

Enterococcus faecalis TH10のプロバイオティクス
としての特性および本菌株におけるヒト腸管付着性
遺伝子の発現に関する基礎的研究

大平 猪一郎

2000

Enterococcus faecalis TH10のプロバイオティクス
としての特性および本菌株におけるヒト腸管付着性
遺伝子の発現に関する基礎的研究

大平 猪一郎

2000

目 次

緒 論	．．．	1
第1章 <i>Enterococcus faecalis</i> TH10の安全性と抗菌性	．．．	18
第1節 安全性と抗菌性に関する検討	．．．	18
第2節 ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー による抗菌性物質の同定	．．．	25
第3節 フェニル乳酸の有害性細菌に対する影響	．．．	30
第2章 <i>E. faecalis</i> TH10のヒト腸管上皮モデル細胞への付着性	．．．	36
第1節 ディスク固定Caco-2細胞と細胞外マトリックスタン パク質へのグラム染色法による付着性評価	．．．	36
第2節 ラジオアイソトープ (RI) ラベル法を用いたCaco-2 細胞への付着性評価	．．．	43
第3章 <i>E. faecalis</i> TH10におけるヒト腸管付着性遺伝子の発現	．．．	49
第1節 形質転換条件の確立	．．．	49
第2節 <i>Lactobacillus fermentum</i> からの糖鎖受容体タンパク 質遺伝子のクローニング	．．．	66
第3節 糖鎖受容体タンパク質遺伝子の導入と発現	．．．	75
総 括	．．．	83
謝 辞	．．．	88
参考文献	．．．	89
英文要旨	．．．	99
付 表 (表1~18)		
付 図 (図1~22)		

緒 論

1. *Enterococcus faecalis*について

1) 分類学上の位置付け

Enterococcus faecalis (以下、*E. faecalis*) は、乳酸菌の1菌種である。乳酸菌は、古来からヒトの生活に有益に関係し、具体的には、腐りやすい乳を保存性の高い、付加価値のある乳製品に加工するための基本的手段として乳酸発酵が用いられてきた。サイレージや漬物、発酵調味料(味噌、醤油、酒)などの製造にも乳酸菌の関与は必要である。また、ヒトやその他の動物の腸管には、腸内フローラの構成菌種として乳酸菌が含まれていることも明らかにされている。

乳酸菌は、いくつかの糖を発酵し多量の乳酸を生産する細菌の総称であって分類学上の呼び名ではない。細菌は現在、数百の属に分類されているが、その複数の属が乳酸菌に分類されている。しかし、乳酸を多量に産生するにもかかわらず、乳酸菌の範疇に入れない属も多くあることから、ここで乳酸菌を定義する必要がある。現在、最もわかりやすく正確な乳酸菌の定義[109]をまとめると、次のとおりである。

- ①グラム陽性の桿菌または球菌で、カタラーゼ陰性、内性孢子を作らない。
- ②一般に運動性は持たないが、まれに若い細胞で運動性を示すものがある。
- ③消費したグルコースから50%以上の乳酸を作り、共通する特徴としてビタミンB群のうちナイアシンを必須に要求する。

これらの定義に当てはまる菌属は、結果的にLow G+C (G+C含量55%を上限)のグラム陽性細菌となる。近年、微生物の分類では16S rRNAの塩基配列に基づく系統解析が行われているが、図1はこれに基づくLow G+Cのグラム陽性グループ細菌の進化系統樹である[132]。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 (1986) [129]では、*Streptococcus* 属から*Enterococcus* 属と*Lactococcus* 属の2属を分離独立させた。この分類の正当性は、この系統樹によっても裏づけられ、これら3菌属は別々のクラスターを形成している。*Streptococcus* 属と*Lactococcus* 属はまだその関係が近いが、*Enterococcus* 属はこれらからかなり離れ、むしろ*Carnobacterium* や

*Vagococcus*に近い。*Enterococcus* 属は、乳酸球菌の中では10℃、45℃、6.5% NaCl、pH 4.4のすべての条件下において生育性を示すことで特徴づけられ [128]、現在19菌種に分類されている。他に新しい乳酸菌の分類も行われ、*Enterococcus* 属を含めた総括として1994年にBergey's Manual of Determinative Bacteriology [48] が刊行された。糞便や消化管内容物からの分離例が多いが、植物からの分離例もある。現在の *Enterococcus faecalis* は、*Streptococcus faecalis* subsp. *faecalis*、*Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* および *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*の3亜種に分類されていたものが統一され、その基準株のG+C含量は38.6%である。細胞壁のペプチドグリカンは、D-イソアスパラギンを架橋部に含むLys-D-Asp タイプのもので *Enterococcus* 属や *Lactococcus* 属に広く分布するが、*E. faecalis* は特異的でLys-Ala₂₋₃タイプである。イソプレノイド・キノンは呼吸系の補酵素で、キノンの種類、側鎖のイソプレノイド鎖長とその水素飽和度が分類指標として使われている。一般に *Streptococcus* 属はキノンを持たないが、*Enterococcus* 属のうち *E. faecalis* がデメチルメナキノンをもち、*E. casseliflavus* と *E. gallinarum* がメナキノンを持つことが知られている [17]。*E. faecalis* と *E. faecium* は性状が非常に類似しているが、*E. faecalis* はメナキノンを持たないとされている [127]。

2) *E. faecalis*に関する遺伝学

乳酸菌の遺伝子の構成は、基本的に他の真正細菌と変わらない。すなわち、染色体、プラスミド、ファージなどがあり、乳酸菌の形質を規定している。染色体の大きさが2メガベース (Mb) 前後と小さめであること、重要な性質を決定する遺伝子がプラスミド上にあることなどが乳酸菌の特徴である [57]。また、1970年頃より始まった乳酸菌の遺伝子の解析は、1990年を境として目覚ましく進展した。その主な原因の1つは、DNA・アミノ酸配列解析装置の普及やPCR法の開発に代表される一般的な遺伝子解析技術の進展である。もう1つは、エレクトロポレーション法に負うところが大きい宿主-ベクター系の開発の進展である。以下、*E. faecalis*における重要な遺伝と

育種に関する現状を述べる。

原核生物における遺伝子交換の1機構である接合伝達は、細胞と細胞の物理的接触を介して遺伝子が伝達する現象で、形質導入と並び乳酸菌における自然界での遺伝子交換に重要な役割を担っている [30, 131]。たとえば、*Enterococcus*属細菌や*Lactococcus*属細菌の多くは、接合により伝達するプラスミドを複数保持し、さまざまな表現形質（各種糖類代謝能、ファージ耐性能、薬剤耐性能など）をコードしている [31]。これらのプラスミドは、他のプラスミドやゲノムの一部を伴って伝達し、さらにはそれらと融合（co-integration）し再編成を起こす場合もあり、その遺伝的解析を非常に複雑困難にしていた。しかし、乳酸菌からのプラスミドの単離法の開発 [4] をはじめとする遺伝子操作の技術発展により、それらの現象の遺伝子レベルでの詳細な解析が可能になり、接合伝達を介する遺伝子交換の現象に関する研究は、乳酸菌の遺伝機構を知る上での重要な知見となっていった。乳酸菌における接合伝達の機構は、*E. faecalis*においてよく研究されている。*E. faecalis*からは、病原性や薬剤耐性などをコードしているプラスミド [10] やトランスポゾン [11] が多く発見されており、広宿主域伝達性プラスミド pAM β 1、フェロモン応答性プラスミド、接合伝達性トランスポゾンなど、特徴あるものが含まれている。これら乳酸菌の接合伝達の研究は、その伝達性プラスミドもしくはトランスポゾンの存在を明らかにすることに始まり、その伝達機構の解析、遺伝子のマッピングなどの基礎研究から、遺伝子導入系への応用まで幅広く行われている。乳酸菌のプラスミドの伝達機構に関しては、大腸菌のFプラスミドに対比して議論されているが、*E. faecalis* や *Lactococcus lactis* において性線毛様の構造体はみられず、菌体細胞の凝集塊を形成し高頻度にプラスミドを伝達する機構を一部に備えている。接合法による遺伝子導入系への応用は、エレクトロポレーション法と並んで乳酸菌の遺伝子操作に欠かすことのできない手法となっている。実際に、高頻度伝達性のプラスミドでなくても、フィルター膜上や寒天プレート上で強制的に供与菌と受容菌の物理的接触を起こさせるという簡便な実験操作により、接合伝達株を得ることができる。

pAM α 1 と pAM β 1 は、それぞれ *E. faecalis* において発見された薬剤耐性

プラスミドであるが、これらのプラスミドは種さらには属を越えて接合伝達する広宿主域性という特性を示し、*Streptococcus*属、*Lactococcus*属、*Lactobacillus*属、*Staphylococcus*属など種々の細菌への伝達が報告されている[11, 29, 33]。これらの広宿主域プラスミドは、供与菌中に共存する自己伝達能を持たない他のプラスミドを同時に伝達 (co-transfer) させる“conjugal mobilization”という、乳酸菌の遺伝子操作に非常に有効な性質を示す。Hayes *et al.* [44] は、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*のラクトース発酵性およびプロテアーゼ産生能をコードする非自己伝達性のpCI301とプロテアーゼ産生能をコードするpCI203を、pAM β 1とco-transferさせた。その結果、得られた薬剤耐性株においては、pCI301およびpCI203ともそれぞれpAM β 1とco-integrateしていることが示されている。

*E. faecalis*のある種のプラスミドは、受容菌の分泌する性フェロモンに応答し、その接合伝達を活性化するという他の細菌のプラスミドにはない特徴的な性質を持つ。この種のプラスミドは20種類ほど発見されているが、大きさは一部の例外を除いてすべて50 kbから70 kbで、*Enterococcus*属間でのみ伝達可能である。この種のプラスミドは溶血素 (ヘモリシン)、バクテリオシン、薬剤耐性などの表現型をコードしているほか、性フェロモンに応答して培養中に凝集を形成し、高頻度で接合伝達するという特徴的な表現型をコードしている。菌体細胞の凝集形成に関する機構は明らかにされており[12, 44]、また性フェロモンは7ないし8個のアミノ酸からなるペプチドであり、一部の例外を除いて、それぞれのプラスミドに対して異なる構造の分子種が存在する。プラスミドには、供与菌が自己のフェロモンに応答するのを防御する機構として、宿主染色体にコードされる性フェロモンの生産を抑えるフェロモンシャットダウンと、性フェロモンに対するインヒビター生産の2機構がコードされている。フェロモンインヒビターはフェロモン同様のペプチドでフェロモンシャットダウンの機構を掻い潜って生産されたフェロモンの作用を競合的に阻害している[91]。プラスミドの詳細なマッピングはTn917の挿入変異や部位特異的変異導入によって行われており、フェロモンに対する応答やASの発現を制御する*tra*および*prg*遺伝子群の個々の遺伝子

の機能解析も進められている [12, 13, 44, 92]。

乳酸菌におけるトランスポゾンの多くは、接合伝達性プラスミドと同様に、細胞と細胞の物理的接触を介して伝達される。現在までにグラム陽性菌で発見されているトランスポゾンは、大部分が*E. faecalis*から得られたもので、そのほとんどがテトラサイクリン耐性などの病院で使用されている薬剤に対する耐性をコードするものである [10]。ナイシン産生能をコードする Tn5276やTn5301などは、食品微生物である*L. lactis*からトランスポゾンが得られた珍しいケースである。従来、ナイシン産生能はプラスミドにコードされるものと考えられていたが、近年の遺伝子解析により、それらは*L. lactis*の染色体上にコードされていることが判明し、トランスポゾンとして接合伝達されていることが明らかとなった。これらのトランスポゾンは、ショ糖発酵性も同時にコードしていることが認められた。トランスポゾンが染色体のさまざまな部位へ挿入されるという性質は、乳酸菌染色体の解析にも有効である。*E. faecalis*で発見されたTn916は、元来その転移頻度はあまり高くないが、高頻度接合伝達性のプラスミドと共存させることによってその伝達頻度を高めることができる。Tn916は*Lactobacillus curvatus*、*Lactobacillus plantarum*、*L. lactis*、*Leuconostoc cremoris*などさまざまな乳酸菌への導入が報告されている [32]。Tn916においては接合伝達性プラスミドpAM180中へトランスポゾンを挿入することにより伝達頻度を高める工夫がなされ、この系を用いて*L. lactis*のマロラクティック発酵の欠損株が得られている [115]。

こういった分子遺伝学の進行する中、現在、さまざまな生物でゲノムDNAの全塩基配列の決定がなされている。乳酸菌においても例外でなく、有用性の認められた菌種菌株において進められたり、そのプロジェクトが立ち上げられたりしている。*E. faecalis*もほぼ全塩基配列が決定された状況にある。

2. プロバイオティクス乳酸菌*E. faecalis*について

プロバイオティクス (probiotics) という言葉は、Lilly and Stillwell [66] によって初めて提唱され (表1)、その後、定義として何度か変更がなされ、

現在ではFuller [26] の提唱する「腸内微生物のバランスを改善することによって宿主動物に有益に働く微生物添加物」という定義が受け入れられている。この定義は、プロバイオティクスが「生きている」微生物菌体であることを強調し、抗生物質との区分けを明確にしている。

この概念を発展させたものが生菌剤である。すなわち、乳酸菌の生菌を単一または複数組み合わせる経口的に投与し、便秘、下痢、腹部膨満感、鼓腸、腹痛、湿疹、口内炎、さらには抗生物質などの薬物の投与による腸内細菌叢の異常とそれによって引き起こされる感染症などの予防または治療を目的とした医薬品として、日本をはじめ欧米においても実用化されている。

1966年に出版された「乳酸菌の研究」[61]の中で、すでに乳酸菌製剤[41]という項目が乳酸菌の応用の章に記載されているのは興味深い。その中に、本研究で取り上げた*E. faecalis*も生菌剤として採用されている。乳酸菌は1856年にPasteur [114]によって発見されたが、それよりも前の1784年にGrieve [87]は酸乳クーミスの医薬価値をすでに報告し、1908年～1914にかけてMetchnikoff [76-79]が乳酸菌による不老長寿説を唱えている。

現在、生菌剤として利用されている乳酸菌はヒト腸内細菌に由来するものが多い。具体的に、乳酸桿菌では*Lactobacillus acidophilus*グループをはじめ*Lactobacillus salivarius*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus casei*グループ、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*、および乳酸球菌では*E. faecalis*、*E. faecium*などが用いられている [1]。

以下、*E. faecalis*に関するヒト・動物の腸管での知見、プロバイオティクスに関する知見についてまとめた。*E. faecalis*のこれらの研究に関しては、非常に早い時期からみられるのが特徴である。

アノイリナーゼ菌保菌者は乳酸菌の連続投与でアノイリナーゼ菌が完全に駆逐されることが知られていたが、そのような患者は腸内に乳酸菌が極めて少ないことが認められた [38-40]。そこで、アノイリナーゼ菌保菌者の糞便の10倍水浸出液を用いて各種乳酸菌に対するその生育阻止作用が調べられたが、その結果は表2のとおりである [41]。この場合、数値の低い方ほど高い耐性を有し、有益であることを意味する。*E. faecalis*は、*Bifidobacterium*

*bifidus*と並んで非常に高い耐性を示している。乳酸菌生菌剤は、便秘にも効果があり、それは乳酸菌より産生される乳酸が腸管蠕動運動を促進することが推測されている。その推測をもとにアノイリナーゼ症が発見され、本症のほか常習性便秘症、腸内腐敗症などの患者ではアンモニア態窒素量が健康なヒトより異常に高いことが示された [73]。そこで、アノイリナーゼ保菌者に *E. faecalis* 生菌剤を約1ヵ月間連続投与したところ、図2のとおり窒素量は健康者レベルまで下がり、アノイリナーゼ菌が陰性となって便秘はしだいに好転したことが報告されている [37-40]。

また、生菌の胆汁酸に対する耐性は腸管付着性や経口投与を考える上で重要となる。ヒト胆汁酸の代表的成分はコール酸とデオキシコール酸であり、*E. faecalis* を用いたそれらに対する耐性を試験した結果が報告されている (表3、表4) [41]。すなわち、供試菌の生育阻止円の直径が小さいほど高い耐性を有することを示し、乳酸菌8菌種の中でも特に *E. faecalis* の胆汁酸に対する耐性能の高さが伺える。このことは、経口的に投与された本菌が消化管を通過する際の生存率に有利に働き、腸内で増殖できる可能性が高いものと考えられる。そのことを顕著に裏付ける実験結果を表5に示す [41]。これはラットの各消化管におけるpHと *E. faecalis* の存在状況を示したものである。胃ではpHが低く肛門へ向かうにつれて中性に近づく。*E. faecalis* の検出割合も *E. faecalis* 無投与区では、胃、十二指腸あたりではまったく検出されないが、pHが中性に近づく結腸や直腸で検出がみられるようになる。一方、*E. faecalis* を生菌で経口投与した試験区では、胃においても *E. faecalis* が検出され肛門に近づくにつれてその菌数の増大が確認された (表5) [41]。

腸管内における乳酸菌の存在は、乳児のアミノ酸代謝を促進し窒素の蓄積を良好にするといわれているが、無菌動物のニワトリやモルモットでも、*E. faecalis*、*L. acidophilus*、*Bifidobacterium* が生体の発育を促進することが確認されている [135]。60g~80gのマウスをビタミンB2欠乏飼料で飼育すると体重がしだいに減少する。しかし、その飼料と同時に *E. faecalis* を生菌の状態で経口投与すると体重は増加し、正常に発育することが認められている (図3)。

Ozawa *et al.* [113] は、薬剤耐性をもつ *E. faecalis* を幼年期のブタに投与

することにより、腸管内において*Enterococcus*属以外に*Bifidobacterium*属、*Lactobacillus*属、*Streptococcus*属などが乳酸菌フローラを形成し、*Salmonella*属が減少することを認めている。また、この現象はウシにもみられ、同等の効果があることを報告している。*E. faecalis*はヒトを含む哺乳類の糞便中から検出される一般的な腸内細菌と考えられるところから、生菌剤として用いられている。たとえば、ヒト、ブタ、ウシに対する整腸剤として市販されている。

以上のことから明らかなように、*E. faecalis*は、古くから乳酸菌生菌剤として重要な役割を果たし、またそのことを裏付ける研究データと実績を有している。本研究では、*E. faecalis*のプロバイオティクスとしての特性を検討し明確にすると共に、その有する特性をさらに高めることを目的とした。

3. 本研究で供試した*E. faecalis* TH10について

世界には、数多くの伝統的発酵食品があり、各地域のもつ気候的特性が素材を生みだし、発酵食品もその風土の特殊性から生まれたものである。特に東南アジアにおいて日常的に食されている主な発酵食品をあげてみると、次のとおりである。すなわち、飲料としてココナッツワインおよびライスワイン、乳加工品としてダディヒ、穀物デンプン加工品ではタペ、豆類加工品としてテンペ、キカップ、タオチュウ、ドサイおよびイドリ、魚類加工製品にはベラチャン、チンチャロック、ブドウ、果実・野菜加工品としてテンポヤックがある。乳酸菌は、これらの発酵食品において、直接あるいは間接的に関与し貢献しているものと考えられる。大平ら [99-107] は、これら東南アジアの発酵食品より乳酸菌を分離同定し乳酸菌叢を明らかにすると共に、それらの生理生化学的諸性状について検討してきた。

本研究で供試した*E. faecalis* TH10は、大豆を主原料とするマレーシア産の発酵食品、テンペ (*Tempeh*) から分離されたものである [99]。伝統的手法によるテンペの調製法は次のとおりである。まず現地産大豆 (*glycine max*) を洗浄し、半日程度浸漬させる。さらにこの大豆は水切りされ、脱皮され、釜に入れて柔らかくなるまで煮込まれる。適当に柔らかくなった大豆は冷却され、"Fungi" (乳酸菌やカビを含むスターター) が散布される。こ

れを適当な大きさに固めて、バナナや大きな樹木の葉に包み、1~2日間室内で静置発酵させる。最近、日本でもその風味や有用性、さらには機能性などについて研究されると共に日本での商品化も進められている。

本菌株ならびに他の発酵食品から分離した3菌株についてまとめた生理生化学的諸性状を表6に示した [100-103]。なお、G+C含量と糖類発酵性については、未発表のものであるが、一括してこの表に示した。これらの性状について述べると、グラム陽性、双球もしくは連鎖球菌の形で生育する。通性嫌気性を示しカタラーゼ陰性である。リトマスミルク中で還元、酸生成、その凝固性を示し、乳酸の旋光性はL (+) 型である。グルコースからガスは産生せず、45℃でも生育し、比較的高い食塩耐性や高pH・低pH抵抗性を示す。代謝できる糖類には、セロビオース、グルコース、ラクトース、マンニトール、リボース、サリシン、ショ糖、トレハロースがある。これら生理生化学的諸性状をBergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 (1986) [129]の記載と照合の結果、本菌株は*E. faecalis*と同定され、*E. faecalis* TH10と命名した。

本菌株は、食品由来かつ製造直後の二次汚染を回避した状態での製品から分離された*E. faecalis*である。したがって、人畜に対する安全性は高いものと考えられる。本菌株の特徴的な性状を表6から抜粋して表7にまとめた。すなわち、一般の乳酸菌に比べて6倍以上の乳タンパク質分解活性（遊離チロシン含量において1.32 mg/5 ml) [108]を示すことがあげられる。次にそのpH抵抗性であるが、*E. faecalis*は低pHでの生育性に優れている。本菌株はpH3.5付近でも生育し、ヒト消化管での生育が期待できる。プロバイオティック乳酸菌としては、その他に抗菌性物質の産生能や腸管への付着性が要求される。

4. 乳酸菌が他の微生物の生育を抑制するメカニズムについて

多くの細菌は、生育環境の中で他の微生物との拮抗や共生の関係を維持しながら生育している。特に、栄養要求性において他の微生物と拮抗している場合、自らの生育環境を安定維持するために他の微生物の生育を抑制あるいは阻止するメカニズムを有していると考えられる。乳酸菌の場合も同様に、

他の微生物の生育を抑制する系が存在し、そのメカニズムや物質について研究が進んでいる [54]。プロバイオティクス乳酸菌を考える場合、その乳酸菌が何らかの抗菌性物質を産生し他の細菌の生育を抑制する現象を明らかにすることは非常に重要な研究課題である。

1) 有機酸

乳酸菌の糖源からの主要な代謝産物は乳酸であり、その抗菌性については古くから研究がなされてきた。まず、乳酸が存在することでその環境中のpHを低下させることによる抗菌性は最もよく知られた現象である。さらに、非解離型の乳酸塩であった場合も、他の微生物の細胞内での電氣的プロトン勾配を壊すことによって抗菌的作用を示す。乳酸以外に産生する有機酸として、微量ながら酢酸やプロピオン酸がある。これらの有機酸は乳酸よりpKa値が高く、pHを同じ条件においた場合、解離度が低いために、抗菌活性は乳酸よりも高い。低pHのもとで乳酸が示す抗菌性に対し、これらの有機酸は相乗効果をもたらすことが認められている。

2) ジアセチル

乳酸菌の産生するジアセチルは、チーズやバターなどの芳香成分として知られ、利用性の上から代謝系や遺伝学について古くより研究がなされてきた物質である [83]が、同時にこの物質は抗菌性も示す。一般に糖源からのピルビン酸の多くが乳酸デヒドロゲナーゼにより乳酸になる部分の経路において、ピルビン酸にジアセチルシンセターゼが作用することで生成される。一方、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* や *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*などはクエン酸を代謝し、ピルビン酸を経て大量のジアセチルを産生する。糖源由来の場合と同じようにピルビン酸を経るにもかかわらず、この場合はすべてのピルビン酸から乳酸が産生されずジアセチルの産生経路に進む。これは、クエン酸代謝によってピルビン酸が生成された場合、クエン酸は高度に酸化された物質なのでそれが分解された時には還元性物質が生成されないため、ピルビン酸から乳酸デヒドロゲナーゼを経て乳酸ができる系が進まないのである。

ジアセチルは、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で酵母やグラム陽性菌の生育を抑制し、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でグラム陰性菌を抑制することが報告されている [54]。一方、ジアセ

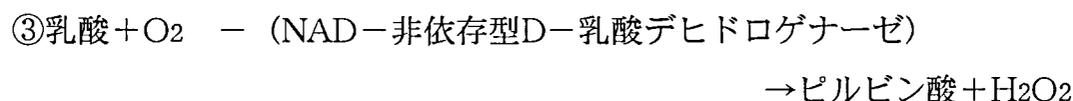
チルを産生する乳酸菌は、一般に350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも生育抑制はみられず、ジアセチルとアセトインに換算して培地中に0.3 mM程度が蓄積すると自らジアセチルレダクターゼやアセトインレダクターゼを誘導し、蓄積したジアセチルを2,3-ブタンジオールに変換する。

3) 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド

*Lactobacillus reuteri*の産生する抗菌性物質、ロイテリンとして同定された物質が、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドである。本物質は、後述するバクテリオシンとは異なり、グラム陰性菌、グラム陽性菌、酵母などに対して広い抗菌スペクトルを示すことが知られている。

4) 過酸化水素 (H_2O_2)

乳酸菌は、カタラーゼ陰性なのでフラボプロテインオキシダーゼを持つものが多い。そのため、次のような経路で H_2O_2 が生成される。



10~20 mMの H_2O_2 は、大腸菌を死滅させることが報告されている。また、牛乳のようにラクトパーオキシダーゼを含む場合は、 H_2O_2 による次のような抗菌メカニズムが知られている。乳酸菌によって生成された H_2O_2 が0.01~0.02 mM程度牛乳中に存在すると、ラクトパーオキシダーゼはチオシアネートの酸化を促進し、その中間で生成する種々のチオシアネート (SCN^-) の酸化物 (OSCN^- 、 O_2SCN^- 、 O_3SCN^-) は強い抗菌性を示す。この系により、生乳やカッテージチーズの保存性が高まっているし、積極的にその系による抗菌性を利用する試みがなされている。

5) バクテリオシン

細菌の中にはタンパク質あるいはペプチドから成る抗菌性物質を作り出すものがあり、バクテリオシンと総称されている [51, 54]。その特徴として、類縁菌など比較的狭い抗菌スペクトルを示すと一般的に考えられている。しかし最近では、*Listeria*属や*Bacillus cereus*など病原性のグラム陽性菌に対し

でも働く比較的広い抗菌スペクトルを示すバクテリオシンも知られるようになってきている。バクテリオシンがタンパク質である場合は、熱処理で失活するものの、そのほとんどが比較的高い耐熱性を有し、ヒトの腸管内消化酵素によって分解されるため、安全性の高い天然の食品保存料として期待されている。

乳酸菌の産生するバクテリオシンについては数多く報告されており、1993年にKlaenhammer [63]はその一次構造から4つのクラスに分類することを提唱し、1996年にNes *et al.* [93]によって、その構造や作用機序に基づいた修正が加えられて分類された。

ナisin (nisin Aとnisin Z) は、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*によって作られるバクテリオシンの1つでチーズスターターの中から見いだされた [62]。すでにその構造、生合成機序、作用機序（抗菌メカニズム）、自己耐性、遺伝的な背景については完全に明らかにされ、現在はその応用に関する報告も多く見られる。ナisinは、バクテリオシンの中で唯一GRAS (Generally recognized as safe) 物質として認識され、日本を除く約50カ国で食品保存料としての使用が認められている。使用されている主な食品にはチーズ、プロセスチーズ、缶詰、牛乳、クリームがあり、応用研究レベルではあるが、漬物や味噌において優れた結果が得られている。

5. 腸管感染症と乳酸菌

現在、プロバイオティクス乳酸菌としての最も重要な性質にヒト腸管付着性がいわれているのは、腸管感染症予防においてその特性が重要となるからである。そこで、腸管感染症を引き起こす有害細菌の腸管定着性のメカニズム、腸管上皮細胞に付着性を有する乳酸菌を用いて、腸管感染症起因菌の上皮細胞への付着を阻止することによる感染症予防の可能性について述べる。

腸管感染症では、病原菌の上皮細胞への付着が発症の第1段階となる [98]。この付着は、細菌側の付着因子（アドヘシン）が上皮細胞側のレセプターに結合することにより起こる。また、病原性大腸菌である *Escherichia coli* O157:H7が産生するベロトキシンも同様に、腸管の上皮細胞の表面膜上にある糖鎖を特異的に認識してこれに結合し、その後細胞内に取り込まれる。

すなわち、ガラクトース α 1 \rightarrow 4ガラクトース（ガラビオース）という構造をもった細胞膜上の糖鎖を受容体として細胞に付着する [142]。そこで、これら病原菌や毒素の付着を阻止することができるならば、感染症の予防が可能と考えられ、anti-adhesion therapyの原理となるであろう。

1) 乳酸菌の腸管上皮細胞への付着機構

ヒト消化管には腸内フローラが存在し、乳酸桿菌では *Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus crispatus*、*Lactobacillus salivarius*、*Lactobacillus reuteri* など、ビフィズス菌では *Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium adolescentis* などが常在菌種として分離されている [81]。したがって、これらの菌種は腸管上皮細胞への付着性あるいはその表面を覆う粘液層への結合性を有すると考えられる。乳酸菌の付着性については、手術により得られた大腸や小腸細胞、固定化大腸上皮切片、固定化大腸粘液、抽出細胞表層タンパク質、培養細胞（Caco-2、HT29-MTX、Intestine 407、FHs 74Int）あるいは糖脂質などを用いて調べられている [137]。これら以外にも、菌体表層の付着因子の検索法として赤血球凝集反応が用いられることもある [84, 140]。バイオプシーで得られた小腸あるいは大腸細胞を用いる方法は最も生体での条件に近似していると考えられるが、実施の容易さから Caco-2、Intestine 407、HT29-MTX などの消化管由来株化細胞が用いられることが多い。付着機構については、赤血球凝集反応の阻害活性、糖脂質への結合、酵素処理が付着に与える影響を調べるなどの手法により研究されている。その結果、付着機構として、菌体表層のレクチン [18, 140]、多糖 [46, 110]、糖タンパク質 [85]、上皮細胞表層の粘液層 [23, 133]、レクチン [85]、糖タンパク質 [2] および糖脂質 [141] との結合が推定されている。また、培養上清中に分泌されたタンパク質 (secreted bridging protein) により付着が促進されるという報告が Conway *et al.* [19, 117] やフランスのグループ [5, 6, 9] により行われている。Conway and Kjelleberg [19] は、*Lactobacillus fermentum* 737 により分泌される腸管付着性タンパク質を部分精製し、分子量 12,000~13,000 の糖を含まないタンパク質と同定している。しかし、Green and Klaenhammer [35] はフランスのグループ [9] の報告した *Lactobacillus acidophilus* BF2FO4 を用いて追試を行った結果、腸

管付着性タンパク質の存在は確認できず、培養上清の添加により付着菌数が増加した原因は単なるpHの低下による付着菌数の増加にすぎなかったのではないかと述べている。したがって、フランスのグループの成績については他の菌株についても追試が必要と思われる。Fontaine *et al.* [24] は *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 を用いて検討し、赤血球表面への付着にはglycophorin Aの糖鎖が関与するが、ブタ胃粘液への付着にはその糖鎖は関与せずペプチド鎖に結合すると推定している。彼らの結果は、赤血球凝集反応から上皮細胞表層のレセプターを推定することができないことを示している。

以上のように、乳酸菌でも菌体側のアドヘシンと上皮細胞側のレセプターを推定したいくつかの報告はあるが、病原菌で明らかにされているような腸管定着性への関与が証明されたアドヘシンは乳酸菌ではまだ見い出されていない。

2) 乳酸菌による病原菌の腸管上皮細胞への付着阻害

Fujiwara *et al.* [25] は、毒素原性大腸菌のasialo-GM1への結合が菌体外に分泌する*Bifidobacterium longum* SBT 2928のタンパク質によって阻害されることを示している。より生体に近い条件である培養細胞を使った付着阻害の報告もある。培養上清に懸濁させた*L. acidophilus*の生菌体あるいは死菌体は、*E. coli*、*Salmonella typhimurium*、*Yersinia pseudotuberculosis*、*Listeria monocytogenes*のCaco-2細胞およびHT29-MTX細胞への付着あるいは侵入を阻止することがフランスの研究グループにより示されている [15, 16]。また、*Bifidobacterium*の死菌体でも同様の結果が得られている [5]。さらに最近Hudault *et al.* [50] は、*Lactobacillus rhamnosus* GGの培養上清で*S. typhimurium*菌体を前処理することにより、後者のCaco-2細胞への侵入菌数が減少することを示した。Lehto and Salminen [65] は、Caco-2細胞を用いて*L. rhamnosus* GGの*S. typhimurium*に対する付着阻害活性を調べた。彼女らは、あらかじめ*L. rhamnosus* GGをCaco-2細胞に付着させることの有無は*S. typhimurium*の付着菌数に影響しないが、*L. rhamnosus* GGの培養上清の添加は付着菌数を減少させることを見い出した。さらにこの付着菌数の減少は、培養上清の

酸性pHにより引き起こされる*S. typhimurium*の付着性の低下および培養細胞の死滅が原因であることを明らかにした。したがって、Caco-2細胞あるいはHT29-MTX細胞に病原菌が付着あるいは侵入するのを乳酸菌が抑制するとした上述のフランスの研究グループの知見は、乳酸菌体の作用ではなく菌体を懸濁するのに用いた培養上清の酸性pHによる付着阻害あるいは培養細胞の死滅の結果に過ぎなかったことを、Lehto and Salminen [65] の成果は強く示唆している。

*Helicobacter pylori*は胃潰瘍や胃癌との関連が指摘されている微生物である。Kabir et al. [56] はヒト胃癌由来MKN 45細胞を用いた実験で、*H. pylori* 130の付着は*L. salivarius* WB1004株の添加により減少することを見出した。さらに彼らは、胃に*H. pylori*を定着させたBALB/cマウスに*L. salivarius* WB1004株を投与すると、胃粘膜の*H. pylori*の菌数が減少することを明らかにした。この実験は、*in vitro*のみならず*in vivo*の系でも有効であったことを示す例として貴重なものである。

腸管感染症の原因菌の中には、*S. typhimurium*、病原性大腸菌、*Yersinia enterocolitica*などが、ラミニン、フィブロネクチンあるいはコラーゲンなどの細胞外マトリックス（ECM）タンパク質に結合することも示されている。そして、その結合性が病原性と関連していることを示したのものもある [98]。ECMタンパク質は基底膜や結合組織に含まれるが、これらは上皮細胞に覆われているので、消化管内微生物がECMタンパク質に接触する機会はないように思われる。しかしLjungh et al. [67] は、潰瘍発生時のほか、細菌あるいはウィルス感染などにより上皮細胞が剥離した場合あるいは正常な上皮細胞のターンオーバーでも絨毛頂上部からの上皮細胞の脱落時には、基底膜や結合組織のECMタンパク質が露出することになると述べている。Toba et al. [49] は、*L. crispatus*が出血性大腸菌のIntestine 407細胞への付着を中性条件下で阻害することをみ出した。この阻害はMatrigelおよび固定化ラミニンでもみられることと、ECMへの付着性を示さない菌株では付着阻害が見られないことから、ラミニン分子を共通のレセプターとする結合の競合であるとその機構を推定している。

3) Anti-adhesion therapyの問題点と将来展望

Salminen *et al.* [123] は、多くの科学的な研究データから、有望なプロバイオティック乳酸菌として *L. casei* Shirota、*L. rhamnosus* GG および *L. acidophilus* NCFB 1748 をあげている。これら3菌株は、いずれも臨床研究により細菌性やウイルス性の下痢症に効果があると報告されているが、それが病原微生物の付着阻害に基づく感染予防や治療であるのかについては不明である。Anti-adhesion therapy に用いる乳酸菌株の開発に当たっては、腸管感染症の原因菌により標的消化管部位やレセプターが異なるため、対象とする病原菌ごとに異なる菌株を選ぶことが必要になると考えられる。レセプター分子は同一でなくても、立体障害により病原菌の付着を阻害することも可能であると考えられる。乳酸菌が複数の病原菌に対する付着阻害効果を合わせ持つと効率的であるので、乳酸菌あるいは乳酸菌の菌体成分の混合物として開発するのが有効であろう。乳酸菌の場合、レセプターの競合に加え、抗菌性物質の寄与も期待できるので、これらとの相乗効果も期待できると思われる。また、菌体以外に Fujiwara *et al.* [25] が報告しているような培養液中に分泌される付着阻害タンパク質の利用も考えられる。

上記2) で示したように、腸管への乳酸菌の付着機構や病原菌に対する付着阻害機構に関してはまだまだ知見が乏しいが、*in vitro* の実験で anti-adhesion therapy に利用できる可能性のある乳酸菌株がいくつか見出されている。これまで行われてきた研究は断片的なものが多いので、今後、*in vitro* から臨床へと系統立てた科学的な研究が多数行われることにより有効性が科学的に証明され、乳酸菌による anti-adhesion therapy が腸管感染症に対する安全な予防・治療法の1つとして開発されることが期待されている。

6. 本研究の目的と本論文の構成

まず、第1章において「*E. faecalis* TH10の安全性と抗菌性」を検討した。*E. faecalis* は菌種としてプロバイオティクス乳酸菌として扱える可能性が高いが、菌種菌株によるところもある。また、*E. faecalis* の場合、ごくまれに溶血性による有害性を示す場合があるので、まず本研究で供試した *E. faecalis* TH10の安全性について試験した。次に、本菌の培養上清を用いて

グラム陽性細菌に対する抗菌性の検討を行い、その抗菌スペクトルをもとにガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー（GC/MS）による抗菌性物質の分離同定を試みた。さらに得られた抗菌性物質について、*E. coli* O157:H7、*Bacillus cereus*など病原性細菌に対する影響を試験した。

第2章において「*E. faecalis* TH10のヒト腸管上皮モデル細胞への付着性」を検討した。文献的にもディスク固定Caco-2細胞とECMタンパク質が用いられているので、それらを用いて*E. faecalis* TH10の付着性を評価した。さらに、その精度を高めるために、独自に考案したラジオアイソトープ（RI）でラベルした*E. faecalis* TH10によるCaco-2細胞への付着試験を行った。

そして、第3章では「*E. faecalis* TH10におけるヒト腸管付着遺伝子の発現」を試みることとし、エレクトロポレーション法による*E. faecalis* TH10の形質転換条件を検討した。また、優れた腸管付着性を有する*Lactobacillus fermentum*からの糖鎖受容体タンパク質遺伝子のクローニングを行った。そのクローン化した腸管付着因子（遺伝子）の*E. faecalis* TH10への導入を図り、得られる形質転換体での糖鎖受容体タンパク質の発現を試みた。

第1章 *Enterococcus faecalis* TH10の安全性と抗菌性

第1節 安全性と抗菌性に関する検討

【目的】

近年、ヒトや家畜に対するプロバイオティクスと同様、食品の保存に対してバイオプリザベーションの重要性が注目されている。Roy [119] の定義に基づくと、バイオプリザベーションとは、バイオプリザバティブを使って食品を保存することで、特に発酵によって生産された物質により食品の保存性を向上させる方法は、その代表的な例といえる。ここでいうバイオプリザバティブとは、植物、動物および微生物起源の抗菌作用を持つ化合物で、ヒトに対して何ら害がなく、食品としてあるいは食品と共に長い歴史の中でヒトに食されてきたものを指す。

冷蔵保存あるいは低温流通を前提として作られた食品は、10℃以下での取扱いを義務付けている。しかし、原 [42] の報告によると、実際には小売店における冷蔵ショウケースの温度は、全体の44%が10℃以上であり、18℃に達する場合も明らかにされている。米国でもRoy [119] の報告にあるように、冷蔵ショウケースで17%が10℃以上であったと述べている。このような温度では、有害微生物の増殖により食品の安全性と品質は低下し、ヒトに対する危険性も増大する。食品の安全性を向上させるためには、高い温度による加熱が簡便でありかつ効果も大であるが、最近のコンビニエンスストアで売られるものは、ready-to-eat食品とされ、加熱調理の手間を省いて食することができることをセールスポイントとしているものが多い。このような状況にあるため、食品は少々の温度変化にも対応できること、すなわち有害微生物の生育に対する抵抗性を持っていることが要求される。具体的には、適切な加熱、包装形態、ガス置換、pH、水分活性、保存料の使用などが考え得る [72]。ただ、保存料としては、いわゆる化学合成による保存料や殺菌料の使用は必ずしも好ましくなく、すべての食品に利用が認められている訳ではない。このため、安全性の高い保存方法として、伝統的に安全とみられ

ている発酵食品の有害微生物に対する高い安全性と保存性を、科学的な検討と管理のもとに利用しようという動きが出てきた。

乳酸発酵食品のチーズ、ヨーグルト、発酵ソーセージ、ピクルスを含む漬物類、なれずしなどの食品は腐敗しにくく、食中毒を起こす原因になることはほとんどない。これは乳酸菌の貢献によるところが大きく、乳酸菌の産生する抗菌作用を示す物質としては、①乳酸・酢酸・プロピオン酸などの有機酸 ②エタノール ③ジアセチル ④アセトアルデヒド ⑤バクテリオシン ⑥過酸化水素 ⑦3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド（ロイテリン）⑧乳酸菌菌体細胞などがあげられる [54]。特に、乳酸菌菌体細胞による他の細菌の生育阻害メカニズムは、これらの抗菌性物質の産生の有無を鑑みながらプロバイオティクス乳酸菌の抗菌作用を考える上でも重要なファクターとなる。プロバイオティクス乳酸菌としての定義の上で、何らかの方法により競合する有害性細菌に対して抗菌性を有することは必須条件であり、その抗菌性のメカニズムを明らかにし、さらに乳酸菌から新たな抗菌性物質の検索を行うことは非常に興味深い課題である。

近年、*Staphylococcus aureus*に起因する院内感染症が劇的に増加し死者まで出ている。この菌種は、特にメチシリンに耐性を持つことからメチシリン耐性*S. aureus* (MRSA) と名付けられている。MRSAの発生頻度は日本において特に高く、その発生件数はヨーロッパなどと比較しほぼ4倍に達している [75]。MRSAによる院内感染は、他の病気などで入院する患者への大きな恐怖となっている。そのことから抗MRSA薬に対する研究が鋭意なされているが、製薬業界ではMRSAを十分に制御し得る抗生物質をさらに開発することは早急には困難であるとの見解を出している。

本章第1節では、マレーシア産発酵食品のテンペから分離同定された*E. faecalis* TH10について、まずは人畜に対する安全性を試験した。次に、プロバイオティクスやバイオプリザベーションに寄与することを目的とし、MRSAを指標にその生育抑制に本菌株が有効であるかどうかをバイオアッセイスクリーニング法により検討した。特に、*E. faecalis*の産生する有名なバクテリオシンであるヘモリシン [53] と比較しながら実験した。本章第2節では、本菌株培養上清から有機溶媒による抽出精製を進め、最終的に得られた

その抗菌性物質をGC/Mにより同定した。本章第3節では、その同定された抗菌性物質について、MRSA以外の病原性を示す細菌への抗菌性をバイオアッセイスクリーニング法により試験した。

【実験方法】

1. 供試菌株と培養・保存法

本研究に供した菌株と入手先は表8のとおりである。

E. faecalis TH10はMRS液体培地（Oxoid、UK）を用い37℃で8～24時間培養した。1週間以上の保存には、MRS液体培地に1.5%量のバクトアガー（Difco、USA）を加えたMRS寒天培地を用いた。37℃で約48時間培養し寒天平板上のコロニー形成を確認したうえで、4℃にて保存した。さらに1ヵ月以上保存する時は、10%スキムミルク（110℃、20分間のオートクレーブ滅菌）と培養液を等量混合し-85℃で凍結した。

E. faecalis TH10の抗菌性を試験するために供試した菌株については下記のとおりである。メチシリン耐性*S. aureus*（MRSA）FSA-1とこれに耐性を示さない*S. aureus* FSA-2、*E. faecalis* RIMD 3116001、*Enterococcus faecium* OR-1、*Streptococcus salivarius* OR-12、*Lactobacillus mesenteroides* subsp. *mesenteroides* OR-1、*Lactobacillus mesenteroides* subsp. *dextranicum* OR-7-1-9、*Lactobacillus plantarum* OR-1、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* OR-25については、MRS液体培地を用いそれぞれ37℃で培養した。*Pediococcus acidilactici* OR-34、*Pediococcus pentosaceus* OR-5-1、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* OR-7は、グルコース含有のM17（Difco、USA）を用い30℃で培養した。1ヵ月程度のそれぞれの細菌の保存には、上記の寒天培地を用い、1ヵ月以上保存する時は、10%スキムミルク（110℃、20分のオートクレーブ滅菌）と培養液を等量混合し-85℃で凍結した。

2. 溶血性試験

溶血性試験は、*E. faecalis* TH10の産生するヘモリシンについて行う方法

[53]に準じ、ウサギとヒトの赤血球を用いて行った。

3. *E. faecalis* TH10からの抗菌成分の抽出と抗菌性試験（ペーパーディスク法）

E. faecalis TH10を37℃で24時間培養した培養液10 mlを、1,000 mlのMRS液体培地に接種し37℃で8日間培養した。培養液を4,000×gで20分間、4℃にて遠心分離を行った後、得られた上清について酢酸エチルを用いpH 3.0の条件下で抽出を行った。その抽出液に無水芒硝を加えて脱水し減圧乾涸させ、これを2 mlの2N NaOHに溶解しpH 7.0に調整した。

その60 μ lを用いてペーパーディスク法による抗菌性試験を行った。すなわち、試験菌の懸濁液を寒天平板全体に塗抹し、そのシャーレの中心部にそのペーパーディスク（直径8 mm）を置いて37℃（試験菌の至適温度）で24時間培養し、ペーパーディスクの周囲に生じるクリアーゾーン（生育阻止円）の直径より抗菌活性について評価した[88]。

4. タンパク質分解処理

プロテイナーゼK（和光純薬、大阪）、V8プロテアーゼ（和光純薬、大阪）、トリプシン（Sigma、USA）、アクロモペプチダーゼ（和光純薬、大阪）をそれぞれ0.1 mg含有の20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）100 μ lに上記酢酸エチル抽出の抗菌成分（乾燥重量10 mg）を溶解し、37℃で16時間インキュベートした。全量をペーパーディスク（直径8 mm）にのせて乾燥した後、供試細菌に対する抗菌性を試験した。用いた各タンパク質分解酵素の最終活性ユニットは、プロテイナーゼK（2.2 units）、V8プロテアーゼ（1,100 units）、トリプシン（2.2 units）、アクロモペプチダーゼ（100 units）に相当した。

【結果および考察】

1) 溶血性試験

*E. faecalis*は、本来ヒトの腸管内の正常なフローラ形成菌種である。その

ため、古くから整腸剤として用いられてきた経緯がある。しかし、同じ菌種でも、その病原性がしばしば指摘される時がある。たとえば、フランス産のチーズ [120] やモッツァレラチーズホエー [139] をはじめスーパーマーケットで販売されている食料品 [28] について、二次汚染による *E. faecalis* が分離されている。その場合、この菌種は抗生物質やアミノグルコシドへの高い耐性を有し、ヒトに対し病原性を示すことが認められている [121]。これらの *E. faecalis* は、広範囲のグラム陽性細菌の溶菌現象を引き起こすバクテリオシンを産生すること [10]、この物質はヒト、ウサギおよびマウスの赤血球を効果的に溶血するヘモリシンとして作用すること [53] が報告されている。

試験の結果、本研究で供試した *E. faecalis* TH10 の抗MRSA活性成分は、ヒトおよびウサギの赤血球を溶血しなかった。すなわち、この抗MRSA活性成分は病原性を示す *E. faecalis* の有するバクテリオシンとは異なるものであることが証明された。また、*E. faecalis* TH10 が病原性を示さないことは、分離源がマレーシアにおいて長く食されてきた伝統的発酵食品のテンペであることから安全性は十分推測されることであったが、これで本菌の安全性が実験的にも証明された。

2) *E. faecalis* TH10 の産生する抗MRSA成分

E. faecalis TH10 の培養液 (pH 3.0) から酢酸エチルによって抽出し、その後、酢酸エチルは蒸発させpHを中性にした状態のものをを用い抗菌活性を試験した結果を表9に示した [108]。酢酸エチルでは、一般的に脂溶性の化合物が抽出され、水溶性の極性化合物はほとんど抽出されない。しかし、抽出率はそれぞれの化合物の酢酸エチルと水に対する分配率によるが、MRS液体培地成分 (表13) のグルコース、リン酸一水素カリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸二アンモニウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガンは抽出されないと考えられる。Tween 80はいくらか抽出され、カゼインペプトン (トリプシン消化物)、肉エキス、酵母エキスについては、その成分 (作られた物質) 次第では、酢酸エチルに分配される物質が抽出されるかも知れない。供試した細菌はすべてグラム陽性菌であるが、これはその抗菌性物質をバクテリオシンと想定してのものであった。グラム陰性菌に対する効果については、本

章第3節で行った。

乳酸菌は、バクテリオシンと総称する多くの抗菌性物質を産生する。一般にバクテリオシンは、バクテリオシン産生細菌に密接に関係する菌種に対し抗菌活性を有する菌体外に放出するペプチドあるいはタンパク質と定義されている [62]。バクテリオシンを産生する乳酸菌は、発酵過程における病原性細菌の生育阻害のみならず、感染症の予防や治療へのバクテリオシンの効果について研究が進んでいるが、バクテリオシンはその抗菌スペクトルが狭く、グラム陰性菌などへの抗菌性は示さないものが多い。また、バクテリオシンがタンパク質である場合は、熱などにも弱く発酵食品などの加熱後における効果は望めない。

表9から明らかのように、*E. faecalis* TH10の培養液から酢酸エチルによって抽出された物質は、今回の供試細菌のうちMRSAに対して最も強い抗菌性を示した [108]。酢酸エチル抽出液には、まだこの段階では色々な物質が含まれているので、ある単一の物質がMRSAに抗菌性を示しているとは言い難いが、抗菌性物質の存在は示唆された。また同抽出液は、*Streptococcus salivarius*や*Pediococcus acidilactici*を除く近縁乳酸菌に対してほとんど抗菌性を示さず、特に*Enterococcus*属細菌にはまったく生育抑制を示さなかった。

上述のように、バクテリオシンはタンパク質あるいはペプチドで構成されているので、いくつかのプロテアーゼを用いて処理した時にその抗菌性が著しく低下するようならば、バクテリオシンである可能性が高まる。一方、これらの処理で抗菌性が失われない場合、本物質がバクテリオシンである可能性はほとんどなくなる。本研究では、V8プロテアーゼ、プロティナーゼK、トリプシンおよびアクロモペプチダーゼを使って、それぞれ至適条件下で本抗菌性物質を消化した。しかし、ここで用いたプロテアーゼでは、MRSAに対する抗菌性にまったく影響を及ぼさず、抗菌活性は保持されていた。また、フェノールやクロロフォルム処理による活性阻害もみられなかった。これらの結果から、*E. faecalis* TH10はバクテリオシン以外の抗菌性物質を産生し、その活性成分はpH 3.0において酢酸エチルに可溶性の酸性低分子物質であることが明らかになった。

なお、その成分が乳酸である可能性が懸念されるので、乳酸ナトリウムを用いたペーパーディスク法により抗菌性を調べた。その結果、乳酸ナトリウム30 mMまで試験したが、MRSAに対する抗菌性はみられなかった。次に、HPLCにより分画した成分の抗菌性をアッセイし、抗菌性物質の単離・構造の決定を行った。

第1章 第2節 ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによる抗菌性物質の同定

【目的】

前節において、*E. faecalis* TH10の培養液中には、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) の生育に阻害活性を示す物質の存在が示唆された。この抗菌性の効果は、*E. faecalis* TH10の産生する有機酸（乳酸とギ酸）やそれに基づくpH低下に起因するものではないことを確認した。また、フェノールやクロロフォルム処理による活性阻害もみられないことから、本抗菌性物質はタンパク質、脂質、多糖類のような高分子の物質ではないことが考えられた。

本節では、*E. faecalis* TH10の産生する抗菌性物質の精製を試み、その構造を決定することを目的とした。まず、*E. faecalis* TH10の培養液をエーテルで抽出し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の溶出パターンからいくつかの画分に分け、それぞれの画分の抗菌性を試験した。抗菌性のアッセイには、上記MRSAを用いその生育が阻害される画分を検出し、その画分をガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー（gas chromatography-mass spectrometry、GC/MS）に供した。得られた結果から抗菌性物質の同定を行った。

【実験方法】

1. 供試試薬

スタンダードとして、フェニル乳酸のL体は東京化成工業（東京）から、フェニル乳酸のD体はAldrich（USA）から購入し供試した。

2. HPLCによる抗菌性物質の分離

HPLCにはJASCO Model 800-MP-15（Japan Spectroscopic、東京）を、逆相カラムには、Shodex Asahipak C8P-50（250×4.6 mm、昭和電工、

東京) を用いた。室温にて、濃度勾配法によりメタノール/水混合液を溶離液とし0.5 ml/minの流速で溶出した。

3. GC/MSによる抗菌性物質の同定

GC/MSは、M Station (日本電子、東京) を用いた。抗菌性画分に塩酸/メタノール (5 : 95) を加えて120℃、1時間加熱して常法によりメチル誘導体化した後、SPB-Octylカラム (60 m × 0.25 mm-i.d. ; Supel, USA) を用いて分析した。検出条件は以下のとおり行った。昇温条件 : 30℃ /min/60-250℃ ; 3℃/min/250-280℃、注入口温度 : 230℃、分離管温度 : 270℃、イオン源温度 : 280℃、イオン化エネルギー : 70eV。

【結果および考察】

E. faecalis TH10をMRS液体培地で培養後、遠心分離で菌体を除き、その上清について水飽和ブタノール、さらにエーテルを用いて抽出し、逆相分配カラムによるHPLCで抗菌活性を示す画分を検討した。図4に示したとおり経時的に混合比を調整したメタノール/水混合液を溶離液とし、逆相分配HPLCを用いてエーテル抽出物中の抗菌性物質の分離を試みた結果、約80%メタノールで溶出される画分にMRSAの生育抑制が認められた (図4-e画分)。すなわち、表10に示したとおり、MRS液体培地のエーテル抽出物を50%加えた対照では、MRSAは37℃で24時間後に660 nmの波長で1.25の濁度まで生育した。同様の系で*E. faecalis* TH10を接種したMRS培養液のエーテル抽出物より得たHPLC画分をそれぞれ約50%加えた場合、e画分以外のa、b、c、d、f、g、h、iおよびj画分では、まったくMRSAの生育に変化のみられない1.19~1.27のOD値を得た。一方、e画分についてのみ0.53 (± 0.13) のOD値しか示さず、明らかにMRSAに対する生育阻害が確認され、この画分に*E. faecalis* TH10の産生する抗菌性物質の存在が示唆された。

この画分を直接マススペクトロメトリー (MS) に供したところ、その主成分は分子量約160~170であることが確認された。この抗菌性物質をガス化させるために、塩酸/メタノール (5 : 95) を加えて120℃、1時間加熱し

てメチル誘導体化した。この物質をGC/MSのイオンクロマトグラフィーのライブラリー検索の結果、トータルイオンクロマトグラム（図5）に示したとおり、本物質はメチル化されたフェニル乳酸（分子量：166）であることが強く示唆された。

そこで、スタンダードとして市販のフェニル乳酸を上記と同様、塩酸/メタノールによってメチル誘導体化したものを用いた。このフェニル乳酸メチルエステルと本抗菌性物質の保持時間およびマススペクトルを比較したところ、図6に示したとおりフェニル乳酸に特徴的なフラグメントイオン180（親イオン）、162、121、103、91（標準ピーク）が得られたので、本抗菌性物質をフェニル乳酸と同定した。フェニル乳酸はその構造中に不斉炭素を有することから光学異性体があるので、光学異性体分離用カラム Nucleosil Chiral-1（Macherey-Nagel, Germany）を用いて光学分割HPLCを行った。得られたフェニル乳酸はD-体およびL-体の両方が存在し、ラセミ混合物を形成していた。また、定量の結果、本菌は10当たりD体を13.4 μM およびL体を6.7 μM 産生し、D-体：L-体=2：1の比率であることが認められた。この産生量は、培養条件や培地組成を検討することで増加させることも可能であろう。D-フェニル乳酸の抗菌性についてはDieuleveux *et al.* [20]が報告しているが、興味深いことに種々のグラム陽性菌に対して抗菌性を示すD-フェニル乳酸が、*E. faecalis*には生育抑制効果を示さなかったという彼らの知見である。すなわち、本菌種は自ら産生するD-フェニル乳酸に対して抵抗性を有していることが伺える。

アミノ酸の1種であるフェニルアラニンとフェニル乳酸の構造式は非常に類似している。哺乳動物の場合、生体内でタンパク質合成に利用されないフェニルアラニンは、フェニルピルビン酸に変換され、さらに還元されることでフェニル乳酸が産生される系が存在する [27, 55]。一方、動物や植物において、乳酸とフェニルアラニンよりフェニル乳酸が生成される代謝系 [80]は知られているが、微生物におけるフェニル乳酸の産生に関する文献はほとんどみられない。

そこで、*E. faecalis* TH10が何を前駆物質としてフェニル乳酸を生成するのかを検討するために、乳酸菌の合成培地組成 [45, 134]を参考に*E.*

faecalis TH10の合成培地を構築した。上記合成培地を一部改変し、本菌が十分に生育する完全合成培地（D63合成培地）の作製に成功した。その成分は、表11のとおりである。

本菌のフェニル乳酸産生の代謝系にフェニルアラニンが関与しているかどうかについて検討するため、フェニルアラニン含有のD63合成培地とフェニルアラニンを含まないD63合成培地のOD（660 nm）値が0.6に達するまで培養し、その中に含まれるフェニル乳酸をGC/MSにより検出した。その結果、まず本菌はフェニルアラニンが存在しないことで著しく生育が悪くなった。Guirard [36] は、*E. faecalis* ATCC 9790 株、ATCC 8043 株、ATCC6057株での生育性におけるフェニルアラニンの要求性が「±」と報告しているが、そのことと一致する。フェニルアラニンを含む場合は、約9時間後にこのOD値に達したが、フェニルアラニンがない培地では約72時間を要した。その結果、フェニルアラニンを含む合成培地からフェニル乳酸の生成が認められていたが、フェニルアラニンを含んでいない培地からはまったくフェニル乳酸が検出されなかった。すなわち、哺乳動物と同様、本菌株がフェニル乳酸を産生する際、フェニルアラニンの存在が不可欠であることが示唆された。今後は、RIなどでラベルしたフェニルアラニンを用いて産生されたフェニル乳酸がそのラベルされたものを含むかどうかの試験をする必要があると考えられる。また、この代謝系は生育にも影響していることが認められた。

*Brevibacterium*や*Corynebacterium*が、D-フェニル乳酸を作るという内容で特許がとられている [58]。細菌におけるフェニル乳酸の産生に関する文献としては、これぐらいしか見当たらない。微生物に範囲を広げると、*Geotrichum candidum*はチーズ製造の際の自然なフローラを形成する微生物であるが、この微生物が産生するD-フェニル乳酸のために、チーズ熟成の際にカビや有害細菌などが生育しないとされている [21]。

このように、乳酸菌がフェニル乳酸を作るという報告ならびに微生物がD-フェニル乳酸を作るという内容でもD-およびL-フェニル乳酸を共に産生するというところを見出した報告はいずれも見当たらない。したがって、これらの結果は本研究で得られた新知見である。フェニル乳酸の *Listeria*

*monocytogenes*に対する抗菌性については報告されている。この報告では、D-フェニル乳酸のみよりD-およびL-フェニル乳酸の両者が存在する方が抗菌性は強いことが明らかにされており [21]、*E. faecalis* TH10がD-およびL-フェニル乳酸をつくることは、本菌株の抗菌性発現の上で有利なことと考えられる。そこで、次にグラム陰性と陽性の有害性細菌に対するD-フェニル乳酸13.4 μ MおよびL-フェニル乳酸6.713.4 μ M（量比は2：1）の抗菌性について試験した。

第1章 第3節 フェニル乳酸の有害性細菌に対する影響

【目的】

MRSAによる院内感染と同様、現在、日本で最も注目すべき有害性細菌は、*Escherichia coli* O157:H7と言っても過言ではないであろう。1982年に米国での集団食中毒において初めて発見された*E. coli* O157:H7は、その後、世界各国でも発生している [116]。*E. coli* O157:H7による食中毒や感染症は、近年、わが国でも増加しつつある疾患として注目され、1996年には集団食中毒として大発生し、患者数は1万人を超えるに至った。このような大規模で短期間に多発した集団食中毒は、世界的に類をみないものである。大腸菌は、ヒトの腸管内正常細菌叢に含まれるグラム陰性桿菌で、異所性（迷入）感染を引き起こす以外、一般的には非病原性である。身体の特定期所に常在する微生物は本来、病気を引き起こさないが、別の場所に移動（迷入）すると感染を引き起こすことがある。一部の特殊な病原因子産生能を獲得した大腸菌は下痢性（病原性）大腸菌と総称され、いくつかに分類される。さらに、血清学的に大腸菌には他の腸内細菌と同じくO抗原、H抗原、K抗原があることから、この3つの抗原により菌型が分類されている。

E. coli O157:H7による消化管感染症の典型像が出血性大腸炎であったために、その起因大腸菌は初め腸管出血性大腸菌と呼ばれていた。しかし、この感染による下痢症が必ずしも消化管出血を呈さないことや大腸菌が産生する毒素がベロトキシン（VT）であることが明らかとなり、近年、腸管出血性大腸菌はベロトキシン産生大腸菌とも呼ばれる。腸管出血性大腸菌はこれまでに約60種の血清型が知られているが、わが国で分離されたその約7割はO157である。本菌による感染症の特徴は、単に腸管感染症にとどまらず、溶血性尿毒症候群（HUS）や血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）や脳症など生命をおびやかす感染症が数%～10%出現し、全身感染症としての側面も有する。また、他の下痢性大腸菌は主に発展途上国で問題になっているのに対し、この*E. coli* O157:H7は欧米や日本などの先進国で問題になっているのも1つの特徴である。

MRSAや*E. coli* O157:H7の他にも、病原性細菌として*Bacillus cereus*、*Yersinia enterocolitica*、*Clostridium perfringens*、*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*などがあげられる。*B. cereus*は、芽胞を形成するグラム陽性の桿菌でエンテロトキシンを産生する。*Y. enterocolitica*は、グラム陰性の桿菌で至適温度は25~30℃であるが、増殖温度域は0~44℃と広い上に、冷蔵庫での保存温度でも増殖する性質がある。エンテロトキシンを産生することで食中毒の原因となるが、感染するとエルシニア症となる。*C. perfringens*は、芽胞を形成するグラム陽性桿菌で、ある種のブライン漬けチーズや乳製品を缶詰にした際の変敗の原因菌で、アンモニア、硫化水素などのガスを発生し食品劣化の原因となる。また本菌は、非常に危険性の高い*Clostridium botulinum*のモデル細菌とされる。*S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*は、グラム陰性桿菌で、チフス性疾患や急性腸炎を引き起こす原因菌である。至適温度は35~37℃であるが、低温や乾燥には抵抗性が高い。

そこで、本節では上記にあげた6菌種8菌株について、フェニル乳酸の抗菌性を試験した。その際、抗菌性のメカニズムが重なることで抗菌性に相乗効果がみられることが一般に知られているので、pHを下げた場合のフェニル乳酸の影響についても検討を行った。

【実験方法】

1. 供試菌株および培地

メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) FSA-1、*Bacillus cereus* JCM 2152、*Escherichia coli* O157:H7 (95-07株)、*Escherichia coli* O157:H7 (96-42株)、*Escherichia coli* O157:H7 (96-70株)、*Yersinia enterocolitica* JCM 1677、*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* JCM 6977および*Clostridium perfringens* JCM 1290を供試したが、菌株の由来と培地、培養温度については表12および13に示すとおりである。

2. フェニル乳酸

フェニル乳酸のL体は、東京化成工業（東京）から、フェニル乳酸のD体は、Aldrich（USA）から購入し供試した。*E. faecalis* TH10の産生するフェニル乳酸に準じてD体 13.4 μ M、L体 6.7 μ M（量比は、2 : 1）に混合したものをを用いた。

3. ペーパーディスク法による抗菌性試験

表14に示した濃度とpHに調整しフェニル乳酸を加えた溶液60 μ lを用い、本章第1節と同様、ペーパーディスク法による抗菌性試験を行った。各試験菌の懸濁液をそれぞれ供試菌株の至適寒天培地全体に塗抹し、そのシャーレの中心部にそのペーパーディスク（直径8 mm）を置いて供試菌株の至適温度で24時間培養し、ペーパーディスクの周囲に生じるクリアーゾーン（生育阻止円）の直径より抗菌活性について評価した。

【結果および考察】

種々の条件で各供試菌に対するフェニル乳酸の抗菌性を試験した結果を表14に示した。まず、1.0%の濃度のフェニル乳酸を用いて各供試菌に対する抗菌性試験を行った。広くグラム陰性・陽性細菌に関係なくすべての供試菌に対し抗菌性が認められた。この中で唯一、*C. perfringens*に対する抗菌性はなかった。

*Listeria monocytogenes*は、グラム陽性の短桿菌で0~45℃の範囲内で生育し、動物性食品の原料となる乳、食肉、魚介類に広く分布している。本菌の感染が原因のリステリア症は、ヒトと動物の人畜共通感染症と認められており、骨髄炎、髄膜炎、敗血症などの症状を呈する極めて有害な細菌である。Dieuleveux *et al.* [20] は、細菌に対するフェニル乳酸の効果を調べ、この*L. monocytogenes*などグラム陽性菌への抗菌性は認めているが、グラム陰性菌に抗菌性は示さないと述べている。しかし本研究では、グラム陰性菌への抗菌性も認められた。Dieuleveux *et al.* [20] の報告では、D-フェニル乳酸のみを用いたが、抗菌性はD型のみよりD型およびL型が存在する方が強いことが認められている。本研究において、*E. faecalis* TH10の抗菌性が

グラム陰性菌にもみられたのは、本菌株がD型の他にL型のフェニル乳酸も産生することに起因すると推察された。特に、グラム陰性細菌の中でも *E. coli* O157:H7に抗菌性を示したことは注目に値すると考えられる。*E. coli* O157:H7のヒトに対する病原性は、他の腸管出血性大腸菌の血清型に比べると非常に高く、一般に他の血清型では1,000個の細胞が口に入ると下痢が発症するが、*E. coli* O157:H7では少なく、約50個の菌体で下痢を発症させることができる [52]。O157:H7はベロトキシン (VT) を産生するが、VTは細胞毒素 (病気の直接的原因として感染症を引き起こす生菌の代謝産物である外毒素) であり、アフリカミドリザルの尿細管細胞 (ペロ細胞) に障害性を有する分子量40,000のタンパク質毒素で、80℃で10分間 (65℃で30分間) の加熱により不活化される易熱性毒素で、抗原性の違いによりVT1とVT2に分類される。VT1は、志賀赤痢菌が産生する志賀毒素と類似 (アミノ酸レベルでは1残基しか違わない) し、抗志賀毒素血清により完全に中和される。VT2は、VT1とアミノ酸レベルで50~60%の相同性を有し、志賀毒素血清では中和されない。また、VT1は成人の γ -グロブリンに中和されるのに対しVT2はされず、マウスに対するLD₅₀はVT1が0.1~0.2 μ gであるのに対し、VT2は1.0 ng (VT1の500~1000倍) とVT1よりも強い毒性を示す。それぞれの局在としては、VT1は菌体内に多く、VT2は大腸菌が生きている限り常に菌体外に放出されている。一般的な腸管出血性大腸菌はVT1のみを産生することが多いのに対し、*E. coli* O157:H7はVT2のみあるいは両方を産生することから、その病原性の強さを推察できる。

MRSA FSA-1、*B. cereus* JCM 2152および*E. coli* O157:H7 (95-07株) の3株については、pH 6.8でD-およびL-フェニル乳酸の濃度を0.7%、0.2%と下げることで抗菌性を試験した。その結果、濃度が低くなるほど抗菌性が弱くなるが、0.2%でも優れた抗菌性を示した。*Geotrichum candidum*の作るD-フェニル乳酸では、0.1%での抗菌性が報告されており [20]、それに呼応する結果であった (表14)。

上記の試験は供試菌にとって条件の良い中性の培地で行ったが、次にpHを6.0あるいは5.5に下げることで抗菌性を試験した。pHの低下による抗菌性向上のメカニズムは、プロトン勾配のバランスが崩れて菌体内のpHを7

付近に保てなくなることに起因している。その結果は、表14に示したとおりで、pHが下がるにつれて抗菌性は上昇している。食品の場合、pHが5付近の製品は数多くあるので、pHが低いこととの相乗効果で抗菌性がさらに向上することは非常に意義があるものと考えられる。

フェニル乳酸の抗菌性をさらに具体的に検討するために、*B. cereus* JCM 2152を1.0%のフェニル乳酸で処理した後、これを洗浄してフェニル乳酸の入っていない寒天培地上で生菌数を測定した。その結果、20分間浸漬するところからはじめたが、この条件下では完全に死滅していた。そこで、浸漬する時間をだんだん短くしていき、最後には浸漬した直後に生菌数を調べたが、その時点で*B. cereus* JCM 2152はすでに死滅していた。すなわち、フェニル乳酸の抗菌性はかなり速効性があることが認められた。

次に、増殖対数期のちょうど真ん中の時間、約6時間後までは、フェニル乳酸の入っていない培地で培養し、6時間後に最終濃度が1%になるようフェニル乳酸を加えてそれらをグラム染色し1,500倍にて鏡検した。これは、細胞壁の状態と生存の有無を間接的に見るためである。*B. cereus* JCM 2152はグラム陽性菌であるので、正常な細胞は紫色に染まる(図7)が、細胞壁の状態が変化したり、死滅するとグラム染色により赤色に染まる。本研究でも、フェニル乳酸を添加して200分後(図8)に赤く染まり出し、400分後には赤く染まる細胞がかなり多くなり、細胞壁の構造変化が伺えた。そこで、これらの細胞を電子顕微鏡にて観察した。200分後(図8)には細胞壁の表面に異常な隆起が観察され、400分後にはその細胞壁がかなり裂けた状態になり、これがグラム染色により赤く染まる原因であることが証明された。

近年、「バイオプリザベーション」の概念が確立されてきたが、これはヒトの長い食文化の中で培われた食品にみられる英知の証明とも言える。たとえば、チーズ製造の場合、開放系で製造・熟成されるにもかかわらず、ヒトにとって安全で良い製品が製造されてきた。これには、非常に精巧な抗菌性メカニズムが働いていることは容易に推察される。チーズ製造の場合、有機酸の存在やpHの低下による抗菌性は古くから理解されてきたが、それらのみでこの強い抗菌性は理論付けられないとの仮説から、チーズスターターである*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*からバクテリオシンが発見された[62]。

同様に、*G. candidum*の産生するフェニル乳酸が安全で効率の良いカマンベールチーズの製造に貢献していることが示されている [21]。このように、発酵食品に生育する有用細菌の抗菌性のメカニズムを1つずつ解明することによって、*in vitro*では現れなくても、相乗効果により食品に大きな抗菌性ならびに有用性を発揮していることが明らかになってきた。一方、フェニル乳酸は、生体内で作られる物質であり、また上述のように長い歴史の中で食されてきた実績のある物質である。したがって、乳酸菌の産生するフェニル乳酸が腸管内での抗菌性に貢献し、本物質の産生菌がプロバイオティクスとして有効である可能性も示唆される。

第2章 *E. faecalis* TH10のヒト腸管上皮モデル細胞への付着性

第1節 ディスク固定Caco-2細胞と細胞外マトリックスタンパク質へのグラム染色法による付着性評価

【目的】

細菌性感染症は、病原性細菌が感染部位に到達、定着した後、細胞侵入因子や毒素を産生することによって成立する。定着とは、細菌が腸管内の細胞に付着し増殖することである。したがって、感染の成立に最も重要なステップが付着である。感染起因細菌の定着因子としての、線毛、外膜に存在するレクチン様タンパク質およびS-layerタンパク質リポタイコ酸が、腸管上皮細胞のレセプターとして糖タンパク質、糖脂質および細胞外マトリックス (ECM) タンパク質などを認識し、定着性にそれぞれ関与していることが明らかにされている [24]。

乳酸菌においては、感染症を引き起こす有害細菌の定着と明らかにメカニズムも異なるので、本論文中では、乳酸菌について腸管にある一定期間留まり、腸管上皮細胞に接着している現象を「付着」という表現にした。乳酸菌も菌種、菌株によって腸管内に付着できる動物種が異なったり、加齢に伴って付着菌種が変化するような現象が見い出されていることから、動物細胞に対し特異的に付着する因子が存在するものと推察されてきた [82]。

一方で、プロバイオティクス乳酸菌と病原性微生物との間の付着部位での競合による感染症予防の可能性を探る観点から、主に腸管系乳酸菌の腸管上皮細胞への付着性や付着因子に関して検討がなされている [137]。乳酸菌の腸管上皮細胞への付着性の検討に関しては、実際の動物の腸管から剥離して腸管上皮細胞を用いたり、Caco-2細胞やHT-29細胞などが利用されている。Caco-2細胞およびHT-29細胞は、自ら分化する培養細胞であり腸管上皮細胞の最適のモデルとされている [137]。また乳酸菌の一部は、細胞間に存在

するECMタンパク質へ付着することも報告されている [51] ので、ECMタンパク質を用いた実験も散見される。しかし、乳酸菌の各種細胞やECMタンパク質への付着に関するメカニズムについて現状ではあまり解明されていない。

多くの病原性細菌の腸管上皮細胞への定着には、菌体表層に存在するレクチンと呼ばれる糖鎖を含むタンパク質が関与していることが多い。*Lactobacillus*属や*Bifidobacterium*属などにおいても、Mukai *et al.* [84]をはじめ多くの研究者がこれらの表層からレクチンを検出している。*Enterococcus*属細菌と動物腸管上皮細胞やECMタンパク質との相互作用についてはほとんど報告が見られず、Zareba *et al.* [145]によるヒト腸管から分離された*Enterococcus*属細菌のECM細胞への付着性評価がなされている程度である。*E. faecalis*はヒト腸管に生息して、腸管内フローラを構成していることから安全性が高く、緒論でも述べたように古くから生菌剤として利用されている。したがって、*E. faecalis*のヒト腸管付着性について検討することはプロバイオティクスとして評価する上で重要である。

以上のことから本節では、*E. faecalis*の赤血球凝集性、Caco-2細胞およびECMタンパク質への付着性について検討した。

【実験方法】

1. 供試菌株

供試菌株として、*Enterococcus faecalis* TH10、*Enterococcus faecalis* JCM 5803を用いた。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIAI 527 [59] および *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 [64] は、Caco-2細胞への付着性評価がなされている菌株なのでリファレンスとして、またECMタンパク質への付着試験のリファレンスとして*Lactobacillus crispatus* JCM 5810 [60] を供試した。*Lactococcus*属および*Enterococcus*属はM17培地 (Difco、USA) を用いて30℃で、*Lactobacillus*属はMRS培地 (Oxoid、UK) にて37℃でそれぞれ培養した。

2. 赤血球凝集試験 [84]

ヒトO型赤血球およびヒツジ赤血球に対する凝集性を検討した。2%赤血球溶液をそれぞれ調製後、マイクロタイターを用いて 10^8 細胞数/mlの供試菌懸濁液と氷上で反応させ、2時間後に判定した。

3. グラム染色法によるCaco-2細胞への付着試験[23]

Caco-2細胞は理研ジーンバンクの細胞開発銀行（つくば市）から入手した。培養には、アンフォテリシンB ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、Sigma、USA)、ストレプトマイシン ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、Sigma、USA)、ペニシリン ($100 \text{U}/\text{ml}$ 、Sigma、USA) を添加した20%ウシ胎児血清（ナカライ、京都）および1%必須アミノ酸を含むDMEM培地（GIBCO BRL、USA）を用いた。LAB-TEKチェンバースライドに 3.5×10^4 細胞数/ cm^2 になるようにCaco-2細胞を接種し、 CO_2 インキュベーター中で 37°C で2週間培養した。培養後の細胞層をリン酸緩衝液（ $\text{pH}6.8$ ）で2回洗浄した後、供試菌株をDMEM培地に菌体数約 5×10^8 /mlとなるよう懸濁した液を注加し、 37°C で2時間保持した。リン酸緩衝液で2回洗浄後、グラム染色し、顕微鏡下で付着菌数を計数した。

4. グラム染色法による細胞外マトリックス（ECM）タンパク質への付着試験[49]

特殊印刷スライドガラス（ウェル直径8 mm、Advantec、東京）に 2.5pmol となるようにラミニン（コスモ・バイオ、東京）、I型コラーゲン（コスモ・バイオ、東京）、IV型コラーゲン（コスモ・バイオ、東京）、V型コラーゲン（コスモ・バイオ、東京）およびウシ血清アルブミン（BSA、Sigma、USA）を固定化した。2%BSAを含むリン酸緩衝液で2時間ブロッキング後、菌体数約 5×10^8 /mlの各供試菌株懸濁液を滴下し、2時間放置した。0.1%BSA含むリン酸緩衝液で洗浄後、付着した菌体をグラム染色し、顕微鏡下で付着菌数を計数した。

【結果および考察】

本実験は、*E. faecalis* TH10のヒト腸管付着性を評価する上で、赤血球凝集性、Caco-2細胞への付着性およびECMタンパク質への付着性を指標として検討した。病原性細菌における細胞への定着には、糖鎖結合性が関与しているものが多い。そこでまず、有害性細菌の糖鎖結合性の検索に広く利用されている赤血球凝集反応を行った。本実験ではヒトO型およびヒツジ赤血球に対する凝集性を検討したが、供試した乳酸菌4株いずれにおいても凝集性はほとんどみられなかった。Fontaine *et al.* [24] は、*Bifidobacterium bifidum* DSM 20082の赤血球表面への付着にはglycophorin Aの糖鎖が関与するが、ブタ胃粘液への付着には糖鎖は関与せずペプチド鎖に結合すると推定している。彼らの結果は、赤血球凝集反応から上皮細胞表層のレセプターを推定することができないことを示している。東北大学のグループ [122] も同様の見解を公表しており、従来の赤血球凝集反応とヒト腸管付着性との相関はまったくないとしている。

次に、各供試菌株のCaco-2細胞への付着性を検討した結果を表15に示した。この値は、1視野当たりの細胞数および細胞付着菌数を無作為に20視野計数し、100細胞当たりの付着菌数で表している。*L. rhamnosus* JCM 1136はCaco-2細胞への付着性と*in vivo*での付着性との関連が示されている菌株である [59]。この菌株の付着菌数は 64.1 ± 12.6 であり、この約60の値はよく付着している評価の目安となる。*E. faecalis* TH10、*E. faecalis* JCM 5803および*L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527の付着菌数は10~25であった。この数値が付着性の強度において優れているかどうかを評価する必要があるが、木元ら [59] は、Caco-2細胞への付着性がみられる菌株としてこの*L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527 (菌体数約 18.0 ± 4.3) をあげていることから、本実験においてそれ以上の付着性を示した*E. faecalis* TH10 (菌体数約 23.2 ± 6.0) は、ヒト腸管上皮細胞への付着性を明らかに有する菌株であると考えられた。

これらの供試菌株について、ECMタンパク質であるラミニン、タイプIコラーゲン、タイプIVコラーゲン、タイプVコラーゲンおよびBSAへの付着性

を検討し、その結果をそれぞれ図9～13に示した。BSAは、タンパク質の代表的なものとして供試し、付着性がタンパク質特異性のあるものかどうかの評価に用いた。各図の付着性評価は、ECMタンパク質面積 $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 当たりの細胞数で示した。これらECMタンパク質への付着性の強いことが示されている *Lactobacillus crispatus* JCM 5810 も本実験に供した。 *L. crispatus* JCM 5810は、ラミニン、タイプIコラーゲン、タイプIVコラーゲン、タイプVコラーゲンへの付着性は非常に高いものであったが、BSAへの付着性はほとんどみられなかった。

Caco-2細胞への付着性の陽性コントロールとして用いた *L. rhamnosus* JCM 1136は、ラミニン、タイプIVコラーゲンおよびBSAにはまったく付着性を示さなかった。 *L. crispatus* JCM 5810には及ばなかったものの、本菌株のタイプIコラーゲン、タイプVコラーゲンへの付着が認められた。

E. faecalis TH10は、ラミニンおよびBSAにはまったく付着性を示さなかったが、陽性コントロールとしての *L. crispatus* JCM 5810には及ばなかったものの、タイプIコラーゲン、タイプIVコラーゲンおよびタイプVコラーゲンに対して付着することが明らかに認められた。特に、タイプIVコラーゲンに対してはかなり強い付着性を有していた。 *L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527および *E. faecalis* JCM 5803も *E. faecalis* TH10と同様の傾向がみられ、タイプIVコラーゲンに対して比較的強く付着することが観察された。

Caco-2細胞への付着性は菌株により異なり、 *Lactobacillus* 属では *Lactobacillus rhamnosus* GG、 *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4、 *Lactobacillus* LBが、また *Bifidobacterium* 属では *Bifidobacterium breve* 4などが強い付着性を有すると報告されている [123]。これらの菌株の一部は腸管毒素原性大腸菌、腸管病原性大腸菌などのCaco-2細胞への付着を阻害することが示されており [123]、これら乳酸菌の *in vivo*での感染症予防効果が期待されている。これらの菌株のヒト上皮細胞への付着阻害メカニズムは明らかにされていないが、乳酸菌と病原性細菌のCaco-2細胞上のレセプター分子が一致していることが推察される。 Mukai *et al.* [86] は *Bifidobacterium* 属においてCaco-2細胞への付着性を検討し、 *Bifidobacterium bifidum*が高い付着性を有していることを認めている。さ

らに感染症起因菌で示されているように、腸管上皮細胞のレセプターとしてECMタンパク質も重要な成分と考えられている。ECMタンパク質としてのコラーゲンやラミニンへの付着性については、いくつかの乳酸菌や *Bifidobacterium* 属が報告されている [86]。Aleljung *et al.* [3, 118] は、*Lactobacillus reuteri* NCIB 11951におけるコラーゲン付着性タンパク質として分子量29,000および31,000のタンパク質の精製に成功している。また、Yamada *et al.* [140]は、*L. acidophilus* グループ6菌種を用いて検討し、*L. crispatus* JCM 5810が高いECMタンパク質への付着性を示すことを報告している。Mukai *et al.* [86] は、*Bifidobacterium* 属12菌種のECMタンパク質への付着性を検討したところ、*Bifidobacterium adolescentis*がコラーゲンに特異的に付着することを見い出している。このように *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属の細胞付着性やECMタンパク質への付着性については多くの報告が出されているが、*Enterococcus* 属では現在までのところほとんどみられない。

哺乳動物の腸管上皮細胞への付着性は特異性が認められているものもあり、1種類の細胞への付着性のみで評価するのは妥当ではない。たとえば、*Bifidobacterium* 属はCaco-2細胞への付着性は低いものの、Intestine 407細胞には高い付着性を示すことが報告されている [74]。本実験で用いた *E. faecalis* TH10について *L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527と比較した結果、Caco-2細胞とECMタンパク質へのほぼ同程度の付着性が認められた。特に、ECMタンパク質の中でタイプIVコラーゲンに対して *E. faecalis* TH10の明らかな付着性がみられた。タイプIVコラーゲンは消化管基底膜中の主要成分であるので、通常は腸内細菌と接することのないECM成分と考えられる。すなわち、運動性のない乳酸菌のレセプターになり得ることはないが、下痢発症時や潰瘍形成時には腸管の表層部に基底膜が露出し、これら腸内細菌の付着する場となり得る。付着性のみられたこれらの菌株は、特に消化管内が何らかの傷害を受けたときにその有効性が期待されるであろう。

本実験は、一般に報告のあるグラム染色法で乳酸菌の付着性を試験し評価したものである。試験の際、細菌を付着させる細胞をディスクに固定させた後に洗浄のステップがあるが、この洗浄の際にCaco-2細胞やECMタンパク

質がディスクから剥がれることもある。すなわち、一定の洗浄条件が得られず、本法も1つの指針になるとは考えられるが、付着性の客観的評価が難しいことを感じた。そこで次節では、Greene and Kleaenhammer [35]の方法に基づくラジオアイソトープ (RI) でラベルした乳酸菌を用いてCaco-2細胞への付着性を検討した。

第2章 第2節 ラジオアイソトープ (RI) ラベル法を用いたCaco-2細胞への付着性評価

【目的】

本章第1節において、ヒト腸管のモデル細胞として最もよく使われているCaco-2細胞への付着性を検討した。しかし試験に用いたグラム染色法は、微妙な洗浄条件により付着している細菌の洗い流される度合いに違いを生じ、同じ条件での洗浄がしにくい傾向にあった。ディスクに固定したCaco-2細胞がその洗浄時に剥がれ落ちてくる現象もあった。また、鏡検での1視野内に付着している細菌数をカウントするのも部分的に多く付着している場所とそうでない場所があり、どの位置が全体の付着性を反映しているのかについても疑問を生じた。したがって、この方法は文献的にはかなり確立され、また多くの報告 [14, 23, 68, 124] がみられるが、厳密な意味では研究者の主観に頼っている部分が否めない。

一方、Greene and Klaenhammer [35] も同様のことを指摘しこの方法に改良を加えた。すなわち彼らは、付着性を評価したい細菌に³H-チミジンを直接取り込ませてラベルし、この段階であらかじめ放射エネルギーと菌数との相関を求めておく。ラベルした細菌をCaco-2細胞に付着させ洗浄後に、液体シンチレーションカウンターにて放射線量を測定し付着している細菌数を数値化している。このRIラベル法の優れたところは、従来の方法（グラム染色法）ではCaco-2細胞の培養固定を直径2 cm以上のディスクで行うのに対し、本法は直径7 mmの小さいディスクを使うことでCaco-2細胞が剥がれにくくなり、さらにウェルの中でピペッティングによる洗浄条件の統一が可能となる。また、グラム染色の鏡検による細胞数のカウントは部分的な評価から全体の付着性を推定するものであるが、本法はディスク全体のCaco-2細胞を回収して液体シンチレーションカウンターに供し、放射線量を数値化するので、付着性評価の信頼度が向上する。さらに再現性が非常に高いことが大きな利点である。

本研究では、Greene and Klaenhammer [35] の方法に準じてRIラベル法

により付着性試験を行った。

【実験方法】

1. 供試菌株

供試菌株として、*E. faecalis* TH10の他に、ヒト腸管への定着因子をもつ *Escherichia coli* SH2 [111]、この菌株からヒト腸管定着遺伝子をノックアウト（破壊）したヒトの腸管に付着性を示さない *E. coli* ORN103 [136]、前節で用いた *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIAI 527 ならびに *Lactobacillus fermentum* の 3 菌株、*L. fermentum* FAF-1、*L. fermentum* CP57 および *L. fermentum* CP498 を用いた。*L. fermentum* は、ヒトの正常な腸内フローラから検出される乳酸菌であるが、ヘテロ発酵性細菌であるため発酵乳製造に用いられることがほとんどなかったため、比較的プロバイオティクスとしての認識の薄い菌種である。しかし、その近縁種である *Lactobacillus reuteri* によるヨーグルトが最近市販されたり、*L. fermentum* のブタ腸管付着性が優れているなどの報告 [19, 46] がなされるなど、*L. fermentum* のヒト腸管付着性についても興味を有する菌種であり、ここで評価することとした。*L. fermentum* は、MRS液体培地を用いて37℃で培養した。長期間の保存は、上記培養液と10%スキムミルクを1:1で混合し、-85℃にて凍結した。

2. ³H-チミジンでラベルした供試菌懸濁液の調製

- 1) 各供試菌株をMRS液体培地で各菌種の至適温度にて16時間、前培養した。
- 2) その培養液の5%量を、5 ml に対し 5 μ l の ³H-チミジン (40 Ci/mmol, 室町製薬、京都) 溶液を添加した新しいMRS液体培地に植菌し、至適温度にて10時間培養した。
- 3) リン酸緩衝液 (pH 6.8) で洗浄し、菌体表面に付着する過剰の ³H-チミジンを取り除いた。
- 4) 放射線量と細菌細胞数を液体シンチレーションカウンター (LSC-900, Aroka, Germany) でカウントし、懸濁液400 μ l の細菌細胞数から換算し

てリン酸緩衝液1 ml当たり $10^7\sim 10^8$ 細胞数を含む菌体懸濁液を調製した。

3. Caco-2細胞の調製と付着性試験

- 1) Caco-2細胞の調製は、本章第1節の方法に基づいて行った。
- 2) 実験に供しうる状態のCaco-2細胞を、プレートに1ウェル (7 mm) 当たり 1×10^5 細胞になるよう調製した。
- 3) 2日に1回培地を交換しながら30℃で7日間インキュベートした。
- 4) オートピペットで培地をゆっくり取り除き、2%グルタルアルデヒド含有のリン酸緩衝液 (pH 6.8) で洗浄し、室温にて1時間インキュベートした。洗浄の条件は、オートピペットにより2%グルタルアルデヒド含有のリン酸緩衝液 (pH 6.8) でゆっくりと3回ピペッティングし、この操作を2回繰り返した。
- 5) グルタルアルデヒドを含まないリン酸緩衝液 (pH 6.8) で、上記と同様に4回洗浄した。
- 6) ^3H -チミジンラベルの供試菌懸濁液400 μl を、Caco-2細胞上に覆うように添加した。
- 7) 37℃で1時間インキュベートした。
- 8) オートピペットで培地をゆっくり取り除き、上記と同様にオートピペットによりリン酸緩衝液 (pH 6.8) でゆっくりと3回ピペッティングし、この操作を3回繰り返した。
- 9) ウェル内面に固定され菌体の付着したCaco-2細胞をすべて回収するために0.1 N NaOHと0.1%SDS溶液を用い、ウェル内の細胞懸濁液すべてを液体シンチレーション液 (和光純薬、東京) 3 mlに懸濁して測定用のバイアルビンに移した。
- 10) ^3H -チミジンからの放射線量を、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

【結果および考察】

^3H ラベルのチミジンを菌体に取り込ませた各培養液400 μl 中の放射線量、

同じ容量の培養液中の細菌数、それぞれCaco-2細胞に付着させるよう1～2.5 mlの範囲で³Hでラベルした菌体培養液量ならびに³Hでラベルされた放射線量を表16に示した。培養液400 μl中の放射線量は、菌体に³H-チミジンを多く含むものは最初から数値が高くなるので、それを後で数値の補正ができるように³Hでラベルされた放射線量当たりの細菌数 (10⁴ 細胞数/Bq) をあらかじめ測定した。すなわち、*L. fermentum* FAF-1や*E. faecalis* TH10はMRS液体培地中で非常によく生育し、同じ量の培養液から菌体懸濁液を調製すると菌体細胞数が多いことで多量の³Hが取り込まれ懸濁液中の放射線量は高くなるので、これを補正するためである。

表17は、各供試菌株のCaco-2細胞への付着性を示したものである。実験は2回行い、その両者にほとんどばらつきはなかったので数値は平均して示した。まず、*E. coli* ORN103であるが、これは本菌の有するヒト腸管付着性因子である線毛（その先端のFim Hタンパク質がもっとも重要）遺伝子を破壊した菌株である。Fim Hタンパク質とは、マンノースをもつ糖鎖に対して特異的にそして強力に結合する因子である。*Salmonella*属も、*E. coli*のFim Hタンパク質のホモロジーとはかなり異なるものの、同様にマンノースを認識して付着するなど、病原細菌の感染症においては古くから研究されているタンパク質である [22]。*E. coli* SH2はクローニングされた線毛 (*fim*) 遺伝子pSH2を上記*E. coli* ORN103に導入し発現させた形質転換体である。両者はマウスの腸管付着性に大きな差のあることが認められており [97]、今回、CaCo-2細胞への付着性および評価法に関してのリファレンスとして供試した。

その結果、Caco-2細胞への付着性において両者には著しい有意差がみられ、*E. coli* SH2の付着性を100%として表示した付着率は、線毛遺伝子を破壊した*E. coli* ORN103では9%を示し、10分の1以下に低下していた。これは、両菌株の性状から推察される結果を明確に反映するものであった。*L. lactis* NIAI 527はCaco-2細胞に付着性のある菌株と評価されており [59]、その付着率は41%であった。一方、*L. fermentum* CP57と*L. fermentum* CP498の付着率もそれぞれ44%と42%であった。*L. fermentum* FAF-1は、ヒトの糞便中から分離された菌株であるが、付着率は*E. coli* SH2よりも高く

148%を示した。*L. rhamnosus* GGは、すでにヒトへの投与がなされ、臨床的にプロバイオティクス乳酸菌としての証明がなされている菌株で、ヒト腸管付着性も認知されている [123]。同様の実験系を用いている研究者からの私信 [122]で、本菌株のCaco-2細胞への相対的な付着率は、42%程度との情報を得ている。すなわち、この実験系で得られた40%という数値は優れた付着性を示すものと考えられる。したがって、この評価法において、*E. faecalis* TH10は*L. rhamnosus* GGよりも強い付着性が証明された。*L. rhamnosus* GGは、投与後7日~10日でも糞便中から本菌株が回収されるなど、客観的評価でヒト腸管付着性のある菌株とされているが、*E. faecalis* TH10は110%を示しそのヒト腸管付着性は十分に期待できるところである。これは線毛の先端にマンノースと結合するFim Hタンパク質を有する*E. coli* (菌体数約 64.3×10^6 /ウェル) よりも本付着性試験においての数値が高かった。これは、プロバイオティクスとして本菌を評価する場合、非常に有益となる結果である。

E. coli O157:H7感染症の治療には多くの臨床施設で抗生物質が用いられている。下痢症の極初期に抗生物質を投与することは、大腸菌の増殖を阻止し重篤な合併症の発生を軽減する効果を期待できる。しかし一方で、*E. coli* O157:H7を破壊して菌体内のVTを菌体外に大量に放出することが危惧されている。ただし、HUS発症に関係深いと考えられているVT2は腸管出血性大腸菌が生存している限り菌体外に放出されるので、感染の早い時期に抗生物質を投与するのは、菌体外へVT2が放出される危険性よりも菌の増殖を早期に阻止することにより結果的にVT2の産生量を減少させ、体内への放出量を減少させる効果を期待してのものである。VTは大腸菌より放出された後、大腸菌が腸管に付着するのと同じメカニズムで腸管の表面に留まり、生体(宿主)に取り込まれるのを待つ。したがって大腸菌の付着性を乳酸菌によって拮抗阻害することは、VT自体の付着性の阻害にもつながる可能性がある。

本章での検討結果より、*E. faecalis* TH10は乳酸菌でも、線毛を持つ大腸菌を上回る付着性を有することが証明されたが、ヒト腸管上皮細胞において病原性細菌の乳酸菌による付着性阻害を図14のようにイメージした場合、病原性細菌よりかなり強力な付着性を乳酸菌が有すると拮抗阻害の効果がさら

に期待できる。そこで、次章では、*L. fermentum* FAF-1からCaco-2細胞への付着性を示すタンパク質遺伝子をクローニングし、その遺伝子を*E. faecalis* TH10に導入し発現させることで、本菌独自の付着性に新たな付着因子を付与し、ヒト腸管上皮細胞への付着性増強の可能性を試みた。

第3章 *E. faecalis* TH10におけるヒト腸管付着性遺伝子の発現

第1節 形質転換条件の確立

【目的】

乳酸菌の産業的利用の増大と共に、乳酸菌における分子遺伝学的研究が急速に進展してきた。薬剤耐性能をマーカーとするプラスミドを用いた遺伝的な組み換え技術や形質転換法が確立され、育種した菌株の「産業的有用性」が問われ、さらに目的の遺伝子を染色体に組み込んで安定化する技術、組み換え体の安全性を保証する技術など、実用化への確固たる方法論の確立が重要となってきた [125]。

現在までに、形質転換法の開発・改良と共に、各菌株に適するベクターや「制限・修飾欠損宿主」の開発、高電圧の電気パルス発生装置の改良など、多くの技術的進歩が達成されたが、菌種菌株による形質転換条件の検討は必須である。

細菌における遺伝学の進展ならびにその手法の確立は大腸菌を先駆けとして行われてきた。その中で、コンピテント細胞を用いた形質転換法の確立は、非常に大きな功績の1つとなっている。一方、1970年代より乳酸菌においてプラスミドの存在やその機能が明らかにされてきたが、その遺伝子の導入には接合法やプロトプラスト融合法が導入されるのみで、一般の乳酸菌では効果的な形質転換法が確立できなかった。すなわち、乳酸菌においてコンピテント細胞がどうしても構築できなかったのである。しかし、1987年に Harlander [43] が乳酸菌で初めて高電圧電気パルスによる intact cell を用いた形質転換に成功し、同年に Chassy *et al.* [7] によって、市販の機器 (Gene Pulser, Bio-Rad, USA) を用いたエレクトロポレーション法による乳酸菌の形質転換の基礎が確立された。

エレクトロポレーション法による形質転換の頻度は、用いる方法、宿主・ベクターの種類とその組み合わせなどによって大きく異なる。宿主の制限修

飾 (R/M) 系の存否・強弱、細胞壁組成、ヌクレアーゼ活性などの影響も大きい。また、一般にベクターのサイズの小さい方が形質転換頻度は高いと考えられているが、他にもレプリコン・選択マーカの種類、挿入断片の有無・性質・転写方向など、さまざまな要因がその頻度に影響する。ベクターのコピー数や構造的・継続的な安定性についても同様に形質転換頻度に影響する。これらの影響については、同一条件で比較した報告がないため、統一的な解釈はできず、各々の宿主-ベクター系で個別に検討する必要がある。選択マーカとしてはエリスロマイシン (Em) 耐性能やクロラムフェニコール (Cm) 耐性能が明確にされているので、これら抗生物質耐性遺伝子が使用されている。Double crossoverによる薬剤耐性マーカ遺伝子が除去できる理論が確立され [125]、より食品レベルに近づくための安全な選択マーカも考えられている [126]。乳酸菌に存在するプラスミドのコピー数は1細胞あたり10以下から多くても50程度で、これは大腸菌などのコピー数と比べてかなり少ない。また、細胞壁が構造的に固いので、アルカリ法のみによっては溶菌せず、リゾチームなどの溶菌酵素を使用する必要がある。また除タンパクがしにくく、DNase活性が高いなど、乳酸菌からのプラスミドの抽出は大腸菌と比べて難点が多い。

本節では、*E. faecalis* TH10を形質転換するため、初期の方法に改良が加えられ汎用性の高いHolo and Nesの方法 [47] に準じたエレクトロポレーション法により、宿主-ベクター系を確立することを目的とした。ベクターにはEm耐性能をコードしたpIL253 [130] を用いた。エレクトロポレーションに供したプラスミドは、Anderson and McKay [4] による大量の培養液からの抽出、そして塩化セシウム密度勾配超遠心法で精製を行った。この際、形質転換頻度を考察する上で、他のいくつかの乳酸菌についても同様に試験した。

【実験材料】

1. 供試菌株

本研究に供試している *E. faecalis* TH10 の他に、乳酸球菌として

Lactococcus lactis subsp. *lactis* LMO230 を、乳酸桿菌として *Lactobacillus fermentum* FAF-1 と *Lactobacillus casei* NRIC 1917 を供試した。それぞれの培養と保存は、前述のとおり行った。Em耐性遺伝子をコードした pIL 253 [130] は、プラスミドフリー株である *L. lactis* LMO230 に導入した状態で複製保存し、Em耐性 *L. lactis* subsp. *lactis* LMO230 より抽出・精製した。*L. lactis* subsp. *lactis* LMO230 は、米国ミネソタ州立大学の Dr. McKay より、pIL 253 はフランス国立農業研究所の Dr. Chopin より分譲していただいた。上記乳酸菌の長期間の保存は、各培養液と 10% スキムミルクを 1:1 で混合し、-85℃ にて凍結した。

2. 供試培地

1) TYG 液体培地 (pH 6.8)

トリプトン (Difco, USA)	20 g
酵母エキス (Difco, USA)	5 g
グルコース	5 g
蒸留水	1,000 ml

2) MRS 液体培地 (pH 6.8)

MRS Broth (Oxoid, UK)	37.25 g
蒸留水	1,000 ml

3. プラスミド大量抽出用試薬 [4]

1) エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液 (pH 8.0)

EDTA (Sigma, USA)	9.3 g
蒸留水	100 ml

2) ショ糖含有 Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (pH 8.0)

ショ糖	6.7 g
トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Sigma, USA)	0.61 g
1) の EDTA 溶液	0.40 ml

上記成分を溶解後、pH を調整し 121℃ で 15 分間オートクレーブで滅菌した。

3) トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (pH 8.0)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	0.3 g
蒸留水	100 ml

上記成分を溶解後、pHを調整し121℃で15分間オートクレーブで滅菌した。

4) 0.25 M EDTA溶液 (DNase不活化用) (pH 8.0)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	0.3 g
1) のEDTA溶液	50 ml

上記成分を溶解後、pHを調整し121℃で15分間オートクレーブで滅菌した。

5) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 含有TE緩衝液 (pH 8.0)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	0.61 g
1) のEDTA溶液	8.0 ml
SDS (ナカライテスク、京都)	20.0 g
蒸留水	71 ml

上記成分を溶解後、pHを調整し121℃で15分間オートクレーブで滅菌した。

6) トリス緩衝液 (pH 7.0)

トリス塩酸塩	31.52 g
蒸留水	100 ml

上記成分を溶解後、pHを調整し121℃で15分間オートクレーブで滅菌した。

7) 20:50TE緩衝液 (pH 7.0)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	0.61 g
1) のEDTA溶液	8.0 ml
蒸留水	100 ml

上記成分を溶解後、pHを調整し121℃で15分間オートクレーブで滅菌した。

8) 塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム	29.22 g
---------	---------

蒸留水 100 ml

上記成分を溶解後、121℃で15分間オートクレーブで滅菌した。

9) 食塩水飽和フェノール

フェノール (ナカライテスク、京都) 500 g

12 gの塩化ナトリウムを400 mlの蒸留水で溶解し、この溶液をフェノールの入った試薬ビンに直接注ぎフェノールを溶解後、冷蔵庫にて保存した。2層に分れるので、下層を供試した。

10) クロロフォルム・イソアミルアルコール (24:1) 混液

クロロフォルム (ナカライテスク、京都) 480 ml

イソアミルアルコール (ナカライテスク、京都) 20 ml

上記成分を混合し、冷蔵庫で保存した。

11) 10:1 TE緩衝液 (pH 7.5)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 0.12 g

1) のEDTA溶液 0.40 ml

蒸留水 100 ml

上記成分を溶解後、pHを調整し121℃で15分間オートクレーブで滅菌した。

12) イソプロパノール (-20℃に冷却したものを使用)

13) リゾチーム溶液 (用事調製)

リゾチーム (Sigma, USA) 1.0 g

3) のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 100 ml

上記成分を溶解後、氷上にて冷却した。

14) 水酸化ナトリウム溶液 (用事調製)

水酸化ナトリウム 0.12 g

蒸留水 1.0 ml

上記成分を溶解後、氷上にて冷却した。

15) プロテイナーゼK溶液

プロテイナーゼK (Merck, Germany) 0.1 g

蒸留水 29 ml

上記成分を溶解後、マイクロチューブに1 mlずつ分注し、56℃で2時間

インキュベートし-20℃にて保存した。

16) エチジウムブロミド溶液

エチジウムブロミド	0.01 g
蒸留水	1.0 ml

上記成分を溶解後、遮光し4℃にて保存した。

17) フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25:24:1) 混液

9) の食塩水飽和フェノール	250 ml
クロロフォルム	240 ml
イソアミルアルコール	10 ml

上記成分を混合し、4℃にて保存した。

4. プラスミド少量抽出用試薬 [112]

1) リゾチーム含有ショ糖溶液 (用事調製)

ショ糖	25 g
リゾチーム (Sigma, USA)	3 g

ショ糖25 gを蒸留水で100 mlにメスアップし、121℃で15分間オートクレーブで滅菌し、4℃にて保存した。この溶液にリゾチームを溶解した。

2) 水酸化ナトリウム含有SDS溶液 (用事調製)

SDS	3.0 g
水酸化ナトリウム	0.8 g

SDSの3 gを蒸留水で100 mlにメスアップし、121℃で15分間オートクレーブで滅菌し、4℃にて保存した。この溶液に水酸化ナトリウムを溶解した。

3) 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.8)

酢酸ナトリウム	40.8 g
---------	--------

溶解後、pH調整し、蒸留水で100 mlにメスアップした。121℃で15分間オートクレーブで滅菌し保存した。

4) イソプロパノール (室温のものを供試)

5) エチジウムブロミド含有酢酸アンモニウム溶液

酢酸アンモニウム溶液（最終濃度 7.5 M） 57.8 g
溶解後、蒸留水で100 mlにメスアップした。121℃で15分間オートクレーブで滅菌し保存した。

エチジウムブロミド溶液（最終濃度 20 mg/ml） 0.2 g
蒸留水 10 ml

溶解後、遮光し4℃にて保存した。

使用時に、酢酸アンモニウム溶液0.975 mlとエチジウムブロミド溶液0.025 mlの割合に混合した。

6) フェノール・クロロフォルム（1:1）試薬

大量抽出用 9) のフェノール試薬 50 ml
クロロフォルム 50 ml

混合後、4℃にて保存した。

7) RNase A溶液（最終濃度 1 mg/ml）

RNase A（Sigma, USA） 0.1 g
10 mM トリス溶液（pH 7.5、トリス塩酸塩を使用） 100 ml

上記成分を溶解後、マイクロチューブに1 mlずつ分注し、95℃にて10分間インキュベート後、-20℃にて保存した。

8) 99%エタノール（-20℃のものを使用）

9) 70%エタノール（-20℃のものを使用）

10) DNA緩衝液

ブロムフェノールブルー 0.014 g
ショ糖 5.0 g
3.-1) のEDTA溶液 0.15 ml
蒸留水 15 ml

上記成分を溶解後、pH 8.0に調整して121℃で15分間オートクレーブで滅菌し、自然冷却後1 mlずつマイクロチューブに分注し冷蔵した。

5. Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System（ミニカラム精製）
用試薬（Promega, USA）

1) 細胞懸濁用溶液

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	0.05 M
EDTA	0.01 M
RNaseA	100 g/ml
2) 細胞溶解用溶液	
水酸化ナトリウム	0.2 M
SDS	1.0 %
3) 中和溶液	
酢酸カリウム(pH 4.8)	1.32 M
4) カラム洗浄用溶液 (pH 7.5)	
酢酸カリウム	80 mM
トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	8.3 mM
EDTA	0.04 mM

使用する直前にエタノール (99%) を55%になるように添加した。

6. エレクトロポレーションに供する培地と試薬 [47]

- 1) SGM17液体培地 (pH 6.8)

M17 Broth (Difco, USA)	37.25 g
グルコース	5.00 g
シヨ糖 (最終濃度 0.5 M)	171.15 g
蒸留水	1,000 ml

上記成分にグリシンを0.5、1.0%になるように加え、溶解後121℃、15分間オートクレーブにより滅菌した。
- 2) SGM17MC液体培地 (pH 6.8)

1) のSGM17液体培地1,000 mlに、以下の試薬 (フィルター滅菌済み) を無菌的に加えた。

1M MgCl ₂ (最終濃度 0.02 M)	20 ml
1M CaCl ₂ (最終濃度 0.002 M)	2 ml
- 3) 菌体洗浄液 (エレクトロポレーションに供する菌体懸濁液)

シヨ糖 (最終濃度 0.5 M)	171.15 g
グリセロール (最終濃度 10%)	100 ml

蒸留水 1,000 ml

上記成分を溶解後、121℃で15分間オートクレーブにより滅菌した。

4) エリスロマイシン (Em) 溶液

Em (Sigma, USA) 0.04 g

99%エタノール 0.25 ml

Emは、水にほとんど溶けないので、あらかじめエタノールに溶解させ、完全に溶解後、蒸留水で50 mlにメスアップし、フィルター滅菌し遮光下4℃で保存した。これを10倍希釈になるように培地に加え供試した。

7. アガロースゲル電気泳動用試薬 [90]

1) ゲル染色液

0.4 mg/mlエチジウムブロミド溶液 0.02 ml

蒸留水 0.98 ml

2) TAE緩衝液

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 242.2 g

3.-1) のEDTA溶液 29.225 ml

上記成分を酢酸でpH 8.0に調整し、蒸留水を加え1,000 mlにメスアップし、121℃で 15分間オートクレーブで滅菌した。

【実験方法】

1. 受容菌の調製 [47]

- 1) *E. faecalis* TH10、*L. lactis* LMO230、*L. casei* NRIC1917はTYG液体培地で、*L. fermentum* FAF-1はMRS液体培地で前培養した。それぞれの培養液をSGM17培地に1%量植菌し、波長600 nmのOD値が0.5～0.7に達するまで培養した。
- 2) それぞれの培養液を6,000 r.p.m.で10分間遠心分離して上清を除き、エレクトロポレーション用菌体洗浄液で2回洗浄した。
- 3) 遠心分離後、エレクトロポレーション用菌体洗浄液に懸濁し、この懸濁液を0.04 mlずつ分注し-80℃で凍結保存した。

4) 直前に氷上にて解凍し、受容菌としてそのままエレクトロポレーションに供した。

2. エレクトロポレーション法 [47]

- 1) 氷上で、expression培養用液体培地となるSGM17MC液体培地 (pH 6.8)、Gene Pulser用キュベットおよびスライダー (Bio-Rad, USA) を10分間ほど冷却しておく。
- 2) 解凍した受容菌懸濁液40 μl を完全に脱塩したプラスミド溶液1 μl (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と混合し、キュベットに入れ氷冷する。
- 3) Gene Pulser (Bio-Rad, USA) を2.0 kV、25 μF (Capacitance)、200 Ω (Pulse Controller Unit) に設定し、キュベット (0.2 cm gap) をスライダーに入れ、このスライダーをGene Pulserの電極に装着した。Gene Pulserの左のパルスボタンを押したままの状態でも右のボタンをブザーが鳴るまで押し続けた。
- 4) ブザーが鳴ったら素早くSGM17MC培地 (expression培養用液体培地) 1 mlを添加し氷冷した。ゆっくり2~3回ピペティングし、受容菌の至適温度で2時間培養した(expression培養)。
- 5) 培養液を遠心分離 (6,000 r.p.mで5分間) により集菌し、300 μl のSGM 17MC培地に懸濁した。その100 μl ずつをEm含有M17G寒天培地上に塗抹し、受容菌の至適温度で48~72時間培養し、Em耐性形質転換体を得た。

3. プラスミド大量抽出法 [4]

- 1) pIL 253を含む*L. lactis* subsp. *lactis* LMO230を10 mlのEm含有TYG液体培地で30°C、8~12時間培養した。
- 2) 500 mlのEm含有TYG液体培地に1%量の培養液を接種し、30°Cで8時間培養した。
- 3) 遠心分離 (5,000 r.p.m.で10分間) により集菌し、0.85%生理食塩水で洗浄した。
- 4) ショ糖含有TE緩衝液を50 ml添加し37°Cで懸濁した。

- 5) リゾチーム溶液を12.5 ml添加して混和した。
- 6) 37℃に保ち5分ごとに緩やかに攪拌し、20分間インキュベートした。
- 7) 0.25 M EDTA溶液を6.25 ml添加・混合後、プロテイナーゼK溶液を1 ml添加した。
- 8) SDS含有TE緩衝液を3.75 ml添加し、56℃で15~20分ごとに緩やかに攪拌し、1時間インキュベート後、スターラーを用いて中速度で2分間混合した。
- 9) 水酸化ナトリウム溶液を2.5 ml添加し、ユニバーサルシェーカー (140 r.p.m.) で10分間混合した。時々、手で上下にも混合した。
- 10) トリス緩衝液を6.0 ml添加し、ユニバーサルシェーカー (140 r.p.m.) で10分間混合した。時々、手で上下にも混合した。
- 11) 塩化ナトリウム溶液を9.5 ml添加し、氷上で30分間インキュベートした。
- 12) 遠心分離 (12,000 r.p.m.で20分間) した後、上清をプラスチックの10 mlピペットを用いて新しいボトルに移した。このボトルに食塩水飽和フェノールを75 ml添加・混合し、遠心分離 (10,000 r.p.m.で10分間) した後、上清を新しいボトルに移した。
- 13) クロロフォルム・イソアミルアルコール (24:1) 混液を75 ml添加・混合し、遠心分離 (10,000 r.p.m.で10分間) した後、上清を新しいボトルに移した。
- 14) イソプロパノールを75 ml添加・混合し、遠心分離 (12,000 r.p.m.で30分間) した後、上清を除きペレット (DNA) を確認の上、JKワイパーの上にボトルを逆さまにして1~3分間ほど置いた。
- 15) ボトルの口の部分にパラフィルムを被せ白金線で複数の穴を開け、真空ポンプで20分間乾燥させた。
- 16) 乾燥したペレット (DNA) を確認後、20:50 TE緩衝液を2.83 ml添加し、ユニバーサルシェーカー (120 r.p.m.) で30分間ペレット (DNA) を溶解した。

4. 塩化セシウム密度勾配遠心を用いたプラスミドの精製法 [89]

- 1) 5 mlサイズのファルコンチューブに塩化セシウムを3.0 g入れ、20 : 50 TE緩衝液に懸濁した上記DNA溶液をさらに滅菌ピペットを用いてゆっくりと移した。上下にゆっくりと混合し完全溶解させた。
- 2) この溶液を超遠心分離用5 mlのウルトラロックチューブ（日立計測器サービス, No. 3400-1351）に移し、エチジウムブロミド溶液を0.4 ml添加・混合した。チューブの指定された先端を越えないようにミネラルオイルでバランスをとった。
- 3) チューブの表面をきれいに拭き取り、所定のゴム栓で蓋をした。
- 4) 超遠心分離機により遠心分離（15℃、55,000 r.p.m.で14時間）した。
- 5) 遠心分離は、スローストップにより30分ほどかけて停止させた。
- 6) 暗室で紫外線をチューブに照射し、プラスミドの赤いバンドを2本確認。その下のバンドの位置するチューブの部分にスコッチテープを貼り、まずチューブの上部に注射針（18G11/2"、テルモ、東京）で3~4カ所の空気穴を開けた。
- 7) 下のバンドが、クローズドサーキュラーのものであるので、そのバンドの下に注射針を差し込み、2 mlのシリンジ（テルモ、東京）を用いて、ゆっくりとほぼ完全に吸い取り、新しい5 mlサイズのチューブ（Falcon、USA）に移した。
- 8) 塩化ナトリウム溶液で飽和させたイソプロパノールを1 ml添加し、上下にゆっくり振ることでプラスミドを染色しているエチジウムブロミドをイソプロパノール層に移行させて抽出した。上のイソプロパノール層を取り除き、新たにイソプロパノールを1 ml添加し、同様の操作を5回繰り返した。最終的に紫外線をチューブに照射し、溶液が赤くないことを確認してこの操作を終えた。
- 9) 集めた上層の溶液を濃縮フィルター（セントリコン分画分子量10,000、直径25 mm、Amicon、USA）に移し、記載の線（約2 ml）まで10:1 TE緩衝液を入れ、遠心分離（6,000 r.p.m.で約30分間）した。溶液が約1 mmの高さまで濃縮し、また記載の線まで10:1 TE緩衝液を入れ、遠心分離（6,000 r.p.m.で約30分間）した。この操作を3回繰り返し、3回目は10:1 TE緩衝液がなくなるまで遠心分離した。

- 10) セントリコンを逆さまにし上の部分にキャップをかぶせ、そこにプラスミドを回収した。逆の位置に0.1 mlの10:1 TE緩衝液を入れ、遠心分離（6,000 r.p.m.で5分間）した。この操作を3回繰り返した。
- 11) この溶液をマイクロチューブに移し、フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール（25:24:1）混液0.5 mlを加え、よく混和した。
- 12) 遠心分離（6,000 r.p.m.で5分間）し、上清を新しいチューブに移した。残した下の層に、新たにフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール（25:24:1）混液0.1 mlを加え、よく混和した。
- 13) 遠心分離（6,000 r.p.m.で5分間）し、上清を先の上清と合わせた。
- 14) 99%エタノールを0.75 ml添加し、室温で5分ほど静置した。
- 15) 遠心分離（12,000 r.p.m.で10分間）し、上清を取り除きペレット（プラスミド）を得た。そのチューブに70%エタノールを1 mlゆっくり加え、遠心分離（12,000 r.p.m.で2分間）し上清を取り除いた。
- 16) 真空ポンプで20分間乾燥後、5 μ lの滅菌蒸留水を加えてペレットを溶解し、99%エタノールを0.125 ml添加し室温で5分間ほど静置した。
- 17) 遠心分離（12,000 r.p.m.で10分間）し、上清を取り除きペレット（プラスミド）を得た。そのチューブに70%エタノールを1 mlゆっくり加え、遠心分離（12,000 r.p.m.で2分間）し上清を取り除いた。
- 18) 真空ポンプで20分間乾燥後、適量の滅菌蒸留水を加えて溶解のために、指で数回弾き、卓上遠心機の「フラッシュ」機能でチューブの先端に集めた。

5. プラスミド少量抽出法 [112]

- 1) 供試菌株を5~10 mlの液体培地で培養し、マイクロチューブに集菌した。
- 2) リゾチーム含有ショ糖溶液0.2 mlを添加し、指で弾いてよく混和後、37℃で15分間インキュベートした。
- 3) 水酸化ナトリウム含有SDS溶液0.4 mlを添加し、指で弾いてよく混和後、室温で7分間インキュベートした。
- 4) 冷蔵した酢酸ナトリウム溶液0.3 mlを添加し、指で弾いてよく混和後、遠心分離（12,000 r.p.m.で15分間）した。

- 5) 新しいマイクロチューブに上清を移し、室温のイソプロパノール0.3 mlを添加し、指で弾いてよく混和後、遠心分離（12,000 r.p.m.で15分間）した。
- 6) 上清を取り除き、ペレットを真空ポンプで15分間乾燥後、滅菌蒸留水0.32 mlでペレットを溶解し、エチジウムブロミド含有酢酸アンモニア溶液0.2 mlを添加しよく混和した。
- 7) フェノール・クロロホルム（1:1）混液0.35 mlを添加し、よく混和後、遠心分離（12,000 r.p.m.で5分間）した。
- 8) 上清を新しいマイクロチューブに移し、99%エタノール1 ml加え、よく混和後、遠心分離（12,000 r.p.m.で15分間）した。
- 9) 上清を取り除き、ペレットに70%エタノール1 mlを加え、よく混和後、遠心分離（12,000 r.p.m.で15分間）し、上清を取り除いて真空ポンプで20分間乾燥させた。
- 10) これを滅菌蒸留水0.08 mlに溶解して、RNase A溶液を0.02 ml添加し、指で弾いてDNA緩衝液を2 μ l加え4°Cに保存した。

6. アガロースゲル電気泳動法 [90]

- 1) 蒸留水300 mlにTAE緩衝液を6 ml添加し、その溶液30 mlにアガロース（SeaKem ME Agarose、Bio Products、USA）0.18 gを添加し、マイクロウェーブで約2分間処理し溶解した。
- 2) 45~50°Cに冷却後、エチジウムブロミド溶液を0.075 ml添加し、ゲルプレートに流し込み、コームを後から差し込み固まらせた。固まったら（15分間以上保持）コームを静かに抜き取り、泳動槽に入れTAE緩衝液をゲルの上、5~8 mmぐらいまで浸るように入れた。
- 3) サンプルをウェルに注入し、電極をセットし電気泳動装置（デンケン、東京）により電圧を60Vにセットし約1時間45分間泳動した。
- 4) 泳動後、フェイスマスクを着用し、ゲルを紫外線テーブル（コナフシ、東京）上で紫外線（312 nm）を照射しプラスミドDNAを確認した。
- 5) ポラロイドカメラ（MP-4電気泳動ゲル撮影セット、藤本写真工業、大阪）のレンズに紫外線と青色線を遮断するフィルター（赤色R1フィル

ター) をつけ、ポラロイド写真を撮影した。

【結果および考察】

pIL253は、乳酸菌においてEm耐性能を有し複製可能な分子量4,963 bpのプラスミドである。広く乳酸菌用のベクターとして用いられているが、もともと*E. faecalis*由来の接合伝達性プラスミドpAMB1から構築されたプラスミドゆえ、*E. faecalis* TH10の形質転換に用いるには最適と考えられる。

O'Sullivan and Klaenhammer [112] のプラスミド少量抽出法により、*E. faecalis* TH10からプラスミドを抽出・精製した。この方法は、従来の乳酸菌の少量抽出法にエチジウムブロミドを使用するステップを加えているので、プラスミドは良く精製されている証明として、彼らはこの方法で得たプラスミドを制限酵素で消化し、得られたDNA断片をさらにライゲーションしている。

E. faecalis TH10は、図15に示したように3種類のプラスミドを保有していた。それぞれ分子量の高い方からpTH10-1、pTH10-2、pTH10-3とした。プラスミドは、抽出・精製の段階でクローズドサーキュラー、オープンサーキュラー、リニアの形態をとるので、アガロースゲル電気泳動の際に同じプラスミドであっても移動度の異なるバンドが得られる。図15に矢印で示したpTH10-1、pTH10-2、pTH10-3のそれぞれのバンドは、クローズドサーキュラーのものである。それ以外のバンドについてはpTH10-1、pTH10-2、pTH10-3の違う形態のものであることを、各バンドのプラスミドをゲル板から切り出し制限酵素によって確認した。

本研究では、Holo and Nesの形質転換法 [47] を採用したが、受容菌を作る際に細胞壁の硬度を低くするため培地にグリシンを添加した。しかし、グリシンを添加することで細菌の生育が抑制されるので、グリシンの最適添加濃度を検討した。すなわち、*E. faecalis* TH10 (グリシン濃度0.5、1.0、2.0%)、*L. fermentum* FAF-1 (グリシン濃度0.75%、1.0%)、*L. casei* NRIC1917 (グリシン濃度0.75、1.0%)、*L. lactis* LMO230 (グリシン濃度0.75、1.0%) の受容菌を用意した。それぞれショ糖 (最終濃度 0.5 M)

とグリセロール（10%）含有の滅菌懸濁用溶液で培養液の約百分の一容量にし、40 μ lずつに分注して-85℃で使用するまで保存した。

リゾチームなどの溶菌酵素処理によって調製した受容菌が、菌株によっては高い形質転換頻度を示すこともあるが、酵素処理時間の検討や条件設定による再現性を得にくいことが指摘されているので、本研究では溶菌酵素処理をせずに受容菌を調製し形質転換に供した。

pIL 253は、*L. lactis* LMO230が保有しているpIL253を用いることとし、500 mlのEm含有培養液からAnderson and McKay [4] のプラスミド大量抽出法に準じて抽出し、塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法によって精製したものを形質転換に供した。エレクトロポレーションには、0.2 cm gapのキューベットを用いたことで、微量の塩が残存してもほとんどショートすることがなくなった。

その結果、*E. faecalis* TH10はグリシン濃度1.0%を用いた場合にのみEm耐性形質転換体を得られ、その数も1平板あたり50~100コロニーが得られ乳酸菌の形質転換頻度としては十分なものであった。エレクトロポレーション処理していない受容菌をEm含有の上記平板に塗抹したが、自然突然変異的なEm耐性株はまったく検出されなかった。グリシン濃度0.5%と2.0%で処理した受容菌からEm耐性形質転換体は得られず、グリシン濃度1.0%処理のものが最適条件であった。そこで、Em耐性形質転換体をランダムに4枚の平板から5コロニーずつ計20コロニーを釣菌し、Em含有の液体培地で培養した。これらよりプラスミドを抽出したところ、親株にはないプラスミドが検出され（図15のpIL 253の矢印）、そのプラスミドは約5 kbで、pIL253の4,963 bpと一致した。したがって、Em耐性を有するこれら形質転換体は、pIL 253が染色体にインテグレートすることもなく、プラスミドの形で菌体内に保有されることが認められた。また、再現性もあり、*E. faecalis* TH10におけるpIL 253を用いた形質転換宿主-ベクター系が確立された。

その他の供試乳酸菌、*L. fermentum* FAF-1（グリシン濃度0.75%）、*L. casei* NRIC1917（グリシン濃度0.75%）ならびに*L. lactis* LMO230（グリシン濃度0.75%）においてEm耐性形質転換体を得ることができ、すべてのEm耐性形質転換体は、pIL 253を保有していることが証明された。pIL

253は、広く乳酸菌において複製可能なプラスミドであることが認められた。

E. coli JM105が保有するアンピシリン (Ap) 耐性能をコードしたpUC19をWizard™ Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)によって精製し、上記の乳酸菌すべてについてエレクトロポレーションを行った。その結果、Ap耐性形質転換体はまったく得られなかった。これは、pUC19が乳酸菌の中で複製できないこと、Ap耐性遺伝子のプロモーターがグラム陽性菌とグラム陰性菌では異なることで説明できる。

第3章 第2節 *Lactobacillus fermentum* からの糖鎖受容体タンパク質遺伝子のクローニング

【目的】

多くの病原性細菌やウイルスは、宿主の細胞膜表面に存在する糖タンパク質や糖脂質の糖鎖を受容体として細胞に定着し感染することが知られている。たとえば、病原性大腸菌は線毛を介して細胞膜上の糖鎖と結合して感染し、さらに細菌が産生する毒素（コレラ毒素やベロ毒素など）も細胞膜上の糖脂質の糖鎖をレセプターとして細胞に定着し感染することが知られている [97]。

一方、腸内細菌にとっても腸の蠕動運動や消化物の流れに抗して腸管内にコロニーを形成するためには、腸管上皮細胞への付着が重要なステップである。乳酸菌のヒト腸管付着性ついて、現象面での事実は認められているものの、レセプターなどメカニズムの詳細についてはほとんど明らかにされていない。そういう中、乳酸菌の明確なヒト腸管付着性の因子として図16に示したとおり、*Lactobacillus rhamnosus*から糖鎖受容体タンパク質が精製され、そのN末端からのアミノ酸シーケンスが公表された [142]。

山本 [142,143] はまず、*L. rhamnosus*について、糖脂質糖鎖との結合性を薄層プレートを用いた免疫染色法により検討している。その結果、この菌株は、Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1 ceramide (CTH) と Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1 ceramide (GA1) に強く結合し、Glucosylceramide、GalactosylceramideおよびLactosylceramideにも結合した。しかし、ガングリオ系の糖脂質など、糖鎖にシアル酸を含む酸性糖脂質にはまったく付着性を示さなかった。これらの結果より、本菌は中性糖脂質、すなわち非還元末端がガラクトシル基かグリコシル基である糖鎖に結合することを示唆し、ガラクトシル基は α -結合でも β -結合でも、また比較的短い糖鎖にも結合することを認めている。

次に*L. rhamnosus*が腸管内に常在するラットを用いて、本菌が細胞膜上の糖鎖に付着性を示す実験を行っている。すなわち、ラット小腸の粘膜表層を剥ぎ取りホモジェナイズ後、クロロフォルム-メタノールで抽出し、

Folch法で得られた脂質成分をイオン交換カラムクロマトグラフィーによって酸性糖脂質画分と中性糖脂質画分に分離し、それぞれの画分について菌体の付着性を試験した。その結果、酸性糖脂質画分には数種類の糖脂質が存在するにもかかわらず本菌の付着性は認められず、これは上記モデル系の実験結果と一致していた。一方、中性糖脂質画分には、CTH、GA1およびGlucosylceramideに相当する糖脂質が存在し、菌体との結合性が明らかに認められた。これらの結果は、中性糖脂質の糖鎖が、菌体と結合するレセプターの役割を果たしていることを示すものである。現在、乳酸菌においてヒト腸管付着性を論ずる場合に、唯一、付着性に関与するレセプターとして明確にされたものである。しかし、この付着性の機序により、どの程度の付着強度を有するものかについては明らかにされていない。

さらに、*L. rhamnosus*の菌体表層に存在する付着因子と考えられる糖鎖受容体タンパク質が精製されている。本菌をグアニジン処理し表層タンパク質画分を得て、これにGA1を添加後ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、抗GA1モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングにより、GA1に結合する1本のバンドを見い出している。本タンパク質は、約16,000の分子サイズを持つサブユニットから構成された分子量約160,000のタンパク質であった。しかし、このタンパク質のN末端より155残基のアミノ酸シーケンス（図16）は決定されたが、DNAシーケンスは公表されていない。

本章では、乳酸菌と感染症を引き起こす細菌の腸管付着性の拮抗作用（図14）による感染防御、さらにはその治療へのアプローチを試みるため、以下のとおり検討を行った。

その第1段階が、有用細菌への強力な腸管付着性の付与であり、分子育種学的手法を用いて*E. faecalis* TH10にさらなる強力な付着性を付与することを計画した。すなわち、優れたヒト腸管付着性の証明された乳酸菌から付着性に関与する遺伝子をクローニングし、この遺伝子を*E. faecalis* TH10に導入することを試み、ヒト腸管付着性が増強された形質転換体を得ることを目的とした。本節では、*L. fermentum*からの糖鎖受容体タンパク質遺伝子のクローニングを試みた。

L. fermentum FAF-1は、前章でのヒト腸管付着性モデル試験に基づき、

Caco-2細胞への付着性が供試菌株の中で最も強く認められた菌株である(表17)。 *L. fermentum*は、ヒトの正常な腸内フローラの構成菌種でヘテロ発酵型の乳酸菌である。まず、本菌に*L. rhamnosus*の糖鎖受容体タンパク質と同様の遺伝子が存在するかどうかをPCR法により試験した。得られた増幅断片をシーケンスし、目的のアミノ酸シーケンス(図16)と一致するかどうかを検討した。

次に、*L. fermentum*由来の遺伝子をPCR増幅およびクローニングするために、ファージベクターを用いて本菌のゲノムライブラリーを作製した。PCR増幅したDNA断片をプローブにゲノムライブラリーから目的の遺伝子を含むクローンをスクリーニングした。このDNAの全シーケンスを決定し、オープンリーディングフレーム(ORF)を推定した。また、得られたDNAシーケンスからこのタンパク質のアミノ酸シーケンスを決定し、報告されている*L. rhamnosus*の糖鎖受容体タンパク質[142]とのアミノ酸レベルでの相同性について検討を行った。

【実験材料】

1. 供試菌株

L. fermentum FAF-1を供試し、培養と保存は第2章第2節に基づいて行った。ゲノムライブラリー作成用のベクターにはλ DASH IIを用い、常法[70]に準じてファージプラークを作らせ保存した。

【実験方法】

1. *L. fermentum* FAF-1のゲノムライブラリーの作成(スキーム:図17)

(1) *L. fermentum*からのゲノムの調製[69]

- 1) MRS液体培地にて、*L. fermentum*を37℃で16時間培養した。
- 2) 3,500 r.p.m.で15分間、4℃で遠心分離後、生理食塩水で1度洗浄し、5 mlの50 mM EDTA溶液(pH 7.0)に懸濁した。
- 3) 50 mg/mlのリゾチームを200 μl加え、37℃で60分間保持した。

- 4) 3,500 r.p.m.で15分間、4°Cで遠心分離し、上清を除いた。
- 5) Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, USA) のNuclei Lysis Solutionを5 ml加え、80°Cで10分間保持した。
- 6) 2 mg/mlのRNase Aを1 μ l加えて37°Cで45分間保持した。
- 7) TE緩衝液飽和フェノール/クロロフォルム (1:1) 混液10 mlを加え、穏やかに10分間攪拌し、3,500 r.p.m.で15分間遠心分離し、その上層を回収した。なお、下の水層については、さらにTE緩衝液飽和フェノール/クロロフォルム (1:1) 混液を加えて、同様の操作を3回行った。
- 8) すべての上層を集め、これにクロロフォルム10 mlを加え、穏やかに10分間攪拌し、3,500 r.p.m.で15分間遠心分離した。
- 9) その上層に冷エタノールを加えゲノムを沈殿させた後、1.5 mlのTE緩衝液に溶解しゲノム溶液を調製した。

(2) 制限酵素*Sau3AI*によるゲノムの限定分解 (制限酵素による消化条件の検討) [69]

調製したゲノム溶液の一部を用い*Sau3AI*で部分消化し、*Sau3AI*断片の分布の中心が9~18 kbになる条件を決定した。*Sau3AI*は、4塩基 (5'-GATC-3') でGC含量を片寄りなく認識し、またその切断部位が*BamHI*と一致するので利用価値が高い。あらかじめ*Sau3AI*による限定分解の至適条件を決定するために、下記の実験を行った。

- 1) 13本のマイクロチューブに5 μ lの滅菌蒸留水を入れた。
- 2) そのうちの1本のチューブに2Uの*Sau3AI*を5 μ l入れた。
- 3) よく混合し、その5 μ l混合液を次のチューブに移した。
- 4) この操作を全13本のチューブに繰り返すことによって段階的に*Sau3AI*を希釈し、本酵素の1/2希釈系列を得た。
- 5) 100~200 kbのDNAを10 μ g/45 μ lになるように滅菌蒸留水に溶解した。
- 6) この45 μ lのDNA溶液に10倍濃度の*Sau3AI*緩衝液を5 μ lずつ加えた。
- 7) この混合液を5 μ lずつ、氷上で13本のチューブに加えた。
- 8) 37°Cで60分間インキュベートした。

(3) 制限酵素Sau 3AIによるゲノムの限定分解（全量による実験）

- 1) (2) の実験の50倍にスケールアップした限定消化を行った。
- 2) 2UのSau3AIは、64倍に希釈する条件で加えた。
- 3) 反応を45分後、60分後、90分後に止めた。
- 4) それぞれの反応液をショ糖密度勾配遠心法によりサイズの分画を行った。

(4) ベクターファージへの組み込み

- 1) 切断断片（5'-GATC-3'）がSau3AIと同じλ DASH IIのBamHIアームにライゲーションした。
- 2) ライゲーションしたDNAをλファージの骨格を作るコートタンパク質に組み込むために、*in vitro* パッケージングを行った。パッケージングイクストラクトには、Gigapack II Gold（Stratagene、USA）を用いた。
- 3) ライブラリー保持のために、ファージを増幅させ保存した。ライブラリーのタイターの算出は、成書 [69] に基づいて行った。

2. 糖鎖受容体タンパク質遺伝子のPCRによる検索

糖鎖受容体タンパク質遺伝子のDNAシーケンスが公表されていなかったことから、アミノ酸シーケンスに基づいて複合プライマーを構築した。アミノ酸を指定するコドン表より、図16のとおり考え得る配列のDNAをすべて含んだものを構築し複合プライマーとして用いた。PCR条件は図18に示したとおりに行った。得られたPCR断片はDNAシーケンスし、それをアミノ酸に変換して既存のものとの相同性を検討した。

3. 糖鎖受容体タンパク質遺伝子のスクリーニング [71]

- 1) 上記 2. で得られたDNAシーケンスをもとに、non-RIのビオチンで標識したプローブを作成した。
- 2) ゲノムライブラリーとのハイブリダイゼーションによるスクリーニングは、成書 [71] に基づいて行った。
- 3) プラークのスクリーニングは、3rdスクリーニングまで行い、得られたクローンのDNAシーケンスを行い、既存のものとの相同性を検討し

た。

【結果および考察】

L. fermentum FAF-1より抽出されたゲノムのアガロースゲル電気泳動写真を図17に示した。両端の1と15レーンがマーカで、2~14レーンがゲノムであるが、良く調製されていることが確認された。ゲノムのDNAとしての濃度は $0.28 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ で、全体として約1.5 mlが回収された。純度も $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.86$ であったので、次のステップに進むこととした。

制限酵素反応の至適条件を決めるためにまずは少量のゲノムを用いて、制限酵素濃度を段階的に検討した。限定分解に4塩基認識の制限酵素として5'-GGCC-3'を認識する*Hae* IIIのような制限酵素を用いると、GCに富む領域を小さく切りすぎる上、クローニングする際のベクターのサイトも限られる。通常は5'-GATC-3'を認識し、しかもその断片が*Bam* HIと一致している*Sau*3AIが使用される。*Sau*3AIで切断すれば、汎用されるシャロン系入フェージやλEMBLのクローニング部位の*Bam*HI配列に連結したり、fill-in反応を行ってλFIX IIの partial fill-in ベクターに組み込むことができる。

そこでまず、ゲノムの一部を*Sau*3AIで消化したところ、図17の結果が得られた。両端がマーカで、マーカの9~23 kbの領域に最も強い染色が見られるのが最も良い消化条件と考えられる。染色の強度は、DNAのモル数だけでなく長さにも相関するため、低分子領域では同じモル数のDNAが存在しても染色像は薄くなる。したがって、9~23 kbの領域よりも少し塩基配列の長い部分が濃く染まったレーン、すなわち図17のレーン8が至適条件である。

得られたこの至適条件でラージスケール、すなわち約200 μg のゲノムを*Sau*3AIで消化した。この全DNAを10~40%ショ糖密度勾配遠心法により分画し、分布の中心が9~23 kb付近にあるDNA断片を有するフラクションを精製し、これらをベクターとのライゲーションに供した。精製したゲノムDNA断片について、λDASHII (*Bam*HIアーム)とのライゲーションを行った。ライゲーション後に、アガロースゲル電気泳動を行い、ライゲーション

が目的どおりなされていることを確認した。

in vitro packaging kit (Novagen, USA) によりパッケージングを行い、宿主にはXL1 Blue MRA (P2) を用いてタイター測定を行った [70]。その結果、プライマリーライブラリーは、約 5.5×10^5 pfuであったので、十分なライゲーションからその後の処理が順調に進んでいることが確認された。

宿主にXL1 Blue MRA (P2) を用いて、プライマリーライブラリー (5.5×10^5 pfu) の増殖を4°Cで一晩行った。直径150 mmのプレート当たり約 5×10^4 pfu のプラークを形成させ10 mlのSMバッファーを重層した。回収したSMバッファーに、7%となるようにジメチルスルフォキシド (DMSO) を加え-80°Cで保存した。増幅したライブラリーについてもタイター測定を行ったところ、十分な量が得られていた。

このゲノムライブラリーをテンプレートに、上記複合プライマーを用いてPCR反応させたところ、図18に見られる370 bpの増幅断片1つが得られた。この増幅断片をDNAシーケンスしたところ、すでに報告のある *L. rhamnosus* における糖鎖受容体タンパク質の122アミノ酸のうち、92アミノ酸が一致 (75.4%) し、この範囲内では特に大きなクラスターでの相同性があった。

次に、データベースを用いてアミノ酸レベルでのシーケンスの相同性を検索してみた。その結果、75.4%の相同性でもって *L. rhamnosus* の菌体表層タンパク質として登録のあるものが検索された。本実験を始めた当初は、アミノ酸シーケンスのみの公表であったが、その数ヵ月後、同じ実験者によって *L. rhamnosus* でこのタンパク質をコードするDNAシーケンスがジーンバンクに登録された。アクセッション番号は [AF037091] である。以下、その登録されたDNAシーケンスを参照しながら、実験を進めた。

このDNAシーケンスをプローブとして、*L. fermentum* のゲノムライブラリーからのスクリーニングを試みた。non-RIでのスクリーニングを行うよう、プローブはビオチンで標識した。スクリーニングは3rdスクリーニングまで行い、10個のクローンが得られたので、それぞれクローン1~クローン10の番号を付けた。まず、クローン1について、5'端からのDNAシーケンスを決定した。この段階で得られた10個のクローンは、スクリーニングの

ステップを考慮し、どれも糖鎖受容体タンパク質遺伝子を持つクローンであると推測した。そこで、まずクローン1の挿入DNA断片をシークエンスしたところ、このDNAシークエンスがジーンバンクに登録されている糖鎖受容体タンパク質遺伝子のシークエンスとは大きく異なったので、登録されている *L. rhamnosus* の糖鎖受容体タンパク質をコードするDNAシークエンスをもとに、このオープンリーディングフレーム (ORF) 中央部に当たる部分にプライマーを構築し、上記10個のクローンについてPCR反応させDNA断片を得た。

10個のクローンのうち、目的のサイズ (約370 bp) のDNAが得られたのは、クローン6~クローン10の5個のクローンであった。ここでクローンは、スクリーニングの際のプロープとの反応性の高いものから順に番号を付した。一般にはその方が相同性が高くスクリーニングしている遺伝子を含むクローンである確率は高いと考えた。しかし、本実験ではPCRによる検索の結果、その反応性の低い方からの5つのクローンが糖鎖受容体タンパク質遺伝子を有するクローンであることが示唆された。

この5つのクローンについて、順番に挿入断片のDNAシークエンスを試みることとした。クローン6について行った結果、前半のDNAシークエンスは一致していたが、後半のシークエンスはまったく異なるものであった。解析の結果、相同性がなくなったところに *Sau3A I* の制限酵素サイトがあり、この部分で消化されたためそこに別の *Sau3A I* の制限酵素サイトをもつ断片がライゲーションされたクローンであることが明らかとなった。

次に、クローン9をシークエンスし相同性を調べた。その結果、全体に相同性をもつクローンをスクリーニングすることに成功した。その全シークエンスは図19に示したとおりであるが、ATGの開始コドン、TAAの終始コドン、開始コドンの上流にはプロモーターが確認され、糖鎖受容体タンパク質遺伝子のORFを含むクローンであった。山本 [143] は、*L. rhamnosus* のゲノムから約3 kbのDNA断片をクローニングし、その中に4つのORFを見出し、このうちのORF-2にGA1受容体タンパク質のアミノ酸シークエンス、すなわち糖鎖受容体タンパク質遺伝子がコードされていたことを示している。図20は得られたDNAシークエンスからアミノ酸に置き換えたもので、すで

に報告 [142] のある *L. rhamnosus* と比較した。その結果、開始コドンから終始コドンまで154アミノ酸のうち119が大きなクラスターで一致し、相同性は77.2%と高いものであった。本研究で得られたクローン9も、このORF-2との相同性が高く同じ機能をもっていることが強く示唆された。ここで、糖鎖受容体タンパク質遺伝子を持つクローンがスクリーニングされたため、クローン7、8および10については解析の必要がないので、凍結保存した。以下の実験は、クローン9を用いて行った。

第3章 第3節 糖鎖受容体タンパク質遺伝子の導入と発現

【目的】

本章第2節において*L. fermentum* FAF-1からクローニングされた糖鎖受容体タンパク質遺伝子が、*E. faecalis* TH10で発現するかどうか、そしてそのタンパク質が機能するかどうかを試験した。クローニングした*L. fermentum*の糖鎖受容体タンパク質遺伝子は、ファージベクターλDASHIIに連結されているため、このままでは乳酸菌で複製されない。そこで、本章第1節において*E. faecalis* TH10の宿主-ベクター系を確立することができたプラスミドpIL 253 [130]をベクターとして用い、クローン化したこの遺伝子をサブクローニングした。さらに、pIL 253へサブクローニングした構築プラスミドを用いて*E. faecalis* TH10を形質転換し、プラスミドの解析および糖鎖受容体タンパク質遺伝子の発現について検討を行った。プラスミドの解析は、少量抽出法 [112]によって得られたプラスミドをテンプレートに組み込んだ遺伝子のプライマーでPCR増幅させ、目的の遺伝子の存在を確認することとした。

E. faecalis TH10における糖鎖受容体タンパク質遺伝子の発現は、抗GA1モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティング法により試験した。ただし、本法では糖鎖受容体タンパク質が検出されたとしても、このタンパク質が菌体の表層に位置していない場合は付着性機能を示さないことになる。そこで、本タンパク質の局在位置が、*E. faecalis* TH10形質転換体の菌体表層なのか、菌体内であるのかについても検討した。最後に、本タンパク質の付着性機能を確認するため、第2章第2節の方法に準じ、得られた*E. faecalis* TH10形質転換体のCaco-2細胞への付着試験による評価を行った。その手順は図21に示したとおりである。

【実験方法】

1. *L. fermentum*由来糖鎖受容体タンパク質遺伝子の乳酸菌用ベクターpIL

253へのサブクローニング

*L. fermentum*の糖鎖受容体タンパク質遺伝子の完全なDNAシーケンス(図19)からORFを含む部分のプライマーを設計した。ベクターに用いるpIL253には、*EcoRI*と*XhoI*が存在するので、コード領域の5'端上流域のフォワードプライマー(Clone9 F109)に*EcoRI*サイトを、3'端下流域のリバースプライマー(Clone9 R1238)に*XhoI*サイトを導入し、糖鎖受容体タンパク質遺伝子のORFを含むよう下記プライマーを設定した。

1) フォワードプライマー (Clone9 F109)

5'-GCGAATTCGTCCTTCCACGACCAAGCACT-3'

2) リバースプライマー (Clone9 R1238)

5'-CGCTCGAGTGGCCCTGAATCACGGTGTC-3'

テンプレートには、本章第2節で得られたファージクローン9を用い、PCR条件もその際と同様に行った。アガロースゲル電気泳動法によりこのDNA断片のサイズが確認できたところで、*EcoRI*と*XhoI*で消化し精製した。得られたDNA断片をpIL253の*EcoRI*と*XhoI*サイトにライゲーションすることにより、*L. fermentum*由来の糖鎖受容体タンパク質遺伝子が方向性をもって組み込まれたプラスミドを構築した。ライゲーションの反応には、TaKaRa Ligation Kit Ver.2を用い、16℃で18時間反応させた。以下、このライゲーション産物、すなわちこの構築プラスミドをp921EXと表記した。

2. サブクローニングした糖鎖受容体タンパク質遺伝子 (p921EX) による *E. faecalis* TH10の形質転換

このp921EXを用い、まず形質転換頻度の高いプラスミドフリー株、*L. lactis* LMO20を受容菌としてEm耐性形質転換体を得た。この形質転換体から得られたp921EXのサイズをアガロースゲル電気泳動法で確認した。このEm耐性形質転換体でコピー数を増やしたp921EXを、フェノール・クロロフォルム・クロロフォルム混液で処理した後、エタノール沈殿法により、精製と脱塩を行った。精製したp921EXを少量の滅菌蒸留水に溶解し、本章第1節の条件に準じて、エレクトロポレーション法により*E. faecalis* TH10を形質転換した。得られた形質転換体のプラスミドについては、PCR法と制限

酵素を用いて解析した。

3. PCR法による*L. fermentum*由来糖鎖受容体タンパク質遺伝子のEm耐性形質転換体での存在確認

*L. fermentum*から糖鎖受容体タンパク質遺伝子を検索する際、本章第2節において約370 bpのDNA断片を増幅させる複合プライマーを設計した。このプライマー対を用いて、*E. faecalis* TH10のゲノムおよび保持する3つのプラスミドをテンプレートにPCR反応させた。これは、*E. faecalis* TH10が*L. fermentum*と同様の糖鎖受容体タンパク質遺伝子を有していないことを確認するためである。

4. Em耐性形質転換体における糖鎖受容体タンパク質の確認 [94-96]

本タンパク質を、マウスに免疫して得られた抗GA1ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットィングで調べた。その際の試料には、菌体表面を緩衝液で洗った画分とグアニジン処理して得られた画分を用いた。この実験により、形質転換体が実際に糖鎖受容体タンパク質を発現しているかどうか、またその局在を確認することができる。

5. Em耐性形質転換体のCaco-2細胞への付着性評価 [35]

糖鎖受容体タンパク質遺伝子の発現について、実際にこのタンパク質が機能しているかどうかを、第2章第2節の方法に基づき、形質転換体のRIレベル法によるCaco-2細胞への付着性で評価した。すなわち、RIで形質転換体をラベルし、Caco-2細胞と混合・洗浄後、液体シンチレーションカウンターによって、付着した細菌数を計測した。

【結果および考察】

クローン9のDNAをテンプレートにフォワードプライマー (5'-GCGAA TTCGTCTTCCACGACCAAGCACT-3') とリバースプライマー (5'-CGC TCGAGTGGCCCTGAATCACGGTGTC-3') のプライマー対を用いてPCR

増幅したところ、約500 kbのDNA断片が得られた。PCR増幅されたDNA断片の場合、条件やポリメラーゼの種類によってはポイントミューテーションが起こる場合があるが、この断片をシーケンスしたところ、図19のDNAシーケンスと1塩基も変わらず一致し、*L. fermentum*由来糖鎖受容体タンパク質遺伝子のORFを含むものであったことから、このDNA断片をEcoRIとXhoIで消化した。一方、pIL 253についてもEcoRIとXhoIで消化し、両者を混合してライゲーションを行った。フォワードプライマーにはEcoRIサイトを、リバープライマーにはXhoIサイトをそれぞれ設けたので、pIL 253に方向性を決めて組み込むことができた。

この構築プラスミドp921EXを用い、*L. lactis* LMO230を受容菌としてエレクトロポレーション法によりEm耐性形質転換体を得た。1 μ g DNA当たり約120個のEm耐性形質転換体を得られ、比較的高い形質転換頻度であった。このうちの10個の形質転換体についてプラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動に供した。その結果、プラスミドのアガロースゲル電気泳動パターンから、8個のEm耐性形質転換体には挿入断片のないpIL 253による形質転換がなされていることが認められた。これは、消化されなかった、もしくはセルフライゲーションしたpIL 253によるEm耐性形質転換体であった。そこで、あとの2つの形質転換体より抽出したプラスミドをテンプレートに上記プライマーを用いてPCR反応させた。その結果、この2つの形質転換体から約500 bpのDNA断片が得られ、いずれも目的のDNA断片を含むプラスミド(p921EX)であることが認められた。

このうち1つの*L. lactis* LMO230のEm耐性形質転換体を1,000 mlのEm含有TYG液体培地で培養し、p921EXをフェノール/クロロフォルム、クロロフォルムを用いて抽出した後、エタノール沈殿により、精製と脱塩を行った。精製したこのp921EXを少量の滅菌蒸留水に溶解し、本章第1節の条件に準じて、エレクトロポレーション法により*E. faecalis* TH10を形質転換した。*E. faecalis* TH10において、1 μ g DNA当たり9個のEm耐性形質転換体を得ることに成功した。得られた形質転換体のプラスミドについては、上記のとおりPCR法を用いて解析した。その結果、目的の遺伝子を導入した*E. faecalis* TH10の形質転換体を得られたことが確認された。

次に、*L. fermentum*由来糖鎖受容体タンパク質遺伝子について*E. faecalis* TH10での存在の有無を試験した。*L. fermentum*から糖鎖受容体タンパク質遺伝子を検索した時と同じ約370bpのDNA断片を増幅させる複合プライマーを用いPCR反応させた。*E. faecalis* TH10は、ゲノムの他に3種類のプラスミドを有することが本章第1節で認められているので、これらすべてのDNAをテンプレートにPCR反応させた。その結果、増幅されるDNA断片は得られなかった。すなわち、*E. faecalis* TH10は*L. fermentum*と同様の糖鎖受容体タンパク質遺伝子を持っていないことが、この実験で証明された。このタンパク質は、サザンブロッティング解析により *Lactobacillus plantarum*や*Lactobacillus paracasei*でその存在が報告されており[143]、本研究でも*L. fermentum*からは検出されたが*E. faecalis*には存在せず、*Lactobacillus*属に由来するタンパク質である可能性が示唆された。*E. faecalis* TH10が示すCaco-2細胞への付着性は、本タンパク質の関与しない異なるメカニズムによって発現するものと考えられる。このことから、別の付着性因子を*E. faecalis* TH10へ導入することによって、菌体表面に本タンパク質が検出されるか、また*E. faecalis* TH10本来のCaco-2細胞への付着性にプラスの効果が見られるかどうかを試験した。

E. faecalis TH10形質転換体に糖鎖受容体タンパク質遺伝子の導入が認められたので、*E. faecalis* TH10での糖鎖受容体タンパク質の確認を行った。抗GA1モノクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロッティングしたが、その際の試料には、菌体表面を緩衝液で洗った画分と飽和グアニジンにより洗浄して得られた画分を用いた。その結果を図22に示した。レーン1にはもともとこのタンパク質を有する*L. fermentum*の試料を泳動した。その結果、矢印で示す分子量136,000の位置に、強いバンドが検出された。レーン4にはpIL 253のみが導入された*E. faecalis* TH10のEm耐性形質転換体であるが、その位置に検出されるバンドは存在しない。レーン3はp921EXによって形質転換された*E. faecalis* TH10のEm耐性形質転換体であるが、*L. fermentum*と同様に抗GA1モノクローナル抗体で反応する分子量136,000のタンパク質が検出されている。したがって、導入された遺伝子が発現し、糖鎖受容体タンパク質を産生していること、そしてこのタンパク質が菌体表

層に局在し発現していることが示された。

一方、飽和グアニジンで処理した2つの菌株についての結果を図22のレーン5とレーン6に示した。レーン5にはp921EXによって形質転換された*E. faecalis* TH10のEm耐性形質転換体を、レーン6はpIL 253のみが導入された*E. faecalis* TH10のEm耐性形質転換体である。その結果、レーン4に抗GA1モノクローナル抗体で反応する分子量136,000のタンパク質が検出され、レーン5にはみられなかった。したがって、本タンパク質は*E. faecalis* TH10形質転換体の細胞質内と菌体表層の両方に存在することが示された。このことから、p921EXには菌体内で産生した本タンパク質を菌体表層に局在させるためのシグナル配列もコードされていることが伺えた。

ヒト乳児の糞便から分離された*L. planturum*や*L. paracasei*は、糖鎖受容体タンパク質を菌体表層に発現しているが、他にその遺伝子の存在が推察される*Lactobacillus*属では、本タンパク質を発現していない。すなわち、遺伝的にかなり相同性の高い部分はあるものの、実際にこのタンパク質を産生しないと述べられている[143]。本研究に用いた*L. fermentum*ではこの糖鎖受容体タンパク質遺伝子を発現し、また*E. faecalis*形質転換体において産生したこのタンパク質が菌体表層に局在することを証明できたことは意義があるものと考えられる。本研究では、ヒト腸管上皮細胞への付着性を検討しており、本タンパク質が菌体表層に位置することが付着性に関与するための必須条件と考え得るからである。

さらに、形質転換体のCaco-2細胞への付着性を評価し、親株との付着性の強度ならびに形質転換体で作られた糖鎖受容体タンパク質が機能しているかどうかを第2章第2節の方法に基づいて試験した結果を表18に示した。すなわち、*L. fermentum*の糖鎖受容体タンパク質遺伝子を*E. faecalis* TH10へ導入することによって、Caco-2細胞への付着性が親株より1.65倍増強された形質転換体を得ることができた。この形質転換体は、マンノースをレセプターとし定着するタイプ1線毛を持つ*E. coli* SH2に比べて1.81倍(165/91)も高いCaco-2細胞への付着性を有することが認められた。

薬剤耐性能をもつプラスミドをキュアリングする時は、アクリジンオレンジやリボフラビンを用いなくても、薬剤の入っていない液体培地で数~十数

回継代することでそのプラスミドを欠落させることができる。本研究で用いたp921EXはEm耐性を有するので、Emを含まないLB液体培地で10回継代し、LB寒天培地に塗抹した。形成した10コロニーをEmを含むLB液体培地と含まない培地に釣菌し培養した結果、10コロニーともEmを含む培地では生育せず、Emのない培地では生育することが確認された。このうち、3菌株についてプラスミドを検出したところ、p921EXは欠落しており、キュアリング株を得ることができた。p921EXをキュアリングした3菌株について、Caco-2細胞による付着性試験を行ったところ、親株とほぼ同等の値（付着率）に戻ることが確認された。すなわち、形質転換体の付着性増加は、p921EXに由来するものであることが示された。

現在、遺伝子組換え体の安全性についてかなり議論されている。植物であれば、害虫に対する耐性能や完熟を遅らせる遺伝子を組み込んだ作物が商品として出荷されている。また、チーズ製造の際に用いる凝乳酵素キモシンは、大腸菌にキモシン産生遺伝子を組み込んで大量にかつ安価に製造され商品化されている。細菌において、死菌であれば組換え体使用を表記することで食品に応用は認可されているが、生菌の組換え体はまだその安全性を検討中である。生菌を食することで効能が最も期待されているものの1つに乳酸菌があり、組換え体のスクリーニングに従来の薬剤マーカを用いないで安全な選択マーカとして乳酸菌由来のチミジン合成酵素遺伝子 (*thyA*) を用いる試みがなされている[126]。Double crossoverにより薬剤耐性マーカ遺伝子を除去できる手法が確立されている[125]ので、スクリーニングを薬剤耐性マーカで行い最終的にこの遺伝子を切り出す（除去）ことも可能となっている。すなわち、乳酸菌のみからの遺伝子で選択マーカを持つベクターを開発し、そこに安全性の確認された細菌由来の有用な遺伝子を組み込み、結果的に安全な細菌由来の遺伝子のみを用いた組換え体を作成し、ヒトや動物に対し生菌としての摂取を試みる考え方である。腸管内では異種腸内細菌の間で接合や融合により遺伝子の複雑な交換が起こることが証明されており、上記のアプローチは、現象的には自然現象に基づいた安全性の考察を意味している。

本研究により、*E. faecalis* TH10の有するプロバイオティクスとしての優

れた特性が科学的に評価された。さらに、他の乳酸菌の比較的強いヒト腸管付着因子である糖鎖受容体タンパク質遺伝子を本菌株に導入したことで、本タンパク質を菌体表層に発現させることが可能となり、ヒト腸管上皮細胞への付着性を増強させるモデル乳酸菌として得られた形質転換体は有用であることが示された。

総 括

Enterococcus faecalis はヒトの腸内乳酸菌フローラの代表的菌種の1つであり、すでに1950年代より、その整腸作用が注目され生菌剤(プロバイオティクス)としてヒトあるいは動物に用いられてきた。

本研究に供試した *E. faecalis* TH10 は、マレーシアにおける大豆を主原料とする伝統的発酵食品「テンペ」から優勢菌種の1つとして分離されたもので、著者は、これまでに、本菌が酸耐性 (pH 3.5)、食塩耐性 (10%)、胆汁酸耐性 (6.1%) など *E. faecalis* としての一般的性状を有するとともに、他の乳酸菌の6倍以上の強いプロテアーゼ活性を持ち、また、抗菌性物質あるいはフレーバ物質としてのコハク酸の産生性を示すことなど、プロバイオティクスとして有用と考えられる性状を有することを明らかにしてきた。

本研究は、さらに、本菌が (1)これまで他の乳酸菌では知られていなかった特性としてフェニル乳酸の産生性を有すること、および (2)ヒト腸管上皮細胞の培養モデル Caco-2 細胞に対する付着性を有することを明らかにするとともに、(3)プロバイオティクスの最も重要な特性の1つといわれるヒト腸管付着性の増強を目的として、分子育種学的手法を用いて他の乳酸桿菌のゲノムからクローニングしたヒト腸管付着性遺伝子を本菌に導入し、その遺伝子が本菌において発現することを明らかにした。

1. *E. faecalis* TH10 のフェニル乳酸産生性

プロバイオティクス乳酸菌の特性の1つとして、バクテリオシンなどの抗菌性物質の産生性があげられている。そこで、各種病原性細菌に対する抗菌性を指標に *E. faecalis* TH10 の MRS 液体培地 (Oxoid) 培養ろ液 (pH 4.0) の酢酸エチル抽出物をスクリーニングした結果、酢酸エチル抽出乾燥物は 10 mg/ディスクの濃度でメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA)、*Bacillus cereus*、*Escherichia coli* O157:H7 および *Listeria monocytogenes* に対して抗菌性を示すことが認められた。次いで、エーテル抽出物から逆相分配カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによって抗菌活性画分を得、この画分をメチル誘導体化後、SPB-Octyl カラム (Supel) を用いたガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーによって分析した結果、抗菌性を示す物質はこれまで乳酸菌からの産生が報告されていなかったフェニル乳酸と同定された。また、光学異性体分離用カラム (Nucleosil Chiral-1, Macherey-Nagel) を用いた光学分割によって D 体と L 体の混合体であることがわかり、MRS 液体培地における産生量は D 体 13.4 μ M、L 体 6.7 μ M で、量比は 2 : 1 であった。D-および L-フェニル乳酸 (Sigma) は、いずれも 0.2% の濃度で LB 液体培地 (pH 7.0) に

において *E. coli* O157:H7 ならびに MRS 液体培地 (pH 6.3) において MRSA の増殖を抑制し、その抗菌性は pH の低下につれて増強した。また、L 体と D 体の混合体は D 体のみより高い抗菌性を示した。この *E. faecalis* TH10 によるフェニル乳酸の産生性は、プロバイオティクス乳酸菌における初めての知見である。

プロバイオティクス乳酸菌の整腸作用のメカニズムについては、pH、バクテリオシン、腸管付着性、免疫などいろいろなファクターの関与が考えられているが、その詳細はほとんど不明である。一方、フェニル乳酸は、チーズの熟成過程において酵母 *Geotrichum candidum* によって多量 (6 mM) に産生され、*L. monocytogenes* など多くの汚染細菌に対し抗菌性物質として作用 (静菌) していることが知られている。したがって、この *E. faecalis* TH10 によって産生されるフェニル乳酸もその抗菌性を通じてプロバイオティクス乳酸菌の特性の 1 つとして、整腸作用に関与している可能性が初めて示唆された。

2. *E. faecalis* TH10 のヒト腸管上皮細胞の培養モデル Caco-2 細胞および細胞外マトリックスタンパク質への付着性

プロバイオティクス乳酸菌の最も重要な特性の 1 つがヒト腸管付着性であるといわれている。病原性細菌の付着因子として線毛や外膜に存在するレクチン様タンパク質、リポタイコ酸、糖タンパク質などがあげられ、腸管上皮細胞側のレセプターとしては糖タンパク質、糖脂質、細胞外マトリックス (ECM) タンパク質などが明らかにされている。乳酸菌においては、菌種菌株によってその腸管内定着性に動物種特異性が見い出されていることなどから、ある種の動物の腸管上皮細胞に特異的に付着する因子が存在するものと想定されてきており、病原性細菌の場合と類似の付着機構が示されている。しかし、その明確なタンパク質や遺伝子はほとんど知られていない。特に *Enterococcus* 属についての腸管付着性に関する報告はほとんどみられない。本研究は、*E. faecalis* TH10 のヒト腸管上皮細胞培養モデル Caco-2 細胞および ECM タンパク質への付着性について調べた。

1) グラム染色法による Caco-2 細胞への付着試験

Caco-2 細胞の培養には、抗生物質、ウシ胎児血清を含む DMEM 培地 (Gibco BRL) を用い、24 ウェルプレート (住友ベークライト) のウェルに薄膜ディスク (7 mm) を入れ、 3.5×10^4 個/cm² の Caco-2 細胞を接種し、37°C で 2 週間 CO₂ 培養した。培養後ディスク面の細胞層をリン酸緩衝液で 2 回洗浄し、供試菌株の DMEM 培地懸濁液 (菌体数約 5×10^8 /ml) 1 ml を注加し、37°C で 2 時間保持した。リン酸緩衝液で 2 回洗浄後、グラム染色し顕微鏡下で付着菌数

を計測した。

各供試菌株の Caco-2 細胞 100 個当たりの付着菌数は、これまでに強い付着性を示すことが知られている *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 で最も高く、 64.1 ± 12.6 であった。これに対して *E. faecalis* TH10 は 23.2 ± 6.0 と、前者に比して低値であった。しかし、*E. faecalis* TH10 は、木元ら (1998) が付着性を有することを確認している *L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527 の 18.0 ± 4.3 よりも高い値を示した。

2) グラム染色法による ECM タンパク質への付着試験

特殊印刷のガラススライド (岩城硝子) に 2.5 pmol となるように ECM タンパク質のラミニン、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、V 型コラーゲンおよび陰性対照としてウシ血清アルブミン (BSA) をそれぞれ溶解し、その一定量を一定面積に固定した。2%BSA を含むリン酸緩衝液で 2 時間のブロッキングの後、各供試菌の懸濁液 (菌体数約 $5 \times 10^8 / \text{ml}$) 0.4 ml を滴下し、2 時間感作した。0.1%BSA を含むリン酸緩衝液で 2 回洗浄後、付着した菌体をグラム染色し、付着菌数を計測した。

供試 5 菌株のうち、ECM タンパク質に強い付着性を持つことが知られている *L. crispatus* JCM 5810 は、すべての供試 ECM タンパク質 ($20 \mu\text{m}^2$ 当たり) に対して 1,000~1,700 個の高い付着性を示した。また、Caco-2 細胞に高い付着性を持つ *L. rhamnosus* JCM 1136 は、タイプ I およびタイプ V コラーゲンに対して約 200 個の低い付着性を示すのみであった。これらに比較して、*E. faecalis* TH10 はタイプ IV コラーゲンに対して約 400 個の中程度の付着性を示すことが認められた。

3) RI ラベル法による Caco-2 細胞への付着試験

上記のグラム染色法は、一般に染色作業中に細胞が剥離脱落するので方法論的に難点が示唆され、これを改善した RI ラベル法によって Caco-2 細胞への付着試験を行った。

供試菌株を ^3H -チミジン (室町製薬) 添加 MRS 液体培地で培養し RI ラベル菌体を得て、洗浄後、1 菌体当たりの放射線量を算出した。1) と同様にウェル内で培養した Caco-2 細胞に、洗浄後、RI ラベル供試菌懸濁液 $400 \mu\text{l}$ (菌体数約 $10^7 \sim 10^8 / \text{ml}$) を添加し、 37°C 1 時間接触させた後洗浄し、ウェル内のすべての Caco-2 細胞を回収して、液体シンチレーションカウンター (LSC-900, Aroka) で放射線量を測定し、付着細菌数を計測した。

供試 7 菌株の付着性を 1 ウェルの全 Caco-2 細胞 (細胞数約 1×10^5) への付着細菌数で表示すると、ヒト腸管付着因子である線毛 (Fim H タンパク質) 遺

伝子を持つ *E. coli* SH2 は 64.3×10^6 CFU であった。この値を 100% とした場合、上記の線毛遺伝子をノックアウトした *E. coli* ORN103 は 9.2% となり親株の 1/10 以下の低い値を示した。また、付着性が確認されている *L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527 などの 4 株はいずれも 40% 前後の付着性であった。これらに対して、*E. faecalis* TH10 は 109.7% で *E. coli* SH2 よりさらに高い値を示し、強い付着性を有することが明らかにされた。

3. *E. faecalis* TH10 におけるヒト腸管付着遺伝子の発現

優れた腸管付着性を持つプロバイオティクス乳酸菌は、病原性細菌の腸管付着性に拮抗し、感染症の防御ならびに感染後の治療に用いることが期待される。そこで、著者はヒトの糞便から *E. coli* SH2 よりも 1.48 倍も高い付着性を有する *Lactobacillus fermentum* FAF-1 を分離しており、その付着性に関与する遺伝子をクローニングし、この遺伝子を *E. faecalis* TH10 に導入してその発現の可能性を試みた。

L. fermentum FAF-1 の付着性はレクチン様タンパク質によるものと推測し、既知の *L. rhamnosus* のレクチン様タンパク質のアミノ酸シーケンス(山本、1998) からフォワードプライマー (5'- CAYCARACNCA YTG GTAYATG -3') とリバースプライマー (5'- ARYTCDG CYTGDATCATCCA -3') を構築した。なお、このプライマー表記中の Y は塩基の C または T を、R は A または G を、N は A、C、G または T を、D は A、G または T をそれぞれ示し、これらすべての組み合わせの複合プライマーを作製した。*L. fermentum* FAF-1 のゲノムをテンプレートに PCR 増幅して、370 bp の増幅断片を得た。このシーケンスを決定したところ、*L. rhamnosus* のレクチン様タンパク質遺伝子と 75.4% の相同性が認められた。

上記遺伝子をクローニングするために、*L. fermentum* FAF-1 のゲノムライブラリーを構築した。まず、ゲノムを *Sau* 3AI で 9~23 kb の断片になるように限定分解し、 λ DASH II の *Bam* HI アームにライゲーションし、ゲノムライブラリーを得た。上記 370 bp の DNA シーケンスをプローブに 3rd スクリーニングまで行い、ゲノムライブラリーよりレクチン様タンパク質遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) を持つファージクローン 9 を得た。このクローンに組み込まれた DNA の全シーケンスを決定した。その結果、開始コドンから終止コドンまで 154 アミノ酸のうち 119 個が大きなクラスターで一致し、*L. rhamnosus* との相同性は 77.2% と高いものであった。

次に、この *L. fermentum* FAF-1 由来のヒト腸管付着性遺伝子を乳酸菌用ベクター-pIL253 にサブクローニングするために、ファージクローン 9 に含まれるシーケンスよりフォワードプライマー (5'- GCGAATTCGTCTTCCACGAC

CAAGCACT -3') とリバースプライマー (5'- CGCTCGAGTGGCCCTGAATCA CGGTGTC -3') を設計した。このプライマーにより増幅される PCR 断片は、*L. fermentum* FAF-1 由来腸管付着性遺伝子の ORF を含むものであった。フォワードプライマーには *Eco*RI サイトを、リバースプライマーには *Xho*I サイトをそれぞれ設けた。この両制限酵素サイトは、乳酸菌用ベクター pIL253 のマルチクローニングサイトに切断部位があるので、方向性を決めてこのベクターに組み込んだ。このプラスミド (p921EX) を精製・脱塩後、15 μ l の滅菌蒸留水に溶解し、*E. faecalis* TH10 を受容菌としてジーンパルサー (Bio-Rad) を用いるエレクトロポレーション法に供した。得られたエリスロマイシン (Em) 耐性形質転換体のプラスミドが PCR 法により *L. fermentum* FAF-1 由来のレクチン様タンパク質遺伝子を持つことを確認し、さらに抗体を作製してこのタンパク質を検出した。p921EX を導入した *E. faecalis* TH10 の Em 耐性形質転換体のヒト腸管付着性を、RI ラベル法による Caco-2 細胞を用いた試験法で評価した。その結果、得られた形質転換体は、タイプ 1 線毛を持つ *E. coli* SH2 に比べ 1.8 倍高い付着性を有することが認められた。この形質転換体の付着性は p921EX をキュアリングすることで、親株とほぼ同じ値に復帰することが確認された。すなわち、*L. fermentum* FAF-1 のヒト腸管付着性遺伝子は *E. faecalis* TH10 で発現され、腸管付着性が親株より 1.65 倍増強された形質転換体を得ることができた。

以上、本研究は、マレーシアの大豆を主原料とする発酵食品由来の *E. faecalis* TH10 についてプロバイオティクスとしての観点からその特性を調べ、本菌株は *E. faecalis* の一般的性状に加え、新たにフェニル乳酸の産生性および腸管付着性を有すること、さらに他の乳酸菌のヒト腸管付着性遺伝子を本菌に導入し、その遺伝子が本菌において発現することを明らかにしたものである。

謝 辞

本研究は、麻布大学獣医学部の金内長司教授の懇切なるご指導・ご助言のもとに、まとめるに至ったものであります。また、学位審査におきまして金内教授には主査をお引き受けいただきました。本学位論文の提出に当たりまして、ここに衷心より金内教授のご厚情に対し深く謝意を表します。

また、学位審査の副査をお引き受けいただきました麻布大学獣医学部の藤谷英男教授ならびに木内明男教授におきましては、心温まるご示唆を賜り、深く御礼申し上げます。

麻布大学獣医学部の森田英利助教授には、研究過程全般にわたり誠に詳細に実験はもとより、表現様式の分野におきましても、長期間にわたりご指導を賜りました。学位審査におきましても副査をお引き受けいただき、謹んで深謝申し上げます。

また、麻布大学の永田致治名誉教授ならびに麻布大学獣医学部の坂田亮一教授には、初志貫徹の念願成就まで、たえず精神的支えとして愛情ある激励を賜りました。ここに、深甚なる敬意を表します。

麻布大学健康環境科学部の其木茂則教授ならびに久松 伸講師には、ご多忙中にもかかわらず抗菌性物質の分離・同定の分野でご指導を賜りました。ここに厚く御礼を申し上げます。

最後に、研究着手時から現在に至るまで長期間、社内の管理・運営に心を注がれ、本研究の遂行に御援助いただいたバイオバンク（株）代表取締役の高畑真澄女史に対し、深く謝意を表します。

参考文献

1. 阿部文明. 1996. 乳酸菌の科学と技術. VIII. 乳酸菌, 発酵食品の栄養生理効果. 2. 畜産分野での乳酸菌の利用. p.336-341. 乳酸菌研究集談会編. 学会出版センター. 東京.
2. Adlerberth, I., Ahrne, S., Johansson, M.L., Molin, G., Hanson, L.A. and Woid, A.E. 1996. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2244-2251.
3. Aleljung, P., Shen, W., Rozalska, B., Hellman, U., Ljungh, A. and Wadstrom, T. 1994. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr. Microbiol.* 28: 231-236.
4. Anderson, D.G. and McKay, L.L.. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 549-552.
5. Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. and Servin, A.L. 1993. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4121-4128.
6. Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. and Servin, A.L. 1993. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 35: 483-489.
7. Chassy, B. and Flickinger, J.L. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 173-177.
8. Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Fourniat, J. and Servin, A.L. 1992. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1689-1696.
9. Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Darfeuille-Michaud, A., Joly, B. and Servin, A.L. 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 70: 213-217.
10. Clewell, D.B. 1981. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol. Rev.* 45: 409-436.
11. Clewell, D.B. and Flannagan, S.E. 1993. Bacterial Conjugation. ed by Clewell. p.369-384. D.B. Plenum Press. New York.
12. Clewell, D.B. and Flannagan, S.E. 1993. Bacterial Conjugation. ed by Clewell. p.349-361. D.B. Plenum Press. New York.
13. Clewell, D.B. 1993. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell.* 73:

9-12.

14. Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kerneis, S., Bernet, M.F. and Servin, A.L. 1992. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2F04 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2034-2039.
15. Coconnier, M.H., Bernet, M.F., Chauviere, G. and Servin, A.L. 1993. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 11: 235-242.
16. Coconnier, M.H., Bernet, M.F., Kerneis, S., Chauviere, G. Fourniat, J. and Servin, A.L. 1993. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 110: 299-306.
17. Collins, M.D. and Jones, D. 1979. The distribution of isoprenoid quinones in streptococci of serological groups D and N. *J. Gen. Microbiol.* 114: 27-33.
18. Conway, P.L., Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70: 1-12.
19. Conway, P.L. and Kjelleberg, S. 1989. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1175-1186.
20. Dieuleveux, V., Lemarinier, S. and Gueguen, M. 1998. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 40: 177-183.
21. Dieuleveux, V., van der Pyl, D., Chataud, J. and Gueguen, M. 1998. Purification and characterization of anti-Listeria compounds produced by *Geotrichum candidum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 800-803.
22. Duguid, J.P., Anderson, E.S. and Campbell, I. 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Pathol. Bacteriol.* 92: 107-137.
23. Elo, S., Saxelin, M. and Salminen, S. 1991. Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 154-156.
24. Fontaine, I.F., Assi, E.A. and Bouquelet, S.J.L. 1994. *In vitro* of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 to mucosal glycoproteins and hemagglutinating activity. *Curr. Microbiol.* 28: 325-330.
25. Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. and Forstner, J.F. 1997. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of *Bifidobacteria* which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 506-512.

26. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
27. Gaby, A.R. and Chawla, R.K. 1976. Efficiency of phenylpyruvic and phenyllactic acids as substitutes for phenylalanine in the diet of the growing rat. *J. Nutr.* 106: 158-168.
28. Garver, K.I. And Muriana, P.M. 1993. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int. J. Food Microbiol.* 19: 241-258.
29. Gasson, M.J. and Davies, F.L. 1980. High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *J. Bacteriol.*, 143: 1260-1264.
30. Gasson, M.J. 1990. *In vivo* genetic systems in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 43-60.
31. Gasson, M.J. and de Vos W.M. (eds.). 1994. Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional. Glasgow.
32. Gawron-Burke, C. and Clewell, D.B. 1982. A transposon in *Streptococcus faecalis* with fertility properties. *Nature.* 300: 281-284.
33. Gibson, E.M., Chance, N.M., London, S.B., and London, L. 1979. Transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance from streptococci to lactobacilli. *J. Bacteriol.* 137: 614-619.
34. Granato, D. ,Perotti, F. ,Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M. ,Servin, A. and Brassart, D. 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* Lal to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1071-1077.
35. Greene, J.D. and Klaenhammer, T.R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4487-4494.
36. Guirard, B. 1974. The Amino acid requirements of microorganisms for growth, *In Handbook of Microbiology*, Vol. 4. p.1-34. eds. by Laskin, A.I. and Lachevalier, H.A. CRC Press. Cleveland.
37. 浜田小弥太. 1953. Aneurinase 菌 (松川・三沢) 保菌の素因所調—Aneurinase 症患者及び Aneurinase 菌 (松川・三沢) . *ビタミン.* 6: 951-955.
38. 浜田小弥太. 1953. Aneurinase 菌 (松川・三沢) 保菌の素因 (2) 保菌者の素因の研究. *ビタミン.* 6: 956-960.
39. 浜田小弥太. 1954. Aneurinase 菌 (松川・三沢) 保菌の素因 (3) 種々の動物及び人體に對する Aneurinase 菌 (松川・三沢) 経口投与比較実験. *ビタミン.* 7: 65-69.
40. 浜田小弥太. 1954. Aneurinase 菌 (松川・三沢) 保菌の素因 (4) 各種動物膽汁酸及び膽汁酸の Aneurinase 菌 (松川・三沢) に對する. *ビタミン.* 7: 70-75.
41. 浜田小弥太. 1966. 乳酸菌の研究. VI. 応用 乳酸菌製剤. p.476-500. 北原覚雄編著. 東

京大学出版. 東京.

42. 原 明弘. 1995. シェルフライフの延長技術 食品の鮮度管理と品温制御. 食品と開発. 30: 13-18.
43. Harlander, S.K. 1987. Streptococcal Genetics. p.229. eds. by Ferretti, J. and Curtis, R. American Society for Microbiology. Washington D.C.
44. Hayes, F., Caplice, E., McSweeney, A., Fitzgerald, G. and Daly, C. 1990. pAM β 1-associated mobilization of proteinase plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317 and *L. lactis* subsp. *cremoris* UC205. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 195-201.
45. Henderson, L.M. and Snell, E.E. 1948. A uniform medium for determination of amino acids with various microorganisms. *J. Biol. Chem.* 172. 15-29.
46. Henrikson, A. and Conway, P.L. 1992. Adhesion to porcine aquamous epithelium of saccharide and protein moieties of *Lactobacillus fermentum* strain 104-S. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2657-2661.
47. Holo, H. and Nes, I.F. 1989. High frequency transformation, by electroporation, of *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3119-3123.
48. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Gram-positive cocci. p.527-558. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Nine edition. Williams & Wilkins, Baltimore.
49. Horie, M., Todoroki, K., Fujihira, Y. and Toba, Unpublished deta.
50. Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F. and Servin, A.L. 1997. Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 513-518.
51. 藤田泰仁. 1996. 乳酸菌の科学と技術. V. 乳酸菌利用に関係する主要な諸性質. 4. バクテリオシン. p.205-215. 乳酸菌研究集談会編. 学会出版センター. 東京.
52. 五十嵐隆. 1997. 医学微生物の最先端. 第7章 腸管出血性大腸菌 O157 の流行と対策. [2] 腸管出血性大腸菌感染症. 中野昌康編著. p.261-264. 菜根出版. 東京.
53. Ike, Y., Hashimoto, H. and Clewell, D.B. 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1524-1528.
54. 伊藤敏敏. 1996. 乳酸菌の科学と技術. VI. 乳酸菌の挙動と利用. 2.3 乳酸菌が他の微生物を抑制する系. p.274-279. 乳酸菌研究集談会編. 学会出版センター. 東京.
55. Jones, M.R., Kopple, J.D. and Swendseid, M.E. 1978. Phenylalanine metabolism in uremic and normal man. *Kidney Int.* 14: 169-179.
56. Kabir, A.M.A., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T. and Koga, Y. 1997. Prevention

- of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*. 41: 49-55.
57. 門多真理子. 1996. 乳酸菌の科学と技術. IV. 乳酸菌の遺伝と育種. 1. 乳酸菌遺伝子の構成. p.133-142. 乳酸菌研究集談会編. 学会出版センター. 東京.
 58. Kamata, M., Toyomasu, R., Suzuki, D. and Tanaka, T., D-phenyllactic acid production by *Brevibacterium* or *Corynebacterium*. Brevet. Ajinomoto Co., Inc., Japan, Patent JP 86108396.
 59. 木元広実・辻典子・栗崎純一・鈴木一郎・大桃定洋. 1998. 乳酸球菌のヒト腸管由来 Caco-2 細胞への付着性. 第 94 回日本畜産学会大会講演要旨. 神戸大学. p.215.
 60. Kirjavainen, P.V., Ouwehand, A.C., Isolauri, E. and Salminen, S.J. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 185-189.
 61. 北原覚雄編. 1966. 乳酸菌の研究. 東京大学出版. 東京.
 62. Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337-349.
 63. Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 338-356.
 64. Kontula, P., Suihko, M.L., von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T. 1999. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 82: 249-256.
 65. Lehto, E.M. and Salminen, S.L. 1997. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18: 125-132.
 66. Lilley, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 147: 747-748.
 67. Ljungh, A.L., Moran, A.P. and Wadstrom, T. 1996. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16: 117-126.
 68. MacDonald, R.S., Thornton Jr., W.H., Marshall, R.T. 1994. A cell culture model to identify biologically active peptides generated by bacterial hydrolysis of casein. *J. Dairy Sci.* 77: 1167-1175.
 69. 真壁和裕. 1997. バイオ実験イラストレイテッド. 4. 苦労なしのクローニング. 第 1 章 cDNA ライブラリーの作製, 第 2 章 ゲノムライブラリーの作製. p.15-93. 秀潤社. 東京.
 70. 真壁和裕. 1997. バイオ実験イラストレイテッド. 4. 苦労なしのクローニング. 第 3 章 ファージの増殖と DNA の調製. p.95-124. 秀潤社. 東京.
 71. 真壁和裕. 1997. バイオ実験イラストレイテッド. 4. 苦労なしのクローニング. 第 4 章 ハイブリによるスクリーニング. p.125-163. 秀潤社. 東京.

72. 松田敏生. 1999. バイオプリザーベーションとはー食品にやさしい殺菌ー, バイオプリザーベーションー乳酸菌による食品微生物制御ー. 森地敏樹・松田敏生編著. p.1-7. 幸書房. 東京.
73. 松川男児・張 寿海・河上 正. 1960. アノイリナーゼ症. 内科. 5: 229-234.
74. McBain, A.J. And Macfarlane, G.T. 1998. Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med. Microbiol.* 47: 407-416.
75. Mehtar, S. 1994. The continuing problem of 'hospital staphylococci': why? *J. Chemther.* 4: 25-40.
76. Metschnikoff, E. 1908. Etudes sur la flore intestinale. *Ann. Inst. Pasteur.* 22: 89-120
77. Metschnikoff, E. 1910. Poisons intestinaux et scleroses. *Ann. Inst. Pasteur.* 24: 755-770.
78. Metschnikoff, E. 1913. Etudes sur la flore intestinale. *Ann. Inst. Pasteur.* 27: 893-906.
79. Metschnikoff, E. 1914. Etudes sur la flore intestinale, Les diarrhees des nourrissons. *Ann. Inst. Pasteur.* 28: 89-120.
80. Michals, K. and Matalon, R. 1985. Phenylalanine metabolites, attention span and hyperactivity. *Am. J. Clin. Nutr.* 42: 361-365.
81. 光岡知足. 1992. 腸内フローラの分類と生態. p.1-34. 学会出版センター. 東京.
82. 光岡知足編. 1986. 腸内フローラと感染症. 学会出版センター. 東京.
83. 森田英利. 1996. 乳酸菌の科学と技術. V. 乳酸菌利用に関係する主要な諸性質. 3. フレーバー生産性. p.197-205. 乳酸菌研究集談会編. 学会出版センター. 東京.
84. Mukai, T., Arihara, K. and Ito, H. 1992. Lectin-like activity of *Lactobacillus acidophilus* strain JCM 1026. *FEMS Microbiol. Lett.* 98: 71-74.
85. Mukai, T. and Arihara, K. 1992. Presence of intestinal lectin-binding glycoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1851-1854.
86. Mukai, T., Toba, T. and Ohori, H. 1997. Collagen binding of *Bifidobacterium adolescentis*. *Curr. Microbiol.* 34: 326-331.
87. 村田昇清・木村敏昭. 1938. 「クミス」の微生物及び製法に就いて. 東京医事新誌. 3071: 461-463.
88. 中瀬安清・久保田好之・田口文章. 1980. 微生物学実験の手引き. 7. 薬剤感受性試験. p.70-71. 廣川書店. 東京.
89. 中山広樹・西方敬人. 1995. バイオ実験イラストレイテッド. 2. 遺伝子解析の基礎. 第1章 プラスミド調製. p.13-31. 秀潤社. 東京.

90. 中山広樹・西方敬人. 1995. バイオ実験イラストレイテッド. 2. 遺伝子解析の基礎. 第3章 DNA断片の分析と精製. p.53-68. 秀潤社. 東京.
91. Nakayama, J., Ruhfel, R.E., Dunny, G.M., Isogai, A. and Suzuki, A. 1994. The *prgQ* gene of the *Enterococcus faecalis* tetracycline resistance plasmid pCF10 encodes a peptide inhibitor, iCF10. *J. Bacteriol.* 176: 7405-7408.
92. Nakayama, J., Yoshida, K., Kobayashi, H., Isogai, A., Clewell, D.B. and Suzuki, A. 1995. Cloning and characterization of a region of *Enterococcus faecalis* plasmid pPD1 encoding pheromone inhibitor (*ipd*), pheromone sensitivity (*traC*), and pheromone shutdown (*traB*) genes. *J. Bacteriol.* 177: 5567-5573.
93. Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek.* 70: 113-128.
94. 西川敬人. 1997. バイオ実験イラストレイテッド. 5. タンパクなんてこわくない. 第1章 SDS-PAGE. p.13-62. 秀潤社. 東京.
95. 西川敬人. 1997. バイオ実験イラストレイテッド. 5. タンパクなんてこわくない. 第4章 ウェスタンブロットティング. p.105-126. 秀潤社. 東京.
96. 西川敬人. 1997. バイオ実験イラストレイテッド. 5. タンパクなんてこわくない. 第8章 抗体の取扱い方. p.183-191. 秀潤社. 東京.
97. Ofek, I. And Beachey, E.H. 1980. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. p.1-29. In Beachey, E.H. ed. Receptors and recognition, Ser. B, Vol. 6. Bacterial adherence. Chapman and Hall. London.
98. Ofek, I., and Doyle, R.J. 1994. Bacterial Adhesion to Cells and Tissues. Chapman & Hall. New York.
99. 大平猪一郎・Darmadji P.・片岡 啓・中江利孝. 1988. 東南アジア地域の伝統的アルコール飲料における乳酸菌の分離と同定. 酪科食研. 37: 1-10.
100. 大平猪一郎・宮本 拓・片岡 啓・中江利孝. 1988. 東南アジア地域の伝統的副食醗酵食品からの乳酸菌の分離. 酪科食研. 37: 95-103.
101. 大平猪一郎・鄭 昌敏・宮本 拓・片岡 啓・中江利孝. 1988. 東南アジア地域の伝統的副食醗酵食品から分離した乳酸菌の同定. 酪科食研. 37: 185-192.
102. 大平猪一郎・岩間 泉・小合龍夫・宮本 拓・中江利孝. 1989. 東南アジア地域における農耕文化と伝統的発酵保蔵食品の起源と由来. 酪科食研. 38: 47-66.
103. 大平猪一郎・鄭 昌敏・宮本 拓・片岡 啓. 1990. 東南アジア地域の伝統的発酵食品より分離した乳酸菌の生化学的性質. 1. 東南アジア地域の伝統的発酵食品より分離した乳酸菌の耐塩性, 耐酸性, 耐熱性および生酸性. 酪科食研. 39: 21-29.
104. 大平猪一郎・鄭 昌敏・宮本 拓・片岡 啓. 1990. 東南アジア地域の伝統的発酵食品より分離した乳酸菌の生化学的性質. 2. 東南アジア地域の伝統的発酵食品より分離した

- 乳酸菌のタンパク質分解性と芳香生産性. 酪科食研. 39: 115-121.
105. 大平猪一朗・鄭 昌敏・宮本 拓・片岡 啓. 1990. 東南アジア地域の伝統的発酵調味食品における乳酸菌の分離と同定. 酪科食研. 39: 175-182.
106. 大平猪一朗・鄭 昌敏・宮本 拓・片岡 啓. 1991. 東南アジア地域の伝統的発酵食品における乳酸菌の分布. 酪科食研. 40: 121-127.
107. 大平猪一朗. 1992. 東南アジア地域の伝統的発酵食品における乳酸菌の分布とその生化学的性質(総説). 酪科食研. 41: 87-98.
108. Ohhira, I., Tamura, T., Fujii, N., Inagaki, K. and Tanaka, H. 1996. Antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the culture broth of *Enterococcus faecalis* TH10, an isolate from Malaysian fermentation food, Temph Jpn. *J. Dairy Food Sci.*, 45 : 93-96.
109. 岡田早苗. 1996. 乳酸菌の科学と技術. I. 乳酸菌の定義と分類・同定. 1. 乳酸菌の定義. p. 9-12. 乳酸菌研究集談会編. 学会出版センター. 東京.
110. Op den Camp, H.J.M., Oosterhof, A. and Veerkamp, J.H. 1985. Interaction of Bifidobacterial lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 47: 332-334.
111. Orndorff, P.E. and Falkow, S. 1984. Identification and characterization of a gene product that regulates type 1 piliation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 160: 61-66.
112. O' Sullivan, D.J. and Klaenhammer, T.R. 1993. Rapid miniprep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2730-2733.
113. Ozawa, K., Yabu-uchi, K., Yamanaka, K., Yamashita, Y., Nomura, S., and Oku, I.. 1983. Effect of *Streptococcus faecalis* B10-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1513-1518.
114. Pasteur, M.L. 1857. Memorire sur la fermentation appelee lactique. *Compt. Rend.* 45: 913-917.
115. Renault, P.P. and Heslot, H. 1987. Selection of *Streptococcus lactis* mutants defective in malolactic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 320-324.
116. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Herbert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M. Hargrett, N.T., Blake, P.A. and Cohen, M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype N. *Engl. J. Med.* 308: 681-685.
117. Rojas, M. and Conway, P.L. 1996. Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. *J. Appl. Microbiol.* 81: 474-480.
118. Roos, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadstrom, T., Lindberg, M. and Jonsson, H. 1996. A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC

- transporter system? *FEMS Microbiol. Lett.* 144: 33-88.
119. Roy, B. 1992. Food Biopreservations of Microbial Origin. p.2-55. CRC Press. Cleveland.
 120. Ryser, E..T., Maisnier-Patin, S., Gratadoux, J.J. and Richard, J. 1994. Isolation and identification of cheese-smear bacteria inhibitory to *Listeria* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 237-246.
 121. Sahn, D.F., Boonlayangoor, S. and Schulz, J.E. 1991. Detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci other than *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2595-2598.
 122. 齋藤忠夫・伊藤敏敏. Personal communication.
 123. Salminen, S., Isolauri, E. and Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 347-358.
 124. Sarem, F., Sarem-Damerdj, L.O., Nicolas, J.P. 1996. Comparison of the adherence of three *Lactobacillus* strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines. *Lett. Appl. Microbiol.* 1996 22: 439-442.
 125. 佐々木隆・森下隆・門多真理子・中山二郎・伊藤喜之・佐々木泰子. 1996. 乳酸菌の科学と技術. IV. 乳酸菌の遺伝と育種. 3. 遺伝子導入と変異の誘起. p.152-184. 乳酸菌研究集談会編. 学会出版センター. 東京.
 126. 佐々木泰子・竹田麻理子・佐々木隆. 2000. 安全なマーカーとしてチミジン合成酵素遺伝子 *thyA* を用いるヨーグルト乳酸菌の遺伝子操作系. 日本乳酸菌学会誌. 11: 25.
 127. Schleifer, K.H. and Kraus, J. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to *Lactococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 183-195.
 128. Schleifer, K.H. and Kilpper-Baltz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. Nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 31-34.
 129. Schleifer, K.H. 1986. Gram-positive cocci. p.999-1103. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
 130. Simon, D. and Chopin, A. 1988. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie.* 70: 559-566.
 131. Steele, J.L. and McKay, L.L.. 1988. Conjugal transfer of genetic material lactococci: a review. *J. Dairy Sci.* 72: 3388-3397.
 132. 鈴木健一郎. 1996. 乳酸菌の科学と技術. I. 乳酸菌の定義と分類・同定. 5. 分類体系と分子系統. p.24-37. 乳酸菌研究集談会編. 学会出版センター. 東京.
 133. Takahashi, N., Saito, T., Ohwada, S., Ota, H., Hashiba, H. and Itoh, T. 1996. A new

- screening method for the selection of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria with high adhesion to human colonic mucosa. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1434-1438.
134. 田村学造. 1952. 乳酸菌によるアミノ酸定量法 (その1) 乳酸菌のアミノ酸要求並びにアミノ酸標準曲線の作成. 日農化誌. 26: 464-470.
 135. 田波潤一郎. 1960. 無菌動物実験を基とする乳酸菌群の生理的意義に関する一考察. 総合医学. 17: 865-879.
 136. Tewari, R., MacGregor, J.I., Ikeda, T., Little, J.R., Hultgren, S.J. and Abraham, S.N. 1993. Neutrophil activation by nascent FimH subunits of type 1 fimbriae purified from the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268: 3009-3015.
 137. 戸羽隆宏・向井孝夫. 1998. 乳酸菌による anti-adhesion therapy の可能性. 日本乳酸菌学会誌. 8: 83-87.
 138. Tuomola, E.M. and Salminen, S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 45-51.
 139. Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P. and Coppola, S. 1993. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 380-387.
 140. Yamada, M., Saito, T., Toba, T., Kitazawa, H., Uemura, J. and Itoh, T. 1994. Hemagglutination activity of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 910-915.
 141. Yamamoto, K., Miwa, T., Taniguchi, H., Nagano, T. and Shimamura, K., Tanaka, T. and Kumagai, H. 1996. Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228: 148-152.
 142. 山本憲二. 1998. 糖鎖を介した乳酸菌の細胞培養. 化学と生物. 36: 26-31.
 143. 山本憲二. 1999. 糖鎖を介した細胞接着に関わる乳酸菌の表層タンパク質. 生物工程. 77: 513-517.
 144. 山本直之・高野俊明. Personal communication.
 145. Zareba, T.W., Pascu, C., Hryniewicz, W. and Wadstrom, T. 1997. Binding of extracellular matrix proteins by enterococci. *Curr Microbiol.* 34: 6-11.

**Probiotic Characteristics of *Enterococcus faecalis* TH10 and
Expression of a Gene of Adherence to the Human
Intestinal Cells in this Strain**

Summary

Ichiro Ohhira

Enterococcus faecalis, a bacterial strain typical of the intestinal lactic acid bacterial flora in human, has been in use since the 1950's in human and animals as a live bacterial product (probiotics) effective in regulating the intestinal function.

E. faecalis TH10, used in this study, has been isolated as one of the dominant strains from the Malaysian fermented food " *Tempeh* ", whose principal raw material is soybeans. The authors have so far found that, in addition to its general characteristics as *E. faecalis*, i.e., acid tolerance (pH 3.5), salt tolerance (10%) and bile acid tolerance (6.1%), this strain shows protease activity more than 6 times stronger than other lactic acid bacteria and production of succinic acid, used as an antibiotic and a flavor substance, and that it can be considered, therefore, to have useful probiotic characteristics.

The objectives of this study were (1) to determine if this strain produces phenyllactic acid, a property so far unknown in other lactic acid bacteria, (2) to determine its adherence to cultured Caco-2 cells, used as a model for human intestinal epithelia cells, and (3) using molecular breeding techniques, to introduce a gene of adherence to the human intestinal cells, cloned from the genome of other lactobacilli, into this strain, in order to increase its adherence to the human intestinal cells, which is one of the most important probiotic properties, and determine if this gene is expressed in this strain.

1. Production of phenyllactic acid by *E. faecalis* TH10

One of the characteristics of probiotic lactic acid bacteria is the production of antibiotic substances such as bacteriocin. As an index of its antibiotic activity against various pathogenic bacteria, the ethyl acetate extract of filtrate (pH 4.0) of MRS culture (Oxoid) of *E. faecalis* TH10 were screened. The ethyl acetate extract dried product showed antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* at a concentration of 10 mg/disc. Next, using high performance liquid chromatography with a reverse phase partition column, the antibiotic fraction was obtained from the ether extract, and after methylation of that fraction, it was analyzed by means of gas chromatography using a SPB-Octyl column (Supel) and mass spectrometry (GC/MS) and identified as phenyllactic acid, whose production has not been previously reported in lactic acid bacteria. In optical partition, using an optical isomer separation column (Nucleosil Chiral-1, Macherey-Nagel), the product was found to contain a mixture of D- and L-isomers and their concentrations in MRS broth were 13.4 μ M of the D type and 6.7 μ M of the L type. D- and L-phenyllactic acid (Sigma), at concentrations of 0.2%, inhibited the growth of *E. coli* O157:H7 in LB broth (pH 7.0) and of MRSA in MRS broth (pH 6.3) and their antibiotic activity increased with lower pH. In addition, the mixture of L- and D-types showed stronger antibiotic activity than the D-type alone. The finding of

phenyllactic acid production by *E. faecalis* TH10 is the first such discovery in probiotic lactic acid bacteria.

The mechanism controlling intestinal function of probiotic lactic acid bacteria is known to be associated with the pH, bacteriocin, intestinal adherence, immunology etc., but the specifics of this mechanism are hardly known. On the other hand, it is known that phenyllactic acid is produced at large quantities (6 mM) by *Geotrichum candidum* in the maturation process of cheese and that it is used as an antibiotic agent (bacteriostatic) against numerous infective bacteria such as *L. monocytogenes* and against fungi. The results obtained suggest, therefore, for the first time, that the production of phenyllactic acid by *E. faecalis* TH10 is one of its characteristics as a probiotic lactic acid bacterium and that the production of this substance may be associated with the intestinal controlling function of probiotics.

2. Adherence of *E. faecalis* TH10 to cultured Caco-2 cells as a model for human intestinal epithelial cells and to extracellular matrix proteins

Adherence to the human intestinal cells is considered one of the most important characteristics of probiotic lactic acid bacteria. The adhesion factors of pathogenic bacteria include lectin-like proteins, lipoteichoic acid and glycoproteins, present in the fimbriae and adventitia. Glycoproteins, glucolipids and extracellular matrix (ECM) proteins present as receptors on the intestinal epithelial cells. For lactic acid bacteria, species specificity was found in the intrainstestinal colonization of bacterial species and strains, and the presence of factors responsible for their specific adherence to the intestinal epithelial cells of certain species was therefore speculated, suggesting an adhesion mechanism similar to that of pathogenic bacteria. Nevertheless, the exact proteins and genes are hardly known and there are almost no reports concerning the adherence of enterococci to the intestinal cells. In this study, the adherence of *E. faecalis* TH10 to cultured Caco-2 cells, used as a model for human intestinal epithelia cells, and to ECM proteins, was studied.

1) Study of the adherence to Caco-2 cells using Gram staining

A DMEM culture medium (Gibco BRL) containing antibiotics and fetal bovine serum was used for incubating the Caco-2 cells. 3.5×10^4 /cm² Caco-2 cells were seeded onto thin membrane discs (7 mm) in vials in a 24-vial plate (Sumitomo Bakelight) and cultured for 2 weeks at 37°C and in CO₂. After the incubation, the cell layer on the disc surfaces was rinsed twice using phosphate buffer, 1 ml (5×10^8 CFU/ml) DMEM culture of the bacterial strains tested were added and the discs were kept for 2 hr at 37°C. The discs were rinsed twice using phosphate buffer, subjected to Gram staining and the adhered bacteria were counted.

The number of adhered bacteria per 100 Caco-2 cells was highest for *L. rhamnosus* JCM 1136, so far known to have the strongest adherence, and

reached 64.1 ± 12.6 . The count for *E. faecalis* TH10, on the other hand, was 23.2 ± 6.0 , a low count compared with the above. Nevertheless, the adherence of *E. faecalis* TH10 was higher than that of *L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527 (18.0 ± 4.3), previously reported by Kimoto *et al.* (1998) to have considerable adherence.

2) Study of the adherence to ECM proteins using Gram staining

The ECM proteins laminin, type-I collagen, type-IV collagen, type-V collagen and bovine serum albumin (BSA) were prepared at concentrations of 2.5 pmol and fixated onto special printing glass slides (Iwaki). After blocking for 2 hr using phosphate buffer containing 2% BSA, 0.4ml of suspensions containing each of the tested bacterial strains (5×10^8 CFU/ml) were dripped and sensitization was conducted for 2 hr. After rinsing the slides twice using phosphate buffer containing 0.1% BSA, the adhered bacteria were subjected to Gram staining and the number of adhered bacteria was counted.

Of the 5 strains tested, *L. crispatus* JCM 5810, which is known to have strong adherence to ECM proteins, showed the strongest adherence, ranging between 1,000 and 1,700 cells per $20 \mu\text{m}^2$ of each of the tested ECM proteins. In addition, *L. rhamnosus* JCM 1136, which showed strong adherence to the Caco-2 cells, showed in this test low adherence of approximately 200 cells to type-I and type-V collagen. *E. faecalis* TH10, on the other hand, showed moderate adherence of approximately 400 cells to type-IV collagen.

3) Study of the adherence to Caco-2 cells using RI labeling

The tested bacterial strains were incubated in MRS broth containing ^3H -thymidine (Muromachi Pharmaceuticals), yielding RI-labeled strains, and after rinsing the radioactivity of each strain was calculated. Caco-2 cells, incubated in vials in the same manner as in 1), were rinsed, 400 μl (10^7 - 10^8 CFU/ml) of suspensions of the RI-labeled tested bacterial strains were added to the cells and after incubation for 1 hr at 37°C they were rinsed, all the Caco-2 cells contained in each vial were collected, their radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (LSC-900, Aroka) and the number of adhered bacteria was calculated.

The adherence of the 7 tested bacterial strains was represented by the number of bacteria adhered to all the Caco-2 cells in 1 vial (1×10^5 cells). The result for *E. coli* SH2, a bacterium containing a cilium (Fim H protein) gene which is an adhesive factor to the human intestinal cells, was 64.3×10^6 . This value was used as 100% and the value for *E. coli* ORN103, from which the above-mentioned *fimH* gene, pSH2 was knocked out, of 9.2%, was less than 1/10 that of the new strain, representing a low value. Moreover, the adherence of 4 strains for which adherence was confirmed, such as *L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527, was around 40%. The adherence of *E. faecalis* TH10, on the other hand, was 109.7%, a value higher than that of *E. coli* SH2, indicating that this strain has a strong adherence.

3. Introduction of a gene of adherence to the human intestinal cells into *E. faecalis* TH10

It is expected that probiotic lactic acid bacteria, which have excellent adherence to the intestinal cells, can be used for prevention of infectious diseases and for post-infectious treatment through their antagonism to the intestinal adhesion of pathogenic bacteria. The author isolated from human feces *Lactobacillus fermentum* FAF-1, a bacterium whose adherence is 1.48 times higher than that of *E. coli* SH2, cloned the gene associated with its adherence, introduced this gene into *E. faecalis* TH10 and determined the possibility of its expression.

The adherence of *L. fermentum* FAF-1 with lectin-like protein was inferred and a forward primer (5'- CAYCARACNCAYTGGTAYATG -3') and reverse primer (5'- ARYTCDGCVTGDATCATCCA -3') were constructed from the amino acid sequence from the lectin-like protein of *L. rhamnosus* (Yamamoto, 1998). These are multiple primers and the Y of this primer can be C or T, R can be A or G, N can be A, C, G or T and D can be A, G or T. The genome of *L. fermentum* FAF-1 was PCR widened on a template and a 370 bp widened fragment was obtained. Its sequence was determined and 75.4% homology with the lectin-like protein gene of *L. rhamnosus* was found.

In order to clone the above-mentioned gene, the genome library of *L. fermentum* FAF-1 was constructed. First, the genome was subjected to partial cleavage into 9 to 23 kb fragments by *Sau* 3AI and ligation to the *Bam* HI arm of λ DASH II, yielding the genome library. The above-mentioned 370 bp DNA sequence was used as a probe and up to 3rd screening was conducted, and phage clone 9 with an open reading frame (ORF) of the lectin-like protein gene was obtained from the genome library. The complete sequence of the DNA integrated into this clone was determined. These results were consistent with a large cluster of 119 out of 154 amino acids from the initiation codon to the termination codon and their homology was also as high as 77.2%.

Next, in order to sub-clone this gene of adherence to the human intestinal cells derived from *L. fermentum* FAF-1 in vector pIL253 for lactic acid bacteria, a forward primer (5'- GCGAATTCGTCTTCCACGACCAAGCA CT -3') and a reverse primer (5'- CGCTCGAGTGGCCCTGAATCACGGTGTC -3') were designed from the sequence contained in clone 9. The PCR fragment widened from this primer was the one containing the ORF of the gene of adherence to the human intestinal cells derived from *L. fermentum* FAF-1. *Eco* RI site was set in the forward primer and *Xho* I site was set in the reverse primer. Both these restriction enzyme sites have cleavage parts in the multi-cloning sites of vector pIL253 for lactic acid bacteria and they were integrated into this vector at a set direction. The plasmid (p921EX) was purified and desalted, dissolved in 15 μ l sterile distilled water and incorporated into *E. faecalis* TH10 by means of electroporation using a gene pulsar (Bio-Rad). The erythromycin (Em) resistant transforming plasmid

thus obtained was found to contain a lectin-like protein gene derived from *L. fermentum* FAF-1, using the PCR method. The adherence to the human intestinal cells of the Em-resistant transformant of *E. faecalis* TH10 into which p921EX was introduced was assessed by means of the test method involving RI labeling and Caco-2 cells. The results confirmed that the transformant thus obtained had adherence 1.8 times stronger than that of *E. coli* SH2, which contains type-1 fimbriae. That the adherence of the transformant cured p921EX was confirmed by recovery of a value similar to that of the parent strain. In other words, the gene of adherence to the human intestinal cells of *L. fermentum* FAF-1 was expressed in *E. faecalis* TH10 and a transformant whose adherence to the intestinal cells was 1.7 times stronger than that of the parent strain. This value was used as 100%. The value for *E. coli* ORN 103, whose fimbriae gene was cured from *E. coli* SH2, was 9.2%, and less than 1/10 that of the parental strain, representing a low value.

In this study, the probiotic characteristics of *E. faecalis* TH10, derived from Malaysian fermented food whose main starting material is soybeans, were studied. In addition to the general properties of *E. faecalis*, this bacterial strain was found to produce phenyllactic acid and to have adherence to the intestinal cells. In addition, it was found that when a gene of adherence to the human intestinal cells, derived from another lactic acid bacterium, was introduced into this strain, the gene was expressed in this strain. The result of this study is a first achievement in the field of probiotics and it is expected to lead the way to new studies involving the use of microbial genetic engineering in the field of probiotics.

表1 プロバイオティクス(Probiotics) とは

Lilly and Stillwell, Science, 1965

- 腸内微生物のバランスを改善することによって
宿主動物に有益に働く微生物添加物

生きている微生物菌体 \longleftrightarrow 抗生物質

- プロバイオティクス細菌(乳酸菌)の特徴

Salminen *et al.*, Antonie Leeuwenhoek, 1996

- Human origin
- Acid and bile stability
- Adherence to human intestinal cells
- Colonization of human intestinal tracts
- Production of antimicrobial substances
- Antagonism against carcinogenic and pathogenic bacteria
- Safety in food and clinical use
- Clinically validated and documented health effects

表2 アノイリナーゼ保菌者糞便液の各種乳酸菌の生育阻止帯の生育阻止作用

菌種	保菌者の氏名・性別・年齢（發育阻止帯の直径 mm）							
	J. Y. ♂36	T. F. ♀27	M. N. ♂34	K. M. ♀57	T. K. ♀27	T. O. ♀36		
<i>E. faecalis</i>	8.0	8.0	8.1	9.2	8.0	9.1		
<i>L. acidophilus</i>	12.0	10.5	11.6	11.5	8.5	13.3		
<i>L. bifidus</i>	9.3	8.4	8.0	9.7	9.1	11.5		
<i>L. fermenti</i>	15.1	15.0	13.3	12.9	10.1	14.5		
<i>L. plantarum</i>	12.4	13.8	12.9	12.8	10.5	14.1		
<i>L. bulgaricus</i>	13.6	11.5	9.3	15.1	13.7	13.2		
<i>L. casei</i>	10.9	12.8	11.8	14.5	16.1	10.3		

(浜田、1953)

表3 コー乳酸の各種乳酸菌の生育阻止作用

菌種	コー乳酸 稀釈倍数 (發育阻止帯の直径 mm)						
	10	10×2	10×2 ²	10×2 ³	10×2 ⁴	10×2 ⁵	10×2 ⁶
<i>E. faecalis</i>	14	13	12.5	9	8	—	—
<i>L. acidophilus</i>	35	21	20.5	8	8	—	—
<i>L. bifidus</i>	30	25	15	8	8	—	—
<i>L. plantarum</i>	25	21.5	12	10	8	—	—
<i>L. lactis</i>	23.5	21	17	12	8	—	—
<i>L. casei</i>	31	32	29	18	8	—	—
<i>Sc. lactis</i>	28	27	22.5	19	13.5	9	8
<i>Pc. lindneri</i>	20	18	16	12.5	8	—	—

(浜田、1966)

表4 デオキシコロール酸の各種乳酸菌の生育阻止作用

菌種	デオキシコロール酸 稀釈倍数 (発育阻止帯の直径 mm)									
	10×2	10×2 ³	10×2 ⁵	10×2 ⁷	10×2 ⁸	10×2 ⁹	10×2 ¹⁰			
<i>E. faecalis</i>	15	16	14	8	—	—	—			
<i>L. acidophilus</i>	23.5	22	16.5	10	8	—	—			
<i>L. plantarum</i>	21	16.5	14.5	10	8	—	—			
<i>L. lactis</i>	18	14.5	14	10	8	—	—			
<i>L. casei</i>	27	26.5	22.5	13	10	8	—			
<i>Sc. lactis</i>	20	16.5	14	11	10	10	8			
<i>Pc. lindneri</i>	16	13	12	10	10	8	—			

(浜田、1966)

表5 ラット消化管の各部位における *E. faecalis* の分布と pH

実験区分	胃	十二指腸	空腸	回腸	盲腸	結腸	直腸	腸		
A	+	4.0	+	6.2	+	6.8	卍	6.4	卍	6.6
B	-	3.8	-	6.4	-	6.2	卍	6.8	卍	6.8
C	-	3.8	-	6.4	-	6.8	-	7.2	+	7.2
D	-	3.8	-	6.4	-	6.8	-	6.8	-	7.0
E	-	2.6	-	6.6	+	6.4	卍	6.4	卍	6.6
F	-	2.6	-	6.2	+	6.4	+	6.8	+	6.8
G	-	2.8	-	6.2	+	6.4	+	6.6	卍	7.0
対照	-	3.6	-	6.4	-	6.6	-	6.8	-	7.0

A : *E. faecalis* を1回だけ投与, 6時間後に解剖.

B : 同上の投与, 24時間後に解剖.

C : 同上の投与, 48時間後に解剖.

D : 同上の投与, 72時間後に解剖.

E : 1日1回の投与を6日継続, 最後の投与から24時間後に解剖.

F : 1日おき1日1回の投与を3回行ない, 最後の投与から48時間後に解剖.

G : 2日おき1日1回の投与を2回行ない, 最後の投与から72時間後に解剖.

- : 乳酸菌を認めず.

+

卍 : 多数.

卍 : きわめて多数. また数字は pH を示す.

表6 東南アジア地域の伝統的発酵食品より分離した乳酸菌4菌株の生理生化学的諸性状

分離菌株 (分離源)	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> TH10 (Tempeh)	<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> DH 1 (Dadih)	<i>Leuconostoc</i> <i>lactis</i> DH 1 (Dadih)	<i>Pediococcus</i> <i>halophilus</i> II 3 (Idli)
グラム染色	+	+	+	+
形態	双球菌, 連鎖球菌	双球菌, 連鎖球菌	連鎖球菌	双球菌
酸素要求性:				
絶対好気性	-	-	-	-
通性嫌気性	+	+	+	+
カタラーゼ活性	-	-	-	-
リトマスミルクで示す性質:				
還元性	+	+	+	+
酸形成能	+	+	+	+
凝固性	+	+	+	-
ゼラチン液化能	+	-	-	-
生成乳酸の透光性	L-(+)	L-(+)	D-(-)	L-(+), D-(-)
グルコースからのガス生成能	-	-	+	-
6.5%NaCl含有培地での生育	+	-	-	+
pH 9.6調整培地での生育	+	-	ND***	ND
アルギニン分解性	+	±	ND	-
馬尿酸塩分解性	+	-	ND	-
糖類発酵性:				
セロビオース	+	+	-	ND
グルコン酸カリウム	-	-	-	+
グルコース	+	+	+	+
グリセロール	-	-	-	+
イヌリン	-	-	-	-
ラクトース	+	+	+	±
マンニトール	±	±	-	-
ラフィノース	-	-	-	±
リボース	+	+	±	+
サリシン	+	+	-	-
ソルビトール	-	-	-	-
ソルボース	-	-	-	+
スクロース	±	±	±	+
トレハロース	+	+	+	+
耐塩性: 5% NaCl含有培地での生育	+	+	+	+
10% NaCl含有培地での生育	±	-	-	+
15% NaCl含有培地での生育	-	-	-	-
耐熱性: 40℃保持培地での生育	+	-	+	+
45℃保持培地での生育	±	-	-	+
50℃保持培地での生育	-	-	-	-
55℃保持培地での生育	-	-	-	-
耐酸性: pH 3.0調整培地での生育	-	-	-	-
pH 3.5調整培地での生育	±	-	-	+
pH 4.0調整培地での生育	±	-	-	+
pH 4.5調整培地での生育	+	+	-	+
酸度: 0%NaCl含有培地での生酸性	0.22	0.28	0.19	0.17
5% NaCl含有培地での生酸性	0.24	0.31	0.19	0.18
pH値: 0% NaCl含有培地での生酸性	6.11	5.69	6.36	6.35
5% NaCl含有培地での生酸性	5.94	6.18	6.15	6.19
タンパク質分解能:				
0% NaCl含有培地, 38℃, 24hr 培養	1.32	0.05	0.05	0.03
5% NaCl含有培地, 38℃, 24hr 培養	0.04	0.06	0.03	0.01
G+C含量 (mol %)	38.6	ND	ND	ND

* 0%および5%NaCl含有スキムミルク(対照試料)の示す酸度は、それぞれ0.14%および0.16%.

** 遊離チロシン含量, mg/5ml.

*** 分析せず.

(大平ら、1988-1990)

表7 *Enterococcus faecalis* TH10 の性状

条件	生育性	その他の諸性状
NaCl 6.5 %	+	グラム陽性・連鎖球菌
NaCl 10.0 %	±	通性嫌気性
NaCl 15.0 %	-	カタラーゼ陰性
pH 3.0	-	G+C含量 : 38.6 %
pH 3.5	±	リトスマイルク凝固性あり
pH 4.0	±	ゼラチン液化性あり
pH 4.5	+	L(+)-乳酸のみ産生
pH 9.6	+	L-アルギニン分解性あり
胆汁酸 6.1%	+	24時間培養後の酸度 : 0.22
培養40°C	+	24時間培養後のpH : 6.11
培養45°C	±	72時間培養後のタンパク分解能 : 1.32
培養50°C	-	ヘモリシンなどによる溶血性示さず

(大平ら, 1988-1990)

表8 供試菌株、その由来および分離源

供試菌株	由来	分離源
<i>Enterococcus faecalis</i> TH10	大平ら分離	植物性発酵食品
メチシリン耐性 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) FSA-1	麻布大学食品科学	ドブネズミ
メチシリン感受性 <i>Staphylococcus aureus</i> FSA-2	麻布大学食品科学	ドブネズミ
<i>Enterococcus faecalis</i> RIMD 3116001	岡山大学畜産物利用学	植物性発酵食品
<i>Enterococcus faecium</i> OR-1	岡山大学畜産物利用学	植物性発酵食品
<i>Streptococcus salivarius</i> OR-12	岡山大学畜産物利用学	植物性発酵食品
<i>Pediococcus acidilactici</i> OR-34	岡山大学畜産物利用学	植物性発酵食品
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OR-5-1	岡山大学畜産物利用学	植物性発酵食品
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> OR-7	岡山大学畜産物利用学	発酵乳
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> OR-1	岡山大学畜産物利用学	発酵乳
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OR-7-1-9	岡山大学畜産物利用学	発酵乳
<i>Lactobacillus plantarum</i> OR-1	岡山大学畜産物利用学	植物性発酵食品
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> OR-25	岡山大学畜産物利用学	発酵乳

表9 *E. faecalis* TH10培養液からの酢酸エチル抽出物の抗菌スペクトル

ペーパーディスクへの添加量¹⁾

供試菌株

	5	10	20 (mg)
メチシリン耐性 <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) FSA-1	- ²⁾	+ ³⁾	+
メチシリン感受性 <i>Staphylococcus aureus</i> FSA-2	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i> RIMD 3116001	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> OR-1	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i> OR-12	-	-	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> OR-34	-	-	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OR-5-1	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> OR-7	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> OR-1	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OR-7-1-9	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> OR-1	-	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> OR-25	-	-	-

1) 酢酸エチル抽出物の乾燥重量 (360 mg / l).

2) - : 生育が阻害されなかった.

3) + : 生育が阻害された.

表10 MRSAの生育に及ぼす*E. faecalis* TH10 培養液エーテル抽出物より得たHPLC画分の影響

HPLC画分	培養液のOD値 (660 nm) ¹⁾
対照 ²⁾	1.25
a画分	1.27
b画分	1.24
c画分	1.22
d画分	1.26
e画分	0.53 (±0.13)
f画分	1.20
g画分	1.19
h画分	1.25
i画分	1.22
j画分	1.25

- 1) 各画分を50%量添加したMRS液体培地にMRSAを0.2%量接種し、37°Cにて24時間後に培養液のOD値(660 nm)を測定し、各実験は5回行った。
- 2) *E. faecalis* を接種していないMRS液体培地のエーテル抽出物をHPLC画分の代わりに用い、同様に試験した。

表11 *E. faecalis* TH100の合成培地(D63合成培地)組成

D-グルコース	2.0 g	L-メチオニン	10 mg
グアニン	1.0 mg	L-リジン	10 mg
アデニン	1.0 mg	L-セリン	10 mg
シトシン	1.0 mg	L-アルギニン	10 mg
チミン	1.0 mg	L-ヒスチジン	10 mg
キサントシン	1.0 mg	L-フェニルアラニン	10 mg
ウラシル	1.0 mg	L-ロイシン	10 mg
Tween 80	0.1 ml	L-バリン	10 mg
MgSO ₄ ・7H ₂ O	50.0 mg	L-グルタミン酸	20 mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	2.0 mg	L-アスパラギン酸	20 mg
MnSO ₄ ・5H ₂ O	4.35 mg	L-システイン	20 mg
クエン酸三アンモニウム	0.1 g	L-トリプトファン	10 mg
酢酸ナトリウム・3H ₂ O	0.838 g	L-チロシン	10 mg
MES buffer	0.326 g	L-アラニン	10 mg
GIBCO BRL ビタミン	1.0 ml	L-グリシン	10 mg
GIBCO BRL ミネラル	10.0 ml	L-プロリン	10 mg
		L-アスパラギン	10 mg
		L-グルタミン	10 mg

上記成分を100 mlの蒸留水に溶解し、KOHでpHを7.0に調整した。

表12 供試菌株、その由来、分離源、培地および培養温度

供試菌株	由来	分離源	培地	培養温度
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) FSA-1	麻布大学食品科学	ドブネズミ	MRS broth	37°C
<i>Bacillus cereus</i> JCM 2152	理化学研究所	=ATCC 14579	Nutrient broth No.2	30°C
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (95-07)	麻布大学食品科学	感染症患者	LB broth	37°C
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (96-42)	麻布大学食品科学	感染症患者	Lb broth	37°C
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (96-70)	麻布大学食品科学	感染症患者	LB broth	37°C
<i>Yersinia enterocolitica</i> JCM 1677	理化学研究所	=CIP 160	LB broth	37°C
<i>Salmonella choleraesuis</i> JCM 6977	理化学研究所	=IFO 14193	LB broth	37°C
<i>Clostridium perfringens</i> JCM 1290	理化学研究所	ウシ	EG medium	37°C

1) 培地組成は、表13を参照。

2) ガスパックを使って完全に嫌気培養した。

表13 供試培地組成

MRS broth (pH 6.3, Oxoid)	Nutrient borth No.2 (pH 7.0, ニッスイ)
Casein peptone, tryptic digest	Peptone
Meat extract	Meat extract
Yeast extract	NaCl
Glucose	Distilled water
Tween 80	10.0 g
K ₂ HPO ₄	10.0 g
Sodium acetate	5.0 g
Diammonium citrate	20.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
MnSO ₄ ·xH ₂ O	2.0 g
Distilled water	5.0 g
	1,000 ml
LB broth (pH 7.0)	EG medium (pH 7.6, ニッスイ)
Tryptone (Difco)	Lab-lemco meat extract (Oxoid)
Yeast extract (Difco)	Protease peptone No.3 (Difco)
NaCl	Bacto yeast extract (Difco)
Distilled water	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O
	Glucose
	Soluble starch
	L- Cystine·2HCl
	10% Silicone SH 5535 (Toray)
	L-Cysteine·HCl·H ₂ O
	Horse blood
	Distilled water
	2.4 g
	10.0 g
	5.0 g
	4.0 g
	1.5 g
	0.5 g
	0.2 g
	5.0 ml
	0.5 g
	50.0 ml
	1,000 ml

表14 ペーパーディスク法によるフェニル乳酸の抗菌性試験

供試菌株	フェニル乳酸濃度 ¹⁾		
	1.0%	0.7%	0.2%
培地のpH	6.8	6.8	6.8
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) FSA-1	2.7 ²⁾	4.2	1.8
<i>Bacillus cereus</i> JCM 2152	2.0	4.0	1.8
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (95-07)	3.0	3.5	1.7
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (96-42)	2.0	—	—
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (96-70)	2.0	—	—
<i>Yersinia enterocolitica</i> JCM 1677	4.0	—	—
<i>Salmonella choleraesuis</i> JCM 6977	2.0	—	—
<i>Clostridium perfringens</i> JCM 1290	0	—	—

1) *E. faecalis* TH10 の産生するフェニル乳酸 D 体 : L 体 = 2 : 1 の配合で供試.

2) ペーパーディスクから阻止円までの長さ (mm).

3) 測定せず.

表15 供試菌株のCaco-2細胞への付着性

供試菌株 100細胞当たりの付着菌数¹⁾

L. rhamnosus JCM1136 64.1 ± 12.6

E. faecalis TH10 23.2 ± 6.0

E. faecalis JCM5803 12.5 ± 3.9

L. lactis NIAI527 18.0 ± 4.3

1) 1視野当たりの細胞数および細胞付着菌数をランダムに20視野計測し、
100細胞当たりの付着菌数を算出。

表16 各供試菌株が³H-チミンを菌体に取り込んだ結果の放射線量と細菌数との関係

供試菌株	400 μ l 中の放射線量 ¹⁾ (Bq)	400 μ l 中の細菌数 ²⁾ ($\times 10^8$)	放射線量当たりの細菌数 (細菌数 [$\times 10^4$] / Bq)
<i>E. coli</i> SH2 ³⁾	257.6	1.6	62.4
<i>E. coli</i> ORN103	283.2	2.9	101.4
<i>L. fermentum</i> FAF-1	1,374.0	26.0	189.0
<i>L. fermentum</i> CP57	937.3	15.0	160.2
<i>L. fermentum</i> CP498	890.0	9.0	101.4
<i>E. faecalis</i> TH10	3,122.7	32.0	102.6
<i>L. lactis</i> NIAI 527	1,653.3	12.4	75.0

1, 2) 各供試菌株を培養後、遠心分離により集菌し、適当な量のリン酸緩衝液に懸濁した。その懸濁液400 μ lについて、放射線量と細菌数を測定したものである。

3) *E. coli*からクローン化した線毛(*fim*)遺伝子(pSH2)導入による*E. coli* ORN103の形質転換体。

表17 供試菌株のCaco-2細胞への付着性試験

供試菌株	Bq / ウェル	付着菌数 ($\times 10^6$) / ウェル	付着率 (%) ¹⁾
<i>E. coli</i> SH2 ²⁾	103.6	64.3	100
<i>E. coli</i> ORN103	5.8	5.9	9
<i>L. fermentum</i> FAF-1	50.1	94.9	148
<i>L. fermentum</i> CP57	17.7	28.3	44
<i>L. fermentum</i> CP498	26.8	27.1	42
<i>E. faecalis</i> TH10	68.8	70.5	110
<i>L. lactis</i> NIAI 527	35.1	26.3	41

1) 線毛を有する*E. coli* SH2の付着率を100%として表示.

2) *E. coli*からクローン化した線毛(*fim*)遺伝子(pSH2)導入による*E. coli* ORN103の形質転換体.

表18 RI ラベルした供試菌株のCaco-2細胞への付着性試験

供試菌株	付着菌数 ($\times 10^6$) / ウェル	付着率 (%) ¹⁾
<i>E. coli</i> SH2 (pSH2含有) ²⁾	64.3	91
<i>E. coli</i> ORN103	5.9	8
<i>L. fermentum</i> FAF-1	94.9	135
<i>E. faecalis</i> TH10	70.5	100
<i>E. faecalis</i> TH10 (p921EX含有) ³⁾	116.3	165
<i>L. lactis</i> NIAI 527	26.3	37

1) *E. faecalis* TH10の付着率を100%として表示.

2) *E. coli* からクローン化した線毛 (*fim*) 遺伝子 (pSH2) 導入による *E. coli* ORN103 の形質転換体.

3) 糖鎖受容体タンパク質遺伝子 (p921EX) 導入による *E. faecalis* TH10のEm耐性形質転換体.

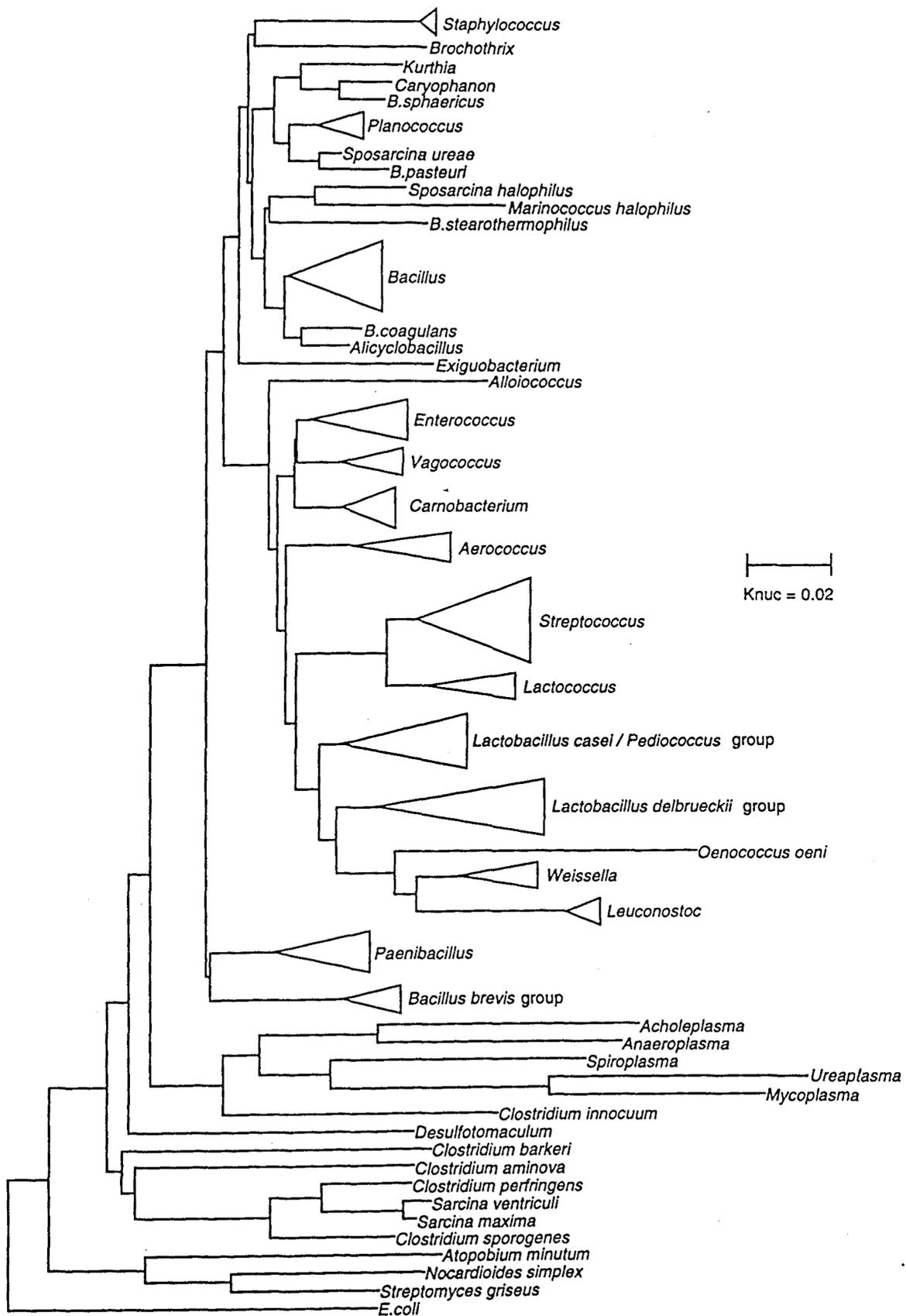


図 1 16S リボソーム RNA の塩基配列に基づくグラム陽性細菌 Low G+C グループの進化系統樹 (Knuc で求めた進化距離を NJ 法で結合) (鈴木、1996)

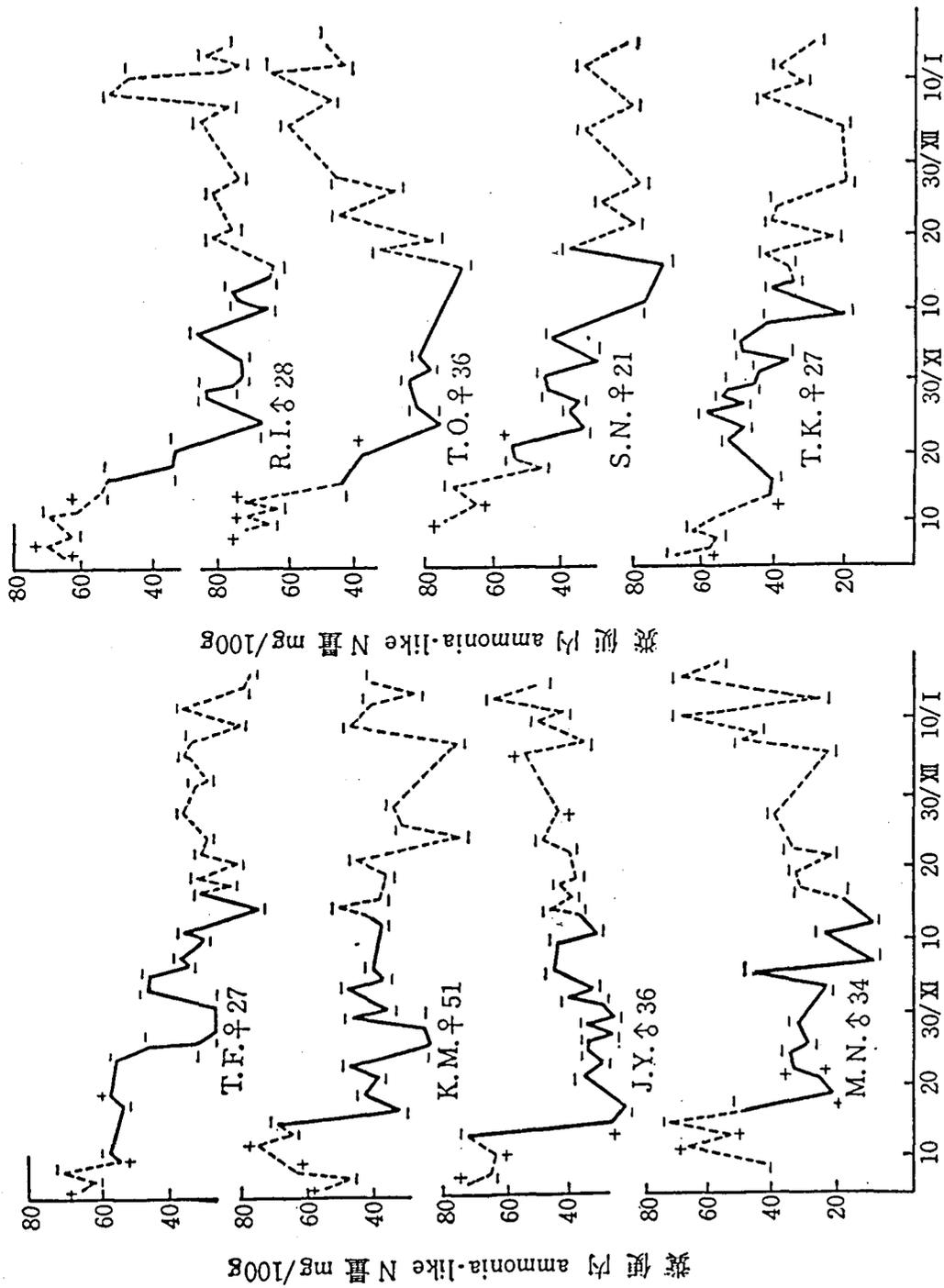


図2 アノイリナーゼ菌保菌者に対する *E. faecalis* 製剤の投与

実線：*E. faecalis* を投与、破線：*E. faecalis* を投与せず

＋：糞便中のアノイリナーゼ菌が陽性

－：糞便中のアノイリナーゼ菌が陰性

(浜田、1966)

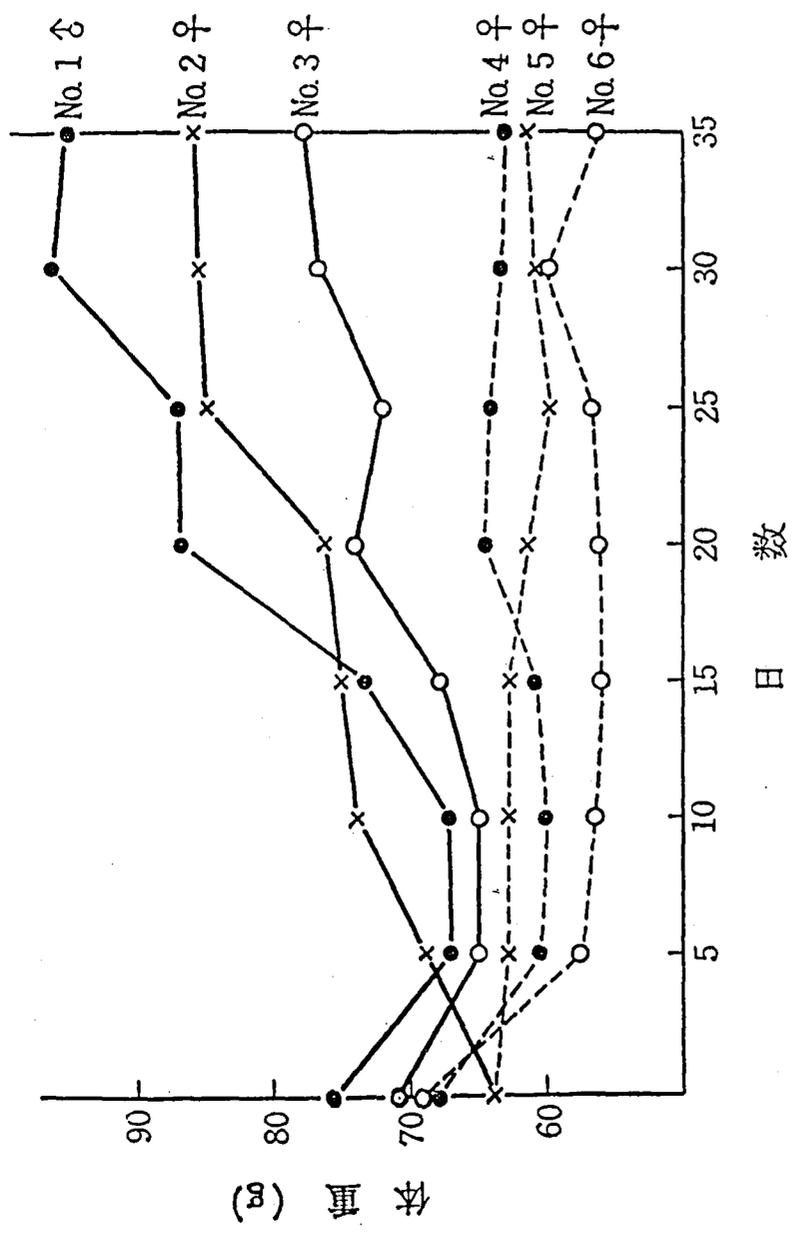


図3 マウスに対する *E. faecalis* 製剤の投与
 No. 1, 2, 3: ビタミンB2 欠乏試料と *E. faecalis* 製剤 投与区
 No. 4, 5, 6: ビタミンB2 欠乏試料 投与区 (木村, 1966)

吸光度 (254 nm)

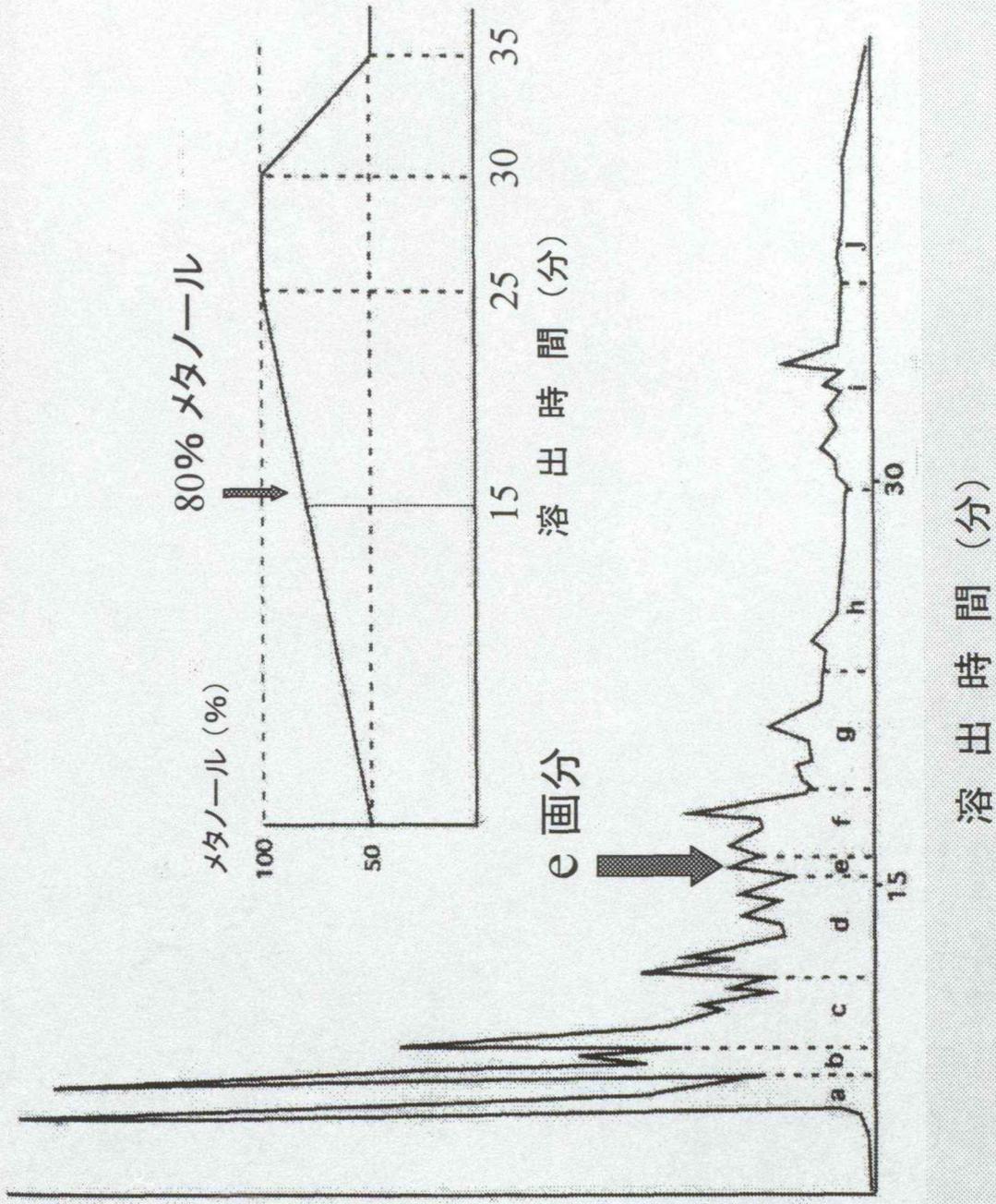


図4 *E. faecalis* TH10培養液のエーテル抽出物のHPLCクロマトグラム

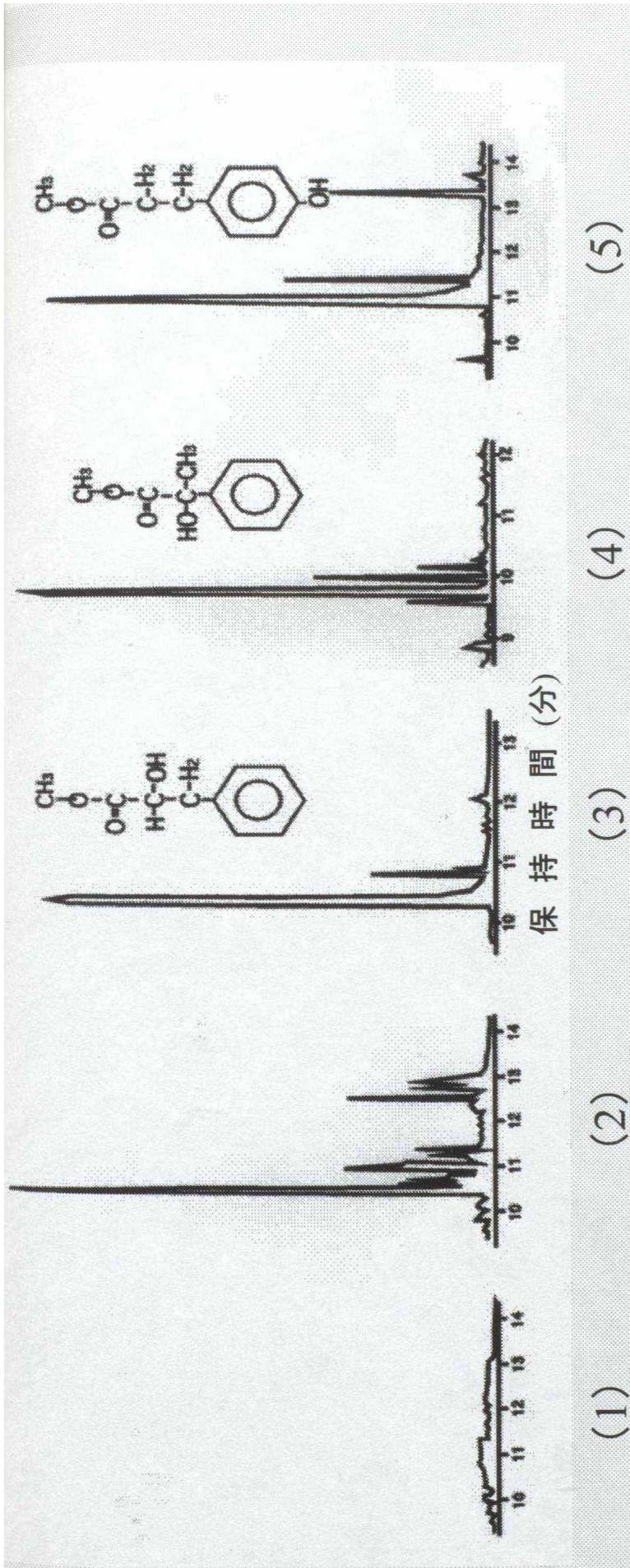
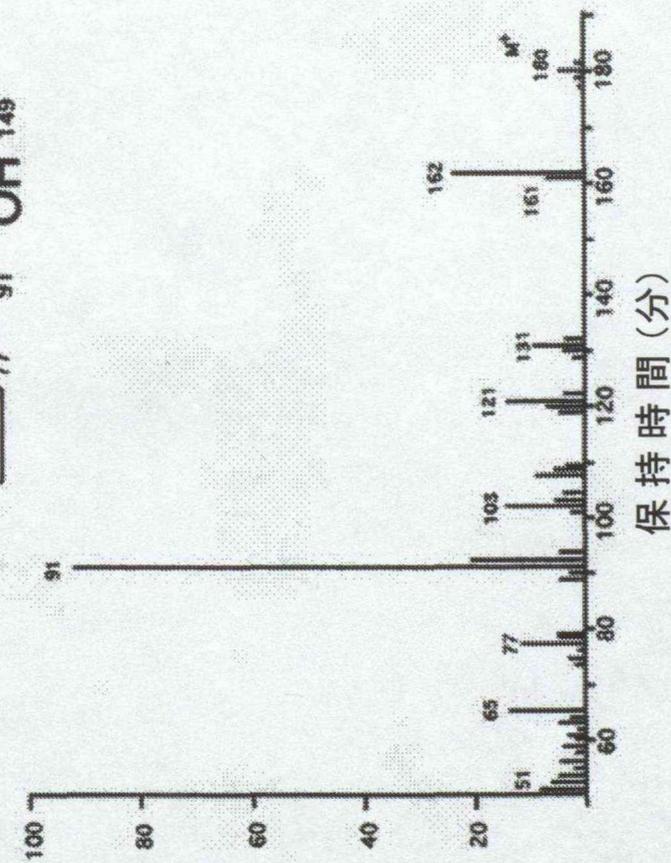
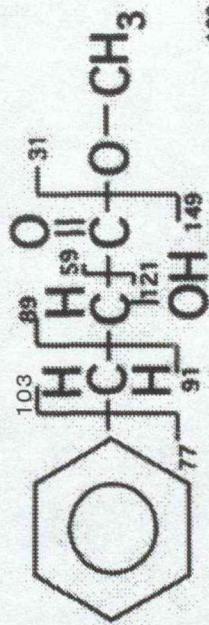
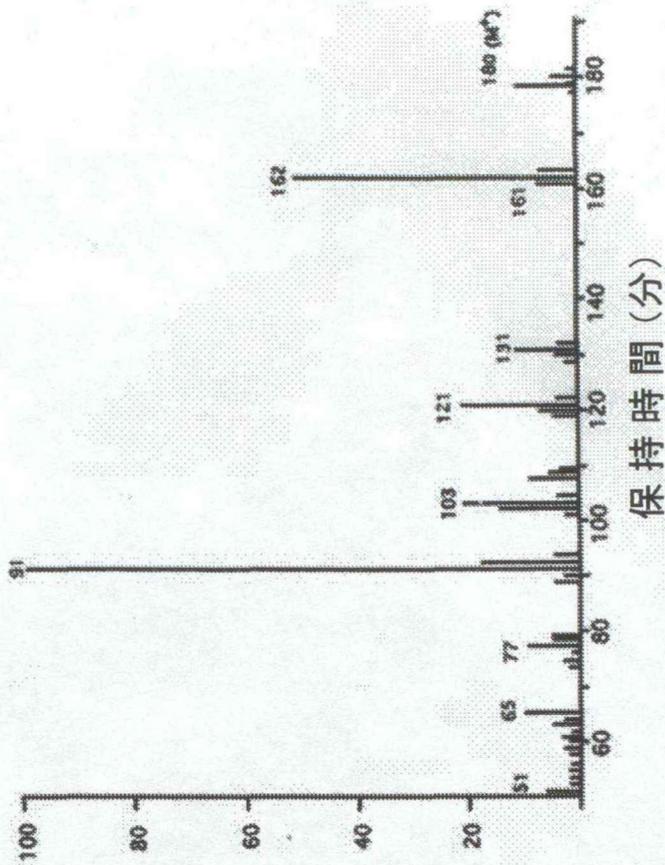


図5 e画分とオキシカルボン酸のガスクロマトグラム

- (1) 抗菌性を示さない画分
- (2) 抗菌性を示すe画分
- (3) フェニル乳酸
- (4) アトロラクチン酸
- (5) 3-4-(ヒドロキシフェニル)プロピオン酸

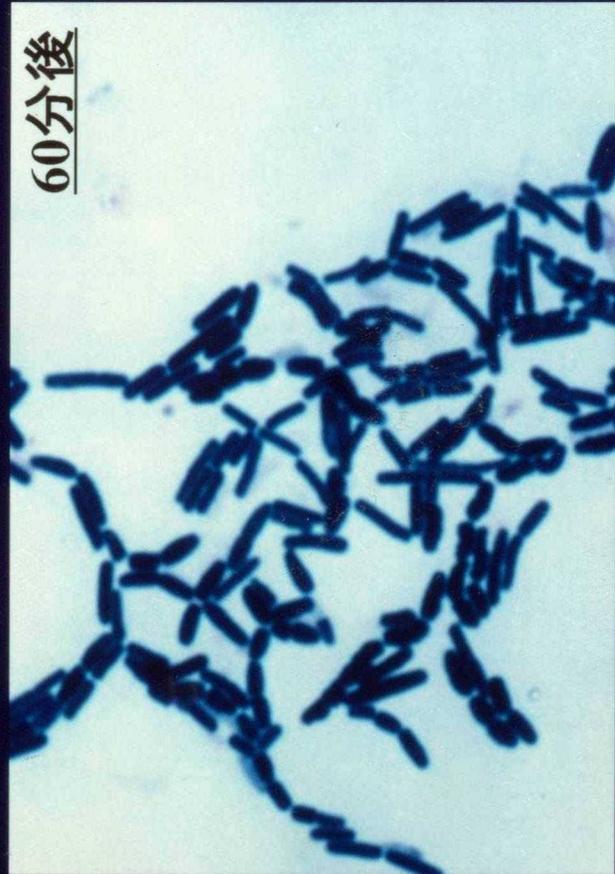
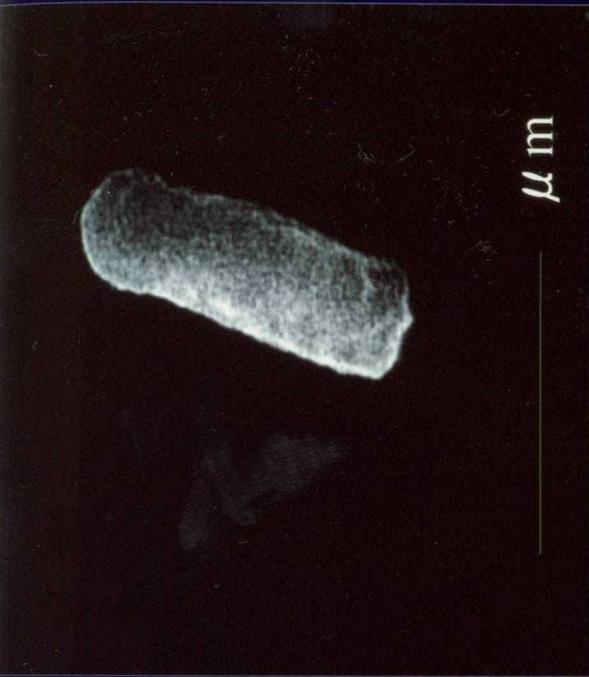


フェニル乳酸メチルエステル



メチル化した抗菌性を示すe画分

図6 フェニル乳酸と抗菌性を示すe画分のGC/MSスペクトル



撮影せず

図7 *Bacillus cereus* JCM 2152の細胞壁に及ぼす1%フェニル乳酸の影響
グラム染色し光学顕微鏡(1,500倍)と電子顕微鏡で観察

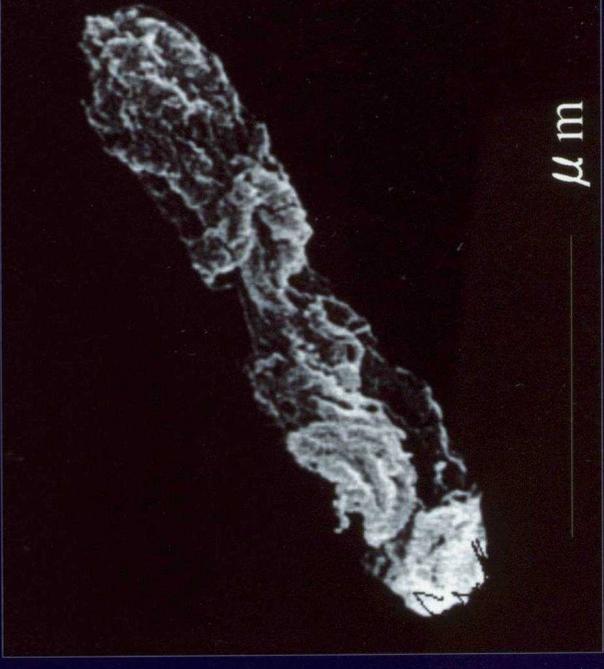
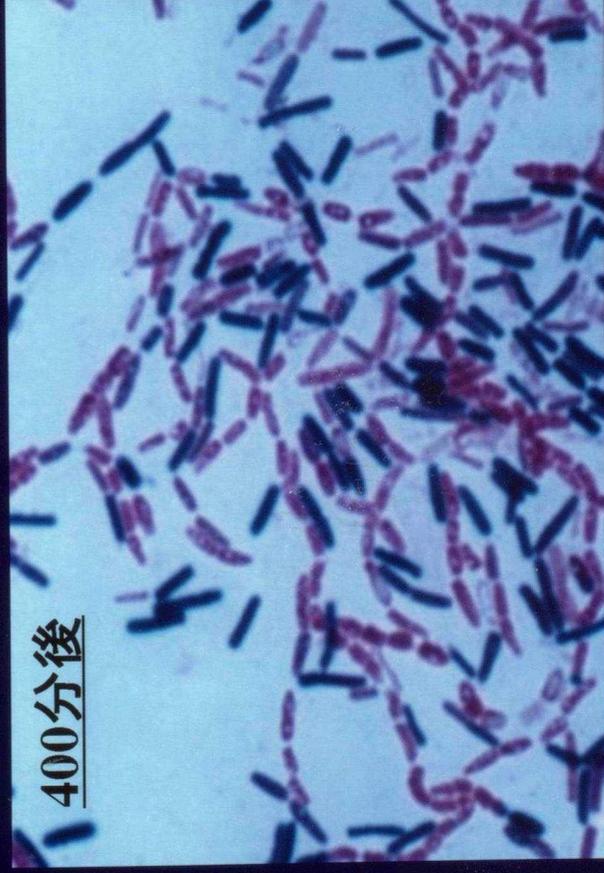
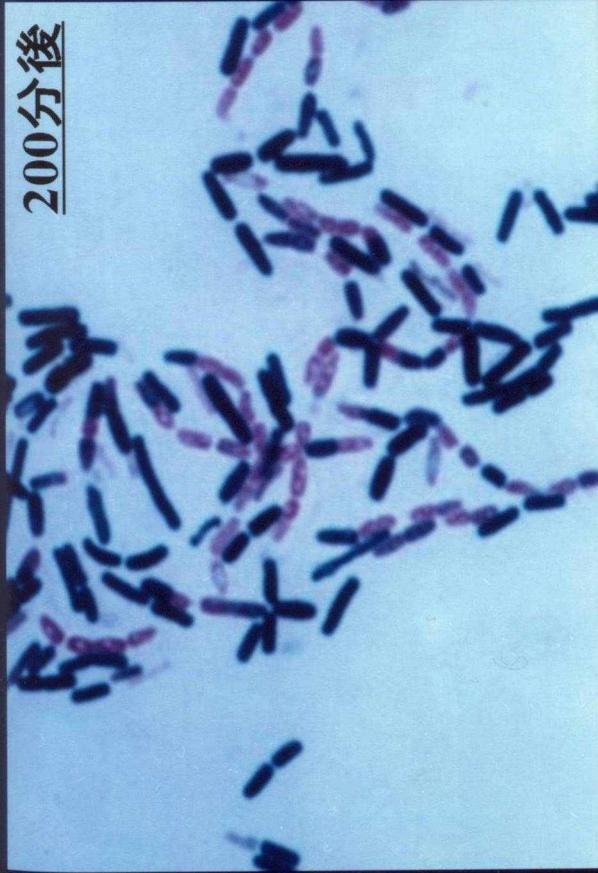


図8 *Bacillus cereus* JCM 2152の細胞壁に及ぼす1%フェニル乳酸の影響
グラム染色し光学顕微鏡(1,500倍)と電子顕微鏡で観察

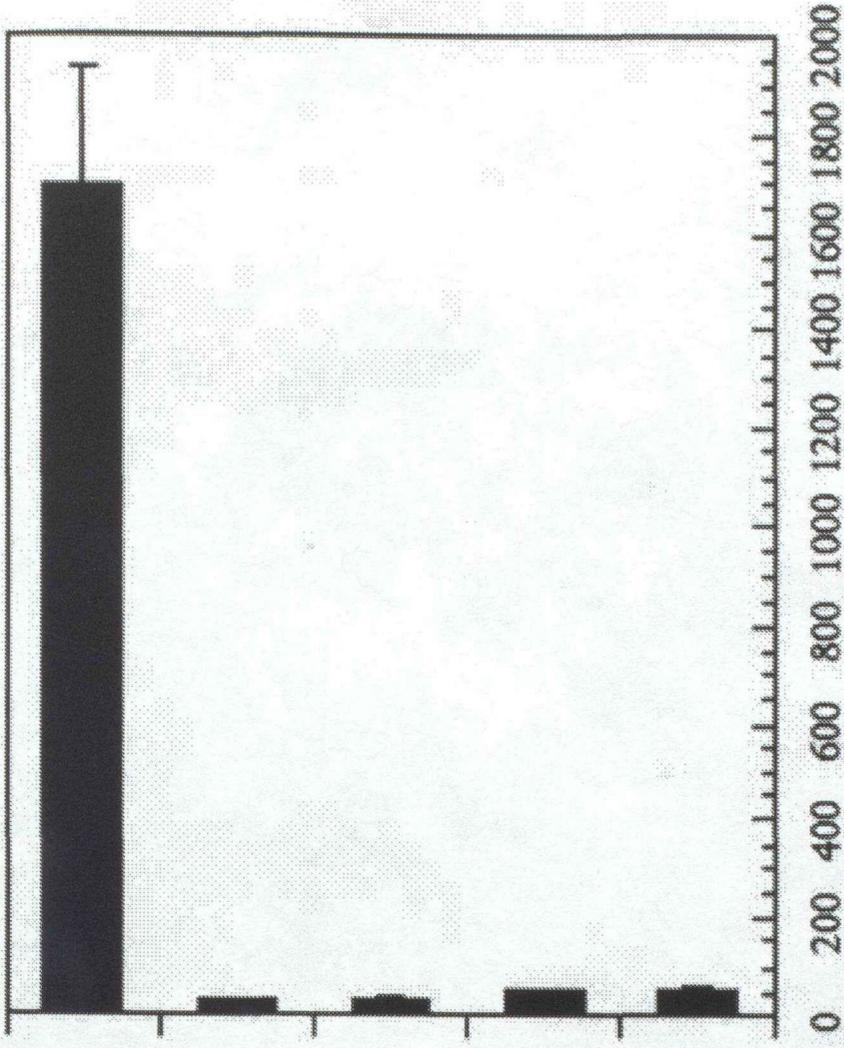
L. crispatus JCM 5810

L. rhamnosus JCM 1136

E. faecalis TH10

E. faecalis JCM 5803

L. lactis NIAI 527



付着菌数 (細胞数 / $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)

図9 供試菌株のラミニンへの付着性

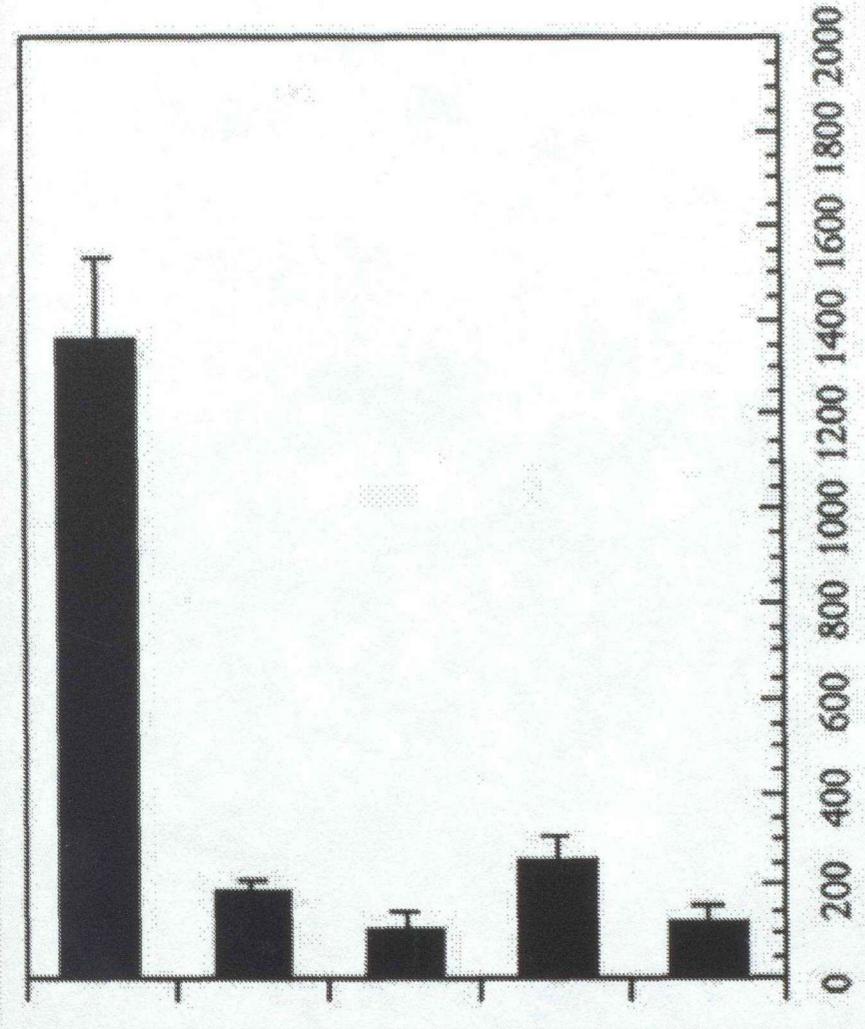
L. crispatus JCM 5810

L. rhamnosus JCM 1136

E. faecalis TH10

E. faecalis JCM 5803

L. lactis NIAI 527



付着菌数 (細胞数 / $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)

図10 供試菌株のタイプIコラーゲンへの付着性

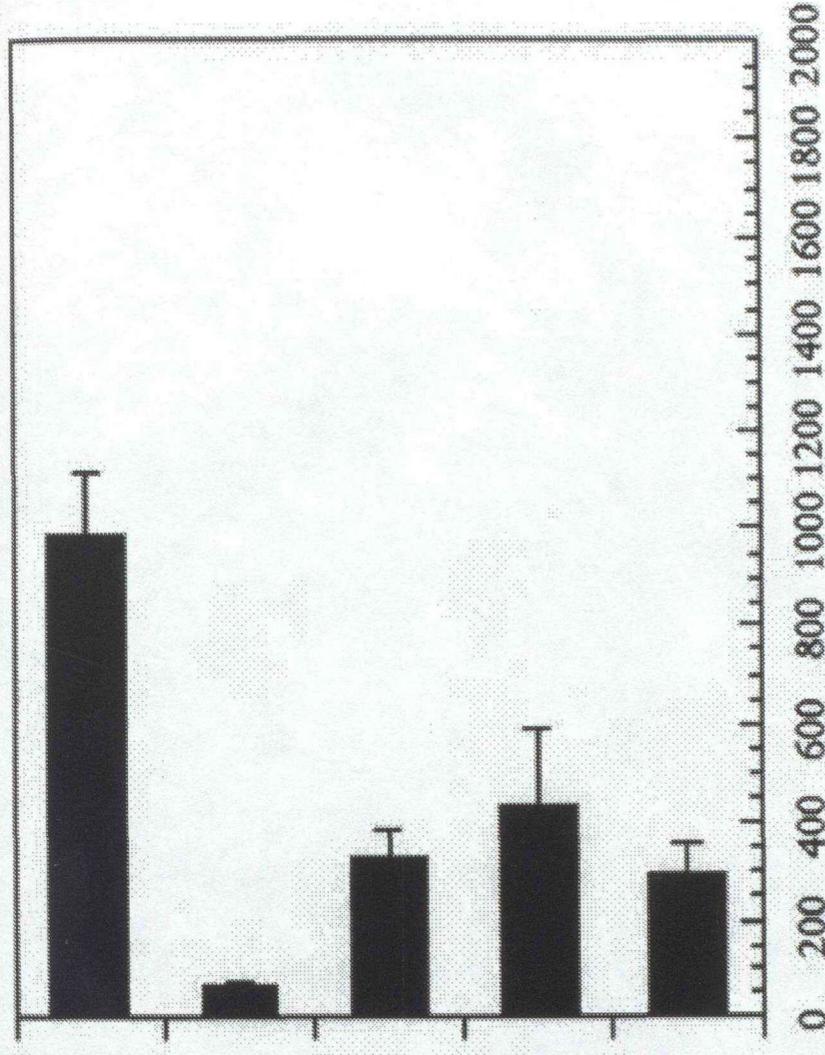
L. crispatus JCM 5810

L. rhamnosus JCM 1136

E. faecalis TH10

E. faecalis JCM 5803

L. lactis NIAI 527



附着菌数 (細胞数 / $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)

図11 供試菌株のタイプIVコラーゲンへの附着性

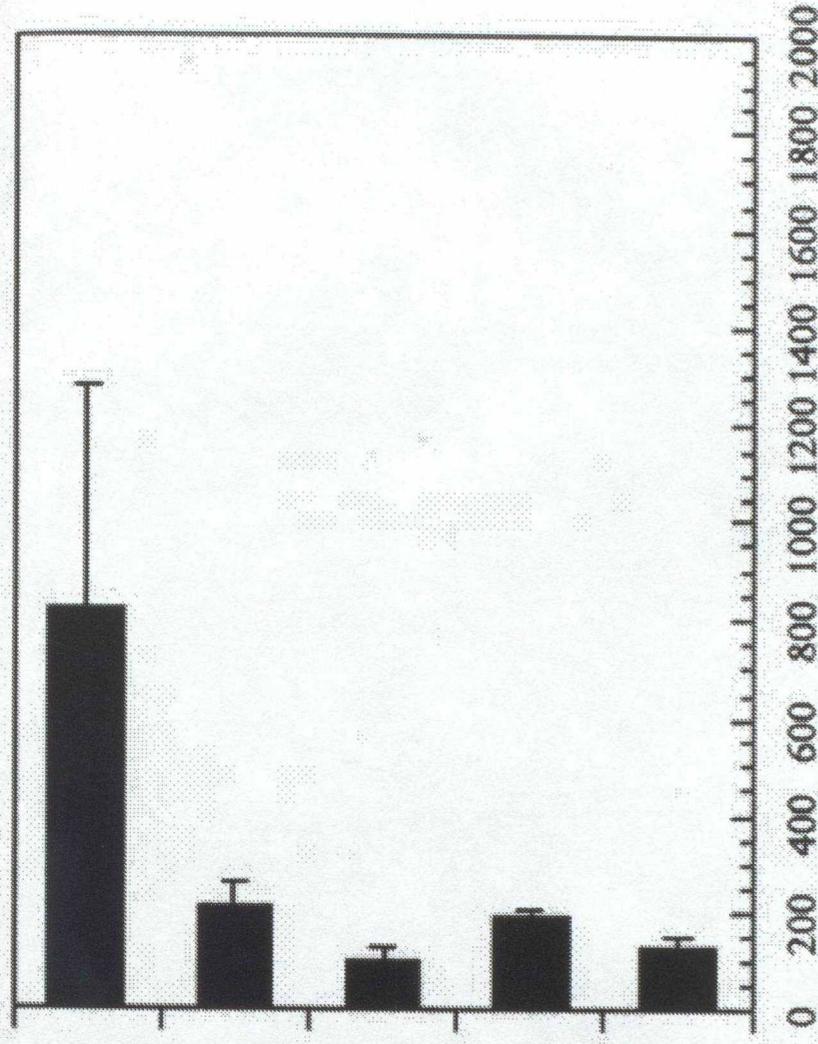
L. crispatus JCM 5810

L. rhamnosus JCM 1136

E. faecalis TH10

E. faecalis JCM 5803

L. lactis NIAI 527



附着菌数 (細胞数 / $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)

図12 供試菌株のタイプVコラーゲンへの付着性

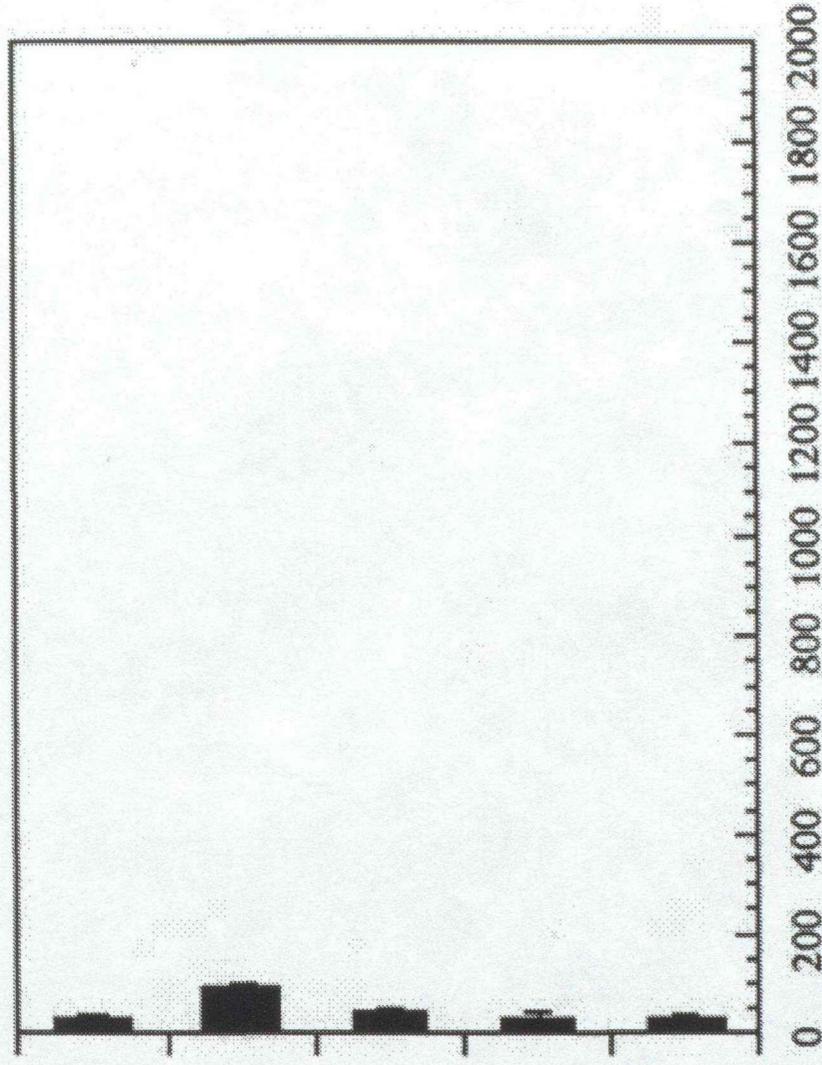
L. crispatus JCM 5810

L. rhamnosus JCM 1136

E. faecalis TH10

E. faecalis JCM 5803

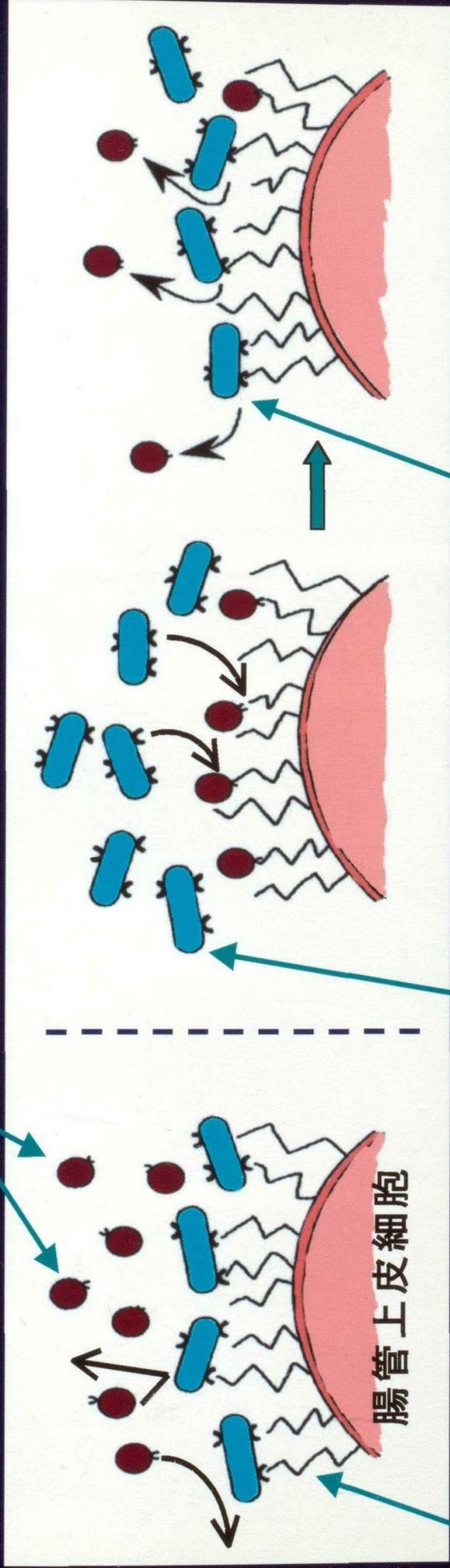
L. lactis NIAI 527



附着菌数 (細胞数 / $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$)

図13 供試菌株の牛血清アルブミンへの附着性

病原性細菌もしくは細菌性毒素



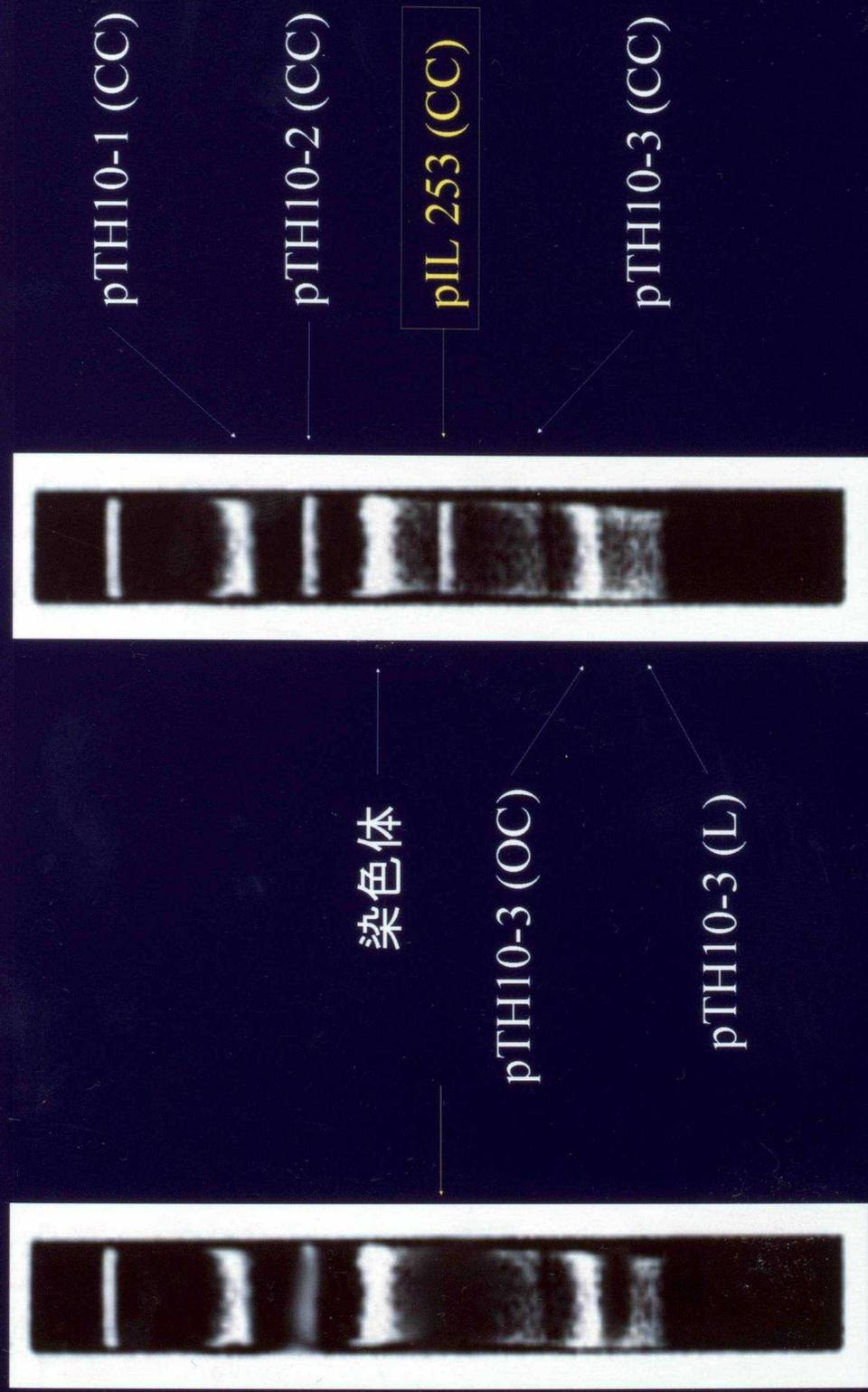
腸管上皮細胞

中性糖脂質の糖鎖

プロバイオティクス乳酸菌

糖鎖受容体タンパク質

図14 ヒト腸管上皮細胞でのプロバイオティクス乳酸菌による
病原性細菌の付着阻害のイメージ



E. faecalis TH10(親株)

Em 耐性形質転換体

図15 *E. faecalis* TH10(親株)とEm 耐性形質転換体のプラスミドプロフィール
 プラスミドの形態 CC: クローズドサーキュラー OC: オープンサーキュラー L: リニア-

MKYTKTKAVL NQLVADLSQM SMIHQTHWY MRGPNFLKLH PLMDEFMEEI DSQLDVISER



Forward : CAY CAR ACN CAY TGG TAY ATG

LIALDGPYS TLKEMAENTK IQDWPGEWDK TTPERLAHLV DGYRYLEDLY QHGIEVSDVE

KDFSTQDIFI GLKTAIEKKI WMIQAEELGSA PEIDE



Reverse : ARY TCD GCY TGD ATC ATC CA

Y:	C or T
R:	A or G
N:	A or C or G or T
D:	A or G or T

図16 *L. rhamnosus* の糖鎖受容体タンパク質の一次構造 (山本, 1998)

に基づくプライマーの設計

1. *L. fermentum*からのゲノムDNAの調製: 濃度 $0.28 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (約 1.5 ml)
純度 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.86$
2. ゲノムDNAの *Sau3AI*による部分分解: $9 \sim 18 \text{ kb}$ になる条件を決定
3. ショ糖密度勾配遠心: $10 \sim 40\%$ のショ糖密度勾配遠心法による分画分布の中心が $9 \sim 18 \text{ kbp}$ のDNA断片を回収
4. ベクターライゲーション: λ DASH IIの *Bam*HIアームにライゲーション
5. *in vitro* packaging
6. ライブラリーのamplification
7. 目的のPCR増幅断片よりプローブを作製
8. ハイブリダイゼーションによるクローンのスクリーニング

ゲノムDNAを *Sau3AI*で部分分解した時のアガロースゲル電気泳動図

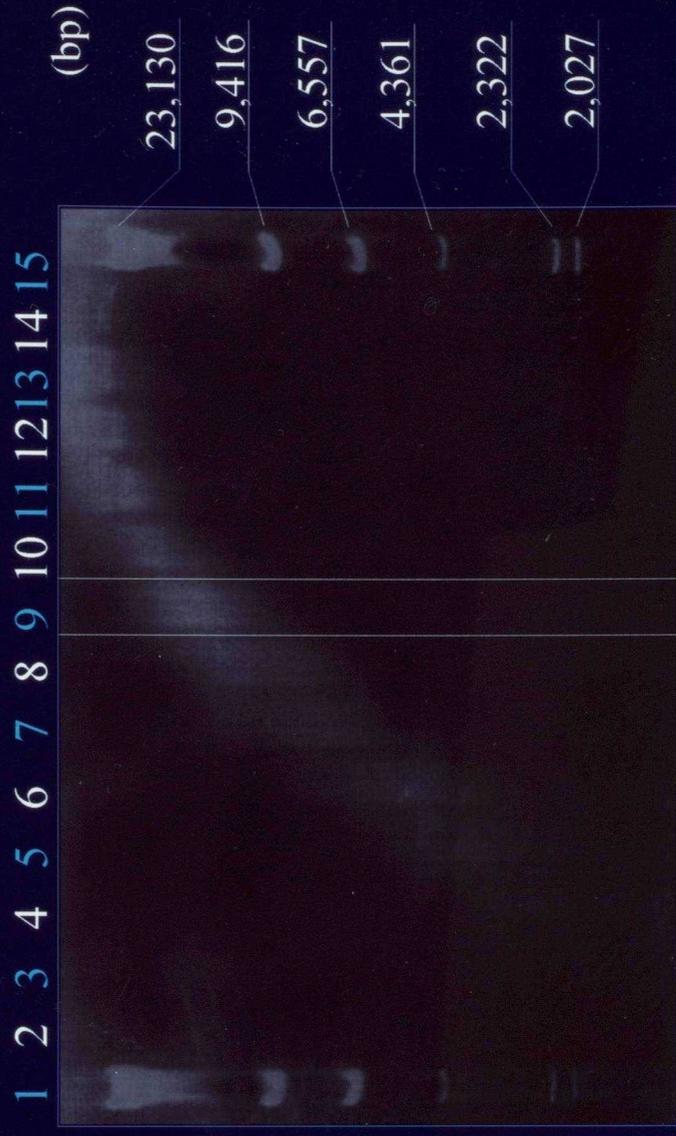


図17 ゲノムライブラリー作成の手順

PCR 条件

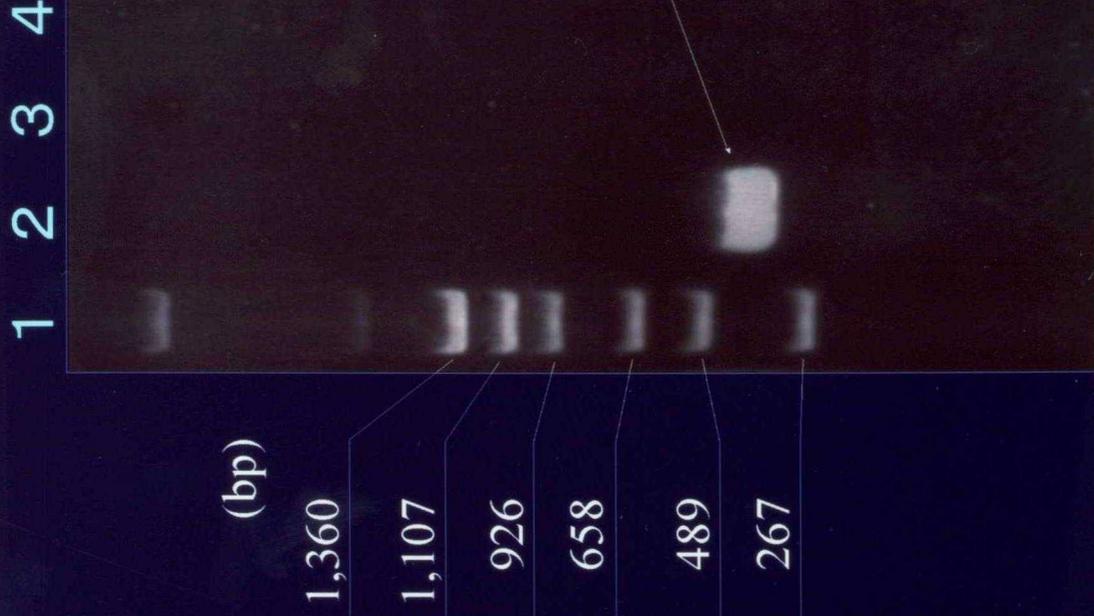
10 × Ex Taq buffer	5.0
2.5mM dNTPs	4.0
Forward primer (100 pmol)	1.0
Reverse primer (100 pmol)	1.0
cDNA ライブラリー	1.0
Ex Taq	0.2
H ₂ O	37.8
	50.0 (μl)

PCR Thermal Cycler 9600使用

94°C 1 min

94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 90 sec / 30 cycles

72°C 3 min



1. マーカー
2. プライマーとテンプレートを含む
3. テンプレートのみ
4. プライマーのみ

図18 PCR条件と複合プライマーを用いて得られたPCR増幅断片

ACGAGATGAA CGATCCCCAA CGATAACTAC CCGGTGGCCG ACGCAACGGG CTACTACAGT TACGAAAAGG 70
ACGTCCCGTT GGCTAAGCTA GAGGCTAAGT TCAAGGAGGT CTTCCACGAC CAAGCACTGG CCCTTGATAA 140
GCGGGTCGTC TACGTCCACG GGTACCAGG GGAATTAGAA TTGCCGGCGA CCGTGGCGGG TAAGCTTAAC 210
GACAAGTACG AACAAACAGT TACCTTACCG ATTGCCGCCG GIAAAAITGA ACGCCTAGAC TAGGGGCGTT 280

-35

GCGGGTTTAA GCAAAACATT TGAAAGCGGT TTTAAATTGT GTTACCITAT TTACGTAAAG GGAGGTTTAA 350

-10

RBS

TTCATGAAAT ACGAAAAGAC CAAGGAAGTA CTCAACCAAC TCGTTGCTGA CCTGAGCCAA CTGGTGATGG 420

Met

TGGTTCACCA AACCCACTGG TACATGCGCG GGGAAAACIT CTTGAAGCTC CACCCGCTGA TGGACGACTG 490
GATGGACGAT TTGAACGACC AACTAGACGA AATTTCCGAA CGGCTGATCG CCTTGTATGG TTCACCATAC 560
TCCACCCTTA AGGAAATGGC GGAACACACC AAGATTCCCG ACGAACCCAGG CAACTGGAAC AAGTCAACCGC 630
CCGAACGGTT CGAAGTGCTA GCCAAGGACT ACCGTTACTT AGCCGATCTC TACCAGCATG GGATCGAGAT 700
TAGTGACGAT GAAAAGGACT TCTCCACCCA GGACATCTTC ATTGGCTTCA AGACCCGGAC CGAAAAGCGG 770
CTTIGGATGA TCCAAGCGGA ACTGGGGAAG GCTCCGGAAC GGGACCTCTA AACACAGCGC ACAATCTAAG 840

*

CAACGCTCGC CAAGTGGTGG GCGTTGCTTA TTTTATAGAA GATTAAGTIT TGATGACGCC CGTTTTGATT 910
GAGTAGGGAG GCTTGCCCGG AAGCGTTAGT TCGTGCTAAA TTGGTGAGAG CAAAATTTTA GAAAACACGA 980
GGAAATTGCA CGTGATTACC ATTACTGACC TGAGCCTGAA CCTGTCAGGC CGGACCTTGT ACCGCGACGT 1050
TAACCTCAAG TTCACGCCCTG GTAACCTGCTA CGGGGTGATT GGGGCGAACG GGGCCGGCAA GTCCACCTTC 1120
TTAAAGCTGT TGGAAAGGAA GATGAGCCCG ACGACCGGGA CGATTTTCGAT TGGCCCTAAC GAACGGATGA 1190
CCTCCTTAAA CCAGGACCAC TTCGCCTTTG ACGACTGCAC GGTCATGGAC ACCGTGATTC AGGGCCACCGC 1260
CAAGCTGTAC CAAATCATGC AAGAAAAGA CGCC 1294

図19 クローン9のDNAシーケンス

<i>L. f.</i> :	MKYEKTKEVL	NQLVADLSQL	VMVVHQTHWY	MARGENFLKLH	PLMDDWMDDL	NDQLDEISER
<i>L. r.</i> :	MKYTKTKAVL	NQLVADLSQM	SMIHQTHWY	MARGPNFLKLH	PLMDEFMEEI	DSQLDVISER
<i>L. f.</i> :	LIALDGPYS	TLKEMAEHTK	IPDEPGNWNK	STPERFEVLA	KDYRYLADLY	QHGIEISDDE
<i>L. r.</i> :	LIALDGPYS	TLKEMAENTK	IQDWPGEWDK	TPPERLAHLV	DGYRYLEDLY	QHGIEVSDVE
<i>L. f.</i> :	KDFSTQDIFI	GFKTATEKRL	WMIQAELGKA	PERDL		
<i>L. r.</i> :	KDFSTQDIFI	GLKTAIEKKI	WMIQAELGSA	PEIDE		

図20 *L. fermentum* (*L.f.*)と*L. rhamnosus* (*L.r.*)由来の糖鎖受容体タンパク質構成アミノ酸の相同性

1. 糖鎖受容体タンパク質遺伝子のORFを含むプライマーの構築

F109 GCGAATTCGTCTCCACGACCAAGCACT

EcoRI

R1238 CGCTCGAGTGGCCCTGAATCACGGTGTC

Xho I

2. ゲノムライブラリーをテンプレートにPCR増幅し、得られたDNA断片を
乳酸菌用ベクターpIL 253の*EcoRI*と*Xho I*サイトにライゲーション

3. 構築したプラスミドを用いて*E. faecalis* TH10を形質転換

4. 糖鎖受容体タンパク質の抗体による検出

5. 得られた形質転換体のCaco-2細胞への付着性評価

図21 糖鎖受容体タンパク質遺伝子のプライマーとプラスミドの構築
および*E. faecalis* TH10形質転換体での発現

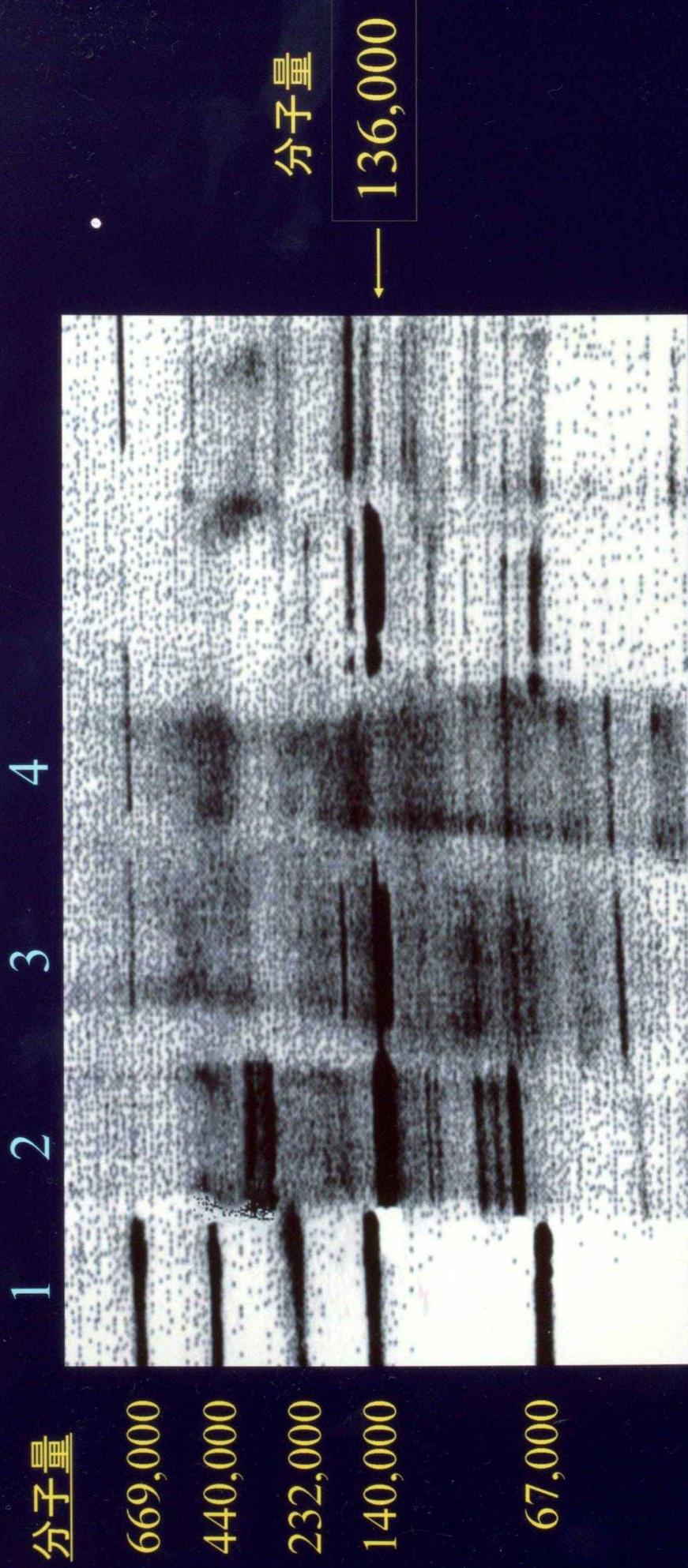


図22 ネイティブ ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のウエスタンブロットティング

レーン1: 分子量マーカー

菌体表層

レーン2: *L. fermentum* FAF-1

レーン3: p921EXを導入した*E. faecalis* TH10

レーン4: pIL 253を含有する*E. faecalis* TH10

菌体細胞内

レーン5: p921EXを含有する*E. faecalis* TH10

レーン6: pIL 253を含有する*E. faecalis* TH10