宮城大学食産業学部紀要　4(1)：45－50（2010）
J. Miyagi Univ. Sch. Food Agri. Environ. Sci.　4(1)：45－50（2010）

総　説

プロバイオティック乳酸菌の酵素活性を有する腸管付着因子とその腸管付着メカニズム

木下　英樹*

Adhesin Proteins of Probiotic Lactic Acid Bacteria Possessing Enzyme Activity and Its Adhesive Mechanisms

Hideki KINOSHITA*

Abstract

The original definition of probiotics is "live microbial feed supplements which beneficially affect the host animal by improving its intestinal microbial balance". Probiotics are associated with beneficial health effects and may be selected for prevention of diseases. One important criterion for a potentially probiotic strain is its ability to adhere to mucosal surfaces of the human gastrointestinal tract. Many reports show various cell surface proteins such as S-layer protein are adhesins that bind to human gastrointestinal mucosa, mucus, and extracellular matrix proteins. However, it was reported that the cytosolic enzymes such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and enolase were expressed on the cells surface of lactobacilli as adhesin recently. GAPDH acts as an important glycolysis enzyme in cytosol although it acts as an adhesin that bound to human colonic mucin (HCM), ABO blood type antigen, and extracellular matrix proteins on the cell surface. Some reports show that pathogens also possess a GAPDH on their cell surface and they have been identified as adhesins. Streptococcal surface GAPDH (SDH) from the group A *Streptococcus* show multiple binding activities to plasmin(ogen), fibronectin, lysozyme, myosin and actin. GAPDH has two sites that bind NAD^+ at the N-terminal and the C-terminal domains. In the binding inhibition test using NAD^+, we suggested the NAD binding domain of GAPDH might be related to binding to HCM. Jin *et al*. suggested that SDH of *Streptococcus pyogenes* bound to the N-terminal domain of uPAR/CD87 as its receptor on human pharyngeal cells, while uPAR more specifically bound to the C-terminal alpha-helix and two immediate flanking regions of the S-loop of the SDH molecule. It was reported that the elongation factor Tu and GroEL that were not the enzyme showed binding activities to intestinal cells and mucin. The feature in these proteins such as GAPDH and enolase is to have the enzyme activity. Now, we study to propose a new screening method using these enzyme activities. It could screen a high adhesive lactobacilli more easily and cheap using new method.

(Received November 13, 2009 ; Accepted January 26, 2010)

Keywords ：probiotics, adhesion, adhesin, enzyme activity
キーワード：プロバイオティクス、付着、付着因子（アドヘシン）、酵素活性

はじめに

プロバイオティクスは、アンチバイオティクス（抗生物質）の対義語として作られた用語であり，1989年，Fullerによって，「腸内菌叢のバランスを改善することにより宿主動物に有益に働く生菌添加物」と定義された[1)]。現在では，国連食糧農業機関（FAO）／世界保

＊　E-mail：kinoshih@myu.ac.jp

健機構（WHO）により，プロバイオティクスのガイドラインが作成され,「適正量を摂取することにより宿主の健康に有益な作用をもたらす生きた微生物」と再定義されている[2]。プロバイオティクスの条件として，①もともと宿主の常在微生物であること，②胃酸や胆汁酸などの消化管上部のバリアー中でも生存できること，③消化管下部で増殖可能なこと，④便性改善，腸管内細菌叢のバランス改善および腸管内腐敗物質の低下などの有効効果を発現すること，⑤抗菌性物質の産生や病原細菌の抑制作用を有していること，⑥食品でも医薬品としても安全性が高いこと，⑦摂取・飲用方法が容易であること，⑧生産する上で扱いやすく，価格・費用が安価であること，などが挙げられ，プロバイオティクスを利用する際には，その有効性を証明することが重要である[3]。以上のような条件を満たし得る代表的なプロバイオティクスとしては，乳酸桿菌（*Lactobacillus*属）およびビフィズス菌（*Bifidobacterium*属）が挙げられる（表１）。実際に現在，我国で市販されている機能性ヨーグルトには，ブルガリア菌（*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*）およびサーモフィルス菌（*Streptococcus thermophilus*）以外に，*Lb. acidophilus*グループ乳酸菌，*Lb. casei*，*Lb. rhamnosus*，*Lb. reuteri*，*B. longum*や*B. breve*などがプロバイオティクスとして添加され，その一部は「特定保健用食品」としての認可を得ている。

*Lactobacillus*属を含む乳酸菌は発酵乳や漬物などを通じて古くから利用されており，このような菌群の多くは，FDA（Food and Drug Administration：米国食品医薬品局）により，一般的に安全と認められた食品･食品添加物として,「GRAS（Generally Recognized As Safe）」[4,5]の認証を受けている。*Lactobacillus*属には，宿主に対して，整腸作用[6]，血中コレステロール低減作用[7]，免疫賦活化作用[8]および抗腫瘍作用[9]などの様々な生理的効果が報告されているが，これらの諸作用の多くは，プロバイオティック乳酸菌が腸管内に留まり増殖することで，初めて十分な生理的効果が期待できるものと考えられる。そのため，プロバイオティック乳酸菌を評価する上で「腸管付着能」は，きわめて重要なファクターの一つである。

乳酸菌は腸管内に留まるために，粘膜（粘液），細胞外マトリックス成分および細胞表面などに付着するための「アドヘシン（付着因子）」を菌体表層に有している。乳酸菌のアドヘシンに関する研究は，病原菌に比べ遅れているのが現状であるが，最近，徐々にその全貌が明らかになりつつある。乳酸菌の腸管付着因子として最もよく研究されているのは，S-layerタンパク質である。S-layerタンパク質は，アシドフィルスグループ乳酸菌などで多く見つかっており，分子量は40～60kDaで，単一分子種のタンパク質または糖タンパク質分子がタンパク質自身の物性により二次元結晶配列として会合した形を取っている[10]。その他にも数多くのアドヘシンが報告されており，上皮細胞，細胞外マトリックス成分，粘液層，糖鎖など様々な物質への付着性が報告されている[11,12]。S-layerタンパク質のようなタンパク質は，明確に菌体表層タンパク質としてデザインされ，菌体保護や付着因子として機能している。しかしながら，近年，菌体内酵素としてデザインされたタンパク質が菌体表層にも発現し，それが付着因子として働いていることが分かってきた。

本稿では，最近徐々に明らかになってきた菌体内酵素群の菌体表層でのアドヘシンとしての役割について概説する。

酵素活性を持つアドヘシン

酵素活性を持つアドヘシンは，元来，菌体内で生命維持のために働いている生物にとって必要不可欠な酵素である。上記のとおり，この菌体内酵素群が乳酸菌の菌体表層に発現し，アドヘシンとして作用していることが明らかになってきた。

最近，フィンランドの研究グループにより，様々な乳酸菌の菌体表層にグリセルアルデヒド-3- リン酸脱水素酵素（GAPDH）やエノラーゼなどが存在しており，プラスミノーゲンおよびプラスミンに付着性を示

表１　代表的なプロバイオティクス

属	種	株
Lactobacillus	*acidophilus*	SBT-2062，L92，NCFM
	gasseri	OLL2716 (LG21)
	casei	Shirota
	fermentum	KLD, RC-14
	johnsonii	La1
	paracasei	KW3110, CRL431, F19
	plantarum	299v
	reuteri	DS2112
	rhamnosus	GG, 271, LB21
	salivarius	UCC118
Bifidobacterium	*breve*	Yakult
	longum	BB536，SBT2928
	lactis	Bb12, HNO19(DR10)

すことが報告された。また，これらの酵素は，組織型プラスミノーゲン活性化因子（tPA）を活性化することで血栓溶解に関与していることが分かった。これらの酵素は，代謝により排出される乳酸により低pHとなる外部環境で正電荷を持ち，菌体表層に存在するリポテイコ酸のリン酸基などの負電荷物質とイオン結合することにより菌体表層に留まっていると考えられている。また，2008年９月に行われた第９回国際乳酸菌シンポジウム（LAB９）では，同研究グループによりGAPDHやエノラーゼのみならず，グルタミンシンテターゼ（GS）および，グルコース−6−リン酸イソメラーゼ（GPI）などの菌体内で働く酵素が菌体表層に発現しており，pH依存的に細胞外マトリックスの構成タンパク質であるラミニン，フィブロネクチンおよびコラーゲンに結合性を示すことが報告された。

また，同時期に筆者らの研究において，ヒト腸管組織から直接単離した高腸管付着性乳酸菌*Lb. plantarum* LA318株（図１）の菌体表層にGAPDHが高発現していることが明らかとなった。GAPDHは，菌体内でグリセルアルデヒド−3−リン酸に作用し，1, 3−ビスホスホグリセリン酸に変換する解糖系の酵素であるが，菌体表層では，ヒト大腸ムチンやその糖鎖末端に発現しているABO式血液型抗原，特にA抗原｛GalNAc α 1-3（Fuc α 1-2）Gal-｝およびB抗原｛Gal α 1-3（Fuc α 1-2）Gal-｝へ高い結合性を示すアドヘシンとして作用していることが明らかになった[15,16]。また，単糖には結合せず，特徴的な血液型三糖構造が重要であることが示され，GAPDHは，N−アセチルガラクトサミン（GalNAc）およびガラクトース（Gal）を認識するレクチン様タンパク質としての特徴を備えていると考えられた。また，世界で最もよく研究されている乳酸菌の一つである*Lb. rhamnosus* GG（通称LGG）の菌体表層にもGAPDHの他にホスホグリセレートキナーゼが発現しており，付着因子としての働きが推測された[17]。このように様々な菌体表層に菌体内酵素群の発現が明らかになってきており（表２），今後さらに増えてくるものと考えられる。

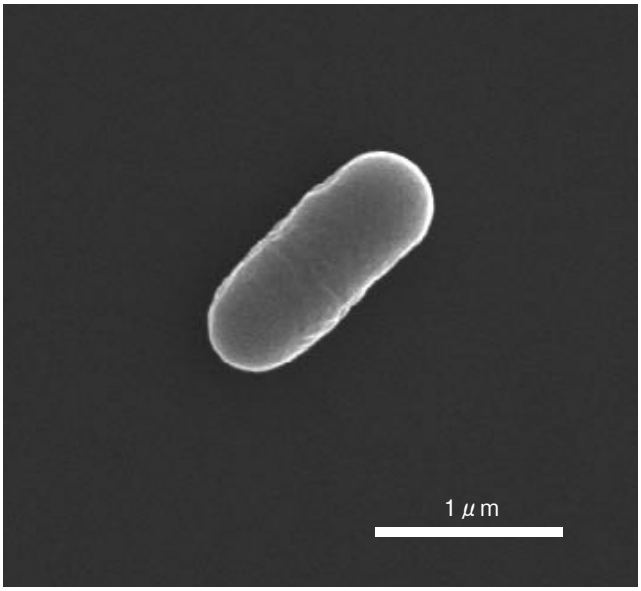

図１．ヒト腸管付着性が高い*Lactobacillus plantarum* LA318の電子顕微鏡写真.

病原菌における表層GAPDH発現

表層GAPDHは，口内病原細菌で多く発見されている。Group A *Streptococcus*（GAS）の表層GAPDHは，SDH（Streptococcal surface dehydrogenase）と呼ばれ，プラスミン（プラスミノーゲン）[18,19]，フィブロネクチン，リゾチーム，ミオシンおよびアクチン[20]へのマルチバインディング特性を示す。また，SDHは，ヒト咽頭細胞のレセプターであるuPAR（urokinase plasminogen activator receptor）／CD87を認識し，宿主細胞への付着を媒介している[21]。Seifertらは，細胞骨格タンパク質および細胞外マトリックスタンパク質へgroup B *Streptococcus*（GBS）が付着することを報告した[22]。*Candida albicans*でも表層GAPDHの発現が報告され，フィブロネクチンおよびラミニンへの結合性が示された[23]。また，*Staphylococcus aureus*および*Staph. epidermidis*の表層GAPDHは，トランスフェリンに結合することが明らかとなっている[24]。さらに，歯周病細菌である*Porphyromonas gingivalis*の繊毛は，*Strep. oralis*のGAPDHと共同凝集を起こし，ヒト口腔上皮細胞へ付着すると報告されている[25,26]。また，グラム陰性細菌である*Escherichia coli*（大腸菌）においても表層GAPDHが確認されており，プラスミノーゲンとフィブリノーゲンおよびCaco-2細胞への付着が報告されている[27]。

GAPDHのリガンド結合部位

上記のように，GAPDHはマルチバインディング特性を示すが，その結合部位は，ほとんど明らかになっていない。GAPDHには，N− 末端側にNAD結合ドメインが，C− 末端側にC− 末端ドメインが存在する（図２）。筆者らは，NAD^+による付着阻害試験の結果，NAD^+によりGAPDHのヒト大腸ムチンへの結合性が有意に

表２　アドヘシンとして働く菌体表層酵素とその結合分子

菌種またはグループ	アドヘシン	結合分子またはレセプター
Lactobacillus crispatus ST1	GAPDH, エノラーゼ, GS, GPI	フィブロネクチン, ラミニン, コラーゲン, プラスミノーゲン
Lactobacillus plantarum LA 318	GAPDH	ヒト大腸ムチン，血液型抗原（A型およびB型）
Group A Streptococcus	GAPDH	プラスミン（プラスミノーゲン）, フィブロネクチン, リゾチーム，ミオシン, アクチン, ヒト咽頭細胞のレセプター（uPAR/CD87）
Group B Streptococcus	GAPDH	細胞骨格タンパク質，細胞外マトリックスタンパク質
Streptococcus oralis ATCC 9811	GAPDH	*Porphyromonas gingivalis*の繊毛（FimA）
Candida albicans ATCC 26555	GAPDH	フィブロネクチン，ラミニン
Staphylococcus aureus BB, *Staph. epidermidis* 138	GAPDH	トランスフェリン
Escherichia coli　86-24h11, E2348/69	GAPDH	プラスミノーゲン，フィブリノーゲン，Caco-2細胞

GAPDH:グリセルアルデヒド-3- リン酸脱水素酵素，GS：グルタミンシンテターゼ，GPI：グルコース-6- リン酸イソメラーゼ

減少することを明かとした。本結果より, NAD結合ドメインがヒト大腸ムチンへの付着に関与する可能性が示唆された[16]。また，Jinらによる研究では，SDHを持つ*Strep. pyogenes* ATCC 700294において，SDHが，ヒト咽頭細胞に発現しているuPAR／CD87のN－末端ドメインに結合し，その結合にSDHのC－末端のαヘリックスとS- ループの２つのフランキング（隣接）領域が関与することが明らかになっている[21]。

GAPDHのマルチバインディング特性を考えるとNAD結合ドメインとC－末端ドメインがそれぞれ違うものを認識していることは十分に考えられる。しかしながら，正確なGAPDHの結合部位の解明には，X線構造解析など更なる研究が必要となるだろう。

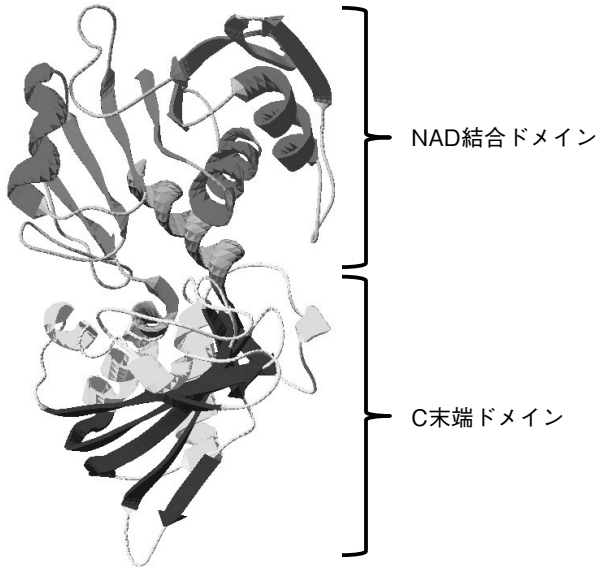

図２．SWISS-MODELによる*Lactobacillus plantarum* LA 318のGAPDH立体構造モデル.

酵素活性を持たない細胞内由来アドヘシン

GAPDHやエノラーゼなどは，酵素活性を持つ細胞内由来のアドヘシンであるが，酵素以外でも細胞内由来アドヘシンはいくつか報告されている。*Lb. johnsonii* NCC 533（以下，La１）では，EF-Tu（Elongation Factor Tu）と呼ばれる翻訳伸長因子が，ヒト腸管セルラインやムチンへの細胞付着を仲介していることが知られている[16]。EF-Tuは，細胞質で働くタンパク質の翻訳に関わるタンパク質であるが，タンデム質量分析法により，細胞表層に完全な分子として発現していることが明確に示された。また，La１では，熱ショックタンパク質であるGroELも菌体表層に発現している[17]。GroELはタンパク質のフォールディングに関連している細胞質タンパク質であるが，ムチンや上皮細胞に対してpH依存的な結合性を示すことが報告された。さらにGroELは，*Helicobacter pylori*（ピロリ菌）を凝集させる性質があることが分かっている。

おわりに

原核生物である乳酸菌は, 少ない遺伝子情報の中で, 環境に適応するために工夫して, 菌体内酵素を転用し, 菌体表層で付着因子として働かせている可能性が考えられる。GAPDHやエノラーゼを中心とした菌体表層酵素群に関する研究は，始まったばかりであり，その全容は明らかになっていない。アドヘシンとして働いている未発見の菌体表層酵素群は，まだまだたくさんあり，その有効利用が可能と考えられる。

筆者らは，現在，菌体表層酵素群の網羅解析と「酵素活性」という特徴を利用したプロバイオティック乳酸菌の新規スクリーニング法の確立を目指して研究を行っている。この新しいスクリーニング法により，時

間とコストが必要である「腸管付着性試験」を行うことなく，酵素活性測定だけで，高い腸管付着性を持った有用乳酸菌がスクリーニング可能になると考えている。簡便かつ安いコストで高腸管付着性乳酸菌を選抜できれば，容易に商品に付加価値を付けることも可能となるだろう。また，高腸管付着性乳酸菌は，ヨーグルトなどの機能性発酵乳として食品業界へ，抗生物質代替物として畜産業界へ，整腸剤として医薬品業界へと，幅広い応用が期待される。

引用文献

1．Fuller, R., Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, **66**, 365-378（1989）.

2．Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, L., Ontario, Canada.（2002）.

3．田中隆一郎．腸内細菌の応用－プロバイオティクス．腸内細菌学，光岡知足（編），426－439（1990）.

4．Stiles, M.E., and Holzapfel, W.H., Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*, **36**, 1-29（1997）.

5．Feord, J., Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 353-360（2002）.

6．Collins, E.B., and Aramaki, K., Production of Hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, **63**, 353-357（1980）.

7．Danielson, A.D., Peo, E.R., Jr., Shahani, K.M., Lewis, A.J., Whalen, P.J., and Amer, M.A., Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J Anim Sci*, **67**, 966-974 （1989）.

8．Perdigón, G., Maldonado Galdeano, C., Valdez, J.C., and Medici, M., Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr*, **56 Suppl 4**, S21-26（2002）.

9．Lim, B.K., Mahendran, R., Lee, Y.K., and Bay, B.H., Chemopreventive effect óof *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse. *Jpn J Cancer Res*, **93**, 36-41 （2002）.

10．内田金治．Ⅱ乳酸菌の構造と菌体成分．乳酸菌の科学と技術，乳酸菌研究集談会編，学会出版センター，pp. 59－88（1996）.

11．木下英樹, 渡辺真通, 齋藤忠夫．プロバイオティック乳酸菌の血液型抗原を介したヒト腸管付着性機構．日本乳酸菌学会誌，19，78－88（2008）.

12．木下英樹，齋藤忠夫．乳酸菌の腸管付着性機構とヒト腸管定住性の獲得．日本乳酸菌学会誌，**17**，3－11（2006）.

13．Antikainen, J., Kuparinen, V., Lähteenmäki, K., and Korhonen, T.K., pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. *J Bacteriol*, **189**, 4539-4543（2007）.

14．Hurmalainen, V., Edelman, S., Antikainen, J., Baumann, M., Lähteenmäki, K., and Korhonen, T.K., Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. *Microbiology*, **153**, 1112-1122 （2007）.

15．Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kawasaki, T., Wakahara, N., Matsuo, H., Watanabe, M., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A., and Saito, T., Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J Appl* Microbiol, **104**, 1667－1674（2008）.

16．Kinoshita, H., Wakahara, N., Watanabe, M., Kawasaki, T., Matsuo, H., Kawai, Y., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A., and Saito, T., Cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Lactobacillus plantarum* LA 318 recognizes human A and B blood group antigens. *Res Microbiol*, **159**, 685－691（2008）.

17．Sánchez, B., Schmitter, J.M., and Urdaci, M.C., Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG grown in de Mann-Rogosa-Sharpe broth. *Lett Appl Microbiol*, **48**, 618－622（2009）.

18．D'Costa, S.S., Romer, T.G., and Boyle, M.D., Analysis of expression of a cytosolic enzyme on the surface of *Streptococcus pyogenes*. *Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 826－832（2000）.

19．Winram, S.B., and Lottenberg, R., The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology*, **142（Pt 8）**, 2311－

2320 (1996).

20. Pancholi, V., and Fischetti, V.A., A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med*, **176**, 415－426 (1992).
21. Jin, H., Song, Y.P., Boel, G., Kochar, J., and Pancholi, V., Group A streptococcal surface GAPDH, SDH, recognizes uPAR/CD87 as its receptor on the human pharyngeal cell and mediates bacterial adherence to host cells. *J Mol Biol*, **350**, 27－41 (2005).
22. Seifert, K.N., McArthur, W.P., Bleiweis, A.S., and Brady, L. J., Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. *Can J Microbiol*, **49**, 350－356 (2003).
23. Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorín, I., Renau-Piqueras, J., Martínez, J.P., and Gil, M.L., The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun*, **66**, 2052－2059 (1998).
24. Modun, B., and Williams, P., The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun*, 67, 1086－1092 (1999).
25. Maeda, K., Nagata, H., Yamamoto, Y., Tanaka, M., Tanaka, J., Minamino, N., and Shizukuishi, S., Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun*, **72**, 1341－1348 (2004).
26. Sojar, H.T., and Genco, R.J., Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of epithelial cells as a second molecule that binds to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **45**, 25－30 (2005).
27. Egea, L., Aguilera, L., Gimenez, R., Sorolla, M.A., Aguilar, J., Badia, J., and Baldoma, L., Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 1190－1203 (2007).