L. mucosae</i>	OLL2925	<i>L. gasseri</i>	OLL2964	<i>L. crispatus</i>
OLL2766	<i>L. plantarum</i>	OLL2806	<i>L. gasseri</i>	OLL2846	<i>L. mucosae</i>	OLL2886	<i>L. amylovorus</i>	OLL2926	<i>L. gasseri</i>	OLL2965	<i>L. vrs</i>
OLL2767	<i>L. plantarum</i>	OLL2807	<i>L. vrs</i>	OLL2847	<i>L. amylovorus</i>	OLL2887	<i>L. mucosae</i>	OLL2927	<i>L. vrs</i>	OLL2966	<i>L. gasseri</i>
OLL2768	<i>L. casei</i>	OLL2808	<i>L. vrs</i>	OLL2848	<i>L. mucosae</i>	OLL2888	<i>L. mucosae</i>	OLL2928	<i>L. gasseri</i>	OLL2967	<i>L. gasseri</i>
OLL2769	<i>L. gasseri</i>	OLL2809	<i>L. gasseri</i>	OLL2849	<i>L. rhamnosus</i>	OLL2889	<i>L. mucosae</i>	OLL2929	<i>L. gasseri</i>	OLL2968	<i>L. gasseri</i>
OLL2770	<i>L. plantarum</i>	OLL2810	<i>L. gasseri</i>	OLL2850	<i>L. salivarius</i>	OLL2890	<i>L. mucosae</i>	OLL2930	<i>L. mucosae</i>	OLL2969	<i>L. gasseri</i>
OLL2771	<i>L. gasseri</i>	OLL2811	<i>L. mucosae</i>	OLL2851	<i>L. gasseri</i>	OLL2891	<i>L. amylovorus</i>	OLL2931	<i>L. gasseri</i>	OLL2970	<i>L. gasseri</i>
OLL2772	<i>L. brevis</i>	OLL2812	<i>L. crispatus</i>	OLL2852	N/A	OLL2892	<i>L. mucosae</i>	OLL2932	<i>L. vrs</i>	OLL2971	<i>L. gasseri</i>
OLL2773	<i>L. fermentum</i>	OLL2813	<i>L. gasseri</i>	OLL2853	<i>L. salivarius</i>	OLL2893	<i>L. mucosae</i>	OLL2933	<i>L. gasseri</i>	OLL2972	<i>L. gasseri</i>
OLL2774	<i>L. fermentum</i>	OLL2814	<i>L. gasseri</i>	OLL2854	<i>L. salivarius</i>	OLL2894	<i>L. mucosae</i>	OLL2934	<i>L. gasseri</i>	OLL2973	<i>L. crispatus</i>
OLL2775	<i>L. brevis</i>	OLL2815	<i>L. gasseri</i>	OLL2855	<i>L. mucosae</i>	OLL2895	<i>L. mucosae</i>	OLL2935	<i>L. gasseri</i>	OLL2974	<i>L. gasseri</i>
OLL2776	<i>L. brevis</i>	OLL2816	<i>L. crispatus</i>	OLL2856	<i>L. mucosae</i>	OLL2896	<i>L. mucosae</i>	OLL2936	<i>L. gasseri</i>	OLL2975	<i>L. gasseri</i>
OLL2777	<i>L. gasseri</i>	OLL2817	<i>L. crispatus</i>	OLL2857	<i>L. casei</i>	OLL2897	<i>L. mucosae</i>	OLL2937	<i>L. fermentum</i>	OLL2976	<i>L. gasseri</i>
OLL2778	<i>L. fermentum</i>	OLL2818	<i>L. gasseri</i>	OLL2858	<i>L. reuteri</i>	OLL2898	<i>L. gasseri</i>	OLL2938	<i>L. johnsonii</i>	OLL2977	<i>L. vrs</i>
OLL2779	<i>L. vrs</i>	OLL2819	<i>L. gasseri</i>	OLL2859	<i>L. casei</i>	OLL2899	<i>L. gasseri</i>	OLL2939	<i>L. fermentum</i>		
OLL2780	<i>L. gasseri</i>	OLL2820	<i>L. vrs</i>	OLL2860	<i>L. mucosae</i>	OLL2900	<i>L. gasseri</i>	OLL2940	<i>L. gasseri</i>		

(Total 238 lactobacilli strains)

Isolated from human feces and identified to be lactobacilli through API 50CHL analytical system and 16S rRNA analysis.

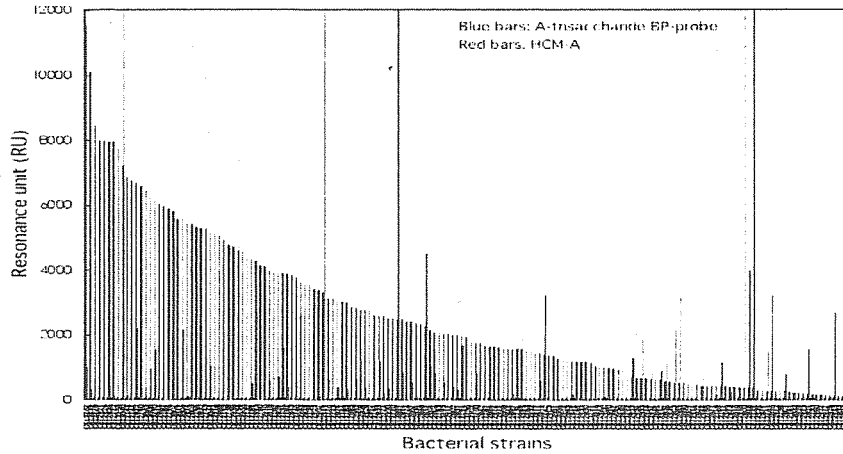


Fig. 6 Total RU values of LAB adhering to A-type ligands using BIACORE analysis.

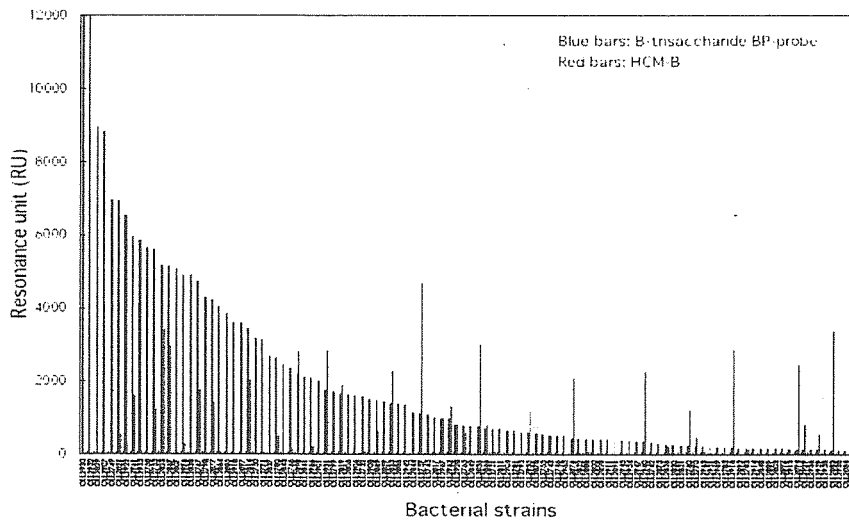


Fig. 7 Total RU values of LAB adhering to B-type ligands using BIACORE analysis.

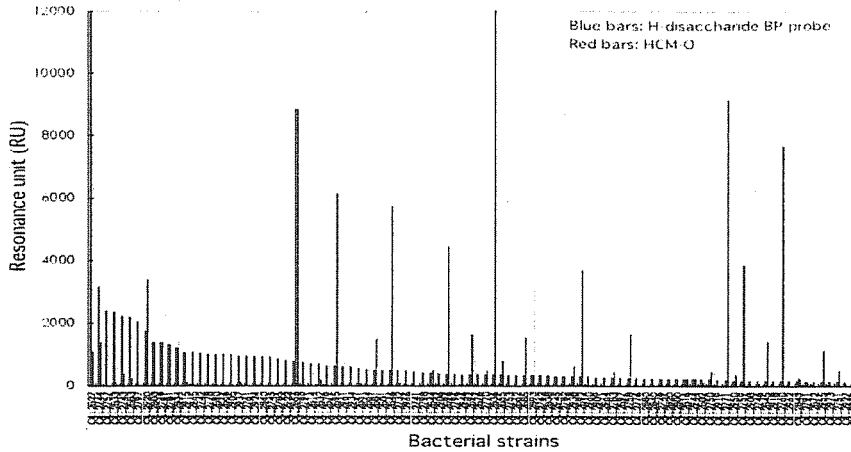


Fig. 8 Total RU values of LAB adhering to O(H)-type ligands using BIAcore analysis.

Table 3 The distribution of ABO blood type in the world(%)

Country	A	B	O	AB	Country	A	B	O	AB
India	21	40	31	8	Colombia	27	10	61	2
Thailand	22	33	39	6	Turkey	43	16	32	7
Azerbaijan	18	29	49	4	Greece	39	13	43	5
Vietnam	22	30	43	5	Bulgaria	45	15	32	8
Burma	25	32	35	8	Italy	39	12	44	5
Pakistan	25	31	34	10	Austria	44	13	39	4
Iran	28	28	36	8	America	40	11	48	4
Yemen	24	24	47	5	Australia	39	10	48	3
Indonesia	27	26	40	7	Brazil	40	10	47	3
Philippines	26	24	45	5	Argentina	40	10	47	3
Iraq	30	26	37	7	Lebanon	47	12	36	5
Taiwan	27	23	44	6	Denmark	45	11	41	3
Morocco	29	23	42	7	Germany	45	10	41	4
Egypt	34	24	36	6	Netherlands	43	9	45	3
Nepal	37	24	30	9	England	42	9	47	3
Japan	38	22	31	9	Belgium	43	8	48	3
South Korea	38	19	34	9	Norway	50	9	38	3
Poland	39	19	33	9	Portugal	48	8	41	3
Hungary	42	19	30	9	France	44	7	46	3
Israel	41	17	36	6	Spain	46	7	44	3
Romania	47	19	28	6	Sweden	46	7	44	3
Finland	46	17	37	6	Switzerland	50	7	40	3

http://www010.upp.se/~net.ne.jp/abofan/index.htm



Fig. 9 SDS-PAGE analysis of SLP from *L. brevis* OLL2772

Electrophoresis was performed in polyacrylamide slab gels denaturing with SDS in a 4.5% stacking gel and a 13% separation gel using the Laemmli method.

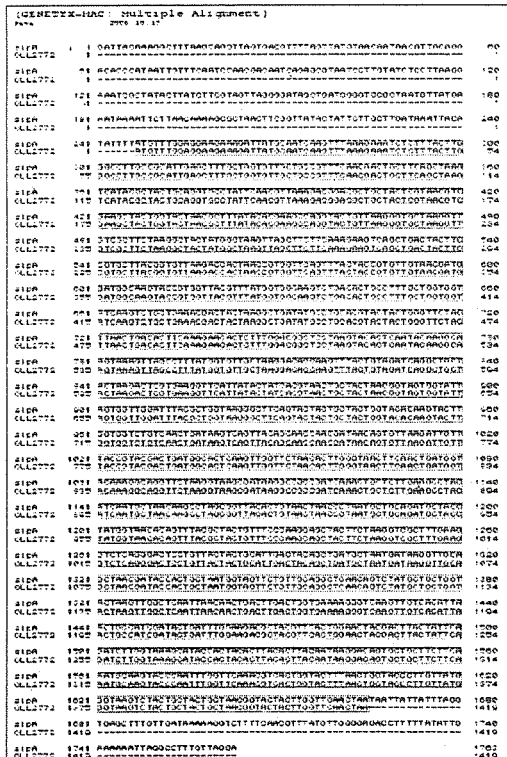


Fig. 10 Alignment of deduced nucleotide sequence of SLP ORF from *L. brevis* OLL2772 and *slpA* from *L. brevis* ATCC8287

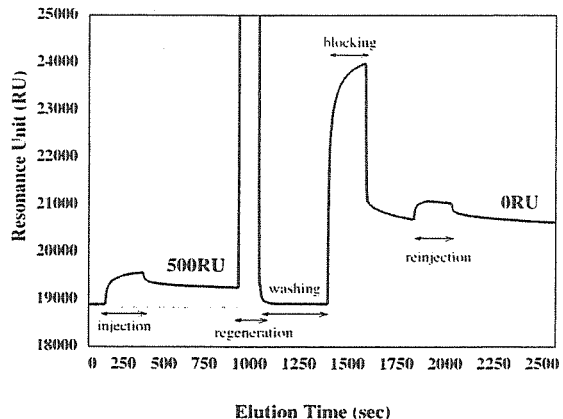


Fig. 11 Specific binding of the SlpA from *L. brevis* OLL2772 to human A-antigen

The differences in RU values before and after blocking with anti-A lectin were detected using three steps: injection, regeneration and blocking. An SlpA suspension from *L. brevis* OLL2772 was injected into the flow cell of a sensor chip immobilized using the A-trisaccharide BP-Probe "human A-antigen" (injection step). After the RU value was measured, the binding SLP was removed from the A-antigen with 3M GHCL solution (regeneration step). After washing the sensor chip with HBS-EP buffer, the human A-antigens were blocked using 20μl of anti-A lectin (blocking step). The SlpA suspension was re-injected into the sensor chip followed by anti-A lectin and the RU values were measured. The difference in RU values before and after blocking with anti-A lectin was determined in duplicate.

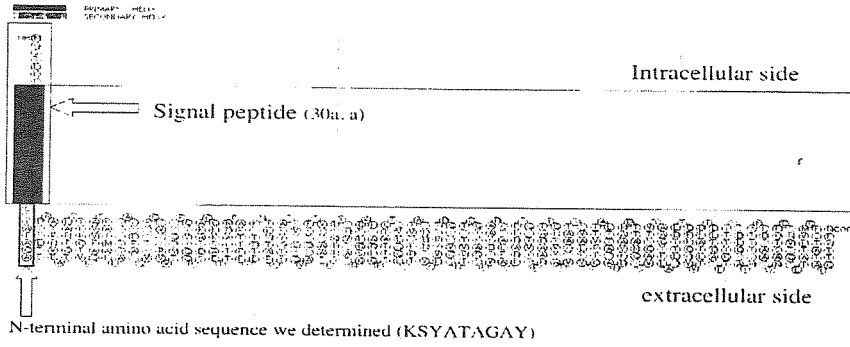


Fig. 12 Prediction for transmembrane region of SlpA (SOSUI)

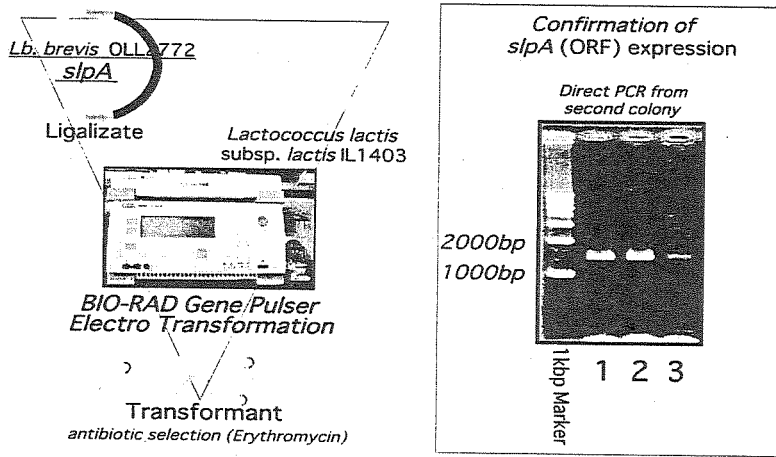


Fig. 13 The procedure of preparation of transformant and confirmation of *slpA* (ORF) expression

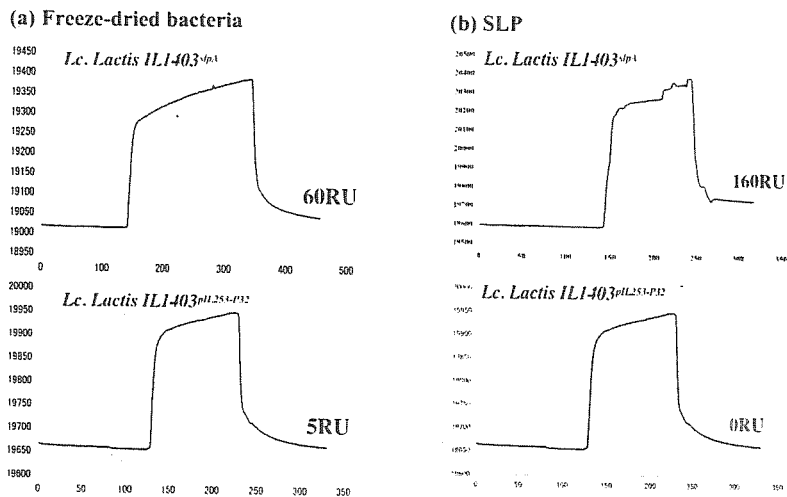


Fig. 14 The total RU of (a) freeze-dried or (b) SLP from *Lc. lactis* IL1403^{slpA} and *Lc. lactis* IL1403^{pIL254-P32} toward the A-trisaccharide BP-Probe

論文審査結果要旨

近年、胃潰瘍や胃癌の原因菌と考えられるピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) が、ヒト血液型抗原を認識・結合することで病原性を発現することが報告され、ある種の消化器系疾患が血液認識性微生物による可能性が指摘された。そこで本研究者は、同様の機構で消化管に結合する有用なプロバイオティクスの存在を予測し、自ら開発したマススクリーニング法を用いて世界で初めて血液型認識性乳酸菌を発見し、その特異的付着性機構のほぼ全貌を解明した。

まず、本研究者は二成分間の相互作用を解析するバイオセンサー：BIACORE を用いて、リガンドとして合成糖鎖プローブ/ヒト大腸ムチン (HCM) を結合させ、アナライトとして各種乳酸菌/細胞表層タンパク質を流し、両者の相互作用を検討する系を初めて開発した。

次に、リガンドにヒト ABO 式血液型抗原を結合した合成糖鎖プローブおよび各種血液型別 HCM を結合したセンサーチップを作成し、ヒト糞便起源の 280 株余の乳酸菌との付着性を検討し、A、B および O 型抗原認識性乳酸菌の存在を世界で初めて示した。

次に、マススクリーニングにより選抜された *Lactobacillus brevis* OLL2772 株の示す強い A 抗原結合性機構を解明するために、まず結合因子成分の単離と N-末端アミノ酸配列分析を行い、本成分は *L. brevis* ATCC8287^T 由来の S-layer protein (SlpA) と完全に一致した。また、同菌の染色体 DNA からの SLP 遺伝子クローニングも実施し、糖鎖を認識するレクチン様タンパク質と同定された。

次に、SlpA をコードする遺伝子 *slpA* を遺伝子導入して *Lactococcus lactis* に発現させ、同菌体がヒト A 抗原糖鎖に結合性を獲得することを確認した。また、この SlpA 表層発現 *Lc. lactis* は BIACORE 解析でも新たに結合性を獲得した。本成分のカイネティック解析の結果、解離定数は 10^{-4} レベルと A 抗原に対して中程度の結合性であることを明らかにし、従来の GalNAc レクチンとは一致しない新しい機構で A 抗原を認識していることを示唆した。

以上のように、本研究者はヒト A 抗原結合性のプロバイオティック乳酸菌の発見とその結合機構について、ほぼ全体像を解明したものと高く評価され、今後の応用研究が期待された。従って、最終試験委員一同は、本研究者に博士 (農学) の学位を授与するのに値するものと認定した。