

解 説

ヒト血液型を認識するプロバイオティック乳酸菌の発見

内田 英明・川井 泰・齋藤 忠夫*

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に輝いた。また, 2004年には Science 誌において, 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¹⁾。ピロリ菌は, 胃粘液中の糖タンパク質である胃ムチンの結合糖鎖に対して, すべての血液型に適応できるアドヘシン (BabA) という付着タンパク質を有することで, 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²⁾。

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。我々は, 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”という新たな切り口から研究を試みた。

プロバイオティクスと腸管付着性

一般的に, プロバイオティクスの機能において, “ヒト腸管付着性”はその後の有用効果の継続にきわめて重要であると考えられている。なぜならば, 腸管感染の予防³⁾, 抗生物質誘導下痢症の改善⁴⁾, 便秘の予防や改善⁵⁾, コレステロール代謝の改善^{6,7)}, 免疫賦活化作用⁸⁾, 発ガン抑制作用⁹⁾などの生理機能は, 乳酸菌が一時的に腸内を通過するだけでは十分に発揮されないためである。したがって, 恒常的にこのような有用な機能性を維持するためには, 乳酸菌の腸内への定着・増殖が必要である (図1)。また, 乳酸菌がヒト腸管に付着するためには, 腸管

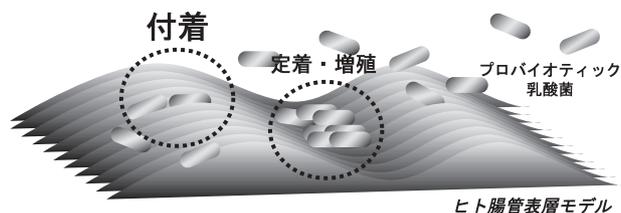


図1. プロバイオティック乳酸菌のヒト腸管表層への付着模式図

上皮細胞を保護的に被覆している「腸ムチン」に結合することが最有力だと我々は考えている。ヒトの腸ムチン層は, 哺乳動物の中では最も厚いと考えられ, 運動性のない乳酸菌が自ら移動して腸管上皮細胞表層に到達することは不可能と考えられるからである。

我々は, ヒト腸ムチンの非還元末端に発現している血液型抗原 (ABO血液型) に特異的に結合する乳酸菌の存在を予測した。表1には世界における血液型分布を示したが¹⁰⁾, 各国に住む人々のABO式血液型の分布は, 一般的に偏りが存在する。したがって, 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, 腸管系乳酸菌も血液型により異なる可能性が示唆される。次項からは, 血液型に注目した新しいヒト腸管付着性プロバイオティクスの選抜システムの提案と血液型認識性乳酸菌の発見およびその将来性について解説する。

乳酸菌の新規スクリーニング法の構築

当研究室ではこれまで, ヒト腸管付着性を検討する際に, ヒト大腸ムチンと類似構造を有するラット大腸ムチン (RCM: rat colonic mucin) を使用していた¹¹⁾。しかし, ヒトABO式血液型抗原への付着性研究を実施するためには, ヒト大腸粘膜に存在している大腸ムチン (HCM: human colonic mucin) とその糖鎖を直接使用することが望ましく, より正しいヒトへの評価が期待できる。そこで, 東北大学大学院医学研究科の協力を得て, 大腸ガン患者の手術時に摘出される大腸正常部位より HCM を

* 著者紹介 東北大学大学院農学研究科生物産業創成科学専攻 (教授) E-mail: tsaito@bios.tohoku.ac.jp

表1. 世界のヒトABO式血液型分布 (%)

国名	A 型	B 型	O 型	AB 型
インド	21	40	31	8
タイ	22	33	39	6
アフガニスタン	18	29	49	4
ベトナム	22	30	43	5
ビルマ	25	32	35	8
パキスタン	25	31	34	10
イラン	28	28	36	8
クウェート	24	24	47	5
インドネシア	27	26	40	7
フィリピン	26	24	45	5
イラク	30	26	37	7
台湾	27	23	44	6
モロッコ	29	23	42	7
エジプト	34	24	36	6
ネパール	37	24	30	9
日本	38	22	31	9
チェコスロバキア	38	19	34	9
ポーランド	39	19	33	9
ハンガリー	42	19	30	9
イスラエル	41	17	36	6
ルーマニア	47	19	26	8
フィンランド	46	17	37	6
コロンビア	27	10	61	2
トルコ	43	16	32	7
ギリシャ	39	13	43	5
ブルガリア	45	15	32	8
イタリア	39	12	44	5
オーストリア	44	13	39	4
アメリカ	40	11	46	4
オーストラリア	39	10	48	3
ブラジル	40	10	47	3
アルゼンチン	40	10	47	3
レバノン	47	12	36	5
デンマーク	45	11	41	3
ドイツ	45	10	41	4
オランダ	43	9	45	3
イギリス	42	8	47	3
ベルギー	43	8	46	3
ノルウェー	50	9	38	3
ポルトガル	48	8	41	3
フランス	44	7	46	3
スペイン	46	7	44	3
スウェーデン	46	7	44	3
スイス	50	7	40	3

調製し、ヒト腸管付着性乳酸菌の選抜に使用することを可能とした。

ヒトの各臓器起源の粘液ムチンにおける ABO 式血液型抗原の発現率はすでに報告がある¹²⁾。乳酸菌の生育部位として注目される大腸(結腸)では23%、空腸および回腸ではそれぞれ80%および56%であり、消化管上部での発現率が高い。胃では興味深いことに、発現率は100%と最も高かった。ピロリ菌はこの特性をうまく利用してヒトに感染し、生息域を拡大していることが理解できる。大腸表面に分泌される HCM は、結合糖鎖末端に血液型抗原(3糖または2糖構造)を発現している。たとえば、A型に対する血液型認識性乳酸菌(A型乳酸菌)は、A抗原を認識するレクチン(様物質)を細胞膜表面に特異的に発現していることが考えられ、腸粘膜表面での一般のプロバイオティクスとの棲み分けが期待できる(図2)。

さて、プロバイオティック乳酸菌の腸管付着能力を評価する場合、その評価系が非常に重要な問題である。現在、最も一般的な手法は、不死化したセルラインであるヒト腸管上皮細胞のCaco-2細胞やHT29細胞などをヒト腸管モデルとして用いる方法である。これらの細胞表層に菌体を添加して反応・洗浄後に、光学または電子顕微鏡を用いて目視で算定する、もしくは菌体を放射性同位体ラベルして放射活性量または蛍光ラベルして吸光度により定量する研究手法などがあげられる^{13,14)}。しかしながら、乳酸菌が健常人の厚い HCM をかいくぐり、ヒト腸管上皮細胞に到達することは困難であると考えられる。また、一般的にムチンを含む細胞表層の糖質の変化が、細胞の癌化の一般的な特徴として認められており、これらの変化が、細胞の接着性の変化に影響を与えていることもすでに検証されているため^{15,16)}、セルラインを通常の健常人における乳酸菌の付着研究用に用いることは好ましくない。

そこで、HCM 糖鎖とプロバイオティクスの相互作用を検討するために、表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance: SPR)を利用して2分子間の相互作用を観察するピアコア(BIACORE)を初めて本分野の研究に導入した(図3)^{17,18)}。本手法は、特別な成分の標識を行うことなくリアルタイムで付着量を定量的に解析可能な装置である。また、BIACOREにおいては、菌体の洗浄作業時などに人為的な操作が入らないために再現性が高く、これまでの洗浄後の細胞表層に残った菌数をカウントして評価する手法に比べて高い信頼性が得られる。

本実験では、血液型抗原が付与された市販のビオチニル化ポリマープローブ、または生体からの HCM をリガンドとして BIACORE センサーチップ表面に固定化し、菌体または菌体表層タンパク質(surface layer protein:

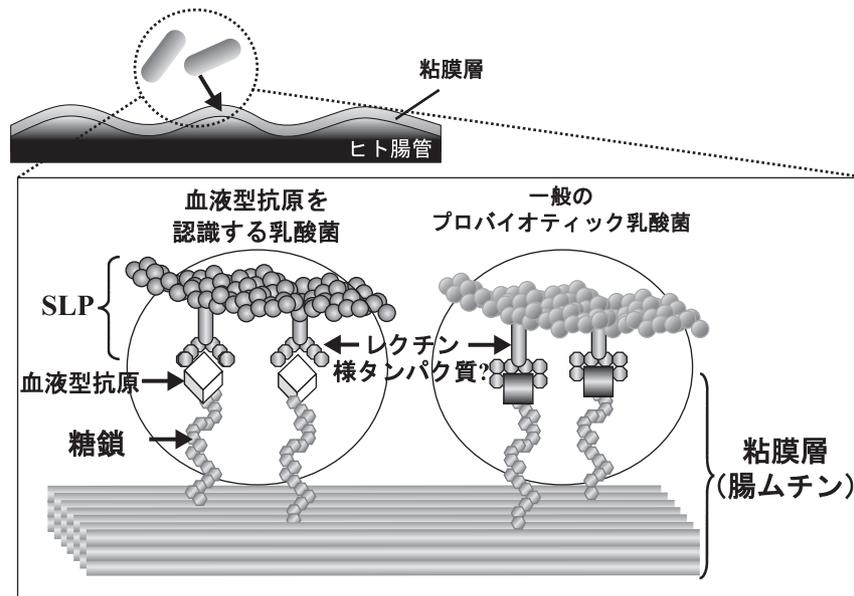


図2. 血液型抗原認識性乳酸菌のヒト腸ムチン糖鎖への付着様式. SLP, 菌体表層タンパク質.

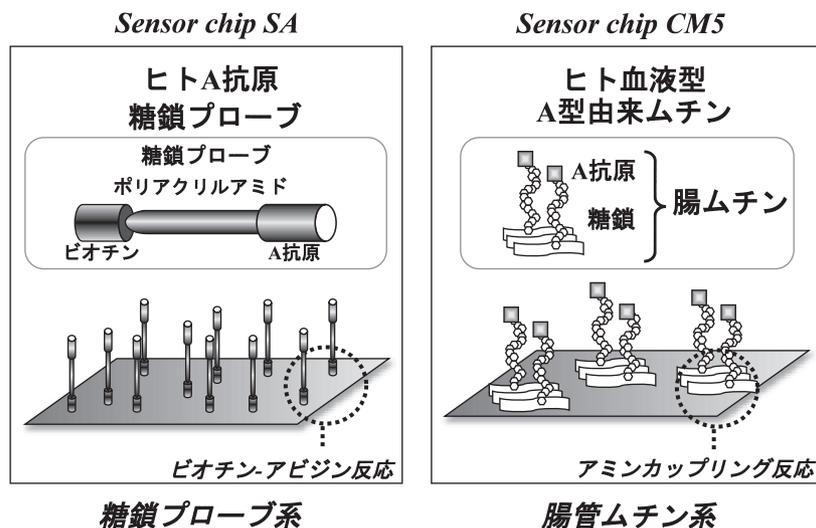


図3. 実験に使用した2種類のセンサーチップとそのリガンド

SLP) をアナライトとして流すことで付着量を定量的に解析した. 結合量は Resonance Unit (RU) 値として表され, 1RU は 1 mm^2 あたりにアナライト 1 pg が結合したことを示している. たとえば, 乳酸菌を流して 1000RU 値上昇した場合は, 単位面積あたりに同菌が約 1000 匹結合したことが推定される (図4).

ヒトA抗原認識性乳酸菌の付着メカニズムの解明¹⁹⁾

日本人に一番多い血液型である A 型 (A 型: 38%, B 型: 22%, O 型: 31%, AB 型: 9%) に注目して実験を進めた. 200 株以上のヒト糞便起源の乳酸桿菌 (凍結乾

燥菌体) を用いて, A 抗原糖鎖プローブ [末端構造: $\text{GalNAc } \alpha 1-3 (\text{Fuc} \alpha 1-2) \text{ Gal-}$] および HCM-A (ヒト血液型 A 型由来の HCM) に対する付着量を BIACORE により測定した. 一次スクリーニングとして, A 抗原糖鎖プローブに対して 2000RU 以上結合する乳酸菌 16 菌株を選抜した (図5). 本結果は, 通常, 黄色ブドウ球菌や大腸菌などの菌体がレセプターに結合したと判断する値 (100 ~ 500RU) を大幅に上回った²⁰⁻²²⁾. 当研究室の山田らが凍結乾燥菌体を用いて付着性試験を行った際にも同じ現象が起きており²³⁾, 生菌体よりも凍結乾燥菌体を用いた際に, 結合反応性が高まることもある. また, 対

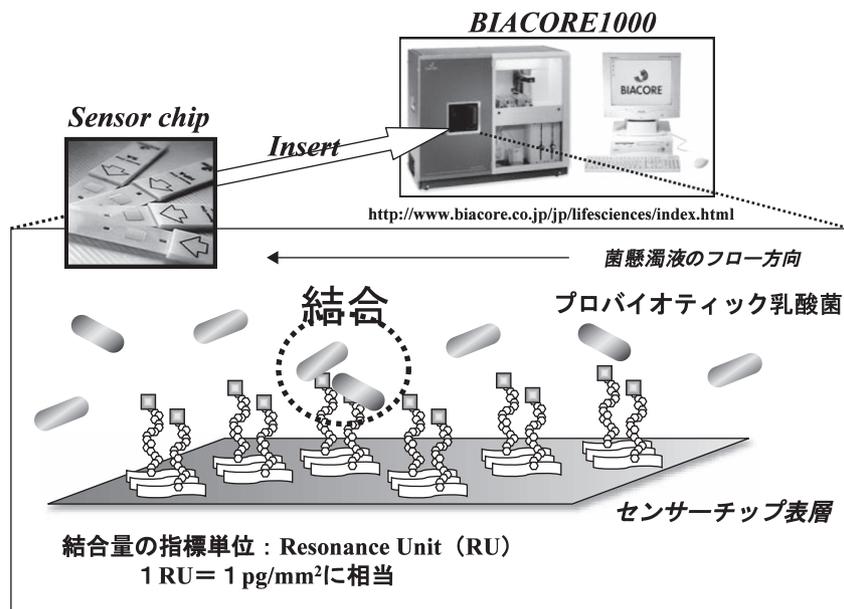


図4. 血液型抗原を認識する乳酸菌のBIACOREを用いた付着性試験.

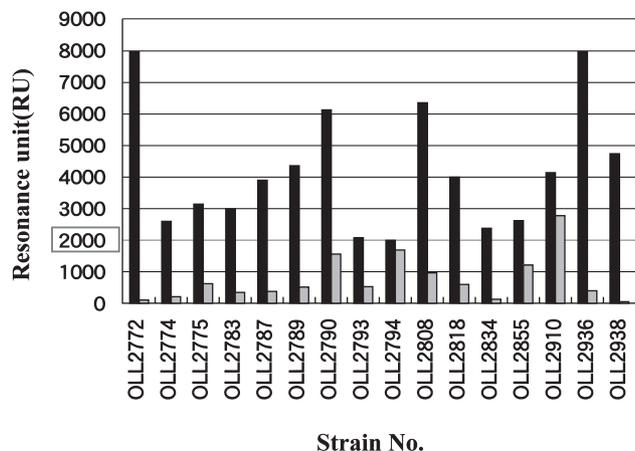


図5. A抗原認識性乳酸菌のスクリーニング. 237菌株より, A抗原糖鎖プローブに対して2000RU以上結合した乳酸菌16菌株を選抜した. ■, 糖鎖プローブ系; ■, 腸管ムチン系.

照として用いた酪農用乳酸菌である *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* はまったく結合性を示さず, プロバイオティクスとの際だった差異を示した.

選抜した16菌株のSLPを調製し, 菌株の付着性試験と同様にA抗原糖鎖プローブに対する結合性を測定したところ, *L. brevis* OLL2772株において非常に強い結合性が確認された(図6-a). また, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(SDS-PAGE)の結果から, 本菌株のSLPは単一のタンパク質から形成されていることも示唆された. SDS-PAGEで検出された主要バンド(約46 kDa)のN-末端アミノ酸配列分析を行ったところ, 9残基(KSYATAGAY)のアミノ酸を決定することができ, 本アミノ酸配列は *L. brevis* ATCC8287^T 由来の S-layer protein

(SlpA) と完全に一致した(図6-b).

L. brevis OLL2772株の染色体DNAからSLP遺伝子をクローニングした後, 国立遺伝学研究所(DDBJ)のweb上でアクセス可能なデータベースとGENETYX-SV/RC Ver.11.0.3.1を用いて相同性解析を行った結果, 遺伝子レベルにおいても, *slpA* (*L. brevis* ATCC8287^T) と100%の相同性を示した. したがって, 本菌株におけるヒトA抗原を認識するタンパク質性因子は, 「SlpA」であることが判明した. さらに, A抗原糖鎖プローブ上のA抗原を抗AレクチンでブロックするとSlpAは結合しなくなり, 本レクチンを外すと再びSlpAは結合した(図6-c)ことから, SlpAのA抗原認識特異性について再確認できた. ここで, 遺伝子情報を基に膜貫通領域予測ソフト(SOSUI program)を用いて構造予測をしたところ, 30残基からなるシグナルペプチドを通じて, 細胞内から細胞外へとSlpAが誘導されることが推定された(図7). 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一致した. したがって, 4Mのグアニジン塩酸塩によるSLPの抽出により, 成熟型SlpAのみが *L. brevis* OLL2772株から調製できたことが考えられた.

菌体の腸管付着性を考えた場合, 外部環境と直接接触する菌体表層が腸管付着性に関与している可能性が高いものと思われる. グラム陽性菌である乳酸桿菌の菌体表層にはテイコ酸, 中性および酸性多糖そしてタンパク質などが存在している. 最もよく研究されている成分は, アシドフィラス菌(*L. acidophilus*)などが持つ, 細胞表

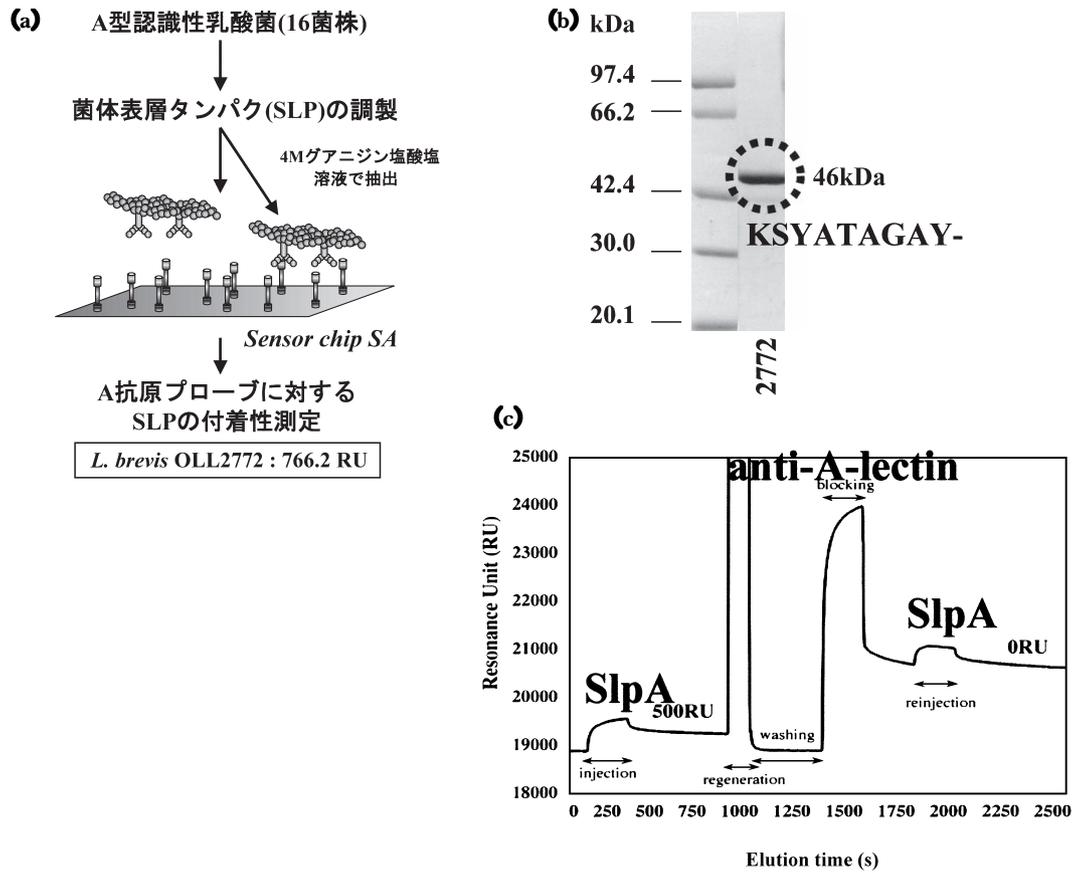


図6. (a) A型認識性乳酸菌の菌体表層タンパク質の調製とA抗原糖鎖プローブへの付着性試験, (b) SDS-PAGE, および (c) 抗Aレクチンによる付着性の変化 (消失).

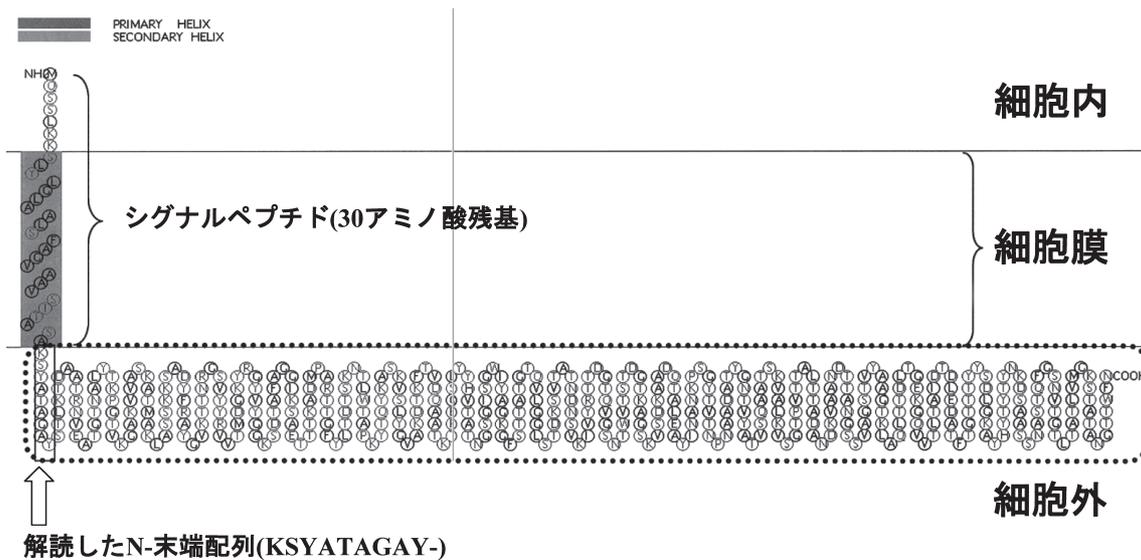


図7. SlpAの細胞膜貫通領域予測 (SOSUI program: sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html). 点線で囲んだ部分構造は成熟型SlpAを示す.

層の最外層構造に存在する規則的に配列し, 単一層を形成するタンパク質または糖タンパク質 (S-layer protein) である. この構造はきわめて単純であり, 単一分子種のタンパク質または糖タンパク質分子が二次元結晶配列と

して会合している²⁴⁾.

乳酸菌の付着能力を有する S-layer protein

乳酸桿菌の S-layer protein は 40 ~ 60 kDa の分子量範

困で多数報告されている。特によく研究されているものとして、*L. crispatus* JCM5810由来のコラーゲン結合性タンパク質である CbsA²⁵⁾、laminin や fibronectin に対する付着性を有する *L. brevis* ATCC8287^T 由来の SlpA^{26,27)}、および *L. acidophilus* ATCC4356 由来の S(A)-protein^{28,29)} などが存在する。また、*L. reuteri* 1063 株においては、粘液成分に付着する Mub (mucus binding protein) と名づけられた約 358kDa の巨大タンパク質についても報告されている³⁰⁾。

さらに、*L. reuteri* NCIB11951 の ATP binding cassette transporter system のタンパク質が、コラーゲンへの結合に関わっているという報告もある³¹⁾。本タンパク質の N-末端アミノ酸配列と非常に類似した mucin adhesion-promoting protein (MAPP) が *L. fermentum* 104R において発見されている³²⁾。MAPP はブタ消化管ムチンに付着性を示し、多量体を形成していることが推測された。

ここで、我々が A 抗原認識性因子として同定した SlpA に関する最近の見解として、付着能力を持たない乳業用乳酸球菌である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* に *slpA* 遺伝子の一部 (N-末端領域) を導入して、シグナルペプチドから SlpA の前半 247 残基までを発現させたところ、human Intestine 407 cells に対する付着能力を獲得したという報告がある³³⁾。しかしながら、本研究では SlpA の血液型認識性についてはまったく言及されていない。

著者らは現在、A 抗原認識性因子として同定した SlpA において、シグナルペプチドの他に、2つの推定プロモーター領域、RBS (ribosomal binding site) を含んだ全長領域 (465 アミノ酸残基) の異種発現を試みている。本異種発現解析が実現すれば、SlpA の A 抗原認識性機構の完全解明への道のりがさらに縮まるものと考えられる。

おわりに

当研究室の血液型乳酸菌研究は、本誌のバイオメディアでもすでに紹介されている³⁴⁾が、最近、ヒト A 型のみならず、B 型および O 型認識性乳酸菌の存在も明らかにした³⁵⁾。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ている。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。

文 献

- 1) Aspholm-Hurtig, M. *et al.*: *Science*, **305**, 519 (2004).
- 2) Hutson, A. M. *et al.*: *J. Infect. Dis.*, **185**, 1335 (2002).
- 3) Hammerman, C. and Kaplan, M.: *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **19**, 277 (2006).
- 4) Katz, J. A.: *J. Clin. Gastroenterol.*, **40**, 249 (2006).
- 5) Ouwehand, A. C. *et al.*: *Ann. Nutr. Metab.*, **46**, 159 (2002).
- 6) Danielson, A. D. *et al.*: *J. Anim. Sci.*, **67**, 966 (1989).
- 7) Hashimoto, H. *et al.*: *J. Anim. Sci.*, **70**, 90 (1999).
- 8) Perdigon, G. *et al.*: *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56**, 21 (2002).
- 9) Lim, B. K. *et al.*: *Jpn. J. Cancer Res.*, **98**, 36 (2002).
- 10) <http://www.human-abo.org/databank/worldmap.html>
- 11) Matsumura, A. *et al.*: *J. Dairy Sci.*, **82**, 2525 (1999).
- 12) 大久保康人: 血液型と輸血検査, 第2版, p.6, 医歯薬出版 (1997).
- 13) Sillanpaa, J. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **182**, 6440 (2000).
- 14) Gopal, P. K. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **67**, 207 (2001).
- 15) Verma, M. *et al.*: *Glycoconjugate J.*, **11**, 172 (1994).
- 16) Sandra, J. G. *et al.*: *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 607 (1995).
- 17) Uchida, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1004 (2004).
- 18) Kinoshita, H. *et al.*: *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 116 (2007).
- 19) Uchida, H. *et al.*: *Res. Microbiol.*, **157**, 659 (2006).
- 20) Fratamico, P. M. *et al.*: *Biotechnol. Techniques*, **7**, 571 (1998).
- 21) Holmes, S. D. *et al.*: *J. Microbiol. Methods*, **28**, 77 (1997).
- 22) O'Shannessy, D. J. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **15**, 132 (1992).
- 23) Yamada, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 910 (1994).
- 24) 内田金治: 乳酸菌の科学と技術, p.59, 学会出版センター (1996).
- 25) Sillanpaa, J. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **182**, 6440 (2000).
- 26) Leeuw, E. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **260**, 210 (2006).
- 27) Hynonen, U. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **184**, 3360 (2002).
- 28) Smit, E. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **305**, 245 (2001).
- 29) Boot, H. J. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **175**, 6089 (1993).
- 30) Roos, S. and Jonsson, H.: *Microbiology*, **148**, 433 (2002).
- 31) Roos, S. *et al.*: *FEMS. Microbiol. Lett.*, **144**, 33 (1996).
- 32) Rojas, M. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2330 (2002).
- 33) Avall-Jaaskelainen, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2230 (2003).
- 34) 松下裕昭: 生物工学, **84**, 98 (2006).
- 35) Uchida, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 3073 (2006).