

氏名(本籍)	大平 猪一郎(長崎県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第385号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	<i>Enterococcus faecalis</i> TH10のプロバイオティクスとしての特性および 本菌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
論文審査委員	(主査) 金内 長司 (副査) 藤谷 英男 木内 明男 森田 英利

論文内容の要旨

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たきた。

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(pH3.5)、食塩耐性(10%)、胆汁酸耐性(6.1%)など *E. faecalis* としての一般的な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)培養液(pH4.0)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10mg/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 (pH7.0) において *E. coli* O157:H7ならびにMRS液体培地 (pH6.3) 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) を使い、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 (7mm) を入れ、 3.5×10^4 個/cm² のCaco-2細胞を接種し、37℃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 (菌数約 5×10^8 / ml) 1 ml を注加し、37℃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 2.5pmol 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 5×10^8 CFU/ml) 0.4ml 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ている。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 H-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 $10^7 \sim 10^8$ / 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'-CAYCARAC NCA 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、370bpの増幅断片を得た。このシークエ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9~23kb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370bpのDNAシークエンスをプローブに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の全シークエンスを決定した。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にに含まれるシークエンスよりフォワードプライマー(5'-GCGAA TTCGCTTCCACGACCAAGCACT-3')とリバースプライマー(5'-CGCTCGAGTGGCCCTGAATCACGG TGTC-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 μlの滅菌蒸留水に溶解し、*E. faecalis* TH10を受容菌としてジーンバルサー(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。

論文審査の結果の要旨

*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。

本研究に用いた*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「テンベ」

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性状としてフェニル乳酸の産生性を有すること、(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。

本研究の概要は以下の通りである。

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、本菌 (*E. faecalis* TH10) についても各種病原性細菌に対する抗菌性を指標に液体培養ろ液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 10mg/ディスクの濃度でメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA)、*Bacillus cereus* (食中毒菌)、*Escherichia coli* O157:H7、*Listeria monocytogenes* (リステリア症原因菌) に対して抗菌性を示すことが認められた。さらに、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーおよび光学分割によって分析した結果、抗菌性を示す物質は D-および L-フェニル乳酸と同定された。産生量 (MRS 液体培地) は D 体 13.4 μ M、L 体 6.7 μ M で、その量比は 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 (LB 液体培地, pH 7.0) で *E. coli* O157:H7 ならびに 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。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* により多量 (6mM) に産生され、*L. monocytogenes* など多くの汚染細菌に対する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、このフェニル乳酸はその抗菌性を通じて *E. faecalis* TH10 のプロバイオティクス乳酸菌としての整腸作用に関与している可能性が示唆された。

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

ヒト腸管付着性は、プロバイオティクス乳酸菌の重要な特性の1つと考えられている。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、リボタイコ酸、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。

乳酸菌についても、病原性細菌の場合と類似の付着機構が示されているが、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 細胞を薄膜ディスク (7mm) に培養し、洗浄した後、被験菌株の懸濁液 (菌体数約 5×10^8 / ml) 1ml と接触させ、37℃ 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 Caco-2 細胞 100 個当たりの付着菌数を顕微鏡下で計測した。その結果、これまでに強い付着性を示すことが知られている *L. rhamnosus* JCM1136 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、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、かなりの付着性を有することが認められた。

2) グラム染色法による ECM タンパク質への付着試験

ECM タンパク質 (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) 溶液 (2.5 pmol) および陰性対照としてウシ血清アルブミン (BSA) 溶液、それぞれを一定量をガラススライドの一定面積に塗布固定し、2% BSA を含むリン酸緩衝液でブロッキング (2 時間) の後、各被験菌の懸濁液 (菌体数約 5×10^8 / ml) 0.4ml を滴下し、2 時間感作した。リン酸緩衝液 (0.1% BSA 含有) 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。

被験菌 5 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、一般に染色操作中に細菌細胞および培養細胞が剥離脱落するという方法論的に難点がある。そこで、本研究ではこの難点を改善した RI ラベル法を試みた。

被験菌を ^3H -チミジンで RI ラベルし、1 菌体当たりの放射線量を算出した。1) 項と同様にウェル内で培養した Caco-2 細胞に、RI ラベルの被験菌懸濁液 (菌体数約 $10^7 \sim 10^8$ / ml) $400 \mu\text{l}$ を添加し、37℃ 1 時間接触させた後洗浄し、Caco-2 細胞を回収して、液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定し、付着細菌数を計測した。

被験菌 7 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 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、ヒト腸管への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性遺伝子の発現

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、感染症の予防ならびに治療効果を有すると考えられている。著者はこれまでにヒトの糞便から *E. coli* SH2 よりも 1.48 倍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。

著者は、*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 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、370bp 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 9~23kb の断片になるように *Sau* 3AI で限定分解し、 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 370bp 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'-GCGAATTCGCTCTCCACGACCAAGCACT-3') とリバースプライマー (5'-CGCTCGAGTGGCCCTGAATCACGGTGTC-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プラスミド p921EX のキュアリングによって、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 の腸管付着性遺伝子は *E. faecalis* TH10 で発現し、そ

の腸管付着性は親株の 1.65 倍に増強することが明らかにされた。

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性状を調べ、本菌株は *E. faecalis* の一般的性状とともに、新たにフェニル乳酸の産生性およびヒト腸管付着性を有していることを明らかにした。さらに、本菌に他の乳酸菌由来のヒト腸管付着性遺伝子を導入し、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。本研究、特に分子育種学的手法によるヒト腸管付着性遺伝子の導入と発現に関する成果は、プロバイオティクスの分野では初めての成功例であり、今後のこの分野における一つの新しい研究方向を示したものとして高く評価でき、また、獣医公衆衛生学あるいは家畜衛生学上の意義も大きく、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしい業績と判定した。