

乳酸菌の宿主定着性に寄与する
細胞表層タンパク質に関する研究

西山 啓太

平成 26 年度

**Studies on the cell surface proteins which contribute
to host colonization of lactic acid bacteria**

Keita Nishiyama

2014

目次

項

第一章

序 論	10
-----	----

第二章

硫酸化糖鎖結合タンパク質の同定とその結合特性の解析

第一節 ムチンの精製と糖鎖の解析

I 緒言	21
II 材料および方法	22
1. ブタ消化管からのムチンの分離と精製	
2. シアリダーゼあるいはスルファターゼによるムチンの酵素的処理	
3. レクチンを用いた ELLA	
4. 抗ムチンモノクローナル抗体を用いた ELISA	
5. ブタ胃由来ムチン (PGM) からオリゴ糖の精製	
III 実験成績	26
1. ムチンの精製と性状の評価	
2. ブタ大腸ムチン (PCM) に含まれるムチン糖鎖の検出	
3. PGM からのムチンオリゴ糖の精製	
IV 考察	28

第二節 硫酸化糖鎖結合タンパク質の同定と結合特性の評価

I 緒言	30
II 材料および方法	30

1 . 供試菌株および培養条件	
2 . 塩化ルビジウム法による <i>E. coli</i> のコンピテントセルの作製	
3 . P47 のアミノ酸シーケンス解析	
4 . P47 のクローニングと塩基配列の決定	
5 . 組み換え EF-Tu タンパク質の発現と精製	
6 . Surface Plasmon Resonance (SPR) による EF-Tu の結合試験	
7 . ELISA による EF-Tu の結合試験	
8 . 競合 ELISA による EF-Tu の結合試験	
9 . 組織化学的評価	
10 . 統計処理	
III 実験成績	37
1 . P47 の同 P47 の配列解析と同定	
2 . EF-Tu の硫酸化糖脂質への結合性の評価	
3 . EF-Tu の PGM への結合性の評価	
4 . 組織化学的手法による EF-Tu の結合性の評価	
IV 考察	40
第三節 <i>L. reuteri</i> における EF-Tu の付着因子としての評価	
I 緒言	43
II 材料および方法	44
1 . 供試菌株および培養条件	
2 . <i>L. reuteri</i> の細胞表層タンパク質の分画	
3 . ウエスタンブロット	
4 . <i>L. reuteri</i> の PGM への付着性の評価	
5 . 統計処理	

III	実験成績	46
1.	<i>L. reuteri</i> JCM1081 における EF-Tu の局在	
2.	他の <i>L. reuteri</i> における EF-Tu の局在	
3.	<i>L. reuteri</i> JCM1081 の EF-Tu を介した PGM への付着性の評価	
IV	考察	47
第四節 スルホムチン付着性を示す <i>Bifidobacterium</i> の探索		
I	緒言	50
II	材料および方法	51
1.	供試菌株および培養条件	
2.	96 穴プレートを用いた <i>Bifidobacterium</i> の PCM への付着性の評価	
3.	Biacore を用いた <i>Bifidobacterium</i> の PCM への付着性の評価	
4.	<i>Bifidobacterium</i> の細胞表層タンパク質の分画	
5.	ウエスタンブロット	
6.	統計処理	
III	実験成績	53
1.	<i>Bifidobacterium</i> の PCM に対する付着性の評価	
2.	<i>Bifidobacterium</i> のスルホムチンとシアロムチンに対する付着性の評価	
3.	<i>Bifidobacterium</i> における EF-Tu の発現と局在	
IV	考察	55

第三章

EF-Tu の分泌機構の解明

第一節 EF-Tu の分泌経路の探索

I	緒言	58
II	材料および方法	59
	1. 供試菌株および培養条件	
	2. 組み換え Enolase タンパク質の発現と精製	
	3. <i>Lactococcus lactis</i> IL1403 のコンピテントセルの作製	
	4. <i>Lac. lactis</i> IL1403 の形質転換	
	5. <i>L. reuteri</i> のコンピテントセルの作製	
	6. <i>L. reuteri</i> の形質転換	
	7. <i>L. reuteri secY</i> 変異株の作製	
	8. <i>L. reuteri</i> への <i>secA</i> の導入と発現	
	9. <i>L. reuteri</i> の生育試験	
	10. <i>L. reuteri</i> のタンパク質の分画	
	11. <i>L. reuteri</i> の膜小胞および膜画分の分画	
	12. ウェスタンブロット	
	13. 配列の解析	
III	実験成績	67
	1. <i>L. reuteri</i> JCM1081 由来 EF-Tu の N 末端配列解析	
	2. His ₆ -Enolase の発現と精製	
	3. 種々の阻害剤が <i>L. reuteri</i> JCM1081 の EF-Tu の分泌に及ぼす影響	
	4. 膜小胞を介した EF-Tu の分泌の評価	
	5. <i>L. reuteri</i> JCM1081 の <i>secY</i> 変異株の作製とタンパク質の分泌の評価	
	6. <i>L. reuteri</i> JCM1081 の <i>secA</i> 導入株における EF-Tu の分泌の評価	
IV	考察	70

第二節 EF-Tu の分泌シグナルの探索

I	緒言	74
II	材料および方法	75
	1. 供試菌株および培養条件	
	2. FLAG タグ付加 EF-Tu (EF-Tu ^{FLAG}) の作製	
	3. 欠損変異 EF-Tu ^{FLAG} の作製	
	4. <i>E. coli</i> JM109 のタンパク質の分画	
	5. 組み換え SecA および C 末端欠損 EF-Tu タンパク質の発現と精製	
	6. His ₆ -SecA の ATPase 活性の測定	
	7. プルダウンアッセイ	
	8. ウェスタンブロット	
	9. 3 次構造予測	
III	実験成績	83
	1. EF-Tu の N 末端または C 末端の欠損が分泌に及ぼす影響	
	2. EF-Tu の疎水性アミノ酸の置換が分泌に及ぼす影響	
	3. EF-Tu が SecA の ATPase 活性に及ぼす影響	
	4. SecA と EF-Tu の相互作用の評価	
	5. EF-Tu のリン酸化修飾の解析	
IV	考察	87

第四章

総括	92
文献	98

謝 辞	111
付 図	112
付 表	157

第一章

序論

ヒトをはじめとする哺乳類の消化管には、 10^{14} 個もの細菌が棲息しており、約1,000種あるいはそれ以上の細菌種が宿主と相互作用しつつ増殖し、多様な腸内フローラを形成している。とりわけ、嫌気性細菌にとって極めて効率のよい生育環境であり、盲腸では1gあたり 10^{11} 個オーダーの嫌気性細菌が常在している⁽¹⁾。また、これらの細菌により様々な代謝産物が産生され、宿主は細菌の代謝産物をしばしば刺激因子として感知することから、腸内フローラの挙動は宿主の健康状態に大きく影響を及ぼすことが知られている⁽²⁾。近年、細菌の全ゲノム解析や腸内フローラのメタゲノム解析といった網羅的遺伝子解析技術により、ヒトという複雑な生態系において宿主と細菌間の共生関係の構築が明らかになり、特に、炎症性腸疾患⁽³⁾、肥満⁽⁴⁾⁽⁵⁾、糖尿病⁽⁶⁾、がん⁽⁷⁾、自閉症⁽⁸⁾など、ヒトのさまざまな疾患における発症の感受性と、腸内フローラの構成異常が密接に結びついていることが実験モデル動物を用いた実験により検証されている。

食経験のある発酵食品や腸管に由来する細菌の中で、積極的に摂取することで直接的または間接的に腸内フローラを改善し、とくにヒトや動物に対して健康維持効果が期待されるものは、プロバイオティクスと呼ばれる。なかでも、*Lactobacillus*属乳酸菌や、ヒトの腸内フローラにおいて最優勢菌種のひとつである*Bifidobacterium*のもつ機能性は、多くの研究者により明らかにされており、整腸作用、免疫の活性化、感染予防、アレルギー予防など多岐にわたる効果が明らかにされている⁽⁹⁾⁻⁽¹³⁾。また近年、マウスへのビフィズス菌の投与がポリアミン産生を促すことで老化予防に寄与することなども報告されており⁽¹⁴⁾、乳酸菌やビフィズス菌の利用的価値は、民間伝承的な健康維持効果にとどまらず、病気を未然に防ぐ「予防医学」への応用が期待されている。

乳酸菌やビフィズス菌が宿主に対して先に述べたような有益な効果を発揮するためには、まず消化管に定着することが重要な要因の一つであるが、その為には消化管での増殖性と受容体に対する付着性が重要な過程であると考えられる⁽¹⁵⁾。病原細菌の場合、消化管上皮細胞に付着すると、多くの場合、下痢や嘔吐などの症状を引き起こすことから、その感染機序が詳細に調べられてきた。しかしながら、乳酸菌やビフィズス菌の付着機構に関する研究は、遅れている状況にある。それは、乳酸菌やビフィズス菌は基本的に共生細菌であり、経験的に安全性が知られているため、病原菌とは異なり付着機構を解明する必要性が低かったことに起因すると考えられる。しかし、乳酸菌やビフィズス菌のもつ、様々なプロバイオティクス効果を適切かつ効率的に発揮させる為にも付着機構の解明は大変重要であるとの認識は広まっている。また、プロバイオティクスとして、その多くが経口的に摂取され消化管で定着することが求められるという他の細菌とは異なる、特殊な環境におかれるものが多い。したがって、いかにしてこれらの細菌は宿主に定着し共生することが出来るのか、大変興味深い研究対象である。

乳酸菌やビフィズス菌の主な棲息域である十二指腸から大腸の腸粘膜は、ムチンと呼ばれる粘性の糖タンパク質で覆われており、これらを消化管での定着の足掛かりとしていると考えられてきた⁽¹⁶⁾。ムチンは、膜結合型ムチンと分泌型ムチンを主成分とする表層ムチン層と、上皮細胞の表面に発現する膜結合ムチンを含む糖タンパク質および糖脂質を主成分とするグリコカリックスに大別される⁽¹⁷⁾。表層ムチン層は、さらに上皮細胞に接した薄く高密度の粘液層 (Inner layer) とその上の厚く低密度の粘液ゲル層 (Outer mucus layer) の二層構造から形成される。ヒトの小腸から大腸における粘液ゲル層の厚さは 50~800 μm であり、結腸で最も

厚くなる。さらに、全細菌に特異的な 16S rDNA プローブを用いた Fluorescent in situ hybridization (FISH) 解析により、粘液ゲル層は腸内細菌の主要な定着の場であることが明らかにされている⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾。また、ムチンの分泌は極めて流動的であり、小腸では 3～5 時間の間隔で杯細胞から分泌が繰り返される⁽¹⁹⁾。

ムチンのコアタンパク質は *muc* 遺伝子にコードされ、現在ヒトで 21 種類の遺伝子型が見いだされており、いくつかの *muc* 遺伝子のホモログは他の動物種にも存在する⁽²⁰⁾。ムチンは、コアタンパク質部分のセリンあるいはスレオニンの水酸基と *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が *O*-グリコシド結合したムチン型糖鎖構造をとる。糖転移は、細胞内のゴルジ装置を移動する過程で起こり、GalNAc に続いて、ガラクトース (Gal), *N*-アセチルグルコサミン (GluNAc), フコース (Fuc) が付加される。すなわち、GalNAc α 1-3Gal β 1-3[Fuc α 1-2]-GlcNAc β 1-3Gal β 1-4 GlcNAc β 1-3[NeuAc α 2-6]-GalNAc---Thr/Ser を基本構造とする。さらに、モノマー同士は、N 末端のシステイン残基のジスルフィド結合により分子量 200 万以上からなる巨大なポリマー体となる⁽¹⁹⁾。

ムチンを化学的に分類すると、非還元末端がシアル酸や硫酸基で修飾され負の電荷を有する酸性ムチンとそれ以外の中性ムチンに大別できる。とくに硫酸基が修飾されたスルホムチンは、強い負の電荷を有するため、ムチンの性質に大きな影響を及ぼす⁽²¹⁾。また、硫酸基は、細菌の糖質分解酵素からムチン糖鎖を保護する役割に加え、*Escherichia coli*⁽²²⁾, *Helicobacter pylori*⁽²³⁾⁻⁽²⁷⁾, *Pseudomonas aeruginosa*⁽²⁸⁾をはじめとする病原細菌の消化管内での受容体としても報告されている。さらに、スルホムチンは、宿主の年齢やガンなどの疾患により存在比が大きく変化することが知られており、疾病のマーカーとしても注目されている⁽²¹⁾。これら

の酸性ムチンに加え，ヒトの ABO 式血液型物質もムチン糖鎖の非還元末端に発現しており，これらが多様な糖鎖構造を生み出している⁽²⁹⁾。

これまでムチンやムチン糖鎖類似の構造をもつ糖脂質に対して，付着性を示すいくつかの乳酸菌やビフィズス菌とその付着機構が研究されてきた。1990年代はじめに，乳酸菌の赤血球凝集性や粘液分泌細胞 HT29-MTX に対する付着性がプロテアーゼ処理により低下する菌株が存在することが報告された⁽³⁰⁾⁻⁽³²⁾。これらは，乳酸菌にも菌体外の架橋タンパク質を介して宿主の細胞表面に存在する複合糖質糖鎖に結合するプロセスが存在することを示唆した最初の報告である。その後，薄層クロマトグラフィーを用いて糖脂質の糖鎖と乳酸菌の相互作用が報告された。*Lactobacillus casei* IFO3425 は非還元末端がガラクトシル基またはグルコシル基の複合糖脂質へ結合することが示された⁽³³⁾。さらに *Bifidobacterium bifidum* EB102 と *Bifidobacatreium longum* SBT2928 は，非還元末端がガラクトシル基である中性の糖鎖に結合し，とくに asialo-GM1 に強く結合することが示された⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾。また，本株の分子量約 10 万の細胞表層タンパク質が糖脂質との相互作用に関与することが示唆されている⁽³⁴⁾。また，これらは，シアル酸を含む酸性糖鎖には結合しないことから，静電的作用ではなく乳酸菌やビフィズス菌の糖鎖との特異な相互作用の存在を示し，レクチン様タンパク質（付着因子）を介した乳酸菌の糖鎖への付着機構が提案されるとともに⁽³¹⁾，次に示すような糖鎖を介したムチンとの相互作用の研究につながった。

ムチン型糖鎖の非還元末端に存在する ABO 血液型抗原の糖鎖プローブを用いて，これらに付着性を示すいくつかの *Lactobacillus* が血液型認識性乳酸菌として見いだされ，ABO 血液型抗原を介したムチン糖鎖への付着機構が提案された⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾。さらに，ヒト結腸ムチンに対するノイラミニ

ダーゼやスルファターゼによる酵素的処理，また塩化バリウムの添加により硫酸バリウムを形成することで付着性が低下する *Lactobacillus gasseri* や *B. bifidum* が見出されており，酸性ムチン糖鎖のシアル酸や硫酸基が乳酸菌やビフィズス菌のムチンへの付着に寄与する可能性が示されている⁽³⁸⁾。このように，複雑な糖鎖構造が含まれるムチンに対しても，レクチン様タンパク質（付着因子）による糖鎖を介した特異性のある乳酸菌やビフィズス菌の相互作用が徐々に明らかにされてきた。

乳酸菌やビフィズス菌の細胞表層は，図 1 に示したように厚いペプチドグリカン層とテイコ酸，リポテイコ酸などの多糖類に加え，様々な細胞表層タンパク質から構成される⁽³⁹⁾。これらの一部がレクチン様の性質をもち，宿主の受容体に対する付着因子として機能することが示されてきた。現在報告されている乳酸菌とビフィズス菌のムチンあるいはムチン糖鎖に対する主なタンパク質様の付着因子を表 1 と表 2 に記載した。乳酸菌では，幾つかの付着因子の詳細な解析が進んでいるが，ビフィズス菌では，遺伝子ツールの開発が遅れていることなどから報告例は少ない。これらのタンパク質の多くは，グラム陽性細菌における主要なタンパク質の輸送経路である Sec 経路および TAT 経路（Ⅱ型分泌経路）により細胞外へと分泌される。Ⅱ型分泌経路により細胞外に分泌されるタンパク質の N 末端には，数十アミノ酸残基からなる分泌シグナル配列が高度に保存されており，シグナル配列依存的に分泌される⁽⁴⁰⁾。Sec 経路依存性のシグナル配列は塩基性領域—疎水性のコア領域と極性領域を含む 15~30 アミノ酸残基から構成される⁽⁴¹⁾。一方，Tat 依存性のシグナル配列は，Sec 依存性のシグナル配列より長い 20~60 アミノ酸残基からなり，高度に保存された 2 つのアルギニン残基を含むツインアルギニンモチーフの存在によって，Sec シグナル配列と区別されている⁽⁴²⁾。このような

分泌経路により細胞外へと分泌されたタンパク質は、細胞壁や細胞膜に共有あるいは非共有結合により固定化されることで細胞表層タンパク質として局在する。そこで、付着因子は、局在様式により幾つかのグループに分類することが出来る。

線毛⁽¹²⁾⁽⁴³⁾⁻⁽⁴⁷⁾や Mucus-binding (Mub)⁽⁴⁸⁾⁻⁽⁵²⁾に代表されるタンパク質は、CWAP (Cell wall anchored protein) と呼ばれ⁽⁵³⁾、ソルターゼの作用により C 末端の LPXTG モチーフが切断されペプチドグリカンとの間で共通結合が形成することで細胞壁に固定される。さらに、Mucus-binding factor (MBF)⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾、Cell and mucus-binding protein A (CmbA)⁽⁵⁶⁾、Lar_0958⁽⁵⁷⁾などの付着因子が見いだされており、これらはソルターゼ依存性の CWAP に分類される。また、リポタンパク質である BopA は⁽⁵⁸⁾⁻⁽⁶⁰⁾、リポボックスモチーフ (LXXC) を介して、細胞膜に共有結合により固定される。

一方、mucus adhesion-promoting protein (MapA)⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾、32-kDa mucus-and mucin-binding protein (32-Mmubp)⁽⁶³⁾、29-kDa protein (Lam29)⁽⁶⁴⁾は、ABC トランスポーターの構成因子であるにもかかわらず付着因子としての機能することが報告されている。これらは、膜貫通ドメインを介して非共有結合により細胞膜に固定される。

さらに、翻訳伸長因子 (EF-Tu)⁽⁶⁵⁾⁻⁽⁶⁸⁾、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH)⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾、シャペロニンのひとつ GroEL⁽⁷¹⁾、transaldolase Tal⁽⁷²⁾は、細胞内酵素であり、Sec あるいは Tat 依存性の既知の分泌シグナル配列が保存されていないにも関わらず、何らかの経路により細胞外に移行し、静電的作用により細胞壁に結合することで付着因子として機能することが示唆されている⁽⁷³⁾。しかし、提示機構に関しては不明な点が多い。また、これらのタンパク質は、本来の機能とは異なる二つ以上

の機能をもつことから、ムーンライトタンパク質（ムーンライト＝“副業”の意味）として総称し呼ばれる⁽⁷⁴⁾。このように乳酸菌やビフィズス菌では、多種多様な細胞表層に存在するタンパク質が付着因子として機能することが示されているが、結合エピトープに関する報告例は少ない。

CWAP の一つである Mub は、*Lactobacillus reuteri* と *Lactobacillus acidophilus* で最初に見いだされた分子量 300 万以上の巨大なタンパク質である⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾。*L. reuteri* の Mub には約 200 アミノ酸残基からなる配列が 14 回繰り返して配置されており、これらがムチンに対して結合性し、また、フェチュインやアシアロフェチュインの添加により結合が阻害されることから本領域の糖鎖結合性を示唆している⁽⁴⁸⁾。さらに、マウス粘膜組織切片に対する Mub の結合性は、過ヨウ素酸処理により低下することから、結合エピトープとしてムチン糖鎖の重要性が示されている⁽⁵²⁾。Mub に含まれる約 200 アミノ酸残基からなる保存された配列は、後に Mucin-binding protein domain (MucBD) と名付けられ、MucBD をもつ表層タンパク質は 10 菌種以上で確認されている⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾。さらに、*Lactobacillus plantarum* WCSF-1 の Mannose-specific adhesin (Msa) は、1010 アミノ酸残基の中に ConA レクチン様の SasA ドメインと MucBD に高い相同性を示す配列が保存されており、ひとつの付着因子の中に複数の結合ドメインをもつことでマンノースを含む糖（鎖）を受容体とする付着因子であることが示唆されている⁽⁷⁵⁾。しかし、マンノースはムチン型糖鎖には含まれないため、グリコカリックスなどムチン以外の受容体に結合すると推測される。

Lactobacillus johonsonii NCC533 の全ゲノム解析から線毛をコードする遺伝子群の存在が乳酸菌で初めて報告され⁽⁴³⁾、その後 *Lactobacillus rhamnosus* GG の細胞表層での線毛の発現が免疫電子顕微鏡により確認さ

れた⁽⁴⁴⁾。*L. rhamnosus* GG の線毛は，SpaA, B, C の3つのサブユニットが重合した構造であり⁽⁷⁶⁾，線毛の先端にある SpaC がムチン糖鎖への結合に関与するレクチン様の性質をもつことが示唆されている⁽⁴⁶⁾。また，ビフィズス菌においても線毛に関する報告があり，*Bifidobacterium breve* UCC2003 の type IVb tight adherence (Tad) 線毛が無菌マウスへの定着に寄与すること⁽⁴⁷⁾や *B. bifidum* PRL2010 の FimA 線毛がムチン，extracellular matrix (ECM) タンパク質，上皮細胞など様々な受容体に結合すること⁽⁴⁵⁾が報告されている。しかし，これらは凝集性にも寄与することから，付着因子と受容体の特異な相互作用が成立するかは不明である。

ムーンライトタンパク質では，*L. plantarum* LA318 の GAPDH が糖鎖プローブを用いた実験により A 型および B 型の血液型抗原に含まれる GalNAc および Gal に対して結合活性を示すことが報告されている⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾。また，*Lactobacillus mucosae* ME-340 の Lam29 もこれらの血液型抗原に結合することが明らかにされており⁽⁶⁴⁾，これらが前述の血液型認識性乳酸菌の付着機構であることが示されている唯一の報告である。

これまで我々は，乳酸菌の消化管定着機構の解明と具体的な利用価値を見出すことを目的として，乳酸菌による病原細菌の付着部位の競合を想定し，感染予防に取り組んできた。胃がんや胃潰瘍の原因菌である *H. pylori* は，硫酸化ガラクトース構造をもつ糖脂質スルファチドやスルホムチン，あるいは血液型糖鎖に対し付着因子であるヒートショックタンパク質 Hsp70 や BabA を介して付着し感染を成立させることが明らかにされている⁽²⁶⁾⁽⁷⁷⁾。そこで，我々は，スルファチドやアジアロ GM1 などの糖脂質に付着能をもつ乳酸菌として *L. reuteri* JCM1081 を選抜し⁽⁷⁸⁾，さらに本株は，*H. pylori* の受容体のひとつであるスルファチドへの付着を阻害することを見出した⁽⁷⁹⁾。そこで，本株の *H. pylori* の付着阻害に関与

する因子の探索を行った結果、カオトロピック薬剤であるオクチルグルコピラノシド（OGP）で可溶化されるタンパク質性の物質であることが判明した。スルファチドの末端構造と同一の糖鎖構造である硫酸化ガラクトースを固定化したアガロースカラムを用いた実験により、菌体表層に存在する約 47kDa のタンパク質（P47）が関与していることを報告した⁽⁷⁹⁾。硫酸化ガラクトース構造をもつ糖鎖は、先の述べたように、複合糖脂質のみならずムチンの非還元末端にも豊富に存在し、様々な細菌の受容体として知られる⁽²²⁾⁻⁽²⁸⁾⁽³⁸⁾。しかしながら、乳酸菌における硫酸化糖鎖に対する付着機構は全く見いだされていない。本論文では、*L. reuteri* JCM1081 の消化管での生存戦略における P47 の硫酸化糖鎖付着因子としての機能的役割を明らかにすることを目的とした。

本論文は、第一章・序論を含む第四章からなる構成とした。まず第二章において、*L. reuteri* の硫酸化糖鎖結合タンパク質である P47 の同定と結合特性の解析を目的とした。そこで、P47 の結合特性の解析のため、ブタの消化管からムチンやムチンオリゴ糖の精製方法について検討し、さらに精製したムチンの性質や糖の組成について評価した（第一節）。次いで、P47 の同定と複合糖脂質やムチンに対する結合性についてタンパク質レベルで評価した（第二節）。さらに、P47 の *L. reuteri* における局在と付着因子としての機能について評価した（第三節）。また、スルホムチン付着性の *Bifidobacterium* のスクリーニングを行い、P47 の局在に関しても合わせて評価することとした（第四節）。

第三章では、硫酸化糖鎖結合タンパク質として同定された EF-Tu の細胞外への移行機構の解明を目的とした。まず、EF-Tu の細胞外への分泌パターンを詳細に解析し、分泌装置の変異株を作製することで EF-Tu の分泌経路の探索を行うこととした（第一節）。次いで、EF-Tu

における分泌シグナル配列の存在について評価するため，変異 EF-Tu を作製し，その分泌パターンを解析すると共に，推定分泌装置との相互作用についても検討することとした（第二節）。

最後に第四章を総括とした。

第二章

硫酸化糖鎖結合タンパク質の同定と その結合特性の解析

第一節

ムチンの精製と糖鎖の解析

第二節

硫酸化糖鎖結合タンパク質の同定と結合特性の評価

第三節

L. reuteri における EF-Tu の付着因子としての評価

第四節

スルホムチン付着性を示す *Bifidobacterium* の探索

第一節

ムチンの精製と糖鎖の解析

I 緒言

プロバイオティクスとしての評価を行う上で、ムチン付着性は重要な評価項目のひとつに挙げられる。乳酸菌のムチンに対する付着性の評価は、いくつかの方法が検討されてきた。具体的には、糖タンパク質や糖脂質など特定の糖鎖、粘液分泌型の培養細胞、粘膜組織切片、バイオプシー組織、消化管から精製したムチンを用いる方法である⁽²⁰⁾。なかでも、ブタやラットなどの消化管から精製したムチンをガラスや Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) プレートに固定し乳酸菌の付着性を評価する方法が最も一般的である。また、これらに糖質分解酵素や抗ムチン抗体を処理することで、乳酸菌のより詳細な付着特性を評価する試みが行われている⁽²⁰⁾。一方、粘液としてのムチンは、ムチン糖タンパク質が大部分を占めるが、それ以外にも脂質、酵素、核酸、分泌型 immunoglobulin A (IgA) などが含まれる複雑な混合物であり⁽⁸⁰⁾、付着特性を評価する際、夾雑物の影響が指摘されてきた⁽⁶¹⁾。

これまで精製の簡便法として、組織からムチンを界面活性剤で抽出後、エタノール沈殿によりムチンを分離する方法があげられる。しかし、本方法では、ムチン以外から由来するヘキソースの割合が半数にも及び⁽⁸¹⁾、ムチンの高次構造と生理的機能を保持したまま分離・定量することは容易ではない。また、これにゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせることで、分子量 200 万以上のポリマー体を得ることが出来るが、ムチンに非共有結合で強く結合した夾雑タンパク質が質量に対して約 20%存在

し、これらを取り除くことは出来ない⁽⁸²⁾。そこで、これらの夾雑物をすべて取り除くため、本論文では、ムチンの生化学的分析に用いられてきた、ゲル濾過クロマトグラフィーと塩化セシウム-グアニジン塩酸塩 (CsCl-GuHCl) 密度勾配超遠心分離を合わせた精製方法⁽⁸³⁾を用いて、ブタの消化管からムチンを精製することとした。一方、ラットやブタのムチンは、生化学あるいは組織化学的な研究が進んでおり、ムチンの糖鎖構造や分布が明らかにされているが⁽⁸⁴⁾⁻⁽⁸⁶⁾、ブタの大腸ムチンに関しては報告例が少ない。そこで、ムチンの非還元末端に特徴的な糖鎖構造を認識して結合するレクチンを用いた enzyme-linked lectin-binding assay (ELLA)⁽⁸⁷⁾あるいは抗ムチンモノクローナル抗体を用いた ELISA により、精製したムチンに含まれる特にスルホムチンやシアロムチンに着目し、その糖鎖の存在を評価することとした。

II 材料と方法

1. ブタ消化管からのムチンの分離と精製

24 週齢の三元交雑豚 (LWD) の胃および結腸は、十和田食肉処理場より入手した。消化管は 0.9%(w/v)生理食塩水で洗浄後、凍結乾燥し粉末にした。1.5g の粉末に対して 50 mM Tris-HCl (pH7.2)を 10 mL 加え、ミクロナスパーテルで攪拌後、100°C で 5 分加熱した。続いて、抽出溶媒 (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 2 mM PMSF, 20 mM N-Ethylmaleimide) を 10mL 加え、ホモジナイズ (12,000 rpm, 5 分) した。TritonX-100 を終濃度 2%(v/v) となるように加え、37°C で 1 時間攪拌した。遠心分離 (10,000 ×g, 30 分, 4°C) し、上清を回収した。担体として Sepharose CL-6B (GE Healthcare, NJ, USA)を充填したゲル濾過カラム (2.5×100 cm) に供し、流速 0.5mL/min

(3mL/tube) とした。緩衝液は、500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.02% (w/v) NaN_3 を用いた。各フラクションのモニターは、フェノール硫酸法⁽⁸⁸⁾を用いて行った。ボイドボリュームに現れた高分子量のヘキソースのピークを回収し、これを蒸留水により透析後、凍結乾燥した。次に、乾燥重量 0.5g のムチンに対して、50 mM Tris-HCl, 6M GuHCl を 12 mL 加え 4°C で一晩攪拌した。塩化セシウム (Sigma-Aldrich, MO, USA) を用いてムチン溶解液を比重 1.2 に調整後、さらにグラジエンターを用いて比重 1.6 の溶液 (50 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl, CsCl) と混合し、比重 1.4 になるように、各遠心チューブ (Hitachi-Koki, 4 PA チューブ, 303272A) に作製した。これを Swing ロータ P56ST (Hitachi-Koki, Tokyo, Japan) にセットし、遠心分離 (150,000 \times g, 120 h, 20°C) した。遠心分離後、ペリスタポンプを用いて 0.5mL ずつフラクションを回収し、比重、中性糖およびタンパク質は BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, MA, USA) を用いて測定し、比重 1.35~1.45 のフラクションをムチン画分とした。

乾燥重量 20 μ g のムチンを、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 7.5% acrylamide) に供し、Periodic acid/Schiff reagent Kit (PAS ; Merck, Tokyo, Japan)を用いて染色した。

2. シアリダーゼあるいはスルファターゼによるムチンの酵素的処理

ムチン 5 mg に対して 10 mU *Aerobacter aerogenes* 由来スルファターゼ (Sigma-Aldrich), 50 mM Tris-HCl (pH 7.1), 100mM KCl, and 10mM MgCl_2 にあるいは 10mU *Clostridium perfringens* 由来シアリダーゼ (Roche, IN, USA), 50 mM acetate buffer (pH 5.0)を加え、37 °C で 5 時間インキュベートした。次に、Sephacryl CL-6B を充填したゲル濾過カラム (Bio-Gel P10 column, Bio-Rad Laboratories, CA, USA; 1.0 \times 50 cm) を用いてゲル濾過ク

ロマトグラフィーにより酵素を除き，蒸留水で透析後，凍結乾燥を行った。

3. レクチンを用いた ELLA

6種類のビオチン化レクチン（Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan），UEA-1（Fuc α 1-2Gal），ECA（Gal β 1-4GlcNAc），PNA（Gal β 1-4GlcNAc），SBA（GalNAc α 1-3Gal），SSA（Sia α 2-3Gal），MSM（Sia α 2-6Gal）を用いてムチン糖鎖の検出を試みた。ELLAの方法は，Ohara *et al.*, (1997)⁽⁸⁷⁾に従った。96穴マイクロプレートに50 mM Tris-HCl (pH9.5)に溶解したムチン溶液（0.1～500 μ g/mL）を各ウェル100 μ Lずつ添加し，4°Cで一晩インキュベートした。Phosphate-buffered saline（PBS）で2回洗浄後，5%(w/v)スキムミルク-PBSにより2時間室温でブロッキング後，PBSで2回洗浄した。100 μ Lの適宜希釈したレクチンを各ウェルに添加後，室温で1時間インキュベートした。Alkaline phosphatase（AP）標識ストレプトアビジン（Roche, 2,000倍希釈）を100 μ L添加後，室温で1時間インキュベートした。PBSで2回洗浄後，BluePhos MicroWell 基質（KPL, MD, USA）を用いて発色し，10分後，2N NaOHで反応を停止し，マイクロプレートリーダー（波長620nm）で測定した。

4. 抗ムチンモノクローナル抗体を用いた ELISA

Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc (6SO₃H) β -（6-sulfated blood-group H type 2 antigen）⁽⁸⁹⁾および NeuAc α 2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-4GlcNAc β -（Sd^a blood group antigen）⁽⁹⁰⁾をエピトープとするモノクローナル抗体 PGM34 抗体および HCM31 抗体を用いて，硫酸化あるいはシアル化されたオリゴ糖の検出を試みた。抗ムチンモノクローナル抗体を用いた ELISA の方法は

Tsubokawa *et al.*, (2007)⁽⁸⁹⁾に従った。ムチンを固定した 96 穴マイクロプレート を PBS で 2 回洗浄後, 5%(w/v)スキムミルク-PBS により 2 時間室温でブロッキング後, PBS で 2 回洗浄した。100 μ L の PGM34 抗体 (100 倍希釈) あるいは HCM31 (50 倍希釈) を各ウェルに添加後, 室温で 1 時間インキュベートした。マウス IgM (50 あるいは 100 倍希釈) をコントロールとして用いた。AP 標識抗マウス IgG (Dako, Glostrup, Denmark ; 2,000 倍希釈)を 100 μ L 添加後, 室温で 1 時間インキュベートした。検出方法は上記と同様である。

5. 抗ムチンモノクローナル抗体を用いた Dot blot assay

ニトロセルロース膜 (Whatman, Kent, UK) に, 100 μ g のムチンを固定し, 5%(w/v) スキムミルク-PBS により室温で 2 時間インキュベートすることで, ブロッキングした。1% (w/v) スキムミルク-PBS-Tween (PBS-T) で希釈した PGM34 抗体 (100 倍希釈) あるいは HCM31 (50 倍希釈) を添加後, 4 °C で一晩インキュベートした。マウス IgM (50 あるいは 100 倍希釈) をコントロールとして用いた。PBS-T で 3 回洗浄後, Alkaline phosphatase (AP)標識抗マウス IgG (1,500 倍希釈) を添加後, 室温で 1 時間インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄後, BCIP/NBT liquid substrate system (Sigma-Aldrich) を用いて発色した。

6. ブタ胃由来ムチン(PGM)からオリゴ糖の精製

PGM からのムチンオリゴ糖の精製は Tsubokawa *et al.*, (2007)⁽⁸⁹⁾に従った。2.5 g の PGM(Wako, Osaka, Japan)を 10 mL の 50 mM NaOH, 1 M NaBH₄ に溶解し 50°C で 24 時間インキュベートした。反応後, 酢酸を滴下し pH 4.0 になるように調製した。Sepharose CL-6B を充填したカラム (2.5 \times 100

cm) に添加後，蒸留水により溶出した。陽イオン交換体 DOWEX™ 50W (Wako) を充填したカラム (Bio-Gel P10) を用いてタンパク質を取り除きオリゴ糖を得た。さらに，陰イオン交換体 HiTrap Q FF (GE healthcare) を用いて 0.1-0.6 M 酢酸ナトリウムのリニアグラジエント溶出により酸性オリゴ糖と中性オリゴ糖を分画した。続いて，酸性オリゴ糖からシアル酸を除去するため，ムチンオリゴ糖 (1 mg) を 0.1 M HCl に溶解し，80 °C で 1 時間インキュベートした。Sephacrose CL-6B を充填した Bio-Gel P10 column により分画後，MALDI-TOF/MS Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) の陰イオンモードにより酸性オリゴ糖のシアル酸の切断を解析した。

III 実験成績

1. ムチンの精製と性状の評価

ムチンは，ゲル濾過クロマトグラフィーおよび密度勾配超遠心分離を用いて精製した。本結果では，ブタ結腸ムチン (PCM) のみ示した。ゲル濾過クロマトグラフィーのボイドボリュームに確認されたヘキソースのピーク (図 1A, Fr.1, 矢印) を回収し，さらに CsCl/GuHCl 密度勾配超遠心分離を行った。遠心分離後，ヘキソースのピークと比重 1.35~1.45 の画分 (図 1B, Fr. 2, 矢印) を回収した。ゲル濾過クロマトグラフィーと密度勾配超遠心分離により得られた各画分の同乾燥重量のムチンは，SDS-PAGE に供し，PAS 染色した (図 1C)。いずれの画分のサンプルも濃縮ゲルの位置に高分子量の PAS 染色陽性のムチンが確認された。一方，中性糖/タンパク質 (w/w) の割合は，Fr. 1 は 0.21 であるのに対して，Fr. 2 は 0.71 であり，密度勾配超遠心分離により夾雑タンパク質の除去が

確認できた。したがって、以降、Fr. 1は粗精製ムチン、Fr. 2は精製ムチンとした。

2. PCMに含まれるムチン糖鎖の検出

精製 PCM に対する各レクチンの結合性を図 3 に示した。Ohara *et al.*, (1997)⁽⁸⁷⁾の方法に従い、シグモイド曲線を示すレクチン濃度のグラフを選択し、4段階での評価した結果を表 3 に示した。SBA レクチンを除く 5 種類のレクチンでシグモイド曲線が確認され、ムチンの濃度依存的に反応性を示した。特に、シアル酸を認識して結合する SSA と MSM では高い結合が認められた。また、ガラクトシル基を認識して結合する ECA と PNA では、数 ng の範囲にあるムチン糖鎖を検出可能であることが示された (図 3)。

次に、スルホムチンあるいはシアロムチンの検出のため、PGM34 あるいは HCM31 抗体による ELISA を行った。どちらの抗体もムチンの濃度依存的に反応性を示した (図 4A)。また、PGM34 抗体は 100 倍希釈、HCM31 抗体は 50 倍希釈でシグモイド曲線が確認された。また、いずれの希釈倍率でも IgM は、ムチンに対してほとんど反応性を示さなかった。

さらに、スルファターゼあるいはシアリダーゼ処理が抗ムチン抗体の反応性に及ぼす影響について評価した。酵素処理した精製あるいは粗精製 PCM を 96 穴プレートに固定あるいはニトロセルロース膜に転写し、抗ムチン抗体の反応性を確認した (図 4B)。精製 PCM に対しては、いずれの抗体の反応性も酵素処理により低下し、酵素処理が適切に行われていることが示された。一方、粗精製 PCM では酵素処理後も抗体の反応性は保たれたままであった (図 4B)。すなわち、ムチンの精製純度が糖質分解酵素の反応効率に影響することが強く示唆された。

3. PGM からのムチンオリゴ糖の精製

PGM のアルカリ加水分解により得られたムチンオリゴ糖は、陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、中性オリゴ糖画分（図 5，矢印 a）と酸性オリゴ糖画分（図 5，矢印 b）に分画した。さらに、酸性オリゴ糖は弱酸加水分解を行うことで、シアル酸を除去した（脱シアル酸酸性オリゴ糖）。次に、シアル酸の切断を確認するため、MALDI-TOF/MS に供し、陰イオンモードで検出した（図 6 A, B）すべての検出されたピークは、dHex/Hex/HexNAc/NeuAc/NeuGc/SO₃H/GalNAc-ol の組み合わせに基づきアサインした。23 の硫酸化糖アルコールと 8 つのシアル酸化糖アルコールが検出され（図 6 A，表 4），弱酸加水分解後は、すべてのシアル酸化糖アルコールのピーク（m/z 675, 878, 1040, 1243, 1389, 1852, 2055, 2096）は消失し（図 6 B，表 4），すべてのシアル酸が切断されていることが確認できた。ここで得られたムチンオリゴ糖は、第二章・第三節で用いた。

IV 考察

ゲル濾過クロマトグラフィーと密度勾配超遠心分離を組み合わせた精製法により、タンパク質に対するヘキソースの割合を 70%程度まで高めた高純度なムチンを分画することが出来た。また、粗精製ムチンと精製ムチンを SDS-PAGE に供し、PAS 染色した結果、いずれも分子量 200 万以上の位置にバンドが確認されることから、精製過程により物理的剪断を受けていないポリマー体⁽⁹¹⁾であることが示された。

また、興味深いことに、スルファターゼとシアリダーゼ処理後の粗精製ムチンと精製ムチンに体する PGM34 と HCM31 抗体の反応性を比較す

ると、粗精製ムチンに対する各抗体の反応はわずかに低下した程度であり、これはムチンに含まれる夾雑物が影響するものと示唆され、ムチンの精製純度が酵素処理の効率に大きな影響を及ぼすことが示された。また、これまで細菌の酵素処理ムチンに対する付着性の評価を行う際に、精製が不十分なムチンが用いられてきた⁽²⁰⁾⁽³⁸⁾⁽⁹²⁾。従って、今回の結果と合わせると、ムチンに酵素処理を行う際は、ムチンの精製純度を十分に考慮する必要があると考えられた。本節で得られた精製ムチンやムチンオリゴ糖は、ムチン糖鎖と細菌あるいは付着因子の相互作用など分子間の解析を行う際に用いた。

ELLA および ELISA により、ECA と PNA は、PCM に対して低バックグラウンドで、濃度依存的な安定した結合性を示した。以前の報告でも、ガラクトシル基を認識して結合するレクチンが PCM に対して高い反応性を示すことが報告されており⁽⁹³⁾、これらの結果は一致した。一方で、スルホムチンやシアロムチンなどの酸性糖鎖の存在についての報告例は少ない。本節で得られた結果では、シアル酸を認識して結合する SSA と MSM が高い反応性を示し、同様に PGM34 や HCM31 抗体も濃度依存的に安定した反応を示した。一方、比較的研究の進んでいる、ヒト大腸の組織化学的手法による解析では、スルホムチンやシアロムチンが豊富に存在すること、特にスルホムチンの存在量が非常に多いことが報告されている⁽⁸⁵⁾。ヒトの大腸に特徴的な *muc2* タイプムチンは、ブタの大腸においても発現が報告されており⁽⁹⁴⁾、同様の O-グリカンのコア構造をもつ⁽⁹⁵⁾。今回の結果から、PCM にも 6-sulfated blood-group H type 2 antigen あるいは Sd^a blood group antigen を含むスルホムチンやシアロムチンが存在することが示された。

第二節

硫酸化糖鎖結合タンパク質の同定と結合特性の評価

I 緒言

ニワトリ腸内由来乳酸菌である *L. reuteri* JCM1081 が *H. pylori* の受容体のひとつであるスルファチドに対して付着性を示すことが見出されてきた⁽⁷⁸⁾。また，スルファチドと類似の構造をもつ硫酸化ガラクトースを固定化したカラムを用いた実験から，カオトロピック薬剤である OGP で可溶化される約 47kDa のタンパク質性の物質 (P47) がスルファチドに対する推定付着因子であることが明らかにされた⁽⁷⁹⁾。そこで，P47 のエドマン法による N 末端のアミノ酸配列解析より配列:AEKEEYE を決定し，P47 の同定が試みられたが，タンパク質の同定には至っていない⁽⁷⁹⁾。

第二節では，V8 プロテアーゼを用いたクリーブランド法⁽⁹⁶⁾により P47 の内部アミノ酸配列を解析することで，P47 遺伝子の同定することを第一の目的とした。さらに，組み換えタンパク質を作製することで，複合糖脂質やムチンに対する P47 の結合特性をタンパク質レベルで明らかにすることを第二の目的とした。

II 材料および方法

1. 供試菌株および培養条件

L. reuteri JCM1081 は理化学研究所 (Saitama, Japan) より入手した。De Man-Rogosa-Sharp (MRS; BD Difco, Le Pont de Claix, France) 寒天培地で 37°C で嫌気培養し，MRS 液体培地では静置培養した。*E. coli* DH5a 株，BL21 (DE3) 株，Rosetta2 株 (Stratagene, CA, USA) は，Luria-Bertani (LB)

寒天培地あるいは LB 液体培地において 37°C で培養した。適宜、アンピシリン (Amp, 100 µg/mL), カナマイシン (Km, 50 µg/mL), クロラムフェニコール (Cm, 30µg/mL) を添加した。

2. 塩化ルビジウム法による *E. coli* のコンピテントセルの作製

E. coli DH5α, BL21 (抗生物質非添加) または *E. coli* Rosetta2 (Cm⁺) を LB 寒天培地で培養し, その後, 5 mL LB 液体培地で一晩振とう培養した。1/100 量の培養液を 20 mM MgSO₄ を添加した 200 mL LB 液体培地に移し, OD₆₀₀ 0.5 になるまで室温で振とう培養した。培養後, 氷上で 10 分間冷却し, 遠心分離 (4,500 ×g, 10 分, 4°C) した。得られたペレットを 40 mL の冷 TFB I 緩衝液 (30 mM 酢酸カリウム, 10 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂, 100 mM RbCl, 15% [v/v]グリセロール) で穏やかに懸濁し, 氷上に 20 分間静置した。遠心分離 (4,500 ×g, 10 分, 4°C) し, 上清を除いた後, 4 mL の冷 TFB II 緩衝液 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% [v/v]グリセロール) で穏やかに懸濁し, 200 µL ずつに分注して -80°C で保存した。

3. P47 のアミノ酸シーケンス解析

L. reuteri JCM1081 は, 5mL MRS 液体培地で 37 °C 12 時間培養後, 50 mL MRS 液体に 2% (v/v) 添加し, 12 時間培養を行った。遠心分離 (6,000 ×g, 4 °C, 5 分) し, PBS で洗浄した。湿重量 100mg のペレットに対して 1 mL の 0.1%(v/v) OGP (Sigma-Aldrich) で懸濁し, 室温で 2 時間振とうした。続いて, 遠心分離 (6,000 ×g, 4 °C, 10 分) した上清を回収し, 蒸留水に対して透析した。Mukai *et al.*, (2002)⁽⁷⁹⁾の方法に従い, ビオチン化硫酸化ガラクトース (Seikagaku Corporation) 固定化したストレプトアビジン-

アガロースカラム（1mL）を用いて、細胞表層画分から目的タンパク質を精製し、凍結乾燥後 5mL の超純水に溶解した。溶解したサンプル 55 μ L に 40 mM になるように DTT を加え、37 °C で 2 時間インキュベートした。次に、800 mM になるようにヨードアセトアミドを加え、37 °C で 30 分インキュベートし、これを 0.2 M NaOH で中和したものをサンプルとした。

アミノ酸内部配列解析のため、クリーブランド法-トリシン SDS-PAGE（16.5 % acrylamide）⁽⁹⁶⁾を行った。なお、V8 プロテアーゼ処理は 1 時間を行った。電気泳動後、セミドライブロッキング法により polyvinylidene difluoride（PVDF）膜に転写し、Coomassie Brilliant Blue R-250（CBB）で 2 分間染色した。PVDF 膜から切り取ったバンドをアミノ酸シーケンサー（Applied biosystems protein sequencer 491）のカートリッジにセットし、得られたプロテアーゼ分解産物をアミノ酸シーケンサーに供し、内部アミノ酸配列を得た。

4. P47 のクローニングと塩基配列の決定

47 kDa タンパク質の N 末端および内部アミノ酸配列配列をもとに、プライマー 5'-GGIGA(A/G)AA(A/G)GA(A/G)CA(C/T)TA-3' と 5'-TCICCI GG(A/G)AA(A/G)TC (A/G)TA(C/T)TC-3' を用いて、degenerate PCR を行った。以降、記載の無い限り、PCR はすべて Takara Ex Taq polymerase（Takara, Shiga, Japan）を用いた。得られた約 500 bp の増幅産物は、LigaFast™ Rapid DNA Ligation System（Promega, Tokyo, Japan）を用いて pGEM-T（Promega）にクローニング後、塩化ルビジウム法により作製した *E. coli* DH5 α コンピテントセルに 42°C、45 秒のヒートショック法により形質転換した。QIAprep Miniprep kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いてプラスミドを精製後、DNA シーケンス解析により塩基配列を得

た。塩基配列のアミノ酸配列の変換およびマルチアライメントは GENETYX ver. 11 (Osaka, Japan), 得られた推定アミノ酸配列の相同性解析は BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により行った。等電点の解析は ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)を用いて行った。

なお, P47 は Elongation Factor-Tu (EF-Tu) であると同定されたため, 以降 P47 を EF-Tu と表記する。

5. 組み換え EF-Tu タンパク質の発現と精製

発現用ベクター pET28b (Novagen, Madison, WI, USA) を用いて, N 末端に 6×His tag を融合した組み換え EF-Tu タンパク質 (His₆-EF-Tu) の発現を行った。ef-tu は, プライマー

5'-CATATGGCTGAAAAAGAACATTATGAAC-3'(下線部は *Nde*I 認識配列)

と 5'-CTCGAGTTAGTCTAAGATGTCGGATAC-3'(下線部は *Xho*I 認識配列)

により増幅した。得られた増幅産物は, pGEM-T easy にクローニング後, *E. coli* DH5α に形質転換した。*Nde*I と *Xho*I により目的配列を切り出し, pET28b にクローン化した。DNA シーケンス解析により塩基配列を確認後, 塩化ルビジウム法により作製した *E. coli* BL21 コンピテントセルにヒートショック法により形質転換した。

250 mL の LB 液体培地 (Km⁺) で 37°C で振とう培養し, OD₆₀₀ 0.5 まで培養後, isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.5 mM) を添加し, さらに 5 時間培養した。遠心分離 (8,000 × g, 5 分, 4 °C) を行い, ペレットを PBS で洗浄した。続いて, リゾチーム (2 mg/mL, Sigma-Aldrich) を添加した BugBuster protein extraction reagent (Novagen) により溶菌後, 超音波破砕機 (Branson, USA) を用いて出力 30% で 5 分間 (30 秒間隔) 処理することで DNA を切断した。遠心分離 (16,000 × g, 10 分, 4 °C)

後、上清を回収し、さらに 0.22 μm シリンジフィルターに通した。これを HisTrap HP (GE Healthcare) カラムを用いて精製した。続いて、20 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 6.0) で透析し、さらに HiTrap DEAE FF (GE Healthcare) カラムを用いて精製した。20 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.2) で透析し、アミコンウルトラ-4 10kDa (Milipore, MA, USA) で濃縮した。得られたタンパク質は、SDS-PAGE (12.5 % acrylamide) に供し CBB を用いて染色した。タンパク質濃度は BCA-Protein Assay Kit で測定し使用するまで -80°C で保存した。また、得られた His₆-EF-Tu を抗原とし、SPF ウサギを免疫動物としてポリクローナル抗体を作製した。

6. Surface plasmon resonance (SPR)による EF-Tu の結合試験

His₆-EF-Tu と糖脂質の相互作用は、SPR を利用した Baicore X (GE Healthcare) により解析した。His₆-EF-Tu は、CM5 dextran sensor chip (GE Healthcare) にアミンカップリング法により約 2,500 resonance units (RU) 固定化した。測定はすべて 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, 25 $^{\circ}\text{C}$ として、ABS-EP (10 mM acetate, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% surfactant P20; pH 4.0, 5.0, 6.0) あるいは HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% surfactant P20; pH7.2) を用いた。単一濃度の結合試験の場合は、350 nM の糖脂質 (sulfatide, sulfated-lactosylceramide, galactosylceramide, lactosylceramide, GM3 ; Sigma-Aldrich) をアナライトとして添加した。解離開始時の RU 値を結合量とした。センサーチップの再生は、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を 60 秒添加することで行った。

カイネティクス解析は、150~350 nM の sulfatide (pH 5.0) をアナライトとして添加した。流速、温度は上記と同様に行い、解離のステップ

の測定時間を 120 秒とした。結合速度定数 (ka), 解離速度定数 (kd), 解離定数 ($K_D = kd/ka$)は, BIA evaluation version 3.0 (GE Healthcare) を用いて計算した。また Global analysis におけるフィッティングモデルは, simple 1:1 Langmuir binding model として, カイ二乗値が 10 以下のセンサーグラムを採用した。

7. ELISA による EF-Tu の結合試験

96 穴マイクロプレートに 50 mM Tris-HCl (pH9.5) に溶解した PGM を各ウェル 100 μ L ずつ(ヘキソース重量換算 100 ng)となるように添加し, 4 °C で一晩インキュベートした。PBS で 2 回洗浄後, 2%(w/v) bovine serum albumin (BSA) -PBS により 2 時間室温でブロッキングした。0.1% (w/v) BSA を含んだ ABS (10 mM acetate, 150 mM NaCl; pH 5.0) あるいは HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl; pH 7.2) で 2 回洗浄後, ABS あるいは HBS に溶解した His₆-EF-Tu を各ウェルに添加後, 1 時間室温でインキュベートした。それぞれの緩衝液で 3 回洗浄後, anti His-tag mouse IgG (Roche; 1,500 倍希釈) を添加し, 1 時間室温でインキュベートした。AP 標識抗マウス IgG (2,000 倍希釈) を 100 μ L 添加後, 室温で 1 時間インキュベートした。2 回洗浄後, BluePhos MicroWell 基質を用いて発色し, 10 分後, 2N NaOH で反応を停止し, マイクロプレートリーダーで測定した。

8. 競合 ELISA による EF-Tu の結合試験

競合 ELISA は, His₆-EF-Tu と PGM 由来オリゴ糖との相互作用を解析した。ABS に溶解した各オリゴ糖 (ヘキソース重量換算 0.1~50 ng) と His₆-EF-Tu (10 μ g) を室温で 1 時間インキュベートした。次に, PGM を固定したプレートに添加し, さらに 1 時間インキュベートした。0.1%(w/v)

BSA-ABS (pH 5.0)で3回洗浄後, anti His-tag mouse IgG (1,500 希釈) を添加した。検出方法は上記の通りである。

PGM34 モノクローナル抗体および血液型タイプ2抗原をエピトープとする RGM21 モノクローナル抗体 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) を用いて, His₆-EF-Tu の PGM に体する結合阻害試験を行った。PGM34 あるいは RGM21 モノクローナル抗体 (62.5~1,000 倍希釈) を PGM 固定プレートに添加し, 1時間インキュベートした。マウス IgM は, コントロールとして用いた。0.1% (w/v) BSA-ABS (pH 5.0)で3回洗浄後, His₆-EF-Tu (10 µg) を添加し, 室温で1時間インキュベートした。さらに, 3回洗浄後, ビオチン化 anti His-tag mouse IgG (1,000 希釈) を添加し, 室温で45分インキュベートした。2回洗浄後, AP 標識ストレプトアビジン (1:2,000 希釈; Roche) を添加し, 室温で30分インキュベートした。検出方法は上記の通りである。

9. 組織化学的評価

屠殺直後のブタ胃 (24 週齢, LWD) を 37 °C で4時間の条件でメタノール-カルノア固定⁽⁹⁷⁾した。パラフィン包埋後, 4 µm に薄切した。硫酸化糖鎖は High Iron Diamine (HID) 染色⁽⁹⁸⁾により検出した。ジアミン溶液 (*N,N*-dimethyl-*m*-phenylenediamine, *N,N*-dimethyl- *p*-phenylenediamine, iron chloride) で20時間染色後, 蒸留水で水洗した。アルコール脱水し, キシレンで透徹後, 封入を行った。Olympus BX53 (Tokyo, Japan)により観察した。

His₆-EF-Tu による染色は, 内在性ペルオキシダーゼ活性は, 0.3% (v/v) 過酸化水素-メタノール溶液で30分処理することで不活化した。5% (w/v) BSA-PBS で1時間ブロッキング後, 1% (w/v) BSA-ABS (pH 5.0) に溶解

した His₆-EF-Tu (30 µg) を 4 °C で 12 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後, peroxidase-標識ストレプトアビジン (1:1,000 倍希; Roche) を添加し 1 時間インキュベートした。3 回洗浄後, ImmPACT DAB Substrate (Vector Laboratories, CA, USA) により発色した。対比染色は, ヘマトキシリンを用いた。

10. 統計処理

統計処理は, PRISM6 (GraphPad Software)により行った。各実験における統計処理方法は図の説明に記載した”n”はそれぞれの実験回数を示した。P 値が 0.05 より小さい場合, 有意差ありと判断した。

III 実験成績

1. P47 の配列解析と同定

P47 の内部アミノ酸配列として, VGLTEDVLKST と EYDFPGDD を同定した。本配列をもとに, degenerate PCR を行い, 499-bp の増幅産物を得た。さらに, DNA シーケンスより得られた配列から 166 アミノ酸残基の配列が決定し, BlastP によるデータベース検索の後, *L. reuteri* JCM1112 の elongation factor-Tu (EF-Tu ; DDBJ accession No. YP_001841624) の部分配列と 100%一致した。さらに, 499-bp の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いて inverse PCR を行い, 1,191-bp の塩基配列を得た。本配列から 396 アミノ酸残基, 47 kDa のタンパク質であることが明らかになった。*ef-tu* の塩基配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (DDBJ accession number: AB827441)。BlastP による相同性解析により, *L. reuteri* JCM1081 の EF-Tu は, *Acinetobacter baumannii* (WP_003107886), *Listeria*

monocytogenes (NP_466175), *Mycoplasma pneumonia* (WP_010875022), *Mycoplasma genitalium* (WP_009885583), *P. aeruginosa* (NP_252967)の EF-Tu と 59~73%の相同性を示した。また, *Lactobacillus* 属では, 約 80~100%の相同性を示した。さらに, ムチンや上皮細胞への結合性が報告されている *L. johnsonii* NCC 533 (La1) (NP_964865.1)の EF-Tu とは 87%の相同性を示した⁽⁶⁵⁾。

2. EF-Tu の硫酸化糖脂質への結合性の評価

His₆-EF-Tu は, *E. coli* BL21 を宿主として発現させ, His-trap HP カラムを用いて精製した。SDS-PAGE に供し CBB で染色した結果, アミノ酸配列から予測された分子量である約 47 kDa の位置に単一バンドのシグナルが検出された (図 7)。

His₆-EF-Tu と Sulfatide の結合性は, Biacore を用いて解析した。*L. johnsonii* NCC 533 の EF-Tu は, ムチンや上皮細胞に対して pH7.0 と比較し pH5.0 で高い結合性を示すことが報告されている⁽⁶⁵⁾。そこで, 幾つかの pH 条件下で解析を行った。緩衝液の pH が pH7.2 から pH4.0 まで低下するに従い His₆-EF-Tu の Sulfatide に対する結合量は増加を示し, pH 依存的に結合した (図 8 A)。続いて, EF-Tu の特異性を評価するため, 幾つかの糖脂質への結合性を解析した。His₆-EF-Tu は, Sulfatide

(SO₃-3Galβ1Cer) と Sulfated-lactosylceramide (SO₃- 3Galβ4Glcβ1Cer) に対して結合性を示し, pH5.0 で顕著に結合性が増加した (図 8 B)。一方, Galactosylceramide (Galβ1Cer) と Lactosylceramide (Galβ4Glcβ1Cer) に対しては, いずれの pH 条件でも結合性は示さなかった。さらに, Sialylated glycolipid (GM3; NeuAcα3Galβ4Glcβ1Cer) に対しては, pH5.0 でわずかに結合が認められたが, 硫酸化糖脂質と比較すると非常に低い結合であっ

た。従って、EF-Tu の結合にはシアル酸は関与しないことが推察された。さらに、pH5.0 の条件で各濃度の His₆-EF-Tu (150~350 nM) を添加した場合、濃度依存的な結合が確認され、これらのセンサーグラムから求められたカイネティクスパラメーターは、 $K_D=5.26 \times 10^{-8}$ M ($k_a: 6.89 \times 10^2$ M⁻¹s⁻¹, $k_d; 3.62 \times 10^5$ s⁻¹) となった (図 8 C)。以上の結果から、EF-Tu は複合糖脂質の硫酸化糖鎖に対して、特異性のある強い結合性をもつことが示された。

3. EF-Tu の PGM への結合性の評価

ELISA により PGM に対する His₆-EF-Tu の結合性の評価を行った。His₆-EF-Tu の PGM の結合性は、pH5.0 の条件で濃度依存的であり、His₆-EF-Tu の添加量が 5 µg 以上で飽和状態となった (図 9 A)。一方、pH7.2 では結合量は低く、これは Sulfatide に対する EF-Tu の結合パターンと一致した。さらに、スルファターゼあるいはシアリダーゼにより酵素的処理を行った PGM への His₆-EF-Tu の結合性を評価した (図 9 B)。10 µg の His₆-EF-Tu を添加した際、スルファターゼ処理により有意な結合性の低下が確認され、さらに、シアリダーゼ処理では結合性は殆ど変化しなかった。

続いて、第一節で精製した中性あるいは酸性ムチンオリゴ糖を添加した際の His₆-EF-Tu の結合性を競合 ELISA により評価した。シアル酸と硫酸基を含む酸性オリゴ糖画分の添加は濃度依存的に His₆-EF-Tu の PGM に対する結合を阻害した (図 10 A)。一方、中性オリゴ糖の添加は結合性にほとんど影響を及ぼさなかった。さらに、酸性オリゴ糖からシアル酸を除去した、脱シアル酸酸性オリゴ糖の添加も同様に阻害活性を示し、中性オリゴ糖やシアル酸は EF-Tu の結合に関与しないことが示された。

次に、SO₃-6-GlcNAc 構造を含む硫酸化血液型タイプ 2 抗原をエピトープとする PGM34 抗体を用いて His₆-EF-Tu の結合阻害試験を行った。またコントロールとして、H type 1 抗原をエピトープとする RGM21 抗体を用いた。PGM に対する PGM34 抗体の前処理により、His₆-EF-Tu の結合性は PGM34 抗体の濃度依存的に阻害された (図 10B)。一方、RGM21 とコントロールである IgM の添加は、ほとんど His₆-EF-Tu の結合性に影響しなかった。以上の結果から、EF-Tu は硫酸基を介して PGM に結合することが示された。

4. 組織化学的手法による EF-Tu の結合性の評価

His₆-EF-Tu のブタ胃粘膜への結合性について評価した。また、胃粘膜における硫酸化糖鎖の検出は、HID 染色により行った。図 11 に示すように、His₆-EF-Tu は、粘液ゲル層 (m; mucous gel layer)、表層粘液細胞 (s; surface mucous cells)、胃腺狭部粘液細胞 (i; mucous cells around the isthmus) に対して部位特異的に反応した。また His₆-EF-Tu の反応部位は、HID 染色陽性の部位と類似した。

IV 考察

第二節では、P47 の同定と結合特性の解析を行った。これまで我々が、硫酸化糖鎖結合因子として推測してきた P47 は、翻訳伸長因子 (EF-Tu) であることが明らかになった。EF-Tu は、リボソーム上でタンパク質合成の中心的な役割を担う細菌の生育に必須なハウスキーピング因子である。一方で、EF-Tu は *L. johnsonii* NCC533 の細胞表層に局在し、上皮細胞やムチンに対する付着因子として機能することが報告されている⁽⁶⁵⁾。さらに、数菌株の *L. plantarum* おいても EF-Tu の存在量とムチンに対す

る付着性が正の相関を示すことから、付着因子として機能が示唆されている⁽⁶⁶⁾⁻⁽⁶⁸⁾。また、数菌株の *Lactobacillus* が enteropathogenic *E. coli*(EPEC) や *Salmonella enterica* serovar Typhi のムチンに対する付着性を阻害し、これに細胞表層の EF-Tu が関与することが報告されている⁽⁶⁶⁾。このように、EF-Tu が細胞外に分泌され、細胞表層に局在することで付着因子としての機能が示されてきたが、EF-Tu がどのような結合特性を示すのか不明であった。

本節で得られた結果から、*L. reuteri* JCM1081 由来の His₆-EF-Tu は硫酸化糖脂質に結合性を示し、硫酸基のない糖脂質には全く結合性を示さないことが示された。これまで乳酸菌の付着因子と糖脂質の糖鎖との相互作用解析が行われてきた。GAPDH がムチン糖鎖に含まれる A 型と B 型の血液型抗原に結合すること⁽⁷⁰⁾、Msa がマンノースを含む糖脂質に対して結合することが示されてきた⁽⁷⁵⁾⁽⁹⁹⁾。しかし、硫酸化糖鎖への結合因子はこれまで一切報告されていない。

さらに、カイネティクス解析の結果、His₆-EF-Tu は Sulfatide に対して $K_D=52$ (nM) を示した。*L. acidophilus* グループにおける ECM タンパク質への付着因子として報告されている S-layer タンパク質のカイネティクス解析の結果と比較すると、フィブロネクチンやラミニンに対する S-layer タンパク質の結合性は $K_D=26\sim 89$ (nM) であり⁽¹⁰⁰⁾、EF-Tu と同程度の値を示す。したがって、EF-Tu が糖脂質に含まれる硫酸化糖鎖に対する付着因子として十分な結合活性があると考えられた。

EF-Tu は、ムチンの硫酸化糖鎖に対しても特異な結合性を示した。また、ムチンオリゴ糖を用いた競合 ELISA でも濃度依存的な抑制が確認されたことから、シアル酸やムチンのコアタンパク部分が、EF-Tu の結合に関与しないことも示された。PGM34 抗体を用いた結合阻害でも同様の

結果が得られた。PGM34の必須エピトープは、SO₃-6GlcNAcとα1,2-Fucである⁽⁸⁹⁾。すなわち、EF-Tuは、SO₃-3Galを含む複合糖脂質に対して結合性を示すことは既に示したが、PGM34抗体の結合阻害試験により、SO₃-3Gal構造だけでなく、そのエピトープ構造に含まれるSO₃-6GlcNAcにも結合することが強く示唆された。

興味深いことに、硫酸基と同じくマイナスの電荷を有するシアル酸に対してEF-Tuは結合性を示さなかった。同様の報告例が幾つか報告されている。例えば、*E. coli*のnon-fimbrial adhesin coli surface antigen 6 (CS6)⁽²²⁾、*H. pylori*のneutrophil-activating protein⁽¹⁰¹⁾は、硫酸化糖脂質に結合するがシアル酸化糖脂質には全く結合性を示さないことが報告されている。さらに、ヒト結腸ムチンのスルファターゼ処理は、*L. reuteri*のMucBD-associated domain (MUBAD)由来の改変ペプチドMUB₇₀の結合を低下させるが、シアリダーゼ処理は結合に影響を及ぼさない⁽⁹²⁾。これらの結合機構が、特異的であるか静電的作用であるかは不明だが、*L. reuteri* JCM1081のEF-Tuと異なる点は、EF-TuがpH依存的事であることである。実際、EF-Tuは酸性条件ではEF-Tuは結合するが、中性条件では殆ど結合しない。さらに、Biacoreによる相互作用解析では、弱アルカリ緩衝液(pH 8.0)を用いることで、EF-Tuの結合を完全に解離させることが出来る。すなわち、静電的相互作用はEF-Tuの結合に極めて重要であることが推察される。しかし、なぜ負の電荷をもつシアル酸にEF-Tuが全く結合しないのか、単なる静電的作用だけでは説明することはできない。また、CS6、neutrophil-activating proteinやMUB₇₀のような硫酸化糖鎖に結合するタンパク質との配列的な類似性は認められない。したがって、今後の研究により、硫酸化糖鎖に対して特異的に結合する新規のレクチン様のドメインまた構造等が見出される可能性が期待される。

第三節

L. reuteri における EF-Tu の付着因子としての評価

I 緒言

第二節では，EF-Tu が複合糖脂質やムチンに含まれる硫酸化糖鎖を特異的に認識して結合する性質をもつことを組み換え EF-Tu タンパク質を用いて明らかにした。EF-Tu は，*A. baumannii*, *L. johnsonii*, *L. monocytogenes*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *P. aeruginosa* において細胞外へと移行し，菌体表層にとどまることが示されており，有用細菌，病原細菌問わず，付着因子または感染因子としての重要な役割をもつことが示されている⁽⁶⁵⁾⁽¹⁰²⁾⁻⁽¹⁰⁷⁾。

EF-Tu が付着因子として機能するためには，細胞表層に局在し，アンカーリングされることが重要である。一般的に，細胞表層に局在する付着因子は，CWAP やリポタンパク質のように細胞壁あるいは細胞膜に共有結合でアンカーリングされるものと，GAPDH, Enolase, GroEL のように静電的に細胞表層にとどまるものが存在する⁽⁷¹⁾⁽⁷³⁾。EF-Tu も，膜貫通ドメインや細胞壁結合ドメインなど既知のアンカーリング領域が保存されていないタンパク質であり，後者のような細胞表層局在様式を示すと考えられてきたが⁽⁶⁵⁾⁽¹⁰²⁾，その局在様式や菌株における付着因子としての解析は十分に行われていない。そこで，第三節では，EF-Tu が *L. reuteri* における付着因子としての評価を行うために，細胞表層における局在と *L. reuteri* の付着性に対する役割に関して評価することを目的とした。

II 材料および方法

1. 供試菌株および培養条件

L. reuteri JCM1081, JCM1084, JCM1112^T, JCM2763, JCM2764 は理化学研究所より入手した。MRS 寒天培地で 37°C で嫌気培養後, 5mL 液体培地で 12 時間静置前培養した。本培養は, 100mL MRS 培地で 10 時間静置培養した。

2. *L. reuteri* の細胞表層タンパク質の抽出

細胞表層タンパク質の抽出方法は Lortal *et al.*, (1992)⁽¹⁰⁸⁾の方法に従った。*L. reuteri* JCM1081 (10^{10} colony-forming units [CFU]) を遠心分離 (16,000 ×g, 10 分, 4 °C) し, ペレット 10 mg に対して 1mL の 5 M GuHCl を加え, 4°C で 15 分振とうした。続いて, 遠心分離 (16,000 ×g, 10 分, 4°C) を行い, 上清を回収し 25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM EDTA で透析した。培養上清は, 0.22 μm シリンジフィルターに通した後, 10% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) 沈殿を行い, 1/50 量の 25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM EDTA に溶解した。菌体は, 25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM EDTA に懸濁後, 0.3 g 0.1-mm zirconia-silica beads を加え, Bead beater (FastPrep QBiogene, CA, USA) で 4,800 rpm, 180 秒間処理した。遠心分離 (10,000 ×g, 5 分, 4 °C) で得られた上清を回収した。

L. reuteri JCM1081 における EF-Tu の局在を評価するため, 遠心分離した菌体ペレット (10^{10} CFU) に対して, ABS (pH 4.0) あるいは HBS (pH 8.0) を 5mL 加え, 37 °C で 1 時間振とうした。サンプルの分画は, 上記に従って行った。

3. ウェスタンブロット

タンパク質サンプルは、SDS-PAGE (12.5% acrylamide) に供し、PVDF 膜に転写した。5%(w/v)スキムミルクを添加した PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T) で2時間ブロッキングした。PBS-T で3回洗浄後、抗 EF-Tu ポリクローナル抗体 (1,500 倍希釈) を添加し室温で1時間インキュベートした。3回洗浄後、AP-標識 mouse anti rabbit IgG (Dako; 2,000 倍希釈) を加え、室温で1時間インキュベートした。3回洗浄後、BCIP/NBT liquid substrate system (Sigma-Aldrich) により発色した。

抗 RNA ポリメラーゼ抗体 (Acris Antibodies, CA, USA ; 2,500 倍希釈) は細胞内マーカーとして使用した。2次抗体は、AP-標識 rabbit anti mouse IgG (3,000 倍希釈) を用いた。

4. *L. reuteri* の PGM への付着性の評価

ムチンが固定された 96 穴プレートを、2% (w/v) BSA-PBS で2時間ブロッキングした。10時間培養した *L. reuteri* JCM1081 を遠心分離 (6,000 ×g, 5分, 4°C) し、pH を調整した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.2) に 5×10^7 CFU/mL になるように菌数を調整した。PBS で3回各ウェルを洗浄した後、調製した菌液を 100 μL ずつ添加し、37°C で1時間インキュベートした。DMEM で2回洗浄後、0.1%(v/v) Triton X-100-PBS を 100 μL ずつ添加し、激しくピペッティングし回収した後、段階希釈し MRS 寒天培地に播種した。付着率 (%) = (付着した菌数 [CFU] / 添加した菌数 [CFU]) × 100 として算出した。

抗 EF-Tu 抗体による付着阻害のため、DMEM (pH5.0) に懸濁した菌液 (5×10^7 CFU/mL) に抗 EF-Tu 抗体 (50, 100, 200 倍希釈) を添加し、37°C で1時間インキュベートした。調製した菌液を 100 μL を付着試験に用いた。方法は、上記の通りである。

5. 統計処理

統計処理は、PRISM6 (GraphPad Software) により行った。各実験における統計処理方法は図の説明に記載した”n”はそれぞれの実験回数を示した。P値が0.05より小さい場合、有意差ありと判断した。

III 実験成績

1. *L. reuteri* JCM1081におけるEF-Tuの局在

L. reuteri JCM1081におけるEF-Tuの局在を抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。細胞内と細胞表層画分では、すべての培養時間においてEF-Tuのシグナルが検出された (図12)。一方、培養上清ではEF-Tuは培養時間6時間まで検出されたが、8時間以降の培養時間では顕著にEF-Tuのシグナルが弱くなった。また、細胞内マーカーであるRNAポリメラーゼ抗体は、培養上清画分には反応せず (図12)、EF-Tuの分泌は細胞溶解によるものではないことが示された。

次にpHを変化させた際のEF-Tuの局在について解析を行った。pH8.0の条件ではEF-Tuはほとんど細胞表層画分に局在せず、上清で検出された (図13)。一方、pH4.0の条件では、EF-Tuは細胞表層画分に局在し、上清では検出されなかった。また、RNAポリメラーゼ抗体は、細胞表層画分と上清画分には反応しなかった。従って、EF-Tuは弱アルカリ条件で上清に遊離し、弱酸性条件で細胞表層に局在することが示された。これはEF-Tuの等電点の前後で局在が変化した結果と一致した。

2. 他の*L. reuteri*におけるEF-Tuの局在

L. reuteri JCM1084, JCM1112^T, JCM2763, JCM2764におけるEF-Tuの局在を、同様に抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。*L. reuteri* JCM2763株での発現量は低かったが、すべての菌株で培養初期から定常期まで細胞表層におけるEF-Tuの局在が確認できた（図14）。

3. *L. reuteri* JCM1081のEF-Tuを介したPGMへの付着性の評価

L. reuteri JCM1081における付着因子としての機能を評価するために、抗EF-Tu抗体を用いたPGMに対する付着阻害試験を行った（図15）。*L. reuteri* JCM1081のPGMに対する付着性は、抗EF-Tu抗体の添加量依存的に阻害され、50倍希釈の条件で最も阻害された。一方、免疫前血清では*L. reuteri* JCM1081の付着性はほとんど変化せず、EF-Tuが細胞表層で付着因子として機能することが示された。

さらに、pH4.0から7.2の条件における*L. reuteri* JCM1081のPGMに対する付着性を評価した結果、pH4.0で最も高い付着性を示し、pHが中性に移行するに従い、付着性は低下した。これはEF-Tuの細胞表層局在および結合性のパターンと一致した（図16）。

IV 考察

L. reuteri JCM1081のEF-Tuは、培養初期から定常期まで細胞外に分泌され、細胞表層における局在は、培地中のpHの影響を受けることが示された。これらの結果は、*L. crispatus* ST1由来のGAPDHやEnolaseの局在に関する報告⁽⁷³⁾と類似した。すなわち、*L. crispatus* ST1のGAPDHとEnolaseは、*L. crispatus* ST1をこれらのタンパク質の等電点（GAPDH：5.2，Enolase：4.8）以下のpHの緩衝液で処理した際、緩衝液中にGAPDHと

Enolaseが遊離すると報告している。また、GAPDHとEnolaseは、*L. crispatus* ST1の細胞壁の構成成分である酸性リポテイコ酸（LTA）に静電的に結合することで、細胞表層における局在を可能としていることを示唆している⁽⁷³⁾。したがって、本節で得られた結果においても、緩衝液のpHが5.5から4.7の間に*L. reuteri* JCM1081におけるEF-Tuの局在が変化しており（図12）、これはEF-Tuの等電点4.9と極めて近い値であることから、GAPDHとEnolaseと同様に、EF-Tuの細胞表層局在にも電荷の関与が強く推察された。さらに、*L. reuteri* JCM1081のムチンに対する付着性は抗EF-Tu抗体処理により濃度依存的に阻害され、また、*L. reuteri* JCM1081のムチンに対する付着性はpH依存的でありpH 4.0で最も高くなった。以上の結果から、*L. reuteri* JCM1081が産生する乳酸による環境中のpH低下に伴い、EF-Tuは*L. reuteri* JCM1081の細胞表面に静電的にアンカーリングされ、さらにムチンや糖脂質の硫酸基をエピトープとする付着因子として機能することが考えられた。

これまで乳酸菌と硫酸化糖鎖との相互作用に関する研究が行われてきた。*Lactobacillus* ME-522 や *L. gasseri* ME-527 はスルホムチンとシアロムチンの双方に付着することが報告されているが、その付着機構や付着因子に関する知見は得られていない⁽³⁸⁾。また、*L. reuteri* の MUB₇₀ 変異ペプチドが Muc2 ムチンの硫酸化糖鎖に結合し、さらに粘液ガンのマーカーとして有用であることが示されているが、菌株における付着因子としての役割は関しては言及されていない⁽⁹²⁾。従って、乳酸菌における硫酸化糖鎖付着因子は、これまで明らかにされておらず、本研究が初めての報告例である。さらに、EF-Tu は他の *Lactobacillus* 属菌と非常に高いアミノ酸配列の相同性を示すことに加え、他の *L. reuteri* においても細胞表層における局在が示された。また、*L. johnsonii* NCC533 の EF-Tu も pH5.0 の

条件でムチンに対して付着性を示し, pH7.0 では付着性を示さないことが報告されている⁽⁶⁵⁾。したがって, *L. reuteri* JCM1081 の EF-Tu とその結合特性は類似する。以上のことから, EF-Tu は他の乳酸菌においても硫酸化糖鎖への特異性のある付着因子として機能すると考えられた。

第四節

スルホムチン付着性を示す *Bifidobacterium* の探索

I 緒言

Bifidobacterium は、偏性嫌気性細菌であり、生後すぐに優勢菌となり、乳児の糞便中からは $10^6 \sim 10^{10}$ cells/g 検出される⁽¹⁰⁹⁾⁽¹¹⁰⁾。さらに成人においても高い菌数を維持しており、ヒトの腸内細菌叢の約 90%を占める⁽¹¹¹⁾。*Bifidobacterium* のうちいくつかの菌株は、免疫活性化⁽¹²⁾、病原の排除⁽¹²⁾⁽¹³⁾など多岐にわたる有用効果が報告されており、プロバイオティクスとして特徴付けられてきた⁽¹¹²⁾。

Bifidobacterium のムチンを介した消化管への付着の過程は、腸内環境でのコロニー形成に重要であり、さらに生存をより有利にする性質として着目されてきた⁽¹¹³⁾。特に、*Bifidobacterium* は、ヒトの消化管下部に生息し、そこにはスルホムチンやシアロムチンといった酸性ムチンが豊富に存在する⁽⁸⁵⁾。したがって、酸性ムチンに付着性を示す *Bifidobacterium* は、腸内環境中における生存に対して有利にはたらくと仮説を立てた。これまで、表 2 に示したように、*Bifidobacterium* のムチンに対する付着因子として Type IV Tad pili⁽⁴⁷⁾や FimA⁽⁴⁵⁾などの線毛（様）付着因子、さらに Transaldolase Tal⁽⁷²⁾、BopA⁽⁵⁸⁾⁻⁽⁶⁰⁾が見出されてきた。しかしながら、それらは菌株に依存的であり、その結合エピトープに関して述べている報告は少なく、特に、酸性ムチンとの相互作用に関する研究例は少ない。

本論文では、第二章 第一節から第三節にわたり、*L. reuteri* の EF-Tu を介した硫酸化糖鎖への付着性に関して述べてきた。EF-Tu は、すべての細菌が保有するハウスキーピング因子であり、*Bifidobacterium* におい

でも高い配列保存性を示す(アミノ酸配列の相同性:86~38%)。そこで、*Bifidobacterium* においても EF-Tu を介したスルホムチンへの付着機構が存在すると仮説を立てた。そこで、第4章では、様々な宿主由来の *Bifidobacterium* 22 菌株を用いて、PCM への付着特性の評価を行うとともに、スルホムチンに付着性を示す *Bifidobacterium* の探索を行うこととした。さらに、EF-Tu の発現を評価することで、*Bifidobacterium* の消化管定着プロセスの一端を明らかにすることを目的とした。

II 材料と方法

1. 供試菌株および培養条件

本研究で用いた *Bifidobacterium* 22 菌株は表5に示した。これらの菌株は、American Type Culture Collection (ATCC; VA, USA) または森永乳業株式会社 (Tokyo, Japan) より分与された。0.05% (w/v) L-システインを添加した MRS 寒天培地あるいは MRS 液体培地において 37°C で嫌気培養した。

2. 96 穴プレートを用いた *Bifidobacterium* の PCM への付着性の評価

96 穴プレートに PCM を固定し、さらに 2% (w/v) BSA-PBS で 2 時間ブロッキングした。*Bifidobacterium* は、MRS 液体培地で OD₆₀₀ 2.0 付近になるまで嫌気培養した。これを遠心分離 (6,000 ×g, 5 分, 4 °C) し、PBS で 2 回洗浄後、10⁸ CFU/mL となるように DMEM に懸濁した。続いて、PBS で 3 回各ウェルを洗浄した後、菌液を 100 μL ずつ各ウェルに添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。DMEM で 2 回洗浄後、0.01%(v/v) Triton X-100-PBS を 100 μL ずつ添加し、激しくピペッティングすること

で菌を回収した。さらに、菌液を段階希釈し MRS 寒天培地に播種した。

抗ムチン抗体による付着阻害試験は、PGM34（100 倍希釈）あるいは HCM31 抗体（50 倍希釈）を PCM を固定した 96 穴プレートに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。0.1%(w/v) BSA-PBS で 2 回洗浄後し、調製した菌液 100 μ L を添加した。方法は、上記の通りである。

3. Biacore を用いた *Bifidobacterium* の PCM への付着性の評価

Bifidobacterium とムチンの相互作用は、Biacore X により解析した。方法は Uchida *et al.*, (2004) ⁽¹¹⁴⁾の方法に従った。粗精製あるいは精製 PCM を CM5 dextran sensor chips にアミンカップリング法により約 3,500 RU 固定化した。測定条件は 10 μ L/min, 25°C として、Running buffer は、HBS-EP (pH7.2) を用いた。*Bifidobacterium* は、MRS 液体培地で OD₆₀₀ 2.0 付近になるまで嫌気培養した。培養菌液を遠心分離 (6,000 \times g, 5 分, 4 °C) し、HBS-EP で 2 回洗浄後、10⁸ CFU/mL となるように HBS-EP に懸濁した。調製した菌液 100 μ L をアナライトとして用いた。解離開始時の RU 値を結合量とした。センサーチップの再生は、2M NaCl を 60 秒間添加した。

4. *Bifidobacterium* の細胞表層タンパク質の抽出

細胞表層タンパク質の抽出方法は第三節に記載した方法に従った。12 時間培養した *Bifidobacterium* (10¹⁰ CFU) を 5 M GuHCl により処理することで細胞表層タンパク質を得た。

5. ウェスタンブロット

ウェスタンブロットの方法は第三節に記載した方法に従った。

6. 統計処理

統計処理は、PRISM6により行った。各実験における統計処理方法は図の説明に記載した”n”はそれぞれの実験回数を示した。P値が0.05より小さい場合、有意差ありと判断した。

III 実験成績

1. *Bifidobacterium*のPCMに対する付着性の評価

Bifidobacterium 22菌株の粗精製あるいは精製PCMに対する付着性の評価はBiacoreを用いて行った。PCMへの付着性は菌株によって異なり、 $31.5 \pm 22.9 \sim 190.6 \pm 10.8$ RUであった（図17）。特に、粗精製ムチンと精製ムチンの間では付着性が大きく異なる菌株が存在した。22菌株の中で、*B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* PNC-2-9Gが精製ムチンに対して最も高い付着性を示した。また、*B. breve* M-16 V, *Bifidobacterium infantis* M-63, *B. longum* BB536, *B. bifidum* ATCC29521, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* PNC-2-9G, *B. thermophilum* S-501, *B. animalis* subsp. *animalis* MCC-1489, *B. animalis* subsp. *lactis* MCC-0525は、粗精製ムチンと比較し精製ムチンに対して有意に高い付着性を示した。一方、*B. bifidum* ATCC15696と*B. animalis* subsp. *lactis* JCM1253は、粗精製ムチンに対して高い付着性を示した。これらの結果は、*Bifidobacterium*のPCMへの付着性は、菌株依存的であり、ムチンの精製純度が付着性に影響を及ぼすことが示された。

2. *Bifidobacterium*のスルホムチンとシアロムチンに対する付着性

スルファターゼあるいはシアリダーゼ処理を行ったPCMに対する *Bifidobacterium* の付着性を評価した。また、本試験で用いた菌株は、精製ムチンに対して有意に高い付着性を示した8菌株を用いた。*B. longum* BB536, *B. bifidum* ATCC 29521, *B. animalis* subsp. *lactis* MCC-0525はスルファターゼ処理により付着性が有意に減少した(図18)。さらに、*B. longum* BB536と *B. animalis* subsp. *animalis* MCC-0525はシアリダーゼ処理により付着性が有意に減少した。一方、*B. animalis* subsp. *animalis* MCC-1489は、スルファターゼ処理により付着性が増加した。

次にPGM34あるいはHCM31モノクローナル抗体による *Bifidobacterium* の付着阻害試験を行った(図19)。PBM34抗体の処理により、*B. bifidum* ATCC29521の付着性は有意に減少した。また、*B. longum* BB536は、PGM34とHCM31抗体によって付着性が有意に減少した。*B. animalis* subsp. *lactis* MCC0525は、HCM31抗体で有意に減少したが、PGM34抗体では付着性は変化しなかった。コントロールであるIgMでは、有意な付着性の変化は認められなかった。

3. *Bifidobacterium*におけるEF-Tuの発現と局在

本試験で用いた菌株は、精製ムチンに対して有意に高い付着性を示した8菌株を用いた。すべての菌株において細胞内のEF-Tuのシグナルは検出された(図20)。一方、*B. thermophilum* S-501ではシグナルが弱く、発現量が低いこと、または、抗体の反応性が弱いことが考えられた。また、*B. breve* M-16 V, *B. longum* BB536, *B. bifidum* ATCC29521, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* PNC-2-9G, *B. thermophilum* S-501, *B. animalis* subsp. *lactis* MCC-0525でEF-Tuの細胞表層における局在が確認された。一方、*B. infantis* M-63と *B. animalis* subsp. *animalis* MCC-1489において細胞表層に

おける局在は全く検出されず，EF-Tuの細胞表層局在あるいは細胞外への分泌は，菌株依存的であることが示された。

IV 考察

第四節では，様々な分離源に由来する *Bifidobacterium* のスルホムチンへの付着性に着目し評価を行った。糖鎖付着性の観点から，精製純度の異なる粗精製ムチンと精製ムチンに対する *Bifidobacterium* の付着性の評価を検討した結果，ムチンの精製純度が大きな影響を及ぼすことが示された。また，粗精製ムチンに対する付着性が増加した菌株は，ムチン糖鎖より核酸やタンパク質など夾雑物に対して付着性を示したことによるものと考えられた。そこで，精製ムチンに対して付着性が増加した8菌株についてスルホムチン付着性について検討した。*B. longum* BB536, *B. bifidum* ATCC29521, *B. animalis* subsp. *lactis* MCC-0525がスルホムチンに対して付着性を示す菌株であることを見出した。一方，*B. longum* BB536と *B. animalis* subsp. *lactis* MCC-0525は，シアリダーゼ処理でも付着性が低下することから，これらの菌株の付着性は，スルホムチンとシアロムチンの認識性がある，もしくは静電的相互作用が示唆された。また，*B. longum* BB536と *B. bifidum* ATCC29521は，PGM34あるいはHCM31抗体により阻害されたことから，それぞれの抗体のエピトープ構造である6-sulfated blood-group H type 2 antigenあるいはSd^a blood group antigenに対しても付着性を示す可能性が示唆された。興味深いことに，*B. animalis* subsp. *animalis* MCC-1489は，スルファターゼにより増加した。この結果は，*Lactobacillus* ME-522 と *B. bifidum* MCC-1092の付着性が低下したことと極めて類似する⁽³⁸⁾。筆者らは，スルファターゼ処理により露出し

たGalやGlcNAcに付着するためであると考えており、*B. animalis* subsp. *animalis* MCC-1489の付着性も同様の性質をもつものと推察された。

次に、細胞表層におけるEF-Tuの局在を評価した。スルホムチン付着性を示した*B. longum* BB536, *B. bifidum* ATCC29521, *B. animalis* subsp. *lactis* MCC-0525においてEF-Tuのシグナルを検出することが出来た。一方で、スルホムチンに付着性を示さない*B. breve* M-16 V, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* PNC-2-9G, *B. animalis* subsp. *animalis* MCC-1489にもEF-Tuの細胞表層におけるシグナルが確認され、EF-Tuの局在とスルホムチン付着性に関して明確な関連性を見いだすことが出来なかった。また、*L. reuteri*のEF-Tuの細胞表層における存在量は、細胞内のEF-Tuと同程度のシグナルを示したが、*Bifidobacterium*の細胞表層における存在量は、半分程度であった。Granato *et al.*, (2003)⁽⁶⁵⁾も同様の報告をしており、細胞表層の構成成分の違いや細胞外への分泌量の違いによるものと推察された。したがって、*Bifidobacterium*のスルホムチン付着性と菌株におけるEF-Tuの付着因子としての役割は*Lactobacillus*と比較しながら、さらに解析する必要がある。

第三章

EF-Tu の分泌機構の解明

第一節

EF-Tu の分泌経路の探索

第二節

EF-Tu の分泌シグナルの探索

第一節

EF-Tu の分泌経路の探索

I 緒言

グラム陽性細菌において細胞外に分泌される多くのタンパク質は、細胞質で合成された後、いくつかのトランスポーターを介して細胞表層に提示される（図 21）。このようなタンパク質の N 末端には、数十アミノ酸残基の塩基性領域-疎水性のコア領域-極性領域からなる分泌シグナル配列をもち、シグナル配列依存的に分泌される⁽⁴⁰⁾⁽¹¹⁵⁾。現在、グラム陽性細菌で報告されている主な分泌シグナル配列は、① Sec シグナル配列、② Twin-arginine (R/R または K/R) シグナル配列、③ リポタンパク質シグナル配列、④ Pseudopilin-様シグナル配列、⑤ バクテリオシンシグナル配列（リーダー配列）が挙げられる⁽¹¹⁵⁾。Sec, Tat, リポタンパク質分泌シグナル配列をもつタンパク質は Sec あるいは Tat 輸送経路⁽⁴⁰⁾⁽⁴²⁾⁽¹¹⁶⁾, Pseudopilin は Com 輸送経路⁽¹¹⁷⁾, バクテリオシンシグナル配列をもつタンパク質は ABC 輸送経路により分泌される⁽¹¹⁸⁾。従って、タンパク質の分泌経路は、分泌シグナル配列により厳密に決定される⁽⁴⁰⁾。

このような分泌シグナルの配列的特徴に基づき、細胞外に分泌されるタンパク質を予測する SignalP⁽¹¹⁹⁾や TATP⁽¹²⁰⁾などのプログラムが開発されており、*Bacillus subtilis* では約 300 種類のタンパク質がこれらの経路で輸送されると予測される⁽¹²¹⁾⁽¹²²⁾。一方、*Bacillus subtilis* のプロテオーム解析では、約 600 種類ものタンパク質が細胞外に分泌されることが報告されていることから⁽¹²³⁾, 先に示したようなプログラムで分泌経路が予測出来るタンパク質は、全分泌タンパク質の半数程度に過ぎない。分泌

シグナル非依存的な分泌経路として、*Bacillus anthracis* や *B. subtilis* の α -Enolase が膜小胞を介して細胞外へと分泌される経路や⁽¹²⁴⁾⁻⁽¹²⁶⁾、溶菌によるタンパク質の細胞外への移行経路が示唆されている⁽¹²⁷⁾⁽¹²⁸⁾。しかしながら、既知の分泌シグナル配列が保存されていないタンパク質の分泌経路に関しては、菌株やタンパク質依存的であることから、配列的予測は困難であり不明な点が多い。さらに、*Lactobacillus* 属乳酸菌のタンパク質の分泌機構に関する研究は極めて遅れており、タンパク質の分泌経路に関する研究例はほとんど無い。

第二章において、*L. reuteri* の硫酸化糖鎖結合タンパク質として Elongation factor Tu (EF-Tu) を同定し、その付着特性と細胞表層における局在を見出してきた。EF-Tu は、EF-Tu・GTP 複合体を形成しアミノアシル tRNA と結合し、リボソーム上で A 部位から P 部位へとアミノ酸を運搬する細胞質内で機能をもつ因子である⁽¹²⁹⁾。このような細胞質内で役割をもつタンパク質であるにも関わらず、多くの EF-Tu が細胞外へと移行していることを見出した。さらに、*L. reuteri* における EF-Tu の分泌は、溶菌ではないことが示されたことから、何らかの分泌装置が関与する推測した。そこで、第三章・第一節では、EF-Tu 分泌経路の探索を行うこととした。

II 材料と方法

1. 供試菌株および培養条件

L. reuteri JCM1081 と *L. reuteri* JCM1112^T は、MRS 寒天培地で 37°C で 24 時間嫌気培養し、MRS 液体培地で静置培養した。クローニングホストとして、*Lactococcus lactis* IL1403 は、0.5 % (w/v) グルコース含有 M17 培

地 (Difco) を用いて 30°C で培養した。 *E. coli* DH5a 株あるいは Rosetta 2 株は, LB 寒天培地あるいは LB 液体培地において 37°C で振とう培養した。 *L. reuteri* JCM1081 には, エリスロマイシン (Em) 10 µg/mL あるいは Cm (20 µg/ml) を添加した。 *Lac. lactis* IL1403 には, Em (10 µg/mL) を添加した。 *E. coli* には, Amp(100 µg/mL), Km(40µg/mL), Cm(30 µg/mL) を添加した。

2. 組み換え Enolase タンパク質の発現と精製

発現用ベクター pET28b を用いて, N 末端に 6×His tag を融合した組み換え Enolase タンパク質 (His₆-Enolase) の発現を行った。方法は, 第二章・第二節に従った。 Enolase 遺伝子 (*eno*) は, プライマー EnoF 5'-CATATGTTAAGTGGAATTGCTTTCCAA-3' (下線部は *NdeI* 認識配列) と EnoR 5'- CTCGAGTTAACGATTTTCGATGTCTTG-3' (下線部は *XhoI* 認識配列) を用いて PCR により増幅した。 pGEM-T easy にクローン化後 (pGEM-T easy-*enolase*)。 *NdeI* と *XhoI* により目的配列を切り出し, pET28b にクローン化し, *E. coli* Rosetta2 に形質転換した。 250mL の LB 液体培地で (Km⁺, Cm⁺) 37 °C で振とう培養し, OD₆₀₀ 0.4 まで培養後, IPTG (0.5 mM) を添加し, さらに 5 時間培養した。遠心分離 (8,000 ×g, 5 分, 4 °C) を行い, ペレットを PBS で洗浄した。続いて, BugBuster protein extraction reagent により溶菌後, 超音波破碎機により DNA を切断した。これを HisTrap HP カラムを用いて精製した。続いて, 10 mM HEPES 緩衝液 (20 mM NaCl, pH 6.5) で透析し, さらに HiTrap DEAE FF カラムを用いて精製した。 10 mM HEPES 緩衝液 (20 mM NaCl, pH 6.5) で透析し, アミコンウルトラ -4 10kDa で濃縮した。得られたタンパク質は, SDS-PAGE (12.5 % acrylamide) に供し CBB を用いて染色した。タンパク質濃度は

BCA-Protein Assay で測定し使用するまで -80°C で保存した。また，得られた His₆-Enolase を抗原とし，SPF ウサギを免疫動物としてポリクローナル抗体を作製した。

3. *Lac. lactis* IL1403 のコンピテントセルの作製

Lac. lactis IL1403 株を M17 寒天培地で一晚培養し，5 mL の 0.5 (w/v)% グルコース添加 M17 液体培地で一晚培養した。培養液を 200 mL の M17 液体培地 (0.5% [w/v] グルコース，0.5 M スクロース，1% [w/v] グリシン) に 1 (v/v) % 加え，OD₆₀₀ 0.6 になるまで 30°C で培養した。培養菌液を遠心分離 ($6,000 \times g$ ，10 分， 4°C) したあと上清を捨て，冷電ロポレーション緩衝液 (0.5 M スクロース，10% [w/v] グリセロール) により洗浄を 2 回洗浄した。洗浄後，冷電ロポレーション緩衝液を 2 mL 加えて懸濁し，50 μL ずつ菌液を分注し， -80°C で保存した。

4. *Lac. lactis* IL1403 の形質転換

-80°C で保存されていたコンピテントセル (50 μL) を氷上で融解し，プラスミド DNA を約 300 ng 加え，氷上で冷やしておいた電ロポレーション用キュベットに入れ，氷上で 10 分間静置した。ジーンパルサー (Bio-Rad) を用いた電ロポレーション (25.0 μF ，2.0 KV，200 Ω) により形質転換を行った。直ちにキュベットをジーンパルサーから取り出し，1 mL の回復 M17 液体培地 (M17 液体培地；0.5 M スクロース，10 mM CaCl₂，0.5% [w/v] グルコース) を加え， 30°C で 2 時間培養した。Em (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加 M17 寒天培地に播種し， 30°C で一晚培養した。

5. *L. reuteri* のコンピテントセルの作製

コンピテントセルの作製は、MQ Wei *et al.*, (1995)⁽¹³⁰⁾の方法の一部を変更し行った。*L. reuteri* JCM1081 株を 5 mL MRS 液体培地で一晚培養した。2%(w/v)グリシン添加 5 mL MRS 液体培地に培養液を 2%(v/v)加え、OD₆₀₀ 0.8~1.0 になるまで 37°C で培養した。次に、2%(w/v)グリシン添加 100 mL MRS 液体培地に培養液を 2%加え、OD₆₀₀ 0.2~0.3 の時点になったら Amp (10 µg/mL) を添加し、OD₆₀₀ 0.5 なるまで 37°C で培養した。培養菌液を遠心分離 (6,000 ×g, 10 分, 4 °C) し、上清を除き、冷電ロポレーション緩衝液 (0.5 M スクロース, 7 mM リン酸カリウム, 1 mM MgCl₂) により洗浄を 2 回行った。洗浄後、冷電ロポレーション緩衝液を本培養培地の 1/200 量加えて懸濁し、100 µL ずつ菌液を分注し氷上で保存した。

6. *L. reuteri* の形質転換

プラスミド DNA を 500 ng 加え、氷上で冷やしておいた電ロポレーション用キュベットに入れ、氷上で 10 分間静置した。電ロポレーション (25.0 µF, 1.7 KV, 200 Ω) により形質転換を行った。1 mL の回復 MRS 液体培地 (MRS 培地, 2 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂, 0.5 M スクロース) を加え、30°C で 4 時間培養した。Em (10 µg/mL) 添加 MRS 寒天培地に播種し、30°C で一晚培養した。

7. *L. reuteri secY* 変異株の作製

L. reuteri JCM1081 の *secY* 遺伝子欠損株は温度感受性ベクター pGhost6⁺ (Appligene, Pleasanton, CA, USA) を用いて、2 点相同組み換え法により作出した。*L. reuteri* JCM1081 のゲノム DNA を鋳型として、*secY* の遺伝子 (1,316 bp) をプライマー KN501:

5'-CTCGAGTTGTTGTCACAGCCGTCAAAAA-3' (下線部は *Xho*I 認識配列)
／KN502: ACTAGTTTAGTCATTTCTCCTTTAGGT-3' (下線部は *Spe*I 認識配列) を用いて PCR により増幅し, pGEM-T easy にクローン化した (pGEM-T easy *secY*)。続いて, pGEM-T easy *secY* を鋳型として, プライマー KN505: 5'-GGATCCAATCCAATTCCCATCCATAA-3'／KN506: 5'-GGATCCTGTTACTCTTGTTATTGTTG-3' (下線部は共に *Bam*I 認識配列) を用いてインバース PCR により増幅し, *secY* の 1,150bp の位置に *Bam*HI 認識配列を導入した。pGK12 由来⁽¹³¹⁾の Cm 耐性遺伝子 (*cm^r*, 855bp) を プライマー MH10: 5'-GGATCCGTAACGACGGCCAGT-3' ．
／MH11: 5'-GGATCCCAGGAAACAGCTATGAC-3' (下線部は共に *Bam*I 認識配列) を用いて PCR により増幅し, 末端を *Bam*HI で処理した。*Bam*HI 処理した pGEM-T easy *secY* に *cm^r* を T4 DNA リガーゼ (Promega) を用いてライゲーションした。次に, *Spe*I および *Xho*I を用いてプラスミドを切断後, あらかじめ *Spe*I および *Xho*I で処理した温度感受性プラスミド pGhost6⁺にライゲーションすることで pGhost6⁺*secY::cm^r* を得て, これを *E. coli* DH5 α に形質転換した。得られたプラスミドは, *L. reuteri* JCM1081 の野生株に形質転換した。

Em (10 μ g/ml) 添加 MRS 寒天培地に播種し, 30°C で一晩培養した。無作為に選択した形質転換体のコロニーをプラスミド側の抗生物質 (Em) を含んだ 5 mL の液体培地 (10 μ g/mL) に植え, 30°C で一晩培養した。培養液を 1,000 倍希釈し, 希釈した菌体液 10 μ L を 100 mL MRS 培地 (Em, 10 μ g/mL) を含んだ培地に添加した。30°C で 3 時間培養したのち, 41.5 °C の水槽インキュベーターに移し一晩培養した。培養液 10 μ L を 1 mL の新しい培地で 1,000 倍希釈し, 希釈した菌体液 10 μ L を 100mL MRS 液体培地 (抗生物質なし) に添加した。これを 28°C で 12 時間培養した。菌液を

10⁴~10⁷倍まで培地で希釈し、①Em (10 µg /mL) 添加 MRS 寒天培地と②Cm (20 µg/mL) 添加 MRS 寒天培地に播種した。これらを 41.5 °Cで一晩培養した。Cm を添加した MRS 培地で生えたコロニーを①および②の培地にそれぞれ 1,000 個ずつ植菌し、41.5 °Cで一晩培養した。Em に感受性を持ち Cm に耐性を持つ株の選抜をおこなった。さらに、DNA ゲノムの組み換えを確認するため、*secY* 全長を増幅するプライマー KN501 / KN502 を用いて PCR をおこなった。

8. *L. reuteri* への *secA* の導入と発現

L. reuteri JCM1081 の *secA* の推定プロモータを含む領域をプライマー KN533 : 5'- GAATTCATTTATACTATGAACGTGGTAA-3' (下線部は *EcoRI* 認識配列) / KN534 : 5'- CTCGAGTTAACGTGTTACATTTTGCCG-3' (下線部は *XhoI* 認識配列) を用いて PCR を行った。増幅産物を pGEM-T easy にクローン化し、pGEM-T easy *secA* を得た。これを *EcoRI* および *XhoI* で処理し、あらかじめ *EcoRI* および *XhoI* で処理した乳酸球菌由来プラスミド pIL253 に導入し、pIL253 *secA* を得た。これを中間宿主である *Lac. lactis* IL1403 に形質転換し、さらに *L. reuteri* JCM1081 野生株に形質転換した。

9. *L. reuteri* の生育試験

L. reuteri JCM1081 の生育試験は、Yang *et al.*, (2011)⁽¹²⁶⁾の方法に従った。*L. reuteri* JCM1081 株を MRS 寒天培地で培養し、シングルコロニーを 5 mL MRS 液体培地で一晩培養した。培養液を 100 mL MRS 液体培地に 2% (v/v) 加え、37°C で培養した。各培養時間の波長 600nm おける吸光度を測定した。また、培養液を 10 mL 回収しこれをウエスタンブロットに供した。なお、以下に示す 1) ~ 3) の試薬を添加した。

1) *L. reuteri* JCM1081 を 10 時間培養後、タンパク質合成阻害剤として Cm (20 µg/mL) を添加した。Cm を添加後、さらに 4 時間培養した。

2) 培養開始時に ATPase 阻害剤として 1 mM アジ化ナトリウム (NaN₃) を添加し、12 時間培養した。

3) 培養開始時にセリンプロテアーゼ阻害剤として 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF, Sigma-Aldrich) を添加し、12 時間培養した。

10. *L. reuteri* のタンパク質の分画

細胞表層および培養上清画分を細胞外画分 (Extracellular fraction) とした。培養菌液 10 mL を回収し、遠心分離 (16,000 ×g, 10 分, 4 °C) し、ペレットに 1mL の抽出溶液 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1mM EDTA [pH8.0]) を加え、4 °C で 15 分振とうした。続いて、遠心分離 (16,000 ×g, 10 分, 4 °C) を行い、上清を回収し、これを培養上清と合わせた。さらに、0.22 µm シリンジフィルターに通した後、10%(w/v)TCA 沈殿を行い、200µL の 25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM EDTA に溶解した。菌体は、25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM EDTA に懸濁後、0.1-mm zirconia-silica beads (0.3 g) を加え、Bead beater (4,800 rpm, 180 秒) により細胞を破砕した。方法は第二章・第二節の通りである。得られたタンパク質の濃度の測定は、BCA Protein Assay Kit を用いて行い、10µg のタンパク質を SDS-PAGE に供した。タンパク質は、CBB R250 または Silver Stain Rescue Reagent (Thermo Scientific) により染色した。

11. *L. reuteri* の膜小胞および膜画分の分画

L. reuteri からの膜小胞および膜画分の精製は、Yang *et al.*, (2011)⁽¹²⁶⁾ の方法に従った。12 時間培養した 250mL の菌液を遠心分離 (10,000 ×g, 10

分, 4 °C) した。ペレットに 5mL の 50 mM Tris-HCl (pH8.0) を添加して懸濁後, 1.35M スクロース, 4mg リゾチーム (Sigma-Aldrich), 62.5U ムタノライシン (Sigma-Aldrich) を添加し, 37 °C で 3 時間振とうした。遠心分離 (16,000 × g, 10 分, 4 °C) 後, 上清を細胞壁画分とした。ペレットは, 3mL の 1.35M スクロースを含む 50 mM Tris-HCl (pH8.0) に懸濁した。超音波破碎機を用いて出力 45 % で 30 分間 (5 秒間隔) 処理することで菌体を破碎した。遠心分離 (16,000 × g, 20 分, 4 °C) し, ペレットは菌体画分とした。上清は超遠心分離し (45,000 × g, 60 分, 4 °C), 得られたペレットは, 50µL 50 mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解し, これを膜小胞および膜分画とした。超遠心分離で得られた上清 10% (w/v) TCA 沈殿を行い, 200µL の 25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM EDTA に溶解した。これを可溶画分とした。得られたタンパク質の濃度の測定には BCA Protein Assay Kit を用い, 20µg のタンパク質を SDS-PAGE に供した。

12. ウエスタンブロット

タンパク質サンプルは, SDS-PAGE (12.5% acrylamide または 7.5-20% acrylamide) に供し, PVDF 膜に転写した。方法は第二章・第三節の通りである。抗 EF-Tu 抗体 (1,500 倍希釈), 抗 RNA ポリメラーゼ抗体 (1:2,500 倍希釈), 抗エノラーゼ抗体 (1,500 倍希釈) を使用し, 室温で 1 時間インキュベートした。2 次抗体は, AP-標識 rabbit anti rabbit IgG または AP-標識 mouse anti rabbit IgG (共に 2,500 倍希釈) を添加し, BCIP/NBT liquid substrate system により発色した。

13. 配列の解析

シグナル配列の解析は, SignalP 4.1

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 疎水性の解析は Kyte and Doolittle hydrophathy profile

(<http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm>) により行った。

Ⅲ 実験成績

1. *L. reuteri* JCM1081 由来 EF-Tu の N 末端配列解析

図 22 に EF-Tu の N 末端の 300 塩基配列と, それに対応するアミノ酸配列を示した。本領域には, R/R もしくは R/K は保存されておらず(図 22A), また, SignalP ver. 4.1 による解析結果, シグナルペプチダーゼによる認識配列は確認されなかった(図 22B)。

2. His₆-Enolase の発現と精製

His₆-Enolase は, *E. coli* Rosetta2 を宿主として発現させ, His-trap HP カラムを用いて精製した。SDS-PAGE に供し, CBB で染色した結果, アミノ酸配列から予測された分子量である約 48 kDa の位置に単一バンドのシグナルが検出された(図 23A)。さらに, His₆-Enolase を抗原として作製した抗 Enolase 抗体を用いて *L. reuteri* JCM1081 の全菌体画分に対してウェスタンブロットを行った結果, 単一バンドのシグナルが検出できた(図 23B)。

3. 種々の阻害剤が *L. reuteri* JCM1081 の EF-Tu の分泌に及ぼす影響

EF-Tu の分泌に能動的輸送機構が関与するか検討するために, タンパク質合成阻害剤として Cm を培養時間 10 時間に添加し, その後 4 時間にわたり EF-Tu の分泌量を確認した(図 24A)。EF-Tu は, 定常期でも分泌

され続け、さらに Cm を添加してもその分泌量に変化は認められなかった (図 24B)。また Cm 添加区では、培養時間 14 時間で細胞内と細胞外の EF-Tu の存在量が同程度になった。

次に、ATPase の阻害剤としてアジ化ナトリウムを培養開始時に添加し、培養時間 12 時間における EF-Tu の分泌を確認した (図 25A)。アジ化ナトリウムの添加は生育には影響を及ぼさず、EF-Tu の細胞外への分泌量は劇的に低下した (図 25B)。また、*L. reuteri* JCM1112^T でも同様の結果が得られた (データは示していない)。一方、Enolase の分泌はアジ化ナトリウムの添加により変化しなかった (図 25C)。

さらに、セリンプロテアーゼの阻害剤として PMSF を培養開始時に添加し、培養時間 12 時間における EF-Tu の分泌を確認した。PMSF の添加は生育には影響を及ぼさず (図 26A)、また EF-Tu の分泌量の変化も認められなかった (図 26B)。

4. 膜小胞を介した EF-Tu の分泌の評価

EF-Tu の分泌に関して検討を行った (図 27A)。全細胞 (Whole cell)、細胞壁 (Cell wall)、細胞膜を含まない細胞内画分 (Soluble) では EF-Tu のシグナルはすべて確認されたが、膜小胞を含む膜画分 (Membrane) においては EF-Tu のシグナルは検出されなかった (図 27A)。さらに 5 倍濃縮したサンプルにおいても、Membrane 画分における EF-Tu のシグナルは微弱であり、分泌量と比較しても少ないことから、膜小胞を介した EF-Tu の分泌は殆ど無いことが示唆された。

一方、同様の各画分に対する抗 Enolase 抗体の反応を確認した結果 (図 27B)、Membrane 画分において Enolase のシグナルが検出され、さらに濃縮サンプルでは、シグナル強度の増加が認められたことから、*L. reuteri*

JCM1081におけるEnolaseの分泌には、膜小胞が関与することが強く示唆された。

5. *L. reuteri* JCM1081の*secY*変異株の作製とタンパク質の分泌の評価

L. reuteri JCM1081の*secY*変異株の作製を試みた。以前の報告により、大腸菌のSecYの9番目の膜貫通領域とそのN末端側の細胞質内領域を欠失した変異株は、膜透過を促進する活性はないが、他の因子と相互作用する活性は保持する機能変異株が作出されている⁽¹³²⁾。そこで、*L. reuteri* JCM1081のSecYの9番目の推定膜貫通領域に温度感受性プラスミドを用いて*cm^r*遺伝子を2点相同組み換えにより挿入することで、*L. reuteri* JCM1081の*secY*変異株の作出を試みた(図28A)。得られた3菌株に対して*Cm^r*遺伝子のゲノムDNAへの挿入を確認する為、*secY*全長を増幅するプライマーを用いて確認した結果、約850bpの*cm^r*遺伝子の挿入が確認出来た(図28B)。次に、*secY*変異株の増殖を確認した結果、培養時間4時間までは野生株と同程度の増殖を示したが、対数期以降は遅れ、野生株の半分程度の増殖曲線を示した(図28C)。さらに、10時間培養した*secY*変異株の分泌タンパク質を確認した結果、野生株と比較して劇的にタンパク質の分泌パターンが異なることが認められた(図28D)。続いて、*secY*変異株のEF-TuとEnolaseの分泌をウエスタンブロットにより評価した

(図29)。*secY*変異株の細胞外面分におけるEF-Tuのシグナルは全く確認されず、EF-Tuの分泌は認められなかった(図29A)。また、RNA-ポリメラーゼのシグナルは、野生株と*secY*変異株の細胞外面分に検出されないことから、溶菌は生じていないことが示された(図29B)。一方、Enolaseは、野生株と*secY*変異株共に細胞外面分で同程度のシグナルが確認され

た。したがって、EF-Tuとは異なり、Enolaseの分泌は、*secY*変異による影響を受けないことが示された（図29C）。

6. *L. reuteri* JCM1081 の *secA* 導入株における EF-Tu の分泌の評価

続いて、*L. reuteri* JCM1081 野生株に乳酸球菌プラスミド pIL253 を用いて *secA* の過剰発現株を作成し、EF-Tu の分泌に及ぼす影響を確認した。それぞれの菌株の全細胞画分の SDS-APGE により、SecA の推定分子量である約 90 kDa の位置のタンパク質の発現増加が認められた（図 30A）。培養時間 10 時間の EF-Tu の分泌を比較した結果、*secA* 導入株において EF-Tu の分泌量の顕著な増加が認められた（図 30B）。

IV 考察

第一節では、*L. reuteri* JCM1081 の EF-Tu の分泌経路について検討した。本節で得られた結果から、①EF-Tuには、SecあるいはTAT依存性の分泌シグナル配列は保存されていない、②EF-Tuは、ATPase活性を必要とする能動的輸送機構により分泌される、③EF-Tuの分泌は、膜小胞を介した分泌ではない、④SecYがEF-Tuの分泌に関与する、以上の四点から、EF-Tuは、Sec輸送経路が関与する能動的輸送機構により分泌されることが強く推察された。

*L. monocytogenes*においてSecAのアクセサリタンパク質である*secA2*欠損株のプロテオーム解析により、EF-Tuを含む複数の既知の分泌シグナル配列を持たないタンパク質の分泌が低下することから、これらの分泌にSecA2が関与することを示唆した報告がある⁽¹²⁷⁾。しかし、同時に溶菌酵素の分泌も低下していることから、SecA2依存性の溶菌酵素がこれらの

タンパク質の分泌に寄与することを示している⁽¹²⁷⁾。一方、本研究の結果では、*L. reuteri*の細胞外面分においてRNAポリメラーゼのシグナルは検出されず、さらにPMSFの添加はEF-Tuの分泌に影響しないことから、*L. reuteri*の溶菌による分泌でないことが示された。また、*L. monocytogenes*では*secA*と*secA2*はそれぞれゲノム上に単一コピー遺伝子としてコードされているが、*L. reuteri*では、*secA2*またはその他のアクセサリSec因子を構成するクラスターは保存されていない⁽¹⁵⁾。したがって、EF-Tuの分泌には、*L. monocytogenes*で報告されているSecA2依存性の溶菌酵素が寄与する分泌機構の可能性は低いと考えられた。

EF-Tuの分泌は、タンパク質合成阻害剤として添加したCmの影響をほとんど受けず、一定の菌濁度を保持しながら、細胞内のEF-Tuが減少しても細胞外へと分泌され続けた。これらの結果は、EF-Tuが定常期において細胞内にプールされること、EF-Tuの分泌には新たなタンパク質の合成を必要としないことを示すものである

さらに、*L. reuteri*のEF-Tuの分泌は、ATPase活性の阻害剤であるアジ化ナトリウムの添加により抑制された。以上の結果から、EF-Tuの分泌に、能動的輸送機構の関与が示唆された。アジ化ナトリウムは、Sec輸送経路のモータータンパク質SecAのATPaseの阻害と⁽¹³³⁾、膜貫通チャネルSecYの細胞内6回膜貫通領域へのSecAへの結合を阻害することから⁽¹³⁴⁾、Sec依存性のシグナル配列をもつタンパク質の阻害剤として用いられる⁽¹¹⁵⁾⁽¹²³⁾⁽¹³⁵⁾。一方、今回の結果と同様、Sec分泌シグナル配列をもたないSec依存性のタンパク質の分泌阻害が報告されている。*Rhizobium leguminosarum*のSuperoxide dismutase (SodA)は、*tatC*変異株では分泌は変化せず、アジ化物の添加によりSodAの分泌が減少すること、さらに*E. coli*の*secA*温度感受性変異株においてSodAの分泌が著しく減少すること

から、SodAの分泌はSecA依存性であると結論づけている⁽¹³⁶⁾。本実験においても、EF-Tuの分泌がアジ化ナトリウム感受性であったことに加え、*secY*変異株のEF-Tuの細胞外への分泌は完全に消失しており、以上の結果から、*L. reuteri*におけるEF-Tuの分泌には、Sec輸送経路の関与が強く推察された。また、SecAは、タンパク質の膜透過が正常な状態では自身の発現を抑制しているが、SecAの過剰発現では抑制機構は機能出来ず、それに伴い、タンパク質の分泌が増加することが報告されている⁽¹³⁷⁾⁽¹³⁸⁾。*L. reuteri* JCM1081野生株におけるSecAの過剰発現は、EF-Tuの分泌量に影響を及ぼした。したがって、*L. reuteri*のEF-Tuの分泌がSecAの発現量に正の相関を示したことは、EF-Tuの分泌にSec輸送経路が関与するという上記の推論を支持するものである。

また、興味深いことに、*L. reuteri*のEnolaseの分泌にアジ化ナトリウム添加は影響せず、さらにEnolaseの分泌は、膜小胞を介した分泌機構が関与することが示された。*B. subtilis*の α -Enolaseの分泌はアジ化ナトリウムの添加に影響を受けないことが報告されている⁽¹²⁶⁾。また、*Bacillus anthracis*の α -Enolaseは、膜小胞を形成することで細胞外へと移行する経路が示されている⁽¹²⁵⁾。したがって、*L. reuteri*においても、EF-Tuとは異なる経路でEnolaseが分泌される可能性が考えられた。これらの結果は、*L. reuteri secY*変異株においてEnolaseの分泌が変化しないことと一致し、野生株と同様に *L. reuteri secY*変異株の特定の分泌機構は正常に機能していることが示唆された。しかしながら、*L. reuteri secY*変異株の相補株が得られなかったことや、タンパク質発現パターンが野生株と比較して大きく異なることから、*secY*変異による他の輸送機構の発現や構築への影響も考えるべきである。また本研究で得られた *Lactobacillus*属における

*secY*変異株の作出は初めての報告であり，プロテオミクス解析など網羅的解析を行うことで，より具体的な新知見が得られるものと期待される。

第二節

EF-Tu の分泌シグナルの探索

I 緒言

第三章・第一節では、*L. reuteri* JCM1081 の EF-Tu の細胞外への分泌に Sec 輸送経路が直接的または間接的に関与することが示された。Sec 輸送経路を構成する主な因子は、モータータンパク質であり ATPase 活性をもつ SecA と膜貫通チャネル複合体 SecYEG からなる。Sec 分泌シグナル配列依存性のタンパク質の分泌機構は、分泌シグナル配列をもつタンパク質がリボソーム上で合成されると、大腸菌では 4.5S RNA，枯草菌などのグラム陽性細菌では，scRNA (small cytoplasmic RNA) がタンパク質性因子 Ffh (fifty four homolog) と複合体を形成する⁽¹³⁹⁾。この複合体が SRP (Signal recognition particle) と呼ばれ，SRP がシグナル配列に結合すると，タンパク質のフォールディングが抑制され，高次構造が形成される前に，Sec 輸送システムへと運ばれる⁽¹⁴⁰⁾。一方で SecA が直接的にシグナル配列に結合する分泌機構も報告されており，SPR が膜透過反応に必須因子であるとは限らない⁽¹⁴¹⁾⁽¹⁴²⁾。

タンパク質の透過は，前駆体タンパク質あるいは SRP-前駆体タンパク質複合体と結合した SecA が，2 量体から単量体になる構造変化に伴い膜内にタンパク質を挿入する⁽¹⁴³⁾。このとき SecA は，前駆体タンパク質が相互作用することで，ATPase 活性の負制御が解除され，活性が急激に増加することが知られている⁽¹⁴⁴⁾⁻⁽¹⁴⁶⁾。また，プロトン駆動力による膜透過促進にも SecA が関与しており，SecA は膜透過反応において中心的な役割を果たしている。続いて，SecYEG の内部に前駆体タンパク質を押し込

み細胞外へと輸送する⁽¹⁴⁷⁾。したがって、前駆体タンパク質が SecA と相互作用し、SecA の ATPase 活性を活性化することが Sec 輸送経路の最初の重要なステップである。

一方、近年、既知の分泌シグナル配列非依存性のタンパク質の分泌機構に関して興味深い報告がある。*B. subtilis*の α -Enolaseの内部に存在する疎水性 α ヘリックス領域の19アミノ酸残基（EMドメイン）⁽¹²⁶⁾とN末端の140アミノ酸残基に含まれる α ヘリックス構造（HHドメイン）⁽¹⁴⁸⁾、この2つの領域が分泌シグナルのように機能することが示されている。

*Streptococcus pyogenes*のGAPDHは、C末端に存在する疎水性の12アミノ酸残基を欠損するとGAPDHが分泌されなくなり⁽¹⁴⁹⁾、*S. pyogenes*の付着性や抗食作用が著しく低下することが報告されている⁽¹⁵⁰⁾。さらに、Yang *et al.*, (2011)⁽¹²⁶⁾は、 α -Enolaseの分泌には、 α ヘリックス構造の維持が重要であることから、TAT経路の関与を示唆している。*R. leguminosarum*のSodAでは、N末端の10アミノ酸残基が分泌に寄与し、Sec輸送経路により分泌されることが示されている⁽¹³⁶⁾。このように、近年、既知の分泌シグナルとは異なる特定のアミノ酸領域がタンパク質の分泌に寄与することが報告されている。第一節で述べたように、EF-TuにはSec輸送経路が直接的または間接的に関与することが示唆されたが、既知のSec依存性シグナル配列は保存されていない。そこで、第二章では、EF-Tuの分泌に関与する新規シグナルの探索を行うこととした。次に、EF-Tuの推定分泌シグナルとSecAとの相互作用を検討することで、EF-Tuの分泌シグナル配列としての役割を評価することとした。

II 材料と方法

1. 供試菌株の培養条件

L. reuteri JCM1081 は MRS 寒天培地で 37°C で 24 時間嫌気培養し, MRS 液体培地で静置培養した。クローニングホストとして, *Lac. lactis* IL1403 は, 0.5 % (w/v) グルコース含有 M17 培地を用いて 30°C で培養した。*E. coli* DH5a 株, JM109 株あるいは Rosetta 2 株は, LB 寒天培地あるいは LB 液体培地において 37°C で振とう培養した。*L. reuteri* JCM1081 あるいは *Lac. lactis* IL1403 には Em (10 µg/mL) を添加した。*E. coli* には, Amp (100 µg/mL), Km (40 µg/mL), Cm (30 µg/mL) 添加した。

2. FLAG タグ付加 EF-Tu (EF-Tu^{FLAG}) の作製

L. reuteri JCM1081 の EF-Tu に FLAG タグを導入する為, プライマー KN514: 5'-GAATTCTCAGGAGGTTTCATTAATCGACTACAAAGACGATGACGACAAGGCTGAAA-3' (下線部は *Eco*RI 認識配列) / KN515: 5'-CTCGAGTTAGTCTAAGATGTCGGATACAACACCGGCAC-3' (下線部は *Xho*I 認識配列) を用いて PCR を行い, EF-Tu の N 末端に FLAG タグを付加した。また, 同様に C 末端に FLAG タグを導入する為, プライマー KN512: 5'-GCC GAATTCTCAGGAGGTTTCATTAATGGCTGAAAAAG-3' (下線部は *Eco*RI 認識配列) / KN513: 5'-CTCGAGTTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCGTCTAAGATGTC-3' (下線部は *Xho*I 認識配列) を用いて PCR を行った。それぞれの増幅産物を pGEM-T easy にクローン化し, pGEM-T easy EF-Tu^{N-FLAG} と pGEM-T easy EF-Tu^{C-FLAG} をそれぞれ得た。これを *Eco*RI および *Xho*I で処理し, あらかじめ *Eco*RI および *Xho*I で処理した乳酸球菌由来プラスミド pIL253 に導入し, pIL253 EF-Tu^{N-FLAG} と pIL253 EF-Tu^{C-FLAG} を得た。これを中間宿主である *Lac. lactis* IL1403 に形質転換し, さらに *L. reuteri* JCM1081 の野生株に形質転換した。

3. 欠損変異 EF-Tu^{FLAG} の作製

1) EF-Tu の N 末端あるいは C 末端の 90 アミノ酸残基を欠損した変異 EF-Tu を作製した。pGEM-T easy EF-Tu^{N-FLAG} を鋳型にプライマー

KN516: 5'-AACGTAGTCAGCGTGTCCAG-3'

／KN517: 5'-AAGAACATGATCACTGGTGCT-3'を用いてインバース PCR を行い, EF-Tu の N 末端 90 アミノ酸残基を欠損した。なお, 本項目では Tks Gflex DNA Polymerase (Takara Bio.) を用い 18 サイクルとした。同様に, pGEM-T easy EF-Tu^{N-FLAG} を鋳型にプライマー

KN518: 5'-GAAGTTCTTGTGAGTTTGGATTGAA-3'／

KN519: 5'-AAGGGTGAAGTTTACGTTATGAC-3'を用いてにインバース PCR を行い, EF-Tu の C 末端 90 アミノ酸残基を欠損した。PCR 産物 20ng に対して 100 U の Dpn I を加え 37°C で 2 時間インキュベートした。続いて T4 Polynucleotide Kinase (Takara) を用いてリン酸化後, セルフライゲーションにより環状化した。これを *E. coli* DH5α に形質転換し, 得られたプラスミドの欠損部位をダイレクトシーケンスにより確認した。また, 大腸菌においてタンパク質の分泌を確認する場合は, *E. coli* JC109 株に導入することとした。これを *EcoRI* および *XhoI* で処理し, あらかじめ *EcoRI* および *XhoI* で処理した乳酸球菌由来プラスミド pIL253 に導入し, pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-Del-N90} と pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-Del-C90} を得た。これを中間宿主である *Lac. lactis* IL1403 に形質転換し, さらに *L. reuteri* JCM1081 の野生株に形質転換した。

2) EF-Tu の N 末端あるいは C 末端の 35 アミノ酸残基を欠損した変異 EF-Tu を 1-1)と同様の方法で作製した。N 末端欠損 EF-Tu はプライマー KN516／KN520: 5'-GTATTGGCAGCCAAAGGTTTAGC-3'を用いた。C 末端

欠損 EF-Tu はプライマー

KN519/KN522: 5'-GTTAACCTTACAAAAGCCAGTTGCT-3'を用いた。乳酸球菌由来プラスミド pIL253 に導入し, pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-Del-N35} と pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-Del-C35} を得た。

3) EF-Tu の C 末端の 35 アミノ酸残基に含まれる 12 の疎水性アミノ酸あるいは塩基性アミノ酸をグリシンに置換した変異 EF-Tu を 3-1) と同様の方法で作製した。それぞれのプライマーは, 表 6 に示した。また, カッコ内にそれぞれのコンストラクトを作製する際のプライマーを示した。乳酸球菌由来プラスミド pIL253 に導入し, pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-L365G} (KN523/KN524), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-V369G} (KN523/KN525), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-L371G} (KN523/KN526), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-L375G} (KN527/KN528), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-I379G} (KN527/KN529), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-V386G} (KN530/KN531), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-V390G} (KN532/KN533), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-V391G} (KN532/KN534), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-I394G} (KN535/KN536), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-K373G} (KN561/KN562), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-K376G} (KN563/KN564), pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-R380G} (KN565/KN566) を得た。

4. *E. coli* JM109 のタンパク質の分画

E. coli JM109 は, 200mL LB 培地 (Amp⁺) で 37 °C で 10 時間振とう培養した。タンパク質の分画方法は, Drew *et al.*, (2006) ⁽¹⁵¹⁾に従った。培養菌液を回収し, 遠心分離 (16,000 ×g, 10 分, 4°C) した。菌体ペレット 1g あたり PBS を 5mL 加え懸濁し, さらに 5mM MgCl₂, 50 μg RNase (Sigma-Aldrich), 25 U DNase (Sigma-Aldrich), 0.8mg リゾチーム, Protease inhibitor cocktail (Roche) を加え, 氷上で 15 分インキュベート

した。続いて、超音波破碎機(出力 45, 累積時間 5 分, 9 秒 ON/ 10 秒 OFF)により破碎した。氷温に保ったまま超遠心分離 (24,000 ×g, 12 分, 4°C) し, 上清を回収した。さらに, 内膜を可溶化するため, 2%(w/v)-ラウロイルサルコシナトリウム (Sigma-Aldrich) を加え, 超遠心分離 (150,000 ×g, 45 分, 4°C) し, ペレットを 10mL PBS に懸濁した。再度, 超遠心分離 (150,000 ×g, 45 分, 4°C) しペレットを回収し, PBS に再度懸濁した。これを外膜画分とした。得られたタンパク質の濃度の測定は, BCA Protein Assay Kit を用いて行い, 20μg のタンパク質を SDS-PAGE に供した。

5. 組み換え SecA および C 末端欠損 EF-Tu タンパク質の発現と精製

発現用ベクター pET28b を用いて, C 末端に 6×His tag を融合した組み換え SecA タンパク質 (His₆-SecA) の発現を行った。方法は, 第二章・第二節に従った。secA は, プライマー

SecAF5'-CCATGGCCAATATTCTAAAAAATGG -3' (下線部は NcoI 認識配列) と SecAR 5'- CTCGAGTTAACGTGTTACATTTTGCC-3' (下線部は XhoI 認識配列) を用いて PCR により増幅した。pGEM-T easy にクローン化後 (pGEM-T easy-secA)。NcoI と XhoI により目的配列を切り出し, pET28b にクローン化し, *E. coli* Rosetta2 に形質転換した。His₆-EF-Tu の C 末端の 35 アミノ酸残基を欠損した His₆-EF-Tu^{Del-C35} は, 第二章・第二節で作製した pET28b *ef-tu* をもとに, プライマー

EF-Tu-35F5'-CCATGGCCAATATTCTAAAAAATGG -3' と EF-Tu-35R 5'-CTCGAGTTAACGTGTTACATTTTGCC-3' を用いて, Tks Gflex DNA Polymerase を使用した PCR により増幅し, リン酸化後, セルフライゲーションにより環状化し, pET28b *ef-tu*^{Del-C35} を作製し, *E. coli* Rosetta2 に形質転換した。150mL の LB 液体培地 (Km⁺, Cm⁺) で 37 °C で振とう培

養し、OD₆₀₀ 0.5 まで培養後、0.5 mM IPTG を添加し、さらに5時間培養した。遠心分離 (8,000 ×g, 5分, 4°C) を行い、ペレットをPBSで洗浄した。続いて、BugBuster protein extraction reagentにより溶菌後、超音波破砕機によりDNAを切断した。これをHisTrap HPカラム(GE-healthcare)を用いて精製した。続いて、10 mM HEPES 緩衝液, 20 mM NaCl (pH 7.0) で透析し、さらにHiTrap DEAE FFカラムを用いて精製した。さらに、His₆-SecAの場合は、HiTrap Butyl FFカラム (GE-healthcare) を用いて精製した。10 mM HEPES 緩衝液, 10 mM NaCl (pH 7.0) で透析し、アミコンウルトラで濃縮した。得られたタンパク質は、SDS-PAGE (10 % acrylamide)に供しCBBを用いて染色した。タンパク質濃度はBCA-Protein Assayで測定し、-80°Cで保存した。

6. His₆-SecAのATPase活性の測定

His₆-SecAのATPase活性の測定方法は、遊離した無機リン酸をマカライトグリーン法⁽¹⁵²⁾を用いて測定した。50 μLのATPase反応液 (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.4 mg/mL BSA, 0.5 mM DTT, pH 8.0) にHis₆-SecAとATP (Sigma-Aldrich) を加え、25°Cで反応を行った。続いてBiomol Green Reagent (Enzo Life Sciences, Inc. NY, USA) を150 μL加え、さらに20分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーを用いて波長620nmにおける吸光度を測定した。検量線は、無機リン酸溶液 (Sigma-Aldrich) を用いて作製した。また、His₆-EF-Tu, His₆-EF-Tu^{Del-C35}, BSA, *E. coli* lipid extract (Avanti Polar Lipids, AL, USA) をそれぞれ10μg添加した際のATPaseの活性を測定した。

7. プルダウンアッセイ

1) *L. reuteri* JCM1081 pIL253 EF-Tu^{N-FLAG} と *L. reuteri* JCM1081 pIL253 EF-Tu^{N-FLAG-Del-C35} の 2 株を用いて, EF-Tu と His₆-SecA の相互作用解析を行った。*L. reuteri* JCM1081 を 250 mL MRS 液体培地で 10 時間培養した。培養菌液を回収し, 遠心分離 (16,000 ×g, 10 分, 4 °C) し, ペレットに 5 mL の緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% [v/v] Triton X-100, Protease inhibitor cocktail, 0.5 mM DTT, pH 8.0) を加え, 4 °C で 15 分振とうした。続いて, 遠心分離 (16,000 ×g, 10 分, 4 °C) を行い, 上清を回収し, 0.22 μm シリンジフィルターに通した。菌体は, 3 mL の緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% [v/v] Triton X-100, Protease inhibitor cocktail [Roche], 0.5 mM DTT, pH 8.0) に懸濁後, zirconia-silica beads により細胞を破碎した。方法は第二章・第二節の通りである。さらに, 50 μg RNase, 25 U DNase を加え, 氷上で 10 分間静置後, 遠心分離 (16,000 ×g, 20 分, 4 °C) を行い, 上清を回収し 0.22 μm シリンジフィルターに通した。全細胞画分は 5 倍希釈したものをを用いた。

次に 200 μg His₆-SecA を固定した HisTrap HP カラム (1 mL) に調整した 0.5 mL の全細胞と細胞外面分, または 50 μg の His₆-EF-Tu と His₆-EF-Tu^{Del-C35} (His tag は Thrombin [GE Healthcare] により切断した) を加え, 室温で 1 時間インキュベートした。カラム容量に対して 3 倍量緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0) で洗浄後, 2 mL の溶出液 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, 0.5 mM DTT, pH 8.0) で溶出し, 10% (w/v) TCA により濃縮した。サンプルは抗 FLAG タグ抗体を用いたウエスタンブロットに供した。

2) *L. reuteri* JCM1081 pIL253 EF-Tu^{N-FLAG} 株 と EF-Tu^{N-FLAG-Del-C35} 株を用いて, 細胞内と細胞外の EF-Tu^{N-FLAG} を回収した。6. 1) で抽出した全細胞と細胞外面分 (500 μL) を Co-Immunoprecipitation Kit (Thermo Scientific)

によって作成したFLAG M2抗体アガロースビーズ (100 μ L) と混ぜ、穏やかに室温で45分攪拌した。遠心分離 (2,000 $\times g$, 5分, 4 $^{\circ}$ C) し, 1000 μ Lの緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) で3回洗浄後, 500 μ Lの100 mM Glysin-HCl (pH3.5) を添加し, 穏やかに室温で15分攪拌した。上清を回収し, 10% (w/v) TCAにより濃縮した。サンプルは抗FLAGタグ抗体とPhos tagを用いたウエスタンブロットに供した。

8. ウエスタンブロット

タンパク質サンプルは, SDS-PAGE (12.5% acrylamide)に供し, PVDF膜に転写した。方法は第二章・第三節の通りである。抗 EF-Tu 抗体 (1,500倍希釈), FLAG タグ M2 抗体 (Sigma-Aldrich, 1,500倍希釈) を使用し, 室温で1時間インキュベートした。2次抗体は, AP-標識 rabbit anti rabbit IgG または AP-標識 mouse anti rabbit IgG (共に 2,500倍希釈) を添加し, BCIP/NBT liquid substrate system により発色した。

Phos tag によるリン酸化タンパク質の検出は, タンパク質サンプルを SDS-PAGE (12.5% acrylamide)に供し, PVDF 膜に転写した。5%(w/v) BSA-TBS-T (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% [v/v]TritonX-100, pH7.4) で60分ブロッキング後, ビオチン化 Phos tag (Wako, 400倍希釈) を添加し, 室温で1時間インキュベートした。TBS-T で洗浄後, Horseradish peroxidase 標識ストレプトアビジン (Roche, 3,000倍希釈) を添加し, TMB Peroxidase Substrate (KPL) により発色した。

9. 3次元構造予測

タンパク質の3次元構造予測は, SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive#sequence>) を用いて行った。E.

coli K-12 株の EF-Tu (アミノ酸配列の相同性: 75%) の X 線解析モデルをリファレンスとして, *L. reuteri* JCM1081 の EF-Tu の 3 次構造を予測した。

III 実験成績

1. EF-TuのN末端またはC末端の欠損が分泌に及ぼす影響

EF-TuのEF-TuのN末端またはC末端の欠損が分泌に及ぼす影響について評価した。また, 内在性のEF-Tuと区別するために, FLAGタグ融合したEF-Tu (EF-Tu^{FLAG}) を *L. reuteri* JCM1081 野生株に発現させた。N末端へのFLAGタグ付加 (EF-Tu^{N-FLAG}) は分泌に殆ど影響を及ぼさず, 一方, C末端へのFLAGタグの付加 (EF-Tu^{C-FLAG}) は, EF-Tuの分泌量の低下が認められた (図31)。そこで, 以降の実験では, EF-Tu^{N-FLAG}を用いることとした。

EF-Tu^{N-FLAG}のアミノ酸配列から推定される疎水プロットと各構成ドメインを図32に示した。EF-Tuは, GTPと相互作用し加水分解を行う Domain I, tRNAと相互作用する Domain II, ヌクレオチド供与体EF-Tsと相互作用する Domain IIIの3つのドメインから構成される。そこで, Domain Iの一部と Domain IIIを含むN末端とC末端のそれぞれ90アミノ酸残基を欠損したEF-Tu^{N-FLAG-Del-N90}とEF-Tu^{N-FLAG-Del-C90}の細胞外への分泌を評価した (図33)。EF-Tu^{N-FLAG-Del-N90} (N末端欠損) では, EF-Tuの細胞外への分泌量は, 内在性のEF-Tuと同程度であったが, EF-Tu^{N-FLAG-Del-C90} (C末端欠損) では, 分泌量が著しく低下した。そこで, EF-TuのC末端に着目し解析を進めた。

EF-Tuの疎水プロットより，C末端の約35アミノ酸残基（図32）疎水性と親水性のアミノ酸を含む領域に着目した。そこで，EF-TuのN末端とC末端のそれぞれ35アミノ酸残基を欠損したEF-Tu^{N-FLAG-Del-N35}とEF-Tu^{N-FLAG-Del-C35}を作製し，同様に細胞外への分泌を評価した（図34）。EF-Tu^{N-FLAG-Del-N35}（N末端欠損）では，EF-Tuの細胞外への分泌量，内在性のEF-Tuと同程度であったが，EF-Tu^{N-FLAG-Del-C35}（C末端欠損）では，分泌は全く確認されなかった。

次に，大腸菌*E. coli* JM109においても同様の分泌パターンが検出されるか検討した。*E. coli* JM109から全細胞画分，培養上清（Extracellular supernatant），外膜画分（Outer membrane）を分画した。野生株におけるEF-Tuの分泌を確認した結果，外膜画分でシグナルが確認できたが，培養上清のシグナルは微弱であった（図35 A）。また，RNAポリメラーゼは，培養上清と外膜画分からは検出されず，適切な分画が確認された（図35 A）。次に，変異EF-Tu^{N-FLAG}の分泌を確認した結果，*E. coli* JM109でも内在性のEF-Tuと同程度のシグナルが外膜画分において確認された（図35 B）。さらに，EF-Tu^{N-FLAG-Del-C35}の分泌は，細胞内ではシグナルが確認できたが，外膜画分では殆ど確認されなかった（図35 C）。

2. EF-TuのC末端の疎水性アミノ酸の置換が分泌に及ぼす影響

EF-TuとEF-Tu^{N-FLAG-Del-C35}の3次元構造予測モデルを比較すると，C末端の35アミノ酸残基の欠損によりDomain IIIの高次構造に大きな変化を及ぼすことが示された（図36）。そこで，EF-TuのC末端の35アミノ酸領域に含まれる疎水性アミノ酸と塩基性アミノ酸をグリシンに置換した12のアミノ酸置換EF-Tu^{N-FLAG}を用いて，分泌パターンを評価することとした（図37）。すべてのグリシン置換体で，全長EF-Tu^{N-FLAG}と同程度の発現

が細胞内で確認できた(図37 A, B)。一方, 疎水性アミノ酸の置換体L375G, I379G, V386G, I394Gの4つのグリシン置換体で全く分泌が確認されなくなった(図37 A)。さらに, 塩基性アミノ酸の置換体K376Gで分泌が全く確認されなくなり, さらにK373Gで分泌が著しく減少した(図37 B)。

次に, EF-TuのC末端領域の6つのグリシン置換体の3次元構造予測モデルを比較した。いずれもアミノ酸置換体においても, C末端の本領域に特徴的な逆平行の β シートを形成する β ストランドのペアに大きな構造的変化は認められなかった(図38)。

EF-Tuの細胞外への分泌が認められている5菌種のEF-TuのC末端領域のマルチプルアライメントを行った結果(図39), V386はすべての菌種に共通し, さらにK373, L375, K376, I379, I394も高い保存性が認められた。

3. EF-TuがSecAのATPase活性に及ぼす影響

His₆-SecAは, *E. coli* Rosetta2を宿主として発現させ, His-trap HP カラムを用いて精製した。SDS-PAGEに供し, CBBで染色した結果, アミノ酸配列から予測された分子量である約90kDaの位置に単一バンドのシグナルが検出された(図40)。続いて, SecAのATPase活性をマラカイトグリーン法を用いて測定した。1mM ATPを基質として添加した際の遊離したPi(nmol/50 μ L)をグラフに示した(図41A)。His₆-SecA添加量(1, 2.5, 5.0, 10 μ g)の増加に比例し, 遊離Piは増加し, 測定60分後まで直線的な酵素反応を示した。さらに, His₆-SecA(5.0 μ g)にATPを0~4,000 μ M加えた際のMichaelis-Menten kineticsパラメーター(k_{cat} , K_m)を求めた(図42B)。フィッティングカーブより求めた値は, $K_m=41.2$, $k_{cat}=1.34$ であり, Segers *et al.*, (2011)⁽¹⁵²⁾の報告と比較し十分なATPase活性を保

持していることが確認できた。

次に、組み換えタンパク質の添加が SecA の ATPase 活性に及ぼす影響について評価した。His₆-EF-Tu^{Del-C35} は、*E. coli* Rosetta2 を宿主として発現させ、His-trap HP カラムを用いて精製した。SDS-PAGE に供し、CBB で染色した結果、アミノ酸配列から予測された約 37kDa の位置に単一バンドのシグナルが検出された (図 42A)。続いて、これを用いて、1mM ATP を基質として、His₆-SecA (5.0 μg) に His₆-EF-Tu, His₆-EF-Tu^{Del-C35}, 大腸菌由来リン脂質膜を加えた際の遊離 Pi 量 (nmol/50 μL) を継時的に測定した (図 42B)。それぞれのタンパク質および脂質を加えた際、直線的な酵素反応を示し、特にポジティブコントロールとして加えたリン脂質膜⁽¹⁵²⁾が最も高い値となった。また His₆-EF-Tu も同程度の反応性を示したが、His₆-EF-Tu^{Del-C35} では EF-Tu 全長と比較して半分まで低下した。

4. SecA と EF-Tu の相互作用の評価

His₆-SecA と His₆-EF-Tu または His₆-EF-Tu^{Del-C35} の相互作用をプルダウン法を用いて評価した。His₆-EF-Tu (全長) を添加した際、His₆-EF-Tu は His₆-SecA と相互作用を示した (図 43A)。一方、His₆-EF-Tu^{Del-C35} は、His₆-SecA に全く相互作用を示さず、SecA の ATPase 活性の結果と一致した (図 43A)。

続いて、変異 EF-Tu^{N-FLAG} または EF-Tu^{N-FLAG-Del-35} を発現させた *L. reuteri* JCM1081 の全細胞または細胞外画分を添加した際の EF-Tu の結合を評価した (図 43 B, C)。EF-Tu^{N-FLAG} (全長) を発現した画分を添加した際、全細胞画分は His₆-SecA との相互作用が確認されたが、細胞外画分では全く確認されなかった (図 43B)。また、His₆-SecA を固定化していないカラムには、いずれの画分の EF-Tu も結合しなかった。さらに、EF-Tu^{N-FLAG-Del-35}

を発現した全細胞画分を添加した際、His₆-SecAとの相互作用は殆ど確認出来なかった（図43C）。したがって、C末端がSecAとの相互作用に寄与していることが示された。

5. EF-Tu のリン酸化修飾の評価

細胞内と細胞外のEF-TuのSecAとの相互作用が異なることが示された。そこで本項目では、FLAGアガロースを用いた免疫沈降法により得たEF-Tu^{N-FLAG}のリン酸化修飾をPhos tagを用いて調べた（図44）。Phos tagによりリン酸化の状態を検出した結果、細胞内のEF-Tuは、EF-Tu^{N-FLAG}、EF-Tu^{N-FLAG-Del-35}共に強い反応性が確認されたが、細胞外のEF-Tu^{N-FLAG}に対しては、殆ど反応を示さなかった（EF-Tu^{N-FLAG-Del-35}は、分泌されないため細胞内画分のみ示した）（図44A）。したがって、細胞内と細胞外のEF-Tuのリン酸化状態が異なることが示された。また、His₆-EF-TuとHis₆-EF-Tu^{Del-C35}は、いずれもPhos tagの強い反応が得られた（図44B）。

IV 考察

EF-Tuの細胞外への分泌に寄与する配列の探索の結果、①EF-TuのC末端の35アミノ酸領域に含まれる4つの疎水性アミノ酸と2つの塩基性アミノ酸が分泌に重要な役割を果たすこと、②EF-TuはSecAと相互作用し、さらにC末端領域が相互作用に必須であること、③EF-Tuのリン酸化修飾が相互作用に関与する可能性があること、以上の結論を得ることができた。

EF-Tuの分泌に寄与する配列は、N末端ではなくC末端に存在し、さらに、EF-TuのC末端から15～20アミノ酸残基の領域に含まれる疎水性と塩

基性アミノ酸残基が関与することが示された。また、*E. coli*においてもEF-TuのC末端の配列依存的な分泌パターンが確認され、EF-Tuの分泌は、グラム陽性あるいは陰性細菌にかかわらず同一の分泌プロセスを経ると考えられた。一方、*S. pyogenes*のGAPDH、*B. subtilis*の α -Enolase、*R. leguminosarum*のSodAで見出された分泌に寄与する領域は、いずれもN末端領域に存在し⁽¹²⁶⁾⁽¹³⁶⁾⁽¹⁴⁸⁾⁽¹⁵⁰⁾、さらにGAPDHや α -Enolaseは、高次構造の保持の重要性が示されている⁽¹²⁶⁾⁽¹⁴⁸⁾⁽¹⁵⁰⁾。しかし、EF-Tuの疎水性と塩基性アミノ酸置換によるC末端領域の逆平行からなる β シート構造の大きな変化は予測されないことから、高次構造はシグナル配列としての機能に関与しないことが示唆された。さらに、C末端に親水性のFLAGタグを付加した場合、EF-Tuの分泌が著しく低下することから、C末端領域の電荷または疎水性の割合が分泌シグナルとして機能するために重要であると考えられた。

His₆-EF-TuはSecAのATPase活性をポジティブコントロールとして用いたリン脂質を添加した場合と同程度まで活性化したが、C末端領域を欠損するとATPase活性は、半分まで低下した。さらに、*E. coli*由来のHis₆-EF-Tuと*L. reuteri*由来のEF-Tu^{N-FLAG}はいずれもC末端を欠損するとSecAとの相互作用は認められなかった。以上の結果は、EF-TuのC末端領域は、SecAとの相互作用に必須であり、さらにEF-TuはSecAと相互作用することでATPase活性を活性化することが明らかになった。したがって、EF-TuがSec輸送経路依存的であるというこれまでの仮説を強く支持する結果を得ることができた。

EF-Tuは、細胞内で高次構造を保持した状態で存在するが⁽¹²⁹⁾、Sec輸送経路は、高次構造が保たれた状態のタンパク質を細胞外へと輸送することはできない⁽¹⁴⁰⁾。一方、EF-Tuと同じく細胞内で高次構造をもつ*R.*

*leguminosarum*のSodAは、シャペロンであるSecBの変異により分泌が抑制されることから、SRP非依存的にSecBにより高次構造の巻き戻しが行われた後、Sec輸送経路を介して細胞外へと分泌される経路が示されている⁽¹³⁶⁾。したがって、EF-Tuも高次構造の巻き戻しに関わるシャペロン様分子が本分泌機構において重要な役割を持つものと推測される。しかしながら、*Lactobacillus*属乳酸菌を含むグラム陽性細菌にはSecBの存在は見出されておらず⁽¹⁵³⁾、今後の解析が求められる。

また、近年の報告により、細胞内で部分的に高次構造をもつ変異タンパク質のTat分泌シグナル配列をSecシグナル配列に置換した場合でも配列依存的にSec輸送経路を介して分泌されることが見出されており⁽¹⁴¹⁾、部分的に高次構造が保持された状態でもSec輸送経路はタンパク質を分泌可能であるという新たな報告もある。したがって、このような新たな機構がEF-Tuの分泌に寄与する可能性も十分に考えられる。

興味深い結果として、細胞内のEF-TuはSecAと相互作用したが、細胞外に分泌されたEF-TuはSecAと相互作用が認められなかった。Archambaud *et al.*, (2006)⁽¹⁵⁴⁾により、*L. monocytogenes*のMn-Superoxide dismutases (MnSod)において類似した研究例が報告されている。すなわち、*L. monocytogenes*のserine-threonine phosphatase (Stp)欠損変異株ではMnSodの細胞外への分泌量が低下し、さらに分泌されたMnSodはいずれも脱リン酸化されていることから、リン酸化状態のMnSodは細胞外へと分泌されないことを示している。さらに、*secA2*欠損変異株では、MnSodは分泌が低下することから、MnSodはSecA2依存的に分泌されることを報告している⁽¹⁵⁴⁾。EF-Tuも同様に、細胞内でserine-threonine kinaseによりリン酸化されており⁽¹⁵⁵⁾⁽¹⁵⁶⁾、EF-Tuのリン酸化はGTP/GDP加水分解の活性化における重要なスイッチシグナルとして知られている⁽¹⁵⁷⁾⁻⁽¹⁵⁹⁾。そこで、*L.*

reuteri JCM1081における細胞内と細胞外のEF-Tuのリン酸化修飾を確認した結果、MnSodと同様にEF-Tuは細胞内で強くリン酸化修飾されていたが、細胞外へと分泌されたEF-Tuのリン酸化修飾のシグナルは殆ど確認できなかった。さらに、細胞内のEF-TuのみSecAと相互作用が認められることから、リン酸化状態が分泌に重要であることを示唆された。また、His₆-EF-TuとHis₆-EF-Tu^{Del-35}はいずれも強いリン酸化修飾された状態であったことを踏まえると、EF-Tuの細胞外への分泌には、EF-TuのC末端を介したSecAとの直接的な相互作用に加えて、EF-Tuの細胞内でのリン酸化修飾の異なる2つの要素の関与が推察された。しかし、細胞内のStpにより脱リン酸化され分泌されるMnSodに対して、本研究で得られた結果では、リン酸化状態のEF-TuがSecAと相互作用し、その後脱リン酸化されることを示唆する結果あり、MnSodと異なる挙動を示すことが考えられた。Archambaud *et al.*, (2006)⁽¹⁵⁴⁾は、MnSodとSecA2の相互作用については言及しておらず、EF-TuとSecAとの相互作用にEF-Tuのリン酸化修飾の状態がどのように寄与するか、すなわち、EF-Tuの脱リン酸化がどの段階で生じているか今後の解析が求められる。

第三章では、EF-Tuの既知のシグナル分泌配列とは異なるC末端の配列依存的に、細胞外へと分泌される機構を初めて明らかにした。また、本経路にはSec輸送経路の関与が強く推察され、さらに、SecAとの相互作用に関わるC末端領域と、細胞内でのEF-Tuのリン酸化修飾の2つの要因が分泌機構に重要であることが示唆された。また、EF-TuのC末端の配列の保存性が様々な細菌種間で保存性が高いことから、多くの細菌種に共通した機構であることが考えられた。これらの結果は、古典的なN末端の分泌シグナル配列依存的なSec輸送機構とは異なり、C末端の分泌シグナル

配列依存的にSec輸送機構が関与する細菌における新たなタンパク質の輸送機構の存在を提案することができた。

第四章

総括

本研究から、*L. reuteri*における硫酸化糖鎖付着因子としての EF-Tu の役割とその細胞外への提示機構に関して、次の事実が明らかにされた。

1. ブタ由来ムチンは乳酸菌の結合性の評価に広く用いられるが、粘性の性質ゆえに莢雑物を含み、それらへの非特異的な結合性が指摘され続けてきた。そこで、ブタの消化管から物理的にムチン層を剥離し、界面活性剤を加えて可溶化したのち、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび密度勾配超遠心分離を組み合わせた手法により、糖の割合を 70%程度まで高めた高純度なムチンを分画することに成功した。また、精製ムチンに対する糖質分解酵素の反応効率は粗精製ムチンと比較し良好であり、ムチン糖鎖と乳酸菌の相互作用など分子間の詳細な解析を行う際に有用であることが示された。さらに、種々のレクチンおよび抗ムチンモノクローナル抗体を用いた実験により、ブタ大腸ムチンにガラクトースが豊富に存在することに加え、6-sulfated blood-group H type 2 antigen あるいは Sd^a blood group antigen を含むスルホムチンやシアロムチンが存在することが示された。

2. P47 の N 末端アミノ酸シーケンスにより得られた配列情報から、P47 は翻訳伸長因子 (EF-Tu) であることが明らかになった。そこで、大腸菌を宿主として組み換えタンパク質 (His₆-EF-Tu) を発現・精製し、His₆-EF-Tu の複合糖脂質に対する結合特性を解析した。表面プラズモン共鳴による相互作用解析から、弱酸性の pH において、非還元末端が硫酸化ガラクトシル基の複合糖脂質に結合し、とくにスルファチドに対しナノモルオーダーの解離定数を示した。また His₆-EF-Tu は、非還元末端がガラクトシル基あるいは硫酸基と同じく負の電荷をもつシアル酸には結

合しないことから静電的作用ではなく EF-Tu と硫酸化糖鎖との特異な相互作用の存在が示された。

3. ムチンは、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミン、フコースからなる中性糖鎖と硫酸基やシアル酸が結合した酸性糖鎖により複雑に修飾される。そこで、中性および酸性ムチンオリゴ糖を競合体としてムチンへの His₆-EF-Tu の結合を競合 ELISA 法により評価した。酸性オリゴ糖および脱シアル酸酸性オリゴ糖の添加は His₆-EF-Tu の結合を同程度阻害したが、中性オリゴ糖による阻害は認められなかった。また、ブタ胃底部粘膜組織の免疫組織化学的染色では HID 染色と His₆-EF-Tu の反応部位が極めて類似した。以上より、EF-Tu は複雑な糖鎖構造をもつムチンにおいても、硫酸基に修飾されたムチン糖鎖に対して特異な結合活性をもつことが示された。

4. *L. reuteri* JCM1081 における EF-Tu の局在と付着因子としての機能を評価した。EF-Tu の局在を抗 EF-Tu 抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した結果、培養初期から定常期まで細胞表層における EF-Tu のシグナルが確認された。また本株のムチンへの付着性は抗 EF-Tu 抗体により阻害されたことから、EF-Tu の付着因子としての役割が示された。さらに、EF-Tu の細胞表層における局在は、培地中の pH に依存的であり、弱酸性条件において、細胞表層に静電的にとどまることが示された。また、EF-Tu は他の *L. reuteri* 5 菌株においても細胞表層局在が確認されたことから、乳酸菌に共通する硫酸化糖鎖への付着因子である可能性が示された。

5. EF-Tu を介した付着機構からスルホムチンは確かな乳酸菌の受容体であることが明らかになった。*Bifidobacterium* は、ほ乳類の大腸において優勢菌種であり、プロバイオティクスとして利用価値の高い菌種である。そこで複数の *Bifidobacterium* のムチンへの付着性を評価した結果、スルホムチンに付着性を示す幾つかの菌株が存在することを新たに見出した。また、これらの菌株において EF-Tu の局在が確認され、*Bifidobacterium* においても EF-Tu が付着因子として機能することが推察された。

6. EF-Tu の分泌経路に関して評価した。*L. reuteri* JCM1081 に対して ATPase 阻害剤であるアジ化ナトリウムを添加したところ EF-Tu の分泌は著しく低下した。また、自己溶菌や膜小胞体を介した分泌でないことを示唆するデータが得られたことから、EF-Tu の菌体外への移行に能動的分泌機構が関与している可能性が考えられた。膜チャネル複合体の構成因子である SecY に 2 点相同組み換えを利用し薬剤耐性遺伝子を組み込むことで *secY* 欠損株を作出した。*secY* 欠損株では EF-Tu の分泌は殆ど確認されなかった。また、モータータンパク質である SecA の過剰発現株では、EF-Tu の分泌量が増加した。したがって、EF-Tu の分泌には Sec 輸送経路が関与する可能性が示された。

7. EF-Tu における分泌シグナル配列の探索を評価した。一般に Sec 輸送経路により分泌されるタンパク質の N 末端には高度に保存された分泌シグナル配列が存在する。そこで分泌シグナルの探索として、EF-Tu の幾つかのアミノ酸残基を欠損または置換させた変異 EF-Tu を作成し、

EF-Tu の分泌に及ぼす影響について検討した。その結果、C 末端の約 35 アミノ酸残基の欠損により EF-Tu の分泌は著しく低下した。そこで本領域の幾つかの疎水性または塩基性アミノ酸残基をグリシンに置換した結果、6 つの置換体で分泌が確認されなくなった。したがって、EF-Tu の C 末端の特定の領域またはアミノ酸残基が分泌シグナルのように機能していることが示された。

次に、本領域の分泌シグナルとしての機能を評価するため、C 末端を欠損した変異 EF-Tu^{FLAG} を用いて、プルダウン法により ATPase 依存性のモーター因子 SecA との相互作用を評価した。EF-Tu は C 末端領域を介して組み換え SecA タンパク質 (His₆-SecA) と相互作用し、また、EF-Tu は His₆-SecA の ATPase 活性を高めることが示された。以上から、EF-Tu の C 末端領域が分泌シグナルとして寄与することが強く示された。さらに細胞内の EF-Tu のみ SecA と相互作用し、さらに細胞内の EF-Tu はリン酸化修飾されていた。すなわち、EF-Tu の C 末端領域が Sec 依存性の分泌シグナルとして機能することに加え、EF-Tu の細胞内でのリン酸化修飾が SecA と相互作用に関与することが示唆された。

以上、本研究で得られた新規な知見は次に示す事柄である (図 45)。EF-Tu の細胞外への分泌は、EF-Tu の C 末端の塩基性と疎水性アミノ酸からなる分泌シグナル配列が存在し、EF-Tu の細胞内でのリン酸化修飾が関与することが示唆された。また、EF-Tu が細胞外へと輸送される際には、Sec 輸送経路が関与することが示された。

さらに、細胞外へと分泌された EF-Tu は、弱酸性 pH で細胞表層にとどまり、ムチンの硫酸化糖鎖を特異的に認識するレクチン様の性質をもつ *L. reuteri* の付着因子として機能することが示された。以上は、既知

の分泌シグナル配列に依存しない EF-Tu の新たな分泌機構の存在を強く示すと共に，乳酸菌における硫酸化糖鎖に対する付着因子を初めて見出したものである。

文献

- (1) Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, Bertucci F, Gigante G, Ianiro G, Ojetti V, Scarpellini E, Gasbarrini A. 2013. The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17:323–333.
- (2) Blum S, Schiffrin EJ. 2003. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria? *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 4:53–60.
- (3) Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz J V, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature.* 500:232–236.
- (4) Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 457:480–484.
- (5) Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman S V, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT. 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science.* 328:228–231.
- (6) Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abe H, Komiya K, Kawaguchi M, Shimizu T, Ogihara T, Tamura Y, Sakurai Y, Yamamoto R, Mita T, Fujitani Y, Fukuda H, Nomoto K, Takahashi T, Asahara T, Hirose T, Nagata S, Yamashiro Y, Watada H. 2014. Gut dysbiosis and detection of “live gut bacteria” in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 37:2343–2350.
- (7) Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. 2013. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature.* 499:97–101.
- (8) Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK. 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.* 155:1451–1463.
- (9) Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82:279–289.
- (10) Servin AL, Coconnier M-H. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17:741–754.
- (11) Lebeer S, Alsteens D, Wildling L, Gruber HJ, Hols P, Keersmaecker S De, Vanderleyden J, Dufre YF. 2008. Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *ACS Nano.* 2:1921–1929.

- (12) Fanning S, Hall LJ, Cronin M, Zomer A, MacSharry J, Goulding D, Motherway MO, Shanahan F, Nally K, Dougan G, van Sinderen D. 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:2108–2113.
- (13) Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 469:543–547.
- (14) Matsumoto M, Kurihara S, Kibe R, Ashida H, Benno Y. 2011. Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One.* 6:e23652.
- (15) Frese SA, Mackenzie DA, Peterson DA, Schmaltz R, Fangman T, Zhou Y, Zhang C, Benson AK, Cody LA, Mulholland F, Juge N, Walter J. 2013. Molecular characterization of host-specific biofilm formation in a vertebrate gut symbiont. *PLoS Genet.* 9:e1004057.
- (16) Schiffrin EJ, Blum S. 2002. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56:60–64.
- (17) Holo H, Nes IF. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3119–3123.
- (18) Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, Lochs H, Dörffel Y. 2007. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut.* 56:343–350.
- (19) Johansson ME V, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:15064–15069.
- (20) Van Tassell ML, Miller MJ. 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients.* 3:613–636.
- (21) Brockhausen I. 2003. Sulphotransferases acting on mucin-type oligosaccharides. *Biochem. Soc. Trans.* 31:318–325.
- (22) Jansson L, Tobias J, Jarefjäll C, Lebens M, Svennerholm A-M, Teneberg S. 2009. Sulfatide recognition by colonization factor antigen CS6 from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One.* 4:e4487.
- (23) Kamisago S, Iwamori M, Tai T, Mitamura K, Yazaki Y, Sugano K. 1996. Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Infect. Immun.* 64:624–628.
- (24) Teneberg S, Miller-Podraza H, Lampert HC, Evans DJ, Evans DG, Danielsson D, Karlsson KA. 1997. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 272:19067–19071.

- (25) Veerman EC, Bank CM, Namavar F, Appelmelk BJ, Bolscher JG, Nieuw Amerongen a V. 1997. Sulfated glycans on oral mucin as receptors for *Helicobacter pylori*. *Glycobiology*. 7:737–743.
- (26) Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA. 1998. Characterization of an Acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 66:4061–4067.
- (27) Kobayashi M, Lee H, Nakayama J, Fukuda M. 2009. Roles of gastric mucin-type O-glycans in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Glycobiology*. 19:453–461.
- (28) Scharfman A, Delmotte P, Beau J, Lamblin G, Roussel P, Mazurier J. 2000. Sialyl-Le(x) and sulfo-sialyl-Le(x) determinants are receptors for *P. aeruginosa*. *Glycoconj. J.* 17:735–740.
- (29) Hoskins LC, Agustines M, McKee WB, Boulding ET, Kriaris M, Niedermeyer G. 1985. Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J. Clin. Invest.* 75:944–953.
- (30) Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kernéis S, Bernet MF, Servin AL. 1992. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2034–2039.
- (31) Mukai T, Arihara K. 1994. Presence of Intestinal lectin-binding glycoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:1851–1854.
- (32) Mukai T, Kaneko S, Ohori H. 1998. Haemagglutination and glycolipid-binding activities of *Lactobacillus reuteri*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27:130–134.
- (33) Yamamoto K, Miwa T, Taniguchi H, Nagano T, Shimamura K, Tanaka T, Kumagai H. 1996. Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228:148–152.
- (34) Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, Forstner JF. 1997. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:506–512.
- (35) Mukai T, Kaneko S, Matsumoto M, Ohori H. 2004. Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *Int. J. Food Microbiol.* 90:357–362.
- (36) Uchida H, Kinoshita H, Kawai Y, Kitazawa H, Miura K, Shiiba K, Horii A, Kimura K, Taketomo N, Oda M, Yajima T, Saito T. 2006. Lactobacilli binding human A-antigen expressed in intestinal mucosa. *Res. Microbiol.* 157:659–665.
- (37) Uchida H, Kawai Y, Kinoshita H, Kitazawa H, Miura K, Shiiba K, Horii A, Kimura K, Taketomo N, Oda M, Yajima T, Saito T. 2006. Lactic acid bacteria

- (LAB) bind to human B- or H-antigens expressed on intestinal mucosa. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:3073–3076.
- (38) Huang I-N, Okawara T, Watanabe M, Kawai Y, Kitazawa H, Ohnuma S, Shibata C, Horii a, Kimura K, Taketomo N, Xiao J-Z, Iwatsuki K, Saito T. 2013. New screening methods for probiotics with adhesion properties to sialic acid and sulphate residues in human colonic mucin using the Biacore assay. *J. Appl. Microbiol.* 114:854–860.
- (39) Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:728–764.
- (40) Van Roosmalen ML, Geukens N, Jongbloed JDH, Tjalsma H, Dubois J-YF, Bron S, van Dijl JM, Anné J. 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694:279–297.
- (41) Sargent F, Bogsch EG, Stanley NR, Wexler M, Robinson C, Berks BC, Palmer T. 1998. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* 17:3640–3650.
- (42) Berks BC, Sargent F, Palmer T. 2000. The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* 35:260–274.
- (43) Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, Pittet A-C, Zwahlen M-C, Rouvet M, Altermann E, Barrangou R, Mollet B, Mercenier A, Klaenhammer T, Arigoni F, Schell MA. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2512–2517.
- (44) Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, Satokari R, Vesterlund S, Hendrickx APA, Lebeer S, De Keersmaecker SCJ, Vanderleyden J, Hämäläinen T, Laukkanen S, Salovuori N, Ritari J, Alatalo E, Korpela R, Mattila-Sandholm T, Lassig A, Hatakka K, Kinnunen KT, Karjalainen H, Saxelin M, Laakso K, Surakka A, Palva A, Salusjärvi T, Auvinen P, de Vos WM. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:17193–171938.
- (45) Turrone F, Serafini F, Foroni E, Duranti S, O’Connell Motherway M, Taverniti V, Mangifesta M, Milani C, Viappiani A, Roversi T, Sánchez B, Santoni A, Gioiosa L, Ferrarini A, Delledonne M, Margolles A, Piazza L, Palanza P, Bolchi A, Guglielmetti S, van Sinderen D, Ventura M. 2013. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:11151–11156.
- (46) Von Ossowski I, Reunanen J, Satokari R, Vesterlund S, Kankainen M, Huhtinen H, Tynkkynen S, Salminen S, de Vos WM, Palva A. 2010. Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2049–2057.
- (47) O’Connell Motherway M, Zomer A, Leahy SC, Reunanen J, Bottacini F, Claesson MJ, O’Brien F, Flynn K, Casey PG, Munoz JAM, Kearney B, Houston AM, O’Mahony C, Higgins DG, Shanahan F, Palva A, de Vos WM, Fitzgerald GF, Ventura M, O’Toole PW, van Sinderen D. 2011. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight

- adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108:11217–11222.
- (48) Roos S, Jonsson H. 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. Microbiology. 148:433–442.
- (49) Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Appl. Environ. Microbiol. 71:8344–8351.
- (50) Boekhorst J, Helmer Q, Kleerebezem M, Siezen RJ. 2006. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. Microbiology. 152:273–280.
- (51) Mackenzie DA, Jeffers F, Parker ML, Vibert-Vallet A, Bongaerts RJ, Roos S, Walter J, Juge N. 2010. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. Microbiology. 156:3368–3378.
- (52) Etzold S, Kober OI, Mackenzie DA, Tailford LE, Gunning AP, Walshaw J, Hemmings AM, Juge N. 2014. Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. Environ. Microbiol. 16:888–903.
- (53) Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O. 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:192–221.
- (54) Von Ossowski I, Satokari R, Reunanen J, Lebeer S, De Keersmaecker SCJ, Vanderleyden J, de Vos WM, Palva A. 2011. Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. Appl. Environ. Microbiol. 77:4465–4472.
- (55) Nishiyama K, Nakamata K, Ueno S, Terao A, Aryantini NPD, Sujaya IN, Fukuda K, Urashima T, Yamamoto Y, Mukai T. 2015. Adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* mucus-binding factor to mucin and extracellular matrix proteins. Biosci. Biotechnol. Biochem. 79:271–279.
- (56) Jensen H, Roos S, Jonsson H, Rud I, Grimmer S, van Pijkeren J-P, Britton RA, Axelsson L. 2014. Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus *in vitro*. Microbiology. 160:671–681.
- (57) Etzold S, Mackenzie DA, Jeffers F, Walshaw J, Roos S, Hemmings AM, Juge N. 2014. Structural and molecular insights into novel surface-exposed mucus adhesins from *Lactobacillus reuteri* human strains. Mol. Microbiol. 92:543–556.
- (58) Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, Minuzzo M, Scarafoni A, Arioli S, Hellman J, Karp M, Parini C. 2008. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. Appl. Environ. Microbiol. 74:4695–4702.
- (59) Gleinser M, Grimm V, Zhurina D, Yuan J, Riedel CU. 2012. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA. Microb. Cell Fact. 11:80.

- (60) Kainulainen V, Reunanen J, Hiippala K, Guglielmetti S, Vesterlund S, Palva A, Satokari R. 2013. BopA does not have a major role in the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to intestinal epithelial cells, extracellular matrix proteins, and mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:6989–6997.
- (61) Rojas M, Ascencio F, Conway PL. 2002. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2330–2336.
- (62) Miyoshi Y, Okada S, Uchimura T, Satoh E. 2006. A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:1622–1628.
- (63) Macías-Rodríguez ME, Zagorec M, Ascencio F, Vázquez-Juárez R, Rojas M. 2009. *Lactobacillus fermentum* BCS87 expresses mucus- and mucin-binding proteins on the cell surface. *J. Appl. Microbiol.* 107:1866–1874.
- (64) Watanabe M, Kinoshita H, Huang I-N, Eguchi K, Tsurumi T, Kawai Y, Kitazawa H, Kimura K, Taketomo N, Kikuchi D, Sase T, Miura K, Ogawa H, Shibata C, Horii A, Saito T. 2012. An adhesin-like protein, Lam29, from *Lactobacillus mucosae* ME-340 binds to histone H3 and blood group antigens in human colonic mucus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76:1655–1660.
- (65) Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthésy-Theulaz IE. 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* 72:2160–2169.
- (66) Dhanani AS, Bagchi T. 2013. The expression of adhesin EF-Tu in response to mucin and its role in *Lactobacillus* adhesion and competitive inhibition of enteropathogens to mucin. *J. Appl. Microbiol.* 115:546–554.
- (67) Ramiah K, van Reenen CA, Dicks LMT. 2007. Expression of the mucus adhesion genes Mub and MapA, adhesion-like factor EF-Tu and bacteriocin gene plaA of *Lactobacillus plantarum* 423, monitored with real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 116:405–409.
- (68) Duary RK, Batish VK, Grover S. 2012. Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro gut conditions. *Mol. Biol. Rep.* 39:2541–2552.
- (69) Kinoshita H, Uchida H, Kawai Y, Kawasaki T, Wakahara N, Matsuo H, Watanabe M, Kitazawa H, Ohnuma S, Miura K, Horii A, Saito T. 2008. Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J. Appl. Microbiol.* 104:1667–1674.
- (70) Kinoshita H, Wakahara N, Watanabe M, Kawasaki T, Matsuo H, Kawai Y, Kitazawa H, Ohnuma S, Miura K, Horii A, 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.

- (71) Bergonzelli GE, Granato D, Pridmore RD, Marvin-Guy LF, Donnicola D, Corthésy-Theulaz IE. 2006. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 74:425–434.
- (72) González-Rodríguez I, Sánchez B, Ruiz L, Turróni F, Ventura M, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A. 2012. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:3992–3998.
- (73) Antikainen J, Kuparinen V, Kupannen V, Lähteenmäki K, Korhonen TK. 2007. 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.
- (74) Jeffery CJ. 2009. Moonlighting proteins--an update. *Mol. Biosyst.* 5:345–350.
- (75) Pretzer G, Snel J, Molenaar D, Wiersma A, Bron P a, Lambert J, de Vos WM, van der Meer R, Smits M a, Kleerebezem M. 2005. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 187:6128–6136.
- (76) Reunanen J, von Ossowski I, Hendrickx APA, Palva A, de Vos WM. 2012. Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2337–2344.
- (77) Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, Vikström S, Sjöström R, Lindén S, Bäckström A, Lundberg C, Arnqvist A, Mahdavi J, Nilsson UJ, Velapatiño B, Gilman RH, Gerhard M, Alarcon T, López-Brea M, Nakazawa T, Fox JG, Correa P, Dominguez-Bello MG, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Normark S, Carlstedt I, Oscarson S, Teneberg S, Berg DE, Borén T. 2004. Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science.* 305:519–522.
- (78) Mukai T, Kaneko S, Ohori H. 1998. Haemagglutination and glycolipid-binding activities of *Lactobacillus reuteri*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27:130–134.
- (79) Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. 2002. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32:105–110.
- (80) Patsos G, Corfield A. 2009. Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. *Biol. Chem.* 390:581–590.
- (81) 堀田恭子, 石原和彦. 1999. 胃粘液の魅力を探る: 最新手法によるムチンの解明. メジカルビュー社.
- (82) Azuumi Y, Ohara S, Ishihara K, Okabe H, Hotta K. 1980. Correlation of quantitative changes of gastric mucosal glycoproteins with aspirin-induced gastric damage in rats. *Gut.* 21:533–536.
- (83) Komuro Y, Ishihara K, Ishii K, Ota H, Katsuyama T, Saigenji K, Hotta K. 1992. A separating method for quantifying mucus glycoprotein localized in the different layer of rat gastric mucosa. *Gastroenterol. Jpn.* 27:466–472.

- (84) Johansson ME V, Larsson JMH, Hansson GC. 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:4659–4665.
- (85) Croix J a, Carbonero F, Nava GM, Russell M, Greenberg E, Gaskins HR. 2011. On the relationship between sialomucin and sulfomucin expression and hydrogenotrophic microbes in the human colonic mucosa. *PLoS One.* 6:e24447.
- (86) Ikezawa T, Goso Y, Ichikawa T, Hayashida H NT, Kurihara M, Saigenji K, Ishihara K. 2002. Immunohistochemical localization in rat gastrointestinal tract of a sialomucin species recognized by HCM31, a new anti-mucin monoclonal antibody. *Biomed. Res.* 23:63–68.
- (87) Ohara S, Watanabe T, Hotta K. 1997. Comparative study of carbohydrate portion of gastrointestinal mucins using Enzyme-linked Lectin-Binding Assay (ELLA). *Comp. Biochem. Physiol.* 116:167–172.
- (88) Saha AK, Brewer CF. 1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.* 254:157–167.
- (89) Tsubokawa D, Goso Y, Sawaguchi A, Kurihara M, Ichikawa T, Sato N, Suganuma T, Hotta K, Ishihara K. 2007. A monoclonal antibody, PGM34, against 6-sulfated blood-group H type 2 antigen, on the carbohydrate moiety of mucin. *FEBS J.* 274:1833–1848.
- (90) Tsubokawa D, Goso Y, Kawashima R, Ota H, Nakamura T, Nakamura K, Sato N, Kurihara M, Dohi T, Kawamura YI, Ichikawa T, Ishihara K. 2012. The monoclonal antibody HCM31 specifically recognises the Sd(a) tetrasaccharide in goblet cell mucin. *FEBS Open Bio.* 2:223–233.
- (91) Mall AS, Tyler M, Lotz Z, Davidson A, Rodrigues J, van der Watt G, Kahn D, Govender D. 2007. The characterisation of mucin in a mature ovarian teratoma occurring in an eight year old patient. *Int. J. Med. Sci.* 4:115–123.
- (92) Coïc Y-M, Baleux F, Poyraz Ö, Thibeaux R, Labruyere E, Chretien F, Sobhani I, Lazure T, Wyplosz B, Schneider G, Mulard L, Sansonetti PJ, Marteyn BS. 2012. Design of a specific colonic mucus marker using a human commensal bacterium cell surface domain. *J. Biol. Chem.* 287:15916–15922.
- (93) Lee CS, Muthusamy A, Abdul-Rahman PS, Bhavanandan VP, Hashim OH. 2013. An improved lectin-based method for the detection of mucin-type O-glycans in biological samples. *Analyst.* 138:3522–3529.
- (94) Allen A, Hutton DA, Pearson JP. 1998. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:797–801.
- (95) Fogg FJ, Hutton DA, Jumel K, Pearson JP, Harding SE, Allen A. 1996. Characterization of pig colonic mucins. *Biochem. J.* 316:937–942.
- (96) Schägger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1:16–22.
- (97) Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. 1970. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. *Histochemie.* 21:97–116.

- (98) Lev R, Spicer SS. 1965. A histochemical comparison of human epithelial mucins in normal and in hypersecretory states including pancreatic cystic fibrosis. *Am. J. Pathol.* 46:23–47.
- (99) Gross G, Snel J, Boekhorst J, Smits M a, Kleerebezem M. 2010. Biodiversity of mannose-specific adhesion in *Lactobacillus plantarum* revisited: strain-specific domain composition of the mannose-adhesin. *Benef. Microbes.* 1:61–66.
- (100) De Leeuw E, Li X, Lu W. 2006. Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 260:210–215.
- (101) Teneberg S. 1997. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 272:19067–19071.
- (102) Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. 2002. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 46:1041–1051.
- (103) Schaumburg J, Diekmann O, Hagendorff P, Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S, Jänsch L, Wehland J, Kärst U. 2004. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics.* 4:2991–3006.
- (104) Balasubramanian S, Kannan TR, Baseman JB. 2008. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. *Infect. Immun.* 76:3116–3123.
- (105) Balasubramanian S, Kannan TR, Hart PJ, Baseman JB. 2009. Amino acid changes in elongation factor Tu of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* influence fibronectin binding. *Infect. Immun.* 77:3533–3541.
- (106) Kunert A, Losse J, Gruszyn C, Hühn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J, Zipfel PF. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J. Immunol.* 179:2979–2988.
- (107) Dallo SF, Zhang B, Denno J, Hong S, Tsai A, Haskins W, Ye JY, Weitao T. 2012. Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin. *Scientific World Journal.* 2012:128705.
- (108) Lortal S, Van Heijenoort J, Gruber K, Sleytr UB. 1992. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. *J. Gen. Microbiol.* 138:611–618.
- (109) Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4506–4512.
- (110) Junick J, Blaut M. 2012. Quantification of human fecal *bifidobacterium* species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the groEL gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2613–2622.

- (111) Turrone F, van Sinderen D, Ventura M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* 149:37–44.
- (112) Kleerebezem M, Vaughan EE. 2009. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:269–290.
- (113) Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:728–764.
- (114) Uchida H, Fujitani K, Kawai Y, Kitazawa H, Horii A, Shiiba K, Saito K, Saito T. 2004. A new assay using surface plasmon resonance (SPR) to determine binding of the *Lactobacillus acidophilus* group to human colonic mucin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:1004–1010.
- (115) Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois J-YF, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, van Dijl JM. 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:207–233.
- (116) Jongbloed JDH, Antelmann H, Hecker M, Nijland R, Bron S, Airaksinen U, Pries F, Quax WJ, van Dijl JM, Braun PG. 2002. Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 277:44068–44078.
- (117) Albers S-V, Szabó Z, Driessen AJM. 2003. Archaeal homolog of bacterial type IV prepilin signal peptidases with broad substrate specificity. *J. Bacteriol.* 185:3918–3925.
- (118) Nakano MM, Zuber P. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10:223–240.
- (119) Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:783–795.
- (120) Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S. 2005. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics.* 6:167.
- (121) Simonen M, Palva I. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57:109–137.
- (122) Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, Ohlmeier S, Bron S, van Dijl JM, Hecker M. 2001. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* 11:1484–1502.
- (123) Hirose I, Sano K, Shioda I, Kumano M, Nakamura K, Yamane K. 2000. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology.* 146:65–75.
- (124) Wu XC, Lee W, Tran L, Wong SL. 1991. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J. Bacteriol.* 173:4952–4958.

- (125) Agarwal S, Kulshreshtha P, Bambah Mukku D, Bhatnagar R. 2008. alpha-Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784:986–994.
- (126) Yang C-K, Ewis HE, Zhang X, Lu C-D, Hu H-J, Pan Y, Abdelal AT, Tai PC. 2011. Nonclassical protein secretion by *Bacillus subtilis* in the stationary phase is not due to cell lysis. *J. Bacteriol.* 193:5607–5615.
- (127) Lenz LL, Mohammadi S, Geissler A, Portnoy DA. 2003. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:12432–12437.
- (128) Scott JR, Barnett TC. 2006. Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:397–423.
- (129) Stark H, Rodnina M V, Rinke-Appel J, Brimacombe R, Wintermeyer W, van Heel M. 1997. Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. *Nature.* 389:403–406.
- (130) Wei M-Q, Rush CM, Norman JM, Hafner LM, Epping RJ, Timms P. 1995. An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *J. Microbiol. Methods.* 21:97–109.
- (131) Kok J, van der Vossen JM, Venema G. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:726–731.
- (132) Shimoike T, Akiyama Y, Baba T, Taura T, Ito K. 1992. SecY variants that interfere with *Escherichia coli* protein export in the presence of normal secY. *Mol. Microbiol.* 6:1205–1210.
- (133) Noumi T, Maeda M, Futai M. 1987. Mode of inhibition of sodium azide on H⁺-ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 213:381–384.
- (134) Davis L, Chin JW. 2012. Designer proteins: applications of genetic code expansion in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:168–182.
- (135) Oliver DB, Cabelli RJ, Dolan KM, Jarosik GP. 1990. Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:8227–8231.
- (136) Krehenbrink M, Edwards A, Downie JA. 2011. The superoxide dismutase SodA is targeted to the periplasm in a SecA-dependent manner by a novel mechanism. *Mol. Microbiol.* 82:164–179.
- (137) Nakane A, Takamatsu H, Oguro A, Sadaie Y, Nakamura K, Yamane K. 1995. Acquisition of azide-resistance by elevated SecA ATPase activity confers azide-resistance upon cell growth and protein translocation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 141:113–121.
- (138) Halbedel S, Kawai M, Breitling R, Hamoen LW. 2014. SecA is required for membrane targeting of the cell division protein DivIVA *in vivo*. *Front. Microbiol.* 5:58.

- (139) Poritz MA, Strub K, Walter P. 1988. Human SRP RNA and *E. coli* 4.5S RNA contain a highly homologous structural domain. *Cell*. 55:4–6.
- (140) Economou A. 1999. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol.* 7:315–320.
- (141) Feltcher ME, Braunstein M. 2012. Emerging themes in SecA2-mediated protein export. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:779–789.
- (142) Feltcher ME, Gibbons HS, Ligon LS, Braunstein M. 2013. Protein export by the mycobacterial SecA2 system is determined by the preprotein mature domain. *J. Bacteriol.* 195:672–681.
- (143) Zimmer J, Nam Y, Rapoport TA. 2008. Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature*. 455:936–943.
- (144) Fekkes P, van der Does C, Driessen AJ. 1997. The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* 16:6105–6113.
- (145) Gelis I, Bonvin AMJJ, Keramisanou D, Koukaki M, Gouridis G, Karamanou S, Economou A, Kalodimos CG. 2007. Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell*. 131:756–769.
- (146) Grady LM, Michtavy J, Oliver DB. 2012. Characterization of the *Escherichia coli* SecA signal peptide-binding site. *J. Bacteriol.* 194:307–316.
- (147) Papanikou E, Karamanou S, Economou A. 2007. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:839–851.
- (148) Yang C-K, Zhang X-Z, Lu C-D, Tai PC. 2014. An internal hydrophobic helical domain of *Bacillus subtilis* enolase is essential but not sufficient as a non-cleavable signal for its secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446:901–905.
- (149) Boël G, Jin H, Pancholi V. 2005. Inhibition of cell surface export of group A streptococcal anchorless surface dehydrogenase affects bacterial adherence and antiphagocytic properties. *Infect. Immun.* 73:6237–6248.
- (150) Jin H, Agarwal S, Agarwal S, Pancholi V. 2011. Surface export of GAPDH/SDH, a glycolytic enzyme, is essential for *Streptococcus pyogenes* virulence. *MBio.* 2:e00068–00011.
- (151) Drew D, Lerch M, Kunji E, Slotboom D-J, de Gier J-W. 2006. Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat. Methods.* 3:303–313.
- (152) Segers K, Klaassen H, Economou A, Chaltin P, Anné J. 2011. Development of a high-throughput screening assay for the discovery of small-molecule SecA inhibitors. *Anal. Biochem.* 413:90–96.
- (153) Khokhlova O V, Nesmeianova MA. 2003. Interaction of SecB and SecA with the N-terminal region of mature alkaline phosphatase on its secretion in *Escherichia coli*. *Mol. Biol.* 37:712–718.

- (154) Archambaud C, Nahori M-A, Pizarro-Cerda J, Cossart P, Dussurget O. 2006. Control of *Listeria superoxide* dismutase by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281:31812–31822.
- (155) Pereira SFF, Goss L, Dworkin J. 2011. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75:192–212.
- (156) Archambaud C, Gouin E, Pizarro-Cerda J, Cossart P, Dussurget O. 2005. Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 56:383–396.
- (157) Sajid A, Arora G, Gupta M, Singhal A, Chakraborty K, Nandicoori VK, Singh Y. 2011. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* elongation factor Tu with GTP is regulated by phosphorylation. *J. Bacteriol.* 193:5347–5358.
- (158) Alexander C, Bilgin N, Lindschau C, Mesters JR, Kraal B, Hilgenfeld R, Erdmann VA, Lippmann C. 1995. Phosphorylation of elongation factor Tu prevents ternary complex formation. *J. Biol. Chem.* 270:14541–14547.
- (159) Nissen P, Kjeldgaard M, Thirup S r., Polekhina G, Reshetnikova L, Clark BFC, Nyborg J. 1995. Crystal Structure of the ternary complex of Phe-tRNA-Phe, EF-Tu, and a GTP analog. *Science.* 270:1464–1472.

謝辞

終わりにあたり，本研究に対してご指導とご校閲の労をとられた北里大学獣医学部 向井孝夫教授，並びに終始有益なご助言とご指導をいただいた北里大学獣医学部 山本裕司講師に心より厚くお礼申し上げます。

また，ムチンの精製技術のご指導やモノクローナル抗体を供与してくださった北里大学保健衛生専門学院 石原和彦学院長，北里大学医学部 坪川大悟助教，実験計画の立案およびビフィズス菌の取り扱いに関する技術指導をいただいた森永乳業(株)食品基盤研究所 阿部文明所長，並びに宮内浩文氏に深く感謝申し上げます。

また，本研究を遂行するにあたって，直接のご指導をいただいた北里大学獣医学部 吉岡一機准教授，さらに，日頃よりご助言と実験のサポートをしていただいた清宮広貴氏，仲又幸一氏，中里彩季子氏，川鍋彬氏，中光貴之氏，落合郁佳氏，南條早由利氏，遠藤紗耶氏，小菅晴春氏，吉村美郁氏，矢吹洋子事務職員，並びに細胞分子機能学研究室の皆様から感謝致します。

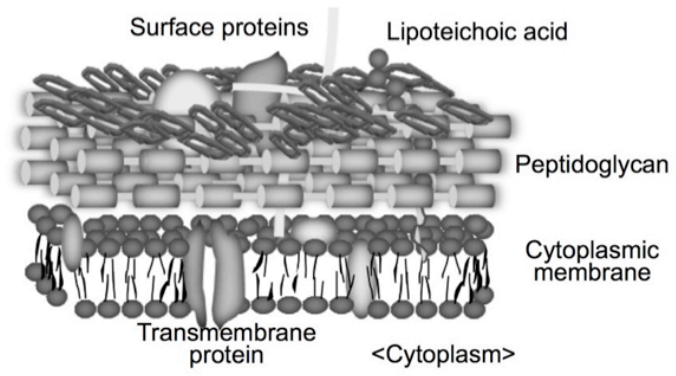


図1 グラム陽性細菌の細胞表層構成因子の模式図

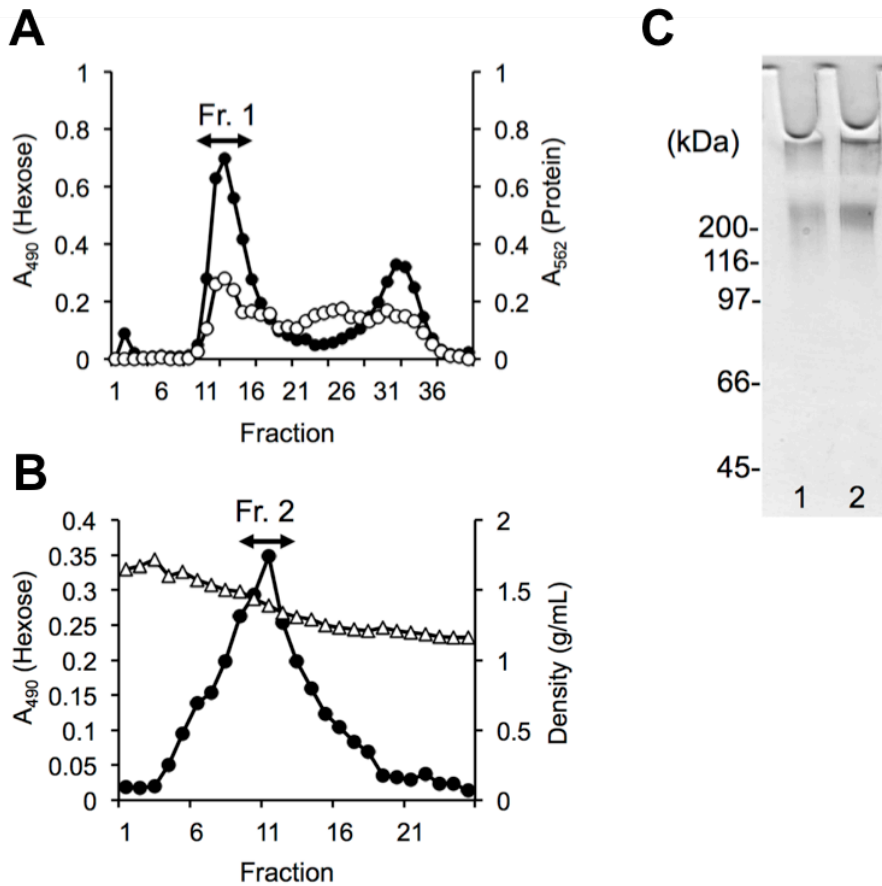


図2 ブタ消化管からのムチンの精製

ブタ結腸からゲル濾過クロマトグラフィーおよび密度勾配超遠心分離によりムチンの精製を行った。(A)ゲル濾過クロマトグラフィーによるムチンの分画。●はフェノール硫酸法により検出したヘキソースを示し、○はBCA法により検出したタンパク質を示す。ボイドボリュームに検出されたピーク、フラクション番号10～18をFr. 1として、密度勾配超遠心分離に供した。(B)密度勾配超遠心分離によるムチンの分画。●はヘキソースを示し、△は比重を示す。1.35～1.45 g/mLのフラクションをFr. 2とした。(C)得られたFr. 1(Lane 1)とFr. 2(Lane 2)は、SDS-PAGE(7.5%アクリルアミド)に供した。PAS染色により染色した。

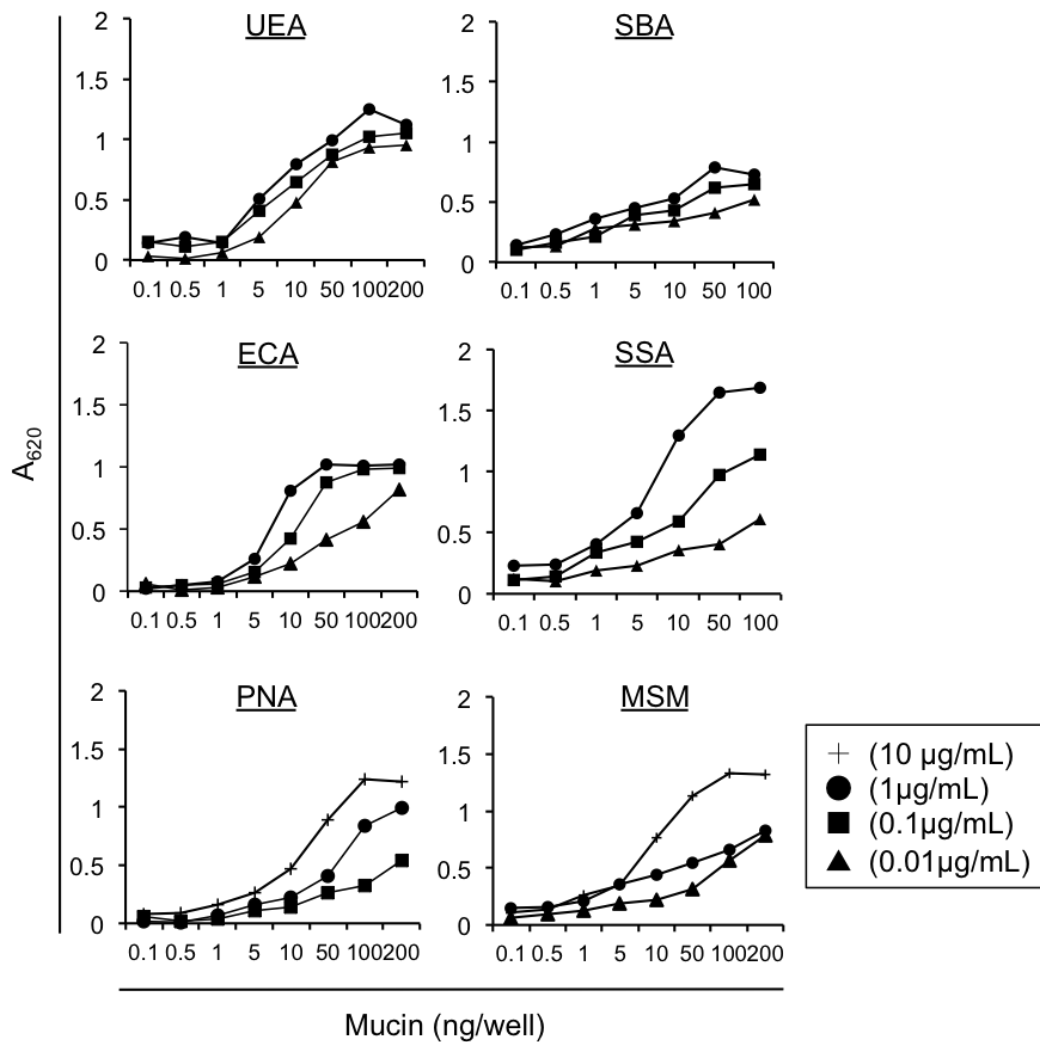


図3 ブタ結腸ムチンに対する種々のレクチンの反応性

ELLAにより6種類の各濃度のビオチン化レクチンをブタ結腸ムチンに添加した際の反応性を示した。各レクチンは、次に示した糖鎖構造に反応性を示す; UEA-I: Fuc α 1-2 Gal, ECA: Gal β 1-4 GlcNAc, PNA: Gal β 1-3 GalNAc, SBA: GalNAc α 1-3Gal, SSA: NANA α 2-3Gal, MSM: NANA α 2-6 Gal。n=3として、平均値を各プロットで示した。

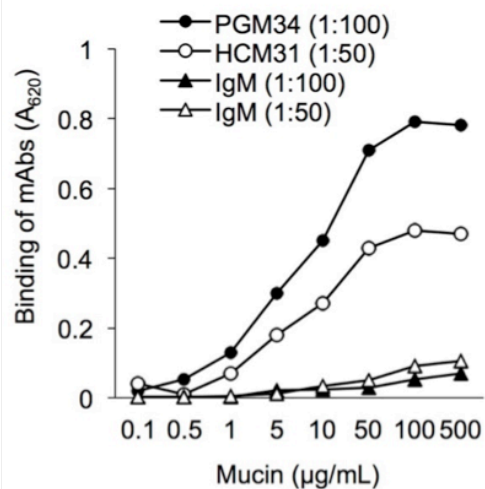
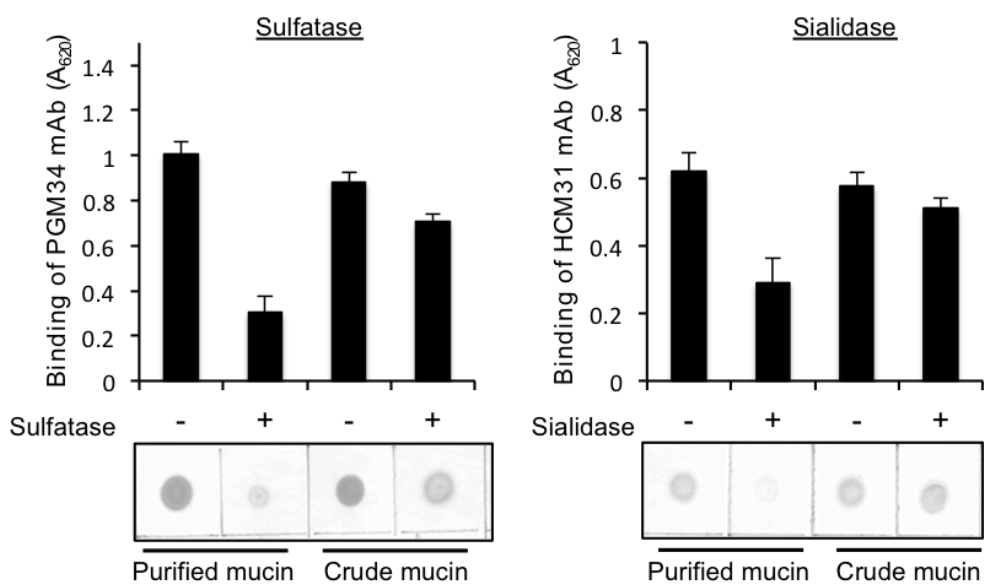
A**B**

図4 ブタ結腸ムチンに対する抗ムチンモノクローナル抗体の反応性

(A)ELISAにより硫酸化血液型Hタイプ2構造をエピトープとするPGM34モノクローナル抗体とSd^(a)血液型抗原をエピトープとするHCM31モノクローナル抗体による酸性ムチン糖鎖の検出を行った。コントロールとして、マウスIgMを用いた。n=3として、平均値を各プロットに示した。(B)スルファターゼあるいはシアリダーゼ処理がPGM34とHCM31モノクローナル抗体の反応性に及ぼす影響を、ELISAとDot blot法により評価した。(-)は抗処処理前, (+)は酵素処理後を示す(n=3)。

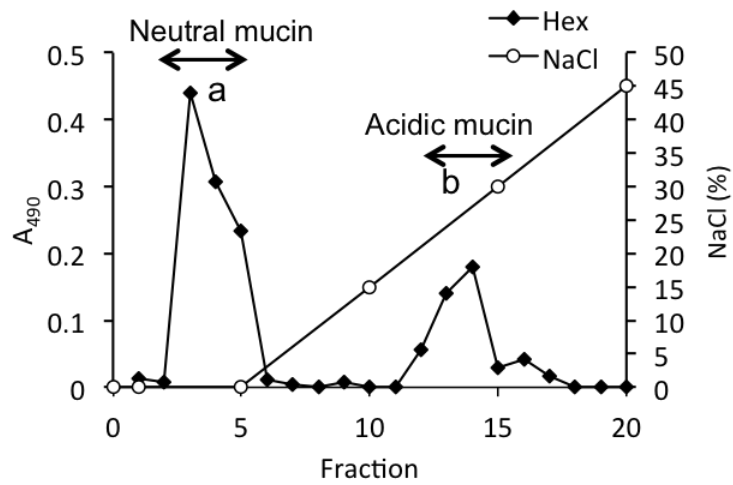


図5 陰イオン交換クロマトグラフィーによるムチン糖鎖の分画

アルカリ加水分解によって得られたブタ胃ムチン由来ムチンオリゴ糖を陰イオン交換クロマトグラフィーにより、中性ムチンオリゴ糖鎖と酸性ムチンオリゴ糖鎖に分画した。●はフェノール硫酸法によって検出したヘキソース、○はNaClの濃度を示す。

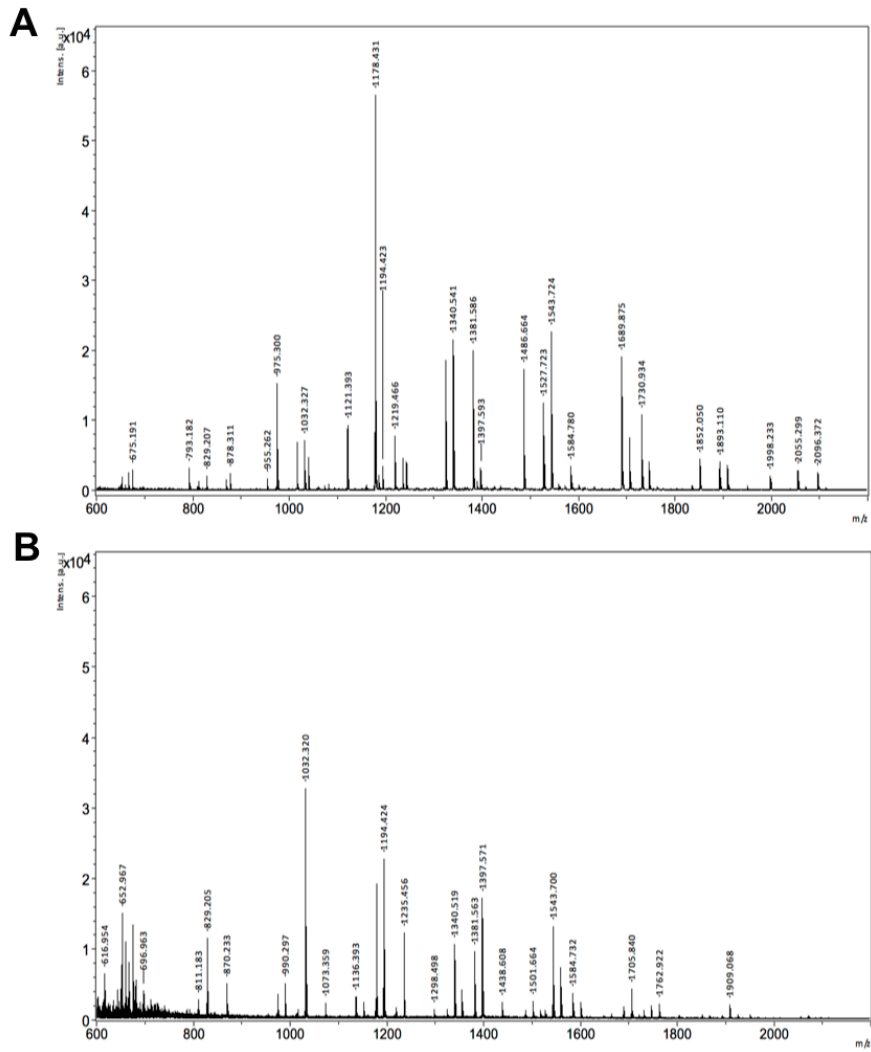


図6 MALDI-TOF/MSによる酸性ムチンオリゴ糖に含まれる酸性糖の検出
 酸性ムチンオリゴ糖に含まれるシアル酸を弱酸加水分解処理により切断した際の酸性糖鎖の検出を陰イオンモードのMALDI-TOF/MSにより検出した。加水分解処理前(A)と比較し、加水分解処理後(B)では、m/z 675, 878, 1040, 1243, 1389, 2055, 2096のシアル酸を含むピークが消失した。各ピークのオリゴ糖鎖の組成は、表4に示した。

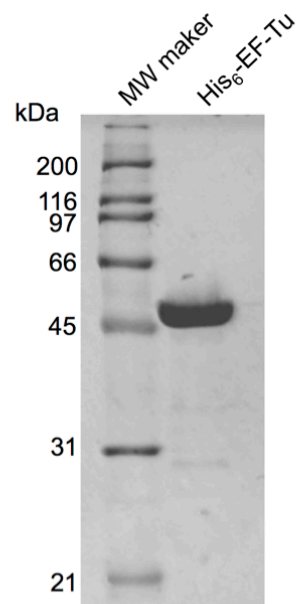


図7 His₆-EF-Tuの電気泳動図

E. coli BL21を宿主として発現し、ニッケルカラムおよびイオン交換カラムによって精製したHis₆-EF-Tuを12.5%アクリルアミドSDS-PAGEに供した。CBB-R250により染色した。

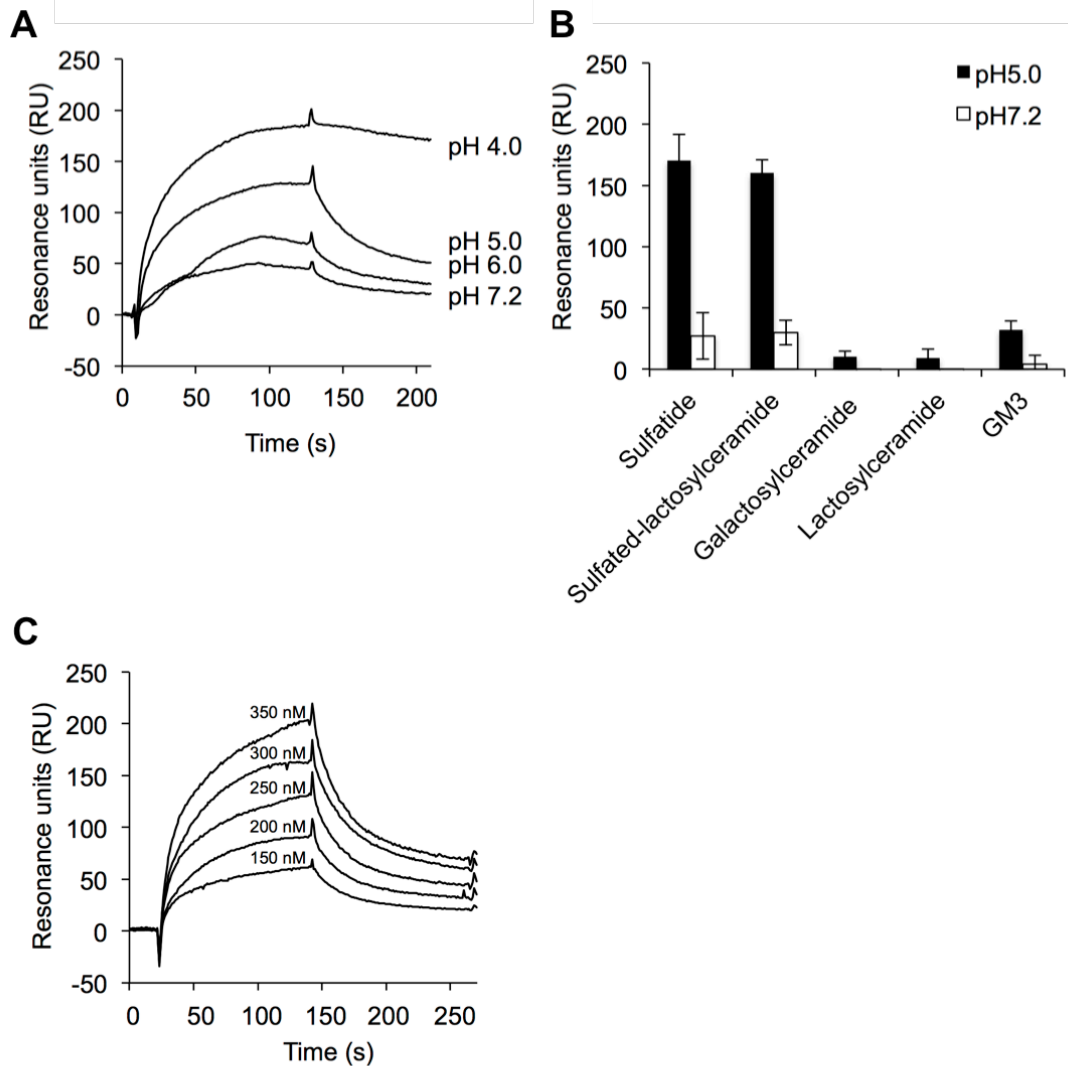


図8 Biacoreによる複合糖質とHis₆-EF-Tuとの相互作用解析

(A)各pH条件(pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.2)におけるSulfatide (SO₃-3Galβ1Cer)とHis₆-EF-Tuとの相互作用解析。センサーチップ上に2,500 RUのHis₆-EF-Tuを固定し、アナライトとして350 nMのSulfatideを添加した。(B)pH5.0とpH7.2におけるSulfatide (SO₃-3Galβ1Cer), Sulfated-lactosylceramide (SO₃-3Galβ4Glcβ1Cer), Galactosylceramide (Galβ1Cer), Lactosylceramide (Galβ4Glcβ1Cer), Sialylated glycolipid (GM3; NeuAcα3Galβ4Glcβ1Cer)とHis₆-EF-Tuとの相互作用解析。アナライトとして350 nMの複合糖脂質を添加した(n=5)。(C)pH5.0における各濃度のSulfatide(150~350 nM)とHis₆-EF-Tuとの相互作用解析。各センサーグラムから得られた解離定数(K_D)は、本文中に示した。

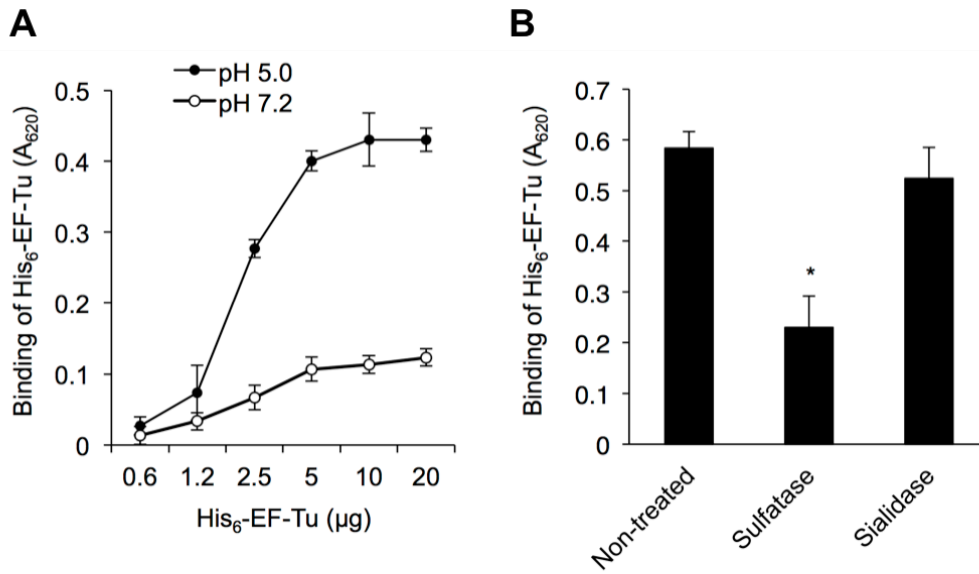


図9 ムチンに対するHis₆-EF-Tuの結合性の評価

(A) pH5.0あるいはpH7.2におけるブタ胃ムチンに対するHis₆-EF-Tuの結合性をELISAにより評価した。His₆-EF-Tuの添加量(0.6~20 μg/well)は、横軸に示した(n=3)。(B)スルファターゼあるいはシアリダーゼ処理を行ったムチンに対するHis₆-EF-Tuの結合性。10 μg/wellのHis₆-EF-Tuを添加した際の結合量を示す。統計処理はStudent's t検定により行った(n=3)。酵素処理前のムチンと比較し、スルファターゼ処理後で有意な(*p<0.05)低下を示す。

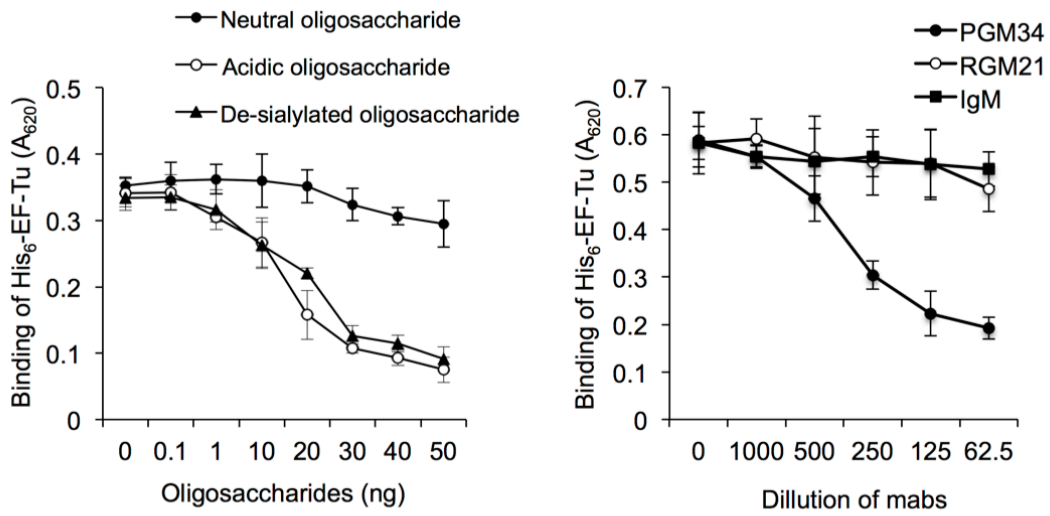


図10 ムチンに対するHis₆-EF-Tuの結合阻害

(A) 競合ELISAによるブタ胃ムチンに対するHis₆-EF-Tuの結合性の評価。ブタ胃ムチン由来の中性オリゴ糖 (Neutral oligosaccharide), 酸性オリゴ糖 (Acidic oligosaccharide), 脱シアル酸酸性オリゴ糖 (De-sialylated oligosaccharide) を0~50ng/well添加した際のHis₆-EF-Tuの結合性を評価した (n=5)。(B) 硫酸化血液型Hタイプ2構造をエピトープとするPGM34モノクローナル抗体あるいは血液型Hタイプ1構造をエピトープとするRGM21モノクローナル抗体を用いて、ブタ胃ムチンに対するHis₆-EF-Tuの結合を阻害した (n=5)。コントロールとしてマウスIgMを用いた。

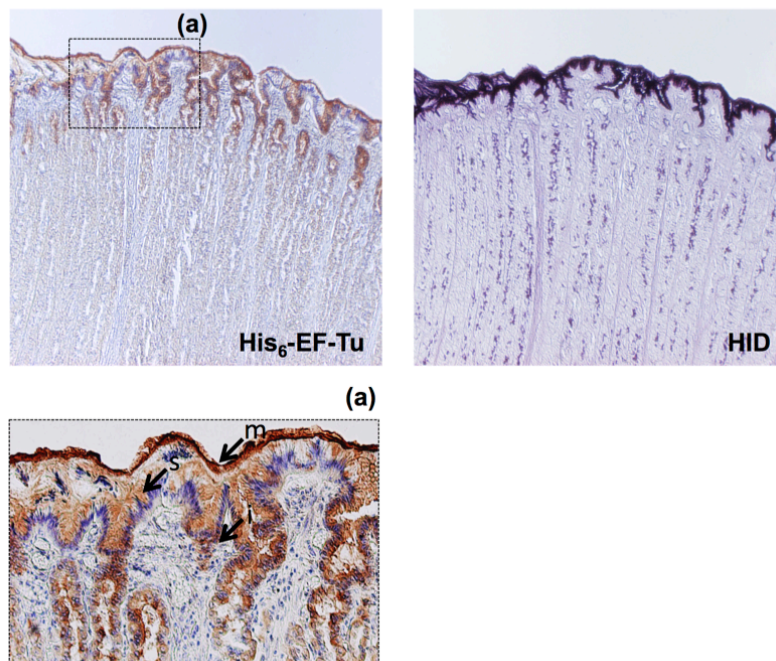


図11 組織化学的手法によるHis₆-EF-Tuの結合性の評価

ブタ胃底部粘膜切片に対するHis₆-EF-Tuの結合性を評価した。メタノール-カルノア固定した粘膜組織をHis₆-EF-Tu(写真・左)またはHID(写真・右)により染色した。His₆-EF-Tu(写真・左)の点線部分を200倍率で検鏡した写真が(a)である。矢印で示した、粘液ゲル層(m; mucous gel layer), 表層粘液細胞(s; surface mucous cells), 胃腺狭部粘液細胞(i; mucous cells around the isthmus)に対して反応性を示した。

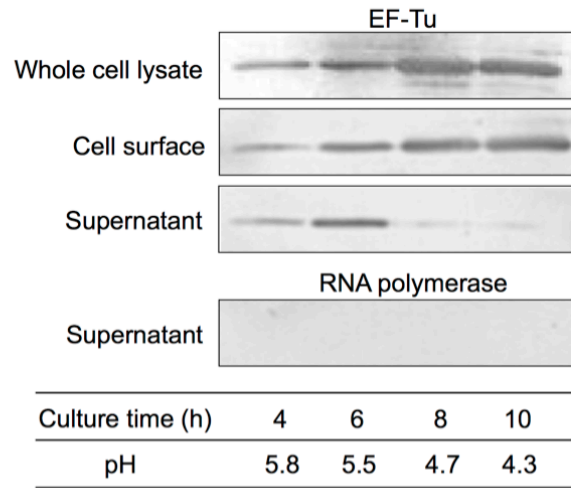


図12 *L. reuteri* JCM1081におけるEF-Tuの局在

L. reuteri JCM1081の各培養時間のWhole cell lysate, Cell surface, SupernatantにおけるEF-Tuの局在を抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。抗RNA-polymerase抗体は細胞内マーカーとして使用し、細胞溶解が起きていないことを確認した。また、培養時間と培地pHを表に示した。

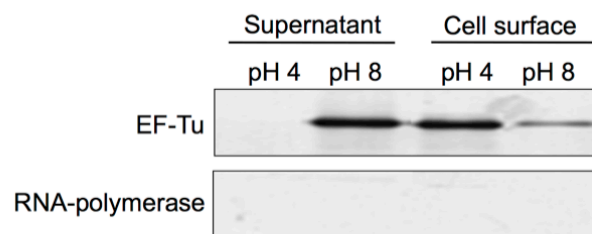


図13 異なるpH条件下における*L. reuteri* JCM1081のEF-Tuの局在

L. reuteri JCM1081をpH4.0またはpH8.0の緩衝液で処理した際のEF-Tuの局在を抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。抗RNA-polymerase抗体は細胞内マーカーとして使用し、細胞溶解が起きていないことを確認した。

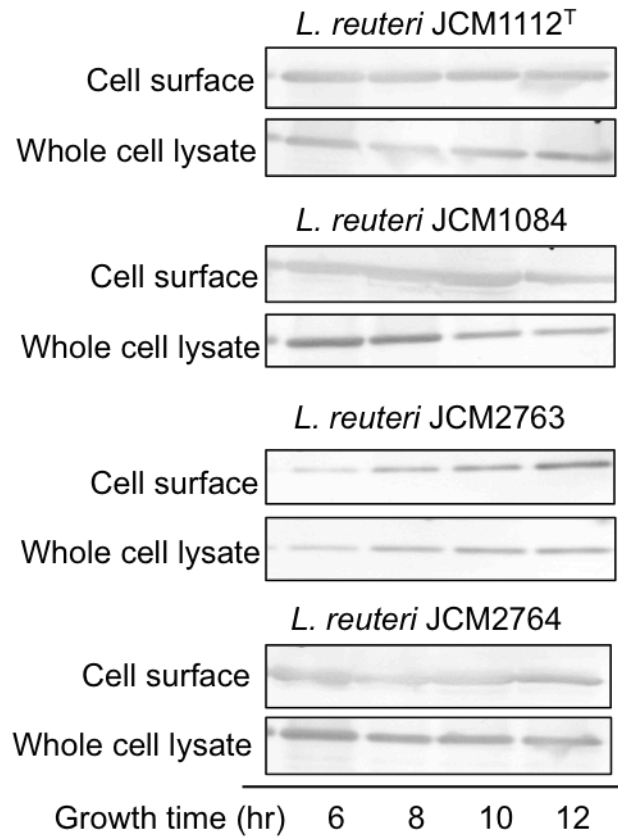


図14 *L. reuteri* 4菌株におけるEF-Tuの局在

L. reuteri 4菌株の各培養時間のWhole cell lysate, Cell surfaceにおけるEF-Tuの局在を抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。また、培養時間を下に示した。

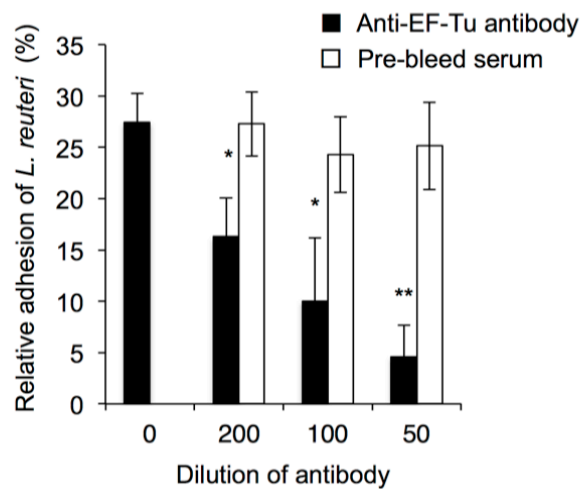


図15 抗EF-Tu抗体による*L. reuteri* JCM1081のムチンに対する付着阻害試験

L. reuteri JCM1081のブタ胃ムチンに対する付着を抗EF-Tu抗体あるいは免疫前血清を用いて阻害した。横軸には、抗体および血清の希釈倍率を示した。統計処理は、Dunnett法により行った。アスタリスクは、抗体非添加区と比較して、抗体添加区で有意な低下(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)があることを示す($n=4$)。

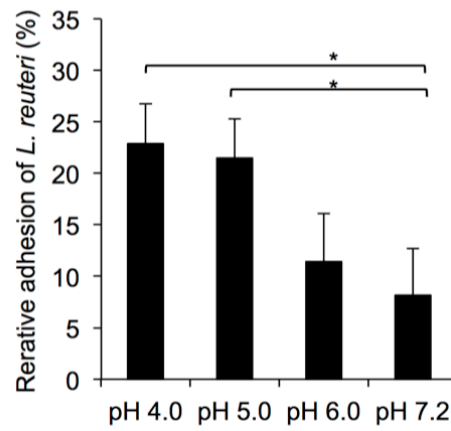


図16 異なるpH条件における*L. reuteri* JCM1081のムチンに対する付着性
pH4.0, 5.0, 6.0, 7.2に調製したDMEM培地で処理した*L. reuteri* JCM1081のブタ胃ムチンに対する付着性を評価した。統計処理は、Bonferroni法により行った。アスタリスクは、実験区間で有意な差(* $p < 0.05$)があることを示す。

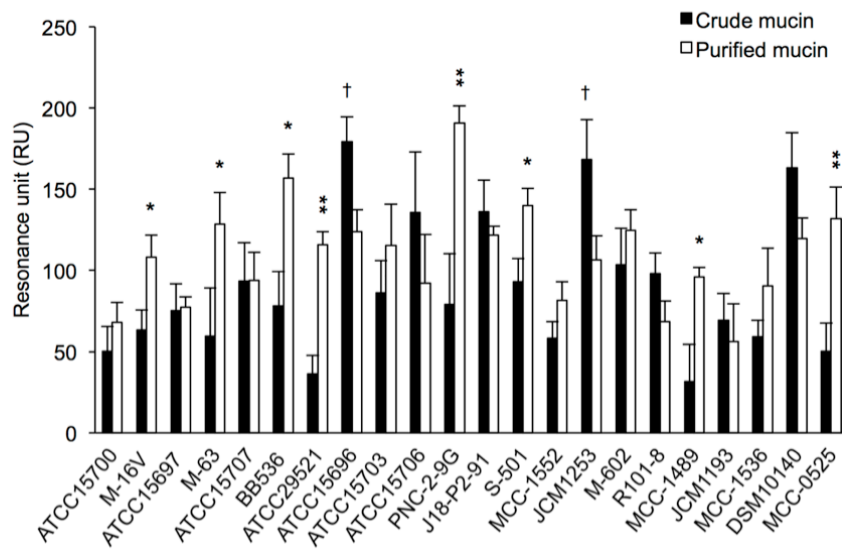


図17 *Bifidobacterium* 22菌株のブタ結腸ムチンに対する付着性

Bifidobacterium 22菌株の粗精製ムチンおよび精製ムチンに対する付着性をBiacoreにより評価した。■は粗精製ムチン, □は精製ムチンを示す。統計処理は, Student t検定により行った。アスタリスクは, 粗精製ムチンと比較して精製ムチンで有意な付着性の増加(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)を示す($n=3$)。また, ダガーは粗精製ムチンと比較して精製ムチンで有意な付着性の低下($\dagger p < 0.05$)を示す($n=3$)。

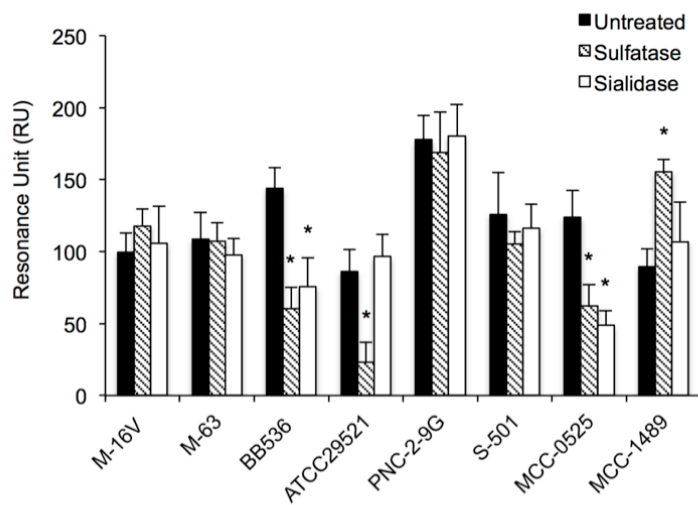


図18 酵素処理が*Bifidobacterium* 8菌株のブタ結腸ムチンに対する付着性に及ぼす影響

Bifidobacterium 8菌株のスルファターゼあるいはシアリダーゼ処理ムチンに対する付着性をBiacoreにより評価した。■は未処理ムチン, ▨はスルファターゼ処理ムチン, □はシアリダーゼ処理ムチンを示す。統計処理は, Dunnett法により行った。アスタリスクは, 未処理ムチンと比較して酵素処理ムチンで有意な付着性の低下 (* $p < 0.05$)を示す (n=5)。

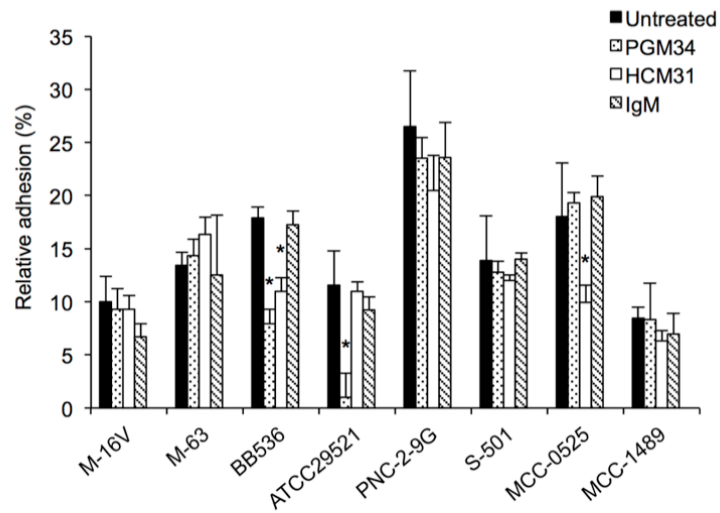


図19 抗ムチンモノクローナル抗体の処理が*Bifidobacterium* 8菌株のブタ結腸ムチンに対する付着性に及ぼす影響

Bifidobacterium 8菌株の抗ムチンモノクローナル抗体処理ムチンに対する付着性をプレート法により評価した。■は未処理ムチン, □はPGM34抗体処理, □はHCM31処理, ▨はIgM処理ムチンを示す。統計処理は, Dunnett法により行った。アスタリスクは, 未処理ムチンと比較して抗体処理ムチンで有意な付着性の低下(* $p < 0.05$)を示す($n=3$)。

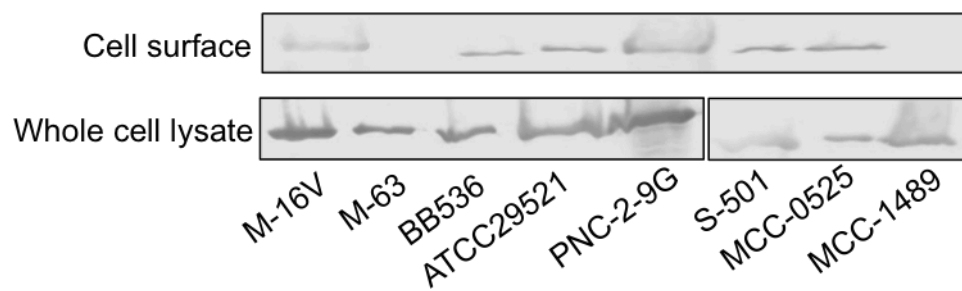


図20 *Bifidobacterium* 8菌株におけるEF-Tuの局在

Bifidobacterium 8菌株の各培養時間のWhole cell lysate, Cell surfaceにおけるEF-Tuの局在を抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。また、培養時間は12時間とした。

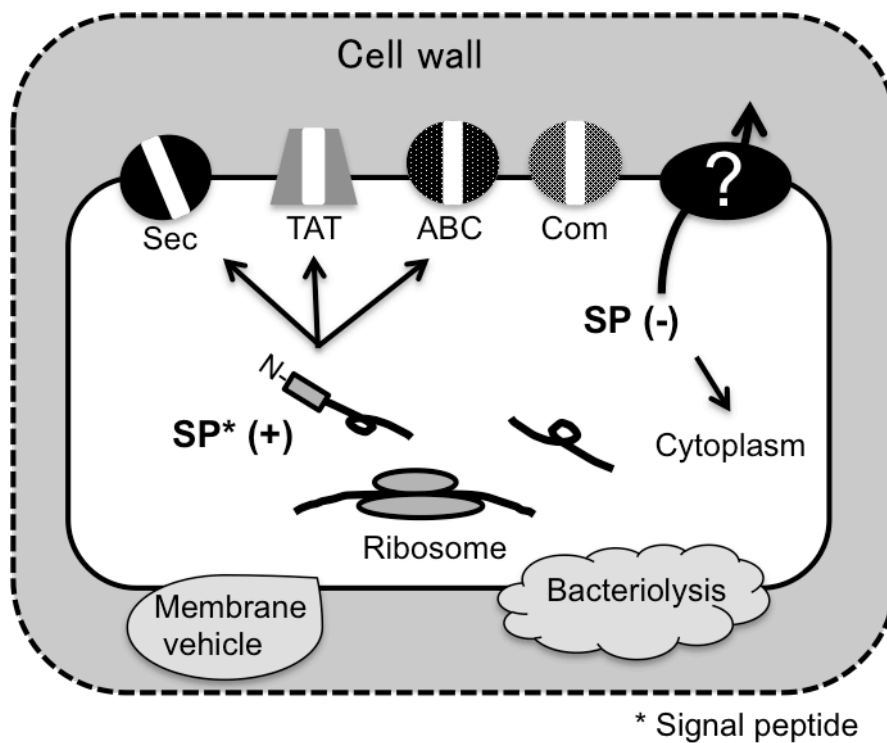


図21 グラム陽性細菌におけるタンパク質の主な分泌経路

リボソーム上で合成された前駆体タンパク質は、N末端の分泌シグナルペプチド依存的に細胞外へと分泌される。Secシグナル配列、Twin-arginine (R/RまたはK/R)シグナル配列、リポタンパク質シグナル配列、Pseudopilin-様シグナル配列、バクテリオシンシグナル配列(リーダー配列)が主な分泌シグナルペプチドである。Sec, Tat, リポタンパク質分泌シグナル配列をもつタンパク質はSecあるいはTat輸送経路、PseudopilinはCom輸送経路、バクテリオシンシグナル配列をもつタンパク質はABC輸送経路により主に分泌される。

一方、分泌シグナルペプチド非依存的分泌として、膜小胞や細胞溶解があるが、分泌シグナルペプチド非依存的な分泌経路は不明な点が多い。

A

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGCTGAAAAGAACATTATGAACGTACAAAACCCACGTTAACATTGGTACTATTGGC
M A E K E H Y E R T K P H V N I G T I G

      70      80      90      100     110     120
CACGTTGACCACGGGAAGACTACTTTAACTGCTGCTATTACAAAGGTATTGGCAGCCAAA
H V D H G K T T L T A A I T K V L A A K

      130     140     150     160     170     180
GGTTTAGCAAAGGCAGAAGATTACGCTGATATCGATGCTGCTCCAGAAGAAAAGGACGT
G L A K A E D Y A D I D A A P E E K E R

      190     200     210     220     230     240
GGTATCACTATCAACACTGCCACGTTGAATACGAAACTGAAAAGCGTCACTACGCACAC
G I T I N T A H V E Y E T E K R H Y A H

      250     260     270     280     290     300
ATCGATGCCCTGGACACGCTGACTACGTTAAGAACATGATCACTGGTGGTGCCCAAATG
I D A P G H A D Y V K N M I T G A A Q M

```

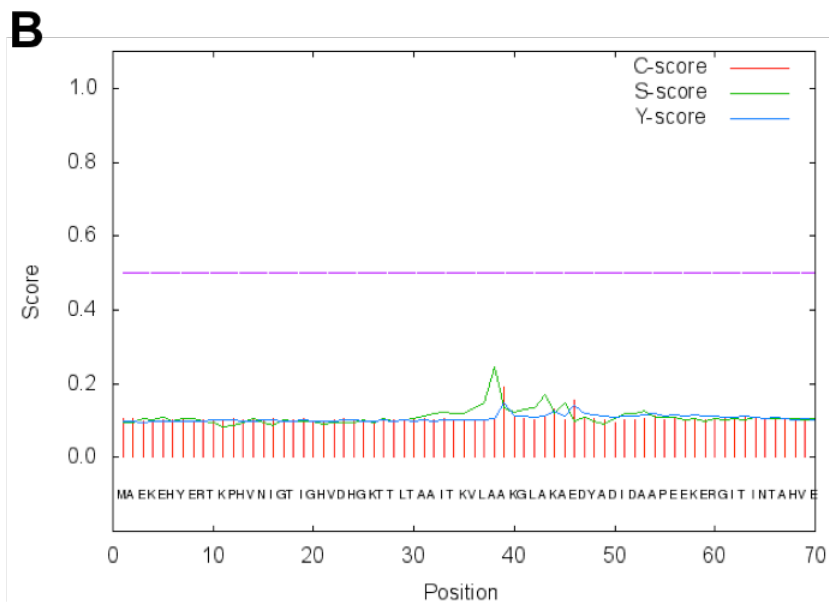


図22 *L. reuteri* JCM1081のEF-TuのN末端アミノ酸配列および塩基配列(A)とSignalP 4.1verによるシグナルペプチターゼ切断部位の解析結果(B)

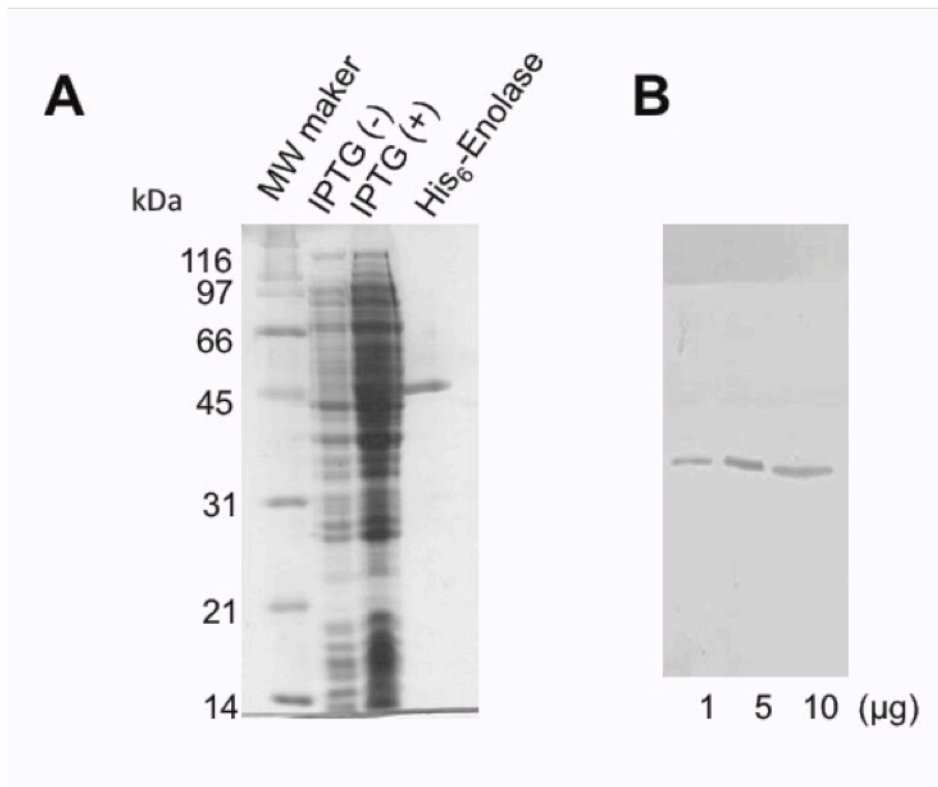


図23 *L. reuteri* JCM1081由来His₆-Enolaseの電気泳動図とウエスタンブロット

(A) *E. coli* Rosetta2を宿主として発現し、ニッケルカラムおよびイオン交換カラムによって精製したHis₆-Enolaseは、12.5%アクリルアミドSDS-PAGEに供した。CBB-R250により染色した。IPTG(-)は、IPTGによる誘導前、IPTG(+)は、IPTGによる誘導後の全菌体を泳動した。(B) *L. reuteri* JCM1081の全菌体画分のウエスタンブロット。タンパク質量は下に示した。

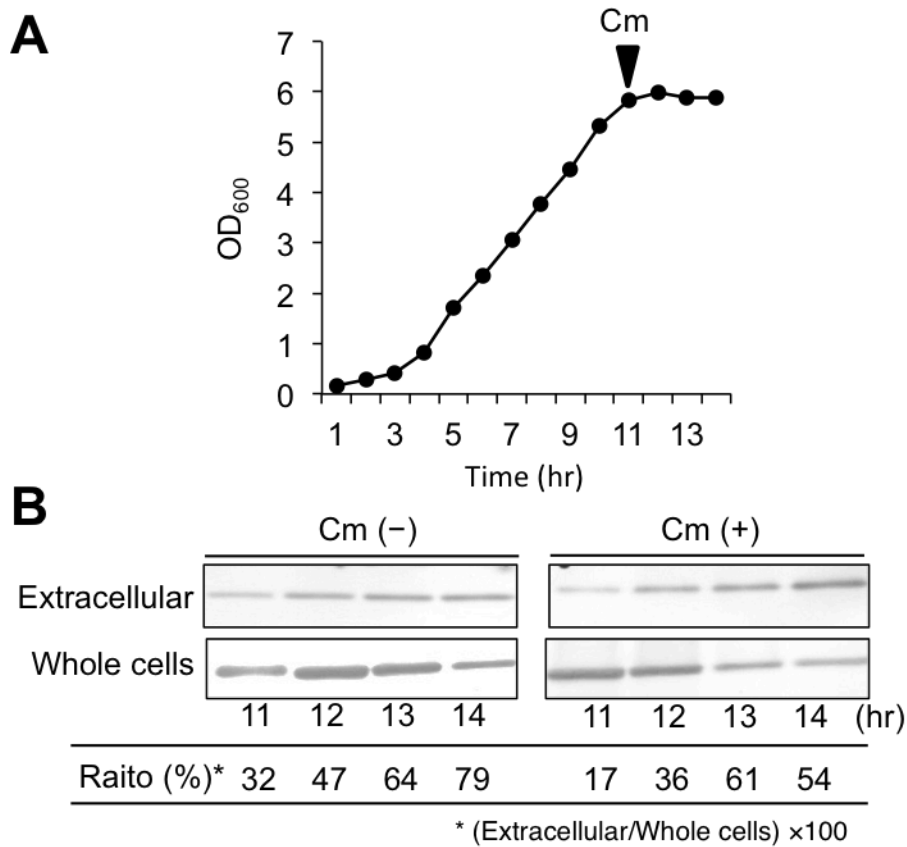


図24 クロラムフェニコールの添加が*L. reuteri* JCM1081のEF-Tuの分泌に及ぼす影響

(A) *L. reuteri* JCM1081の増殖曲線。▼は、クロラムフェニコール(Cm, 20 μ g/mL)を添加した時間を示す。(B)各培養時間でのCm添加前(-)とCm添加後(+)のEF-Tuの分泌を、抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Image Jを用いてWhole cellに対するExtracellularの割合(%)を数値化し示した。Extracellularは、培養上清と細胞表層画分を合わせた画分を示す。

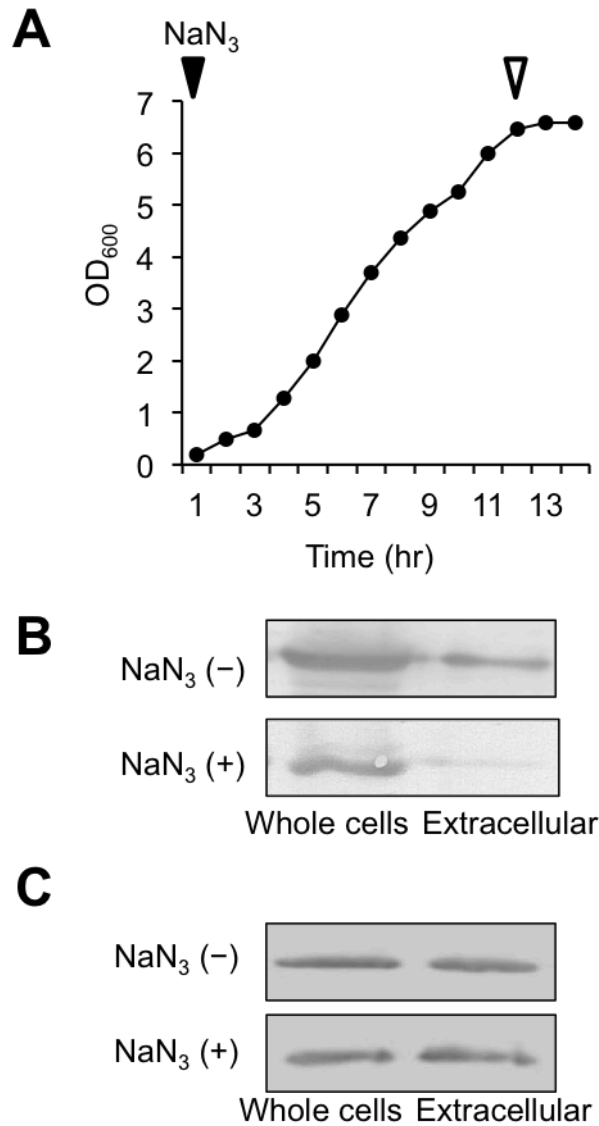


図25 アジ化ナトリウムの添加が*L. reuteri* JCM1081のEF-Tuの分泌に及ぼす影響

(A)*L. reuteri* JCM1081の増殖曲線。▼は、アジ化ナトリウム(NaN₃, 1mM)を添加した時間, ▽は、サンプルを回収した時間を示す。EF-Tu(B)とEnolase(C)の分泌は、抗EF-Tu抗体あるいは抗Enolase抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Extracellularは、培養上清と細胞表層画分を合わせた画分を示す。NaN₃非添加区(-)と添加区(+)を示す。

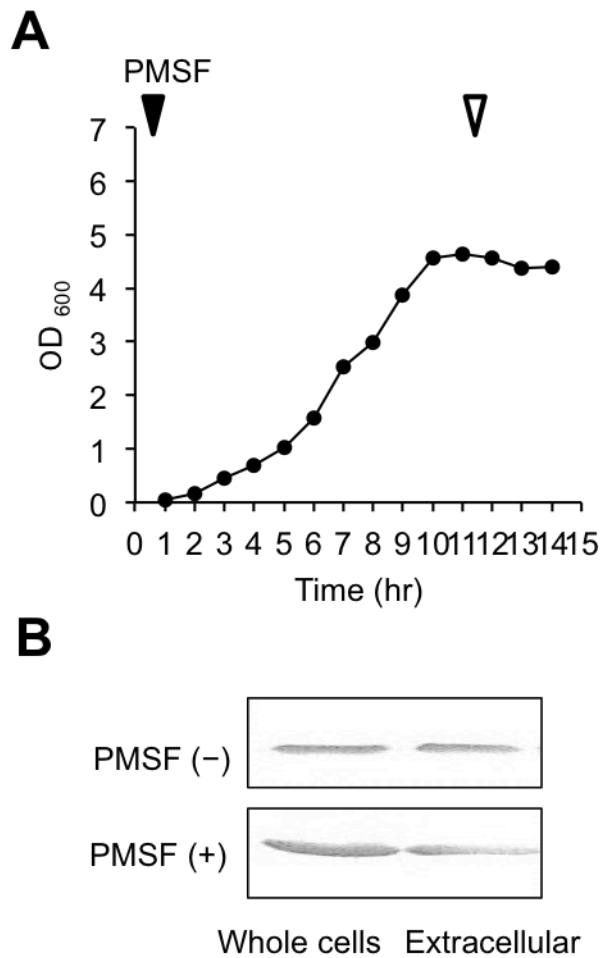


図26 PMSFの添加が*L. reuteri* JCM1081のEF-Tuの分泌に及ぼす影響

(A) *L. reuteri* JCM1081の増殖曲線。▼は、フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF, 1mM)を添加した時間、▽は、サンプルを回収した時間(12時間)を示す。(B) EF-Tuの分泌は、抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。PMSF非添加区(-)と添加区(+)を示す。

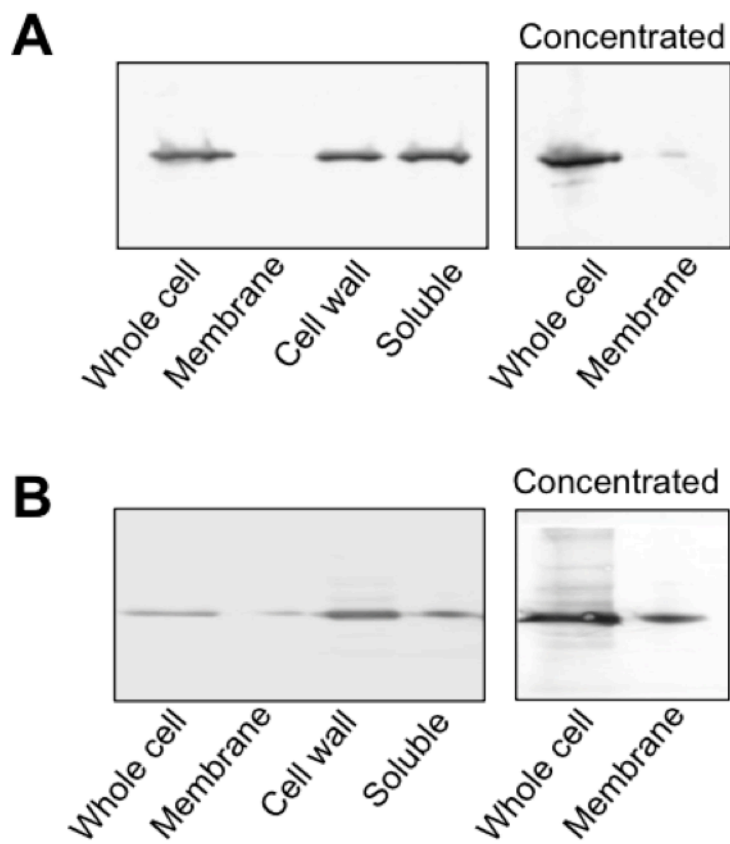


図27 *L. reuteri* JCM1081におけるEF-TuとEnolaseの局在

L. reuteri JCM1081 (培養10時間)の各画分における(A)EF-Tuと(B)Enolaseの局在を抗EF-Tu抗体あるいは抗Enolase抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。また、Whole cellとMembrane画分をTCA沈殿により濃縮したサンプルを右(Concentrated)に示した。

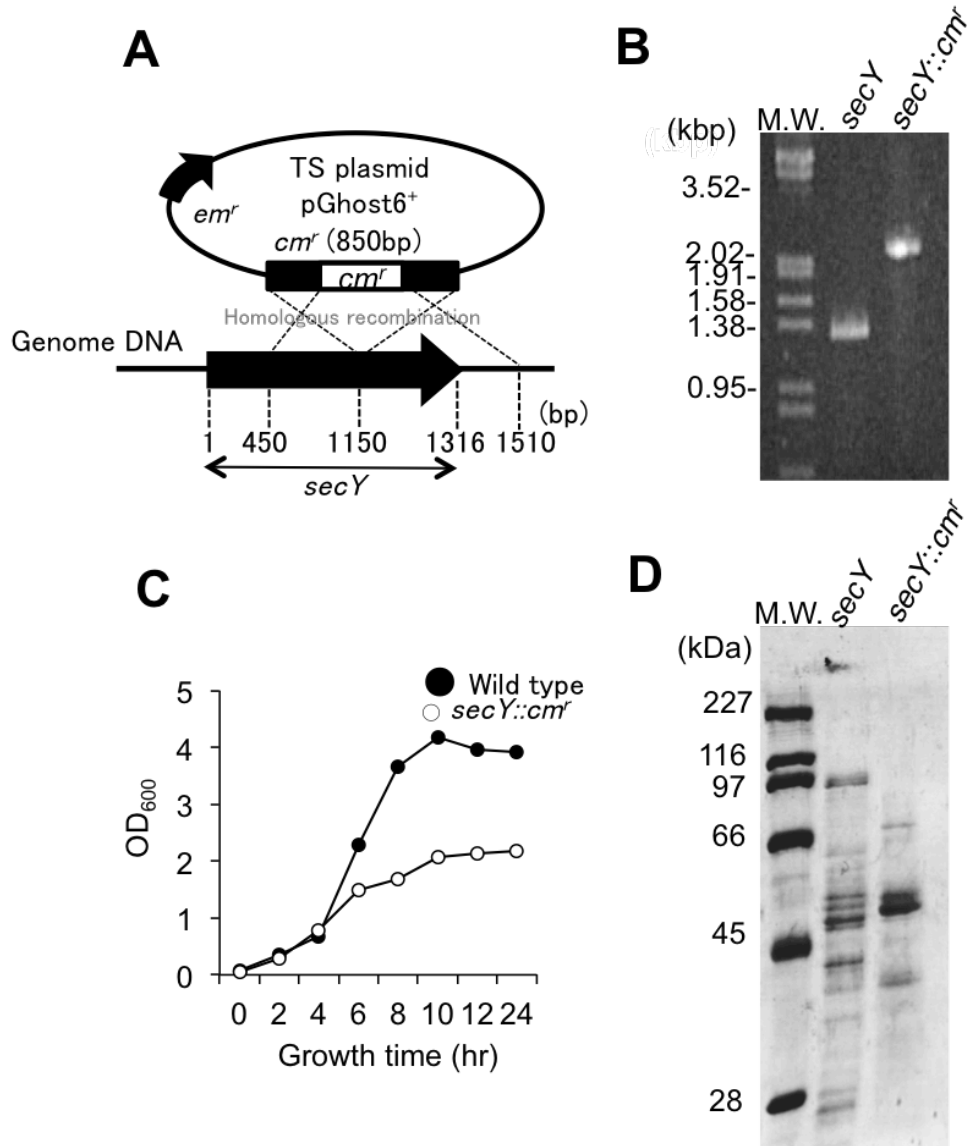


図28 *L. reuteri* JCM1081の*secY*変異株の作製と表現型の評価

(A) *secY*の0.9kbpの位置にクロラムフェニコール耐性遺伝子(*cm^r*)を挿入することで不活化した*secY::cm^r*を温度感受性(TS)プラスミドpGhost6に構築し(pGhost6 *secY::cm^r*), これを*L. reuteri* JCM1081のゲノムDNAに2点相同組み換えすることで, *secY*変異株(Δ *secY*)を作出した。(B) *secY*全長を増幅するプライマーを使用し, ゲノムDNAを鋳型としてPCRを行うことで, 相同組み換えを確認した。(C) *L. reuteri* JCM1081野生株(●)と Δ *secY*株(○)の増殖曲線。横軸は培養時間を示す。(D) 10時間培養した Δ *secY*株のExtracellular(培養上清と細胞表層)における全分泌タンパク質を7.5-20%アクリルアミドSDS-PAGEに供し, CBB R-250により染色した。

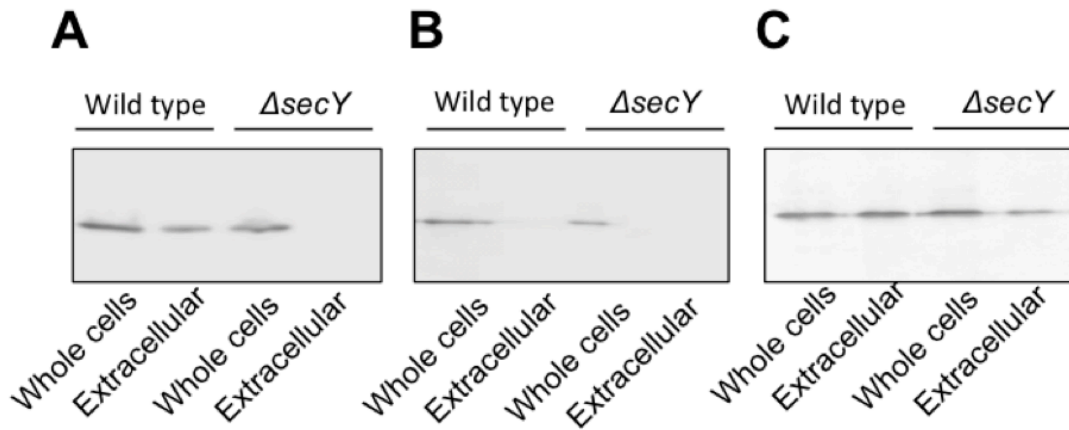


図29 *L. reuteri* JCM1081 $\Delta secY$ 株のタンパク質の分泌

L. reuteri JCM1081 野生株と $\Delta secY$ 株における(A)EF-Tu, (B)RNA polymerase, (C)Enolaseの局在を各抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Extracellularは、培養上清と細胞表層画分を合わせた画分を示す。

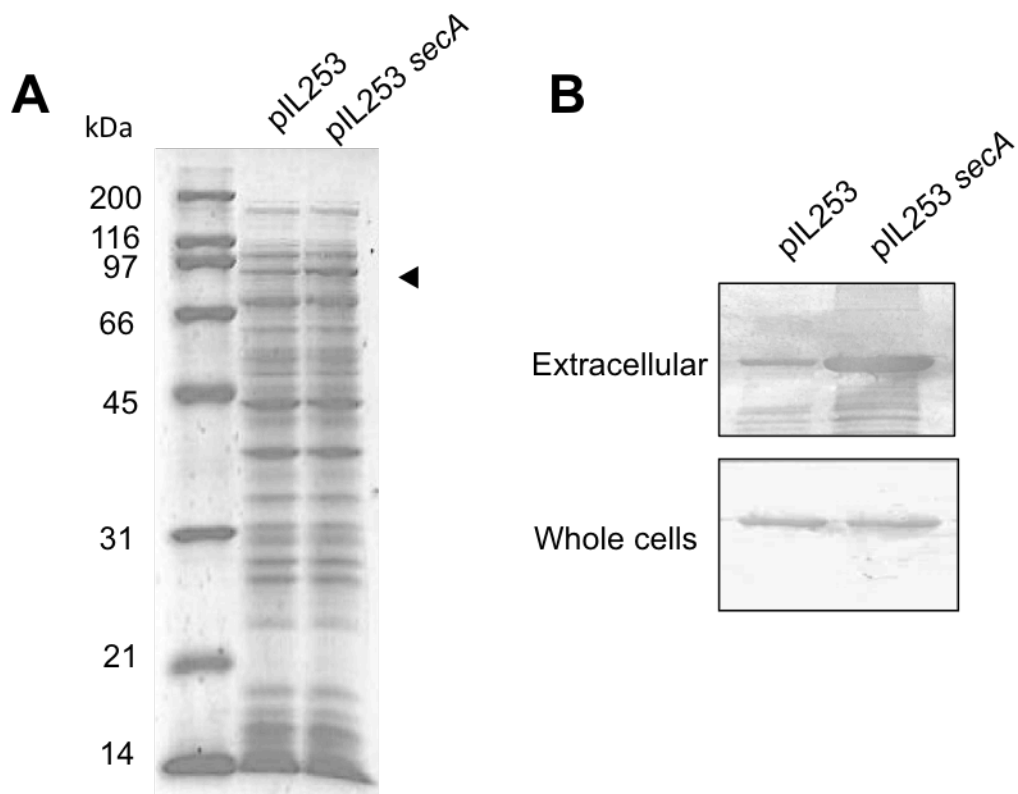


図30 *L. reuteri* JCM1081へのpIL253プラスミドによるsecAの導入とEF-Tuの分泌

L. reuteri JCM1081由来secAの推定プロモーター領域を含む領域をpIL253プラスミドに構築し、*L. reuteri* JCM1081野生株に形質転換した。(A)培養時間10時間の全細胞菌体を10%アクリルアミドSDS-PAGEに供し、銀染色により染色した。◀は、SecAの推定分子量の位置を示す。(B)抗EF-Tu抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Extracellularは、培養上清と細胞表層画分を合わせた画分を示す。

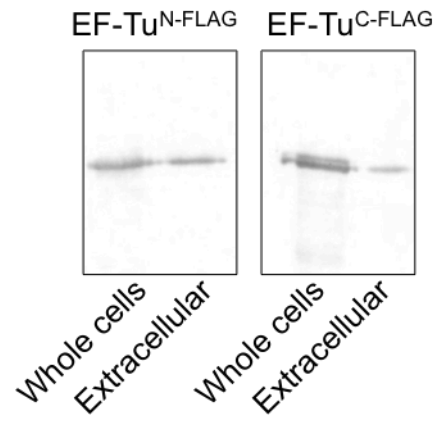


図31 *L. reuteri* JCM1081における変異EF-Tuの分泌

EF-TuのN末端あるいはC末端にFLAGタグを付加した変異EF-Tu^{FLAG}をpIL253プラスミドに構築し、*L. reuteri* JCM1081野生株に形質転換した。EF-Tuの分泌は、抗FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Extracellularは、培養上清と細胞表層画分を合わせた画分を示す。

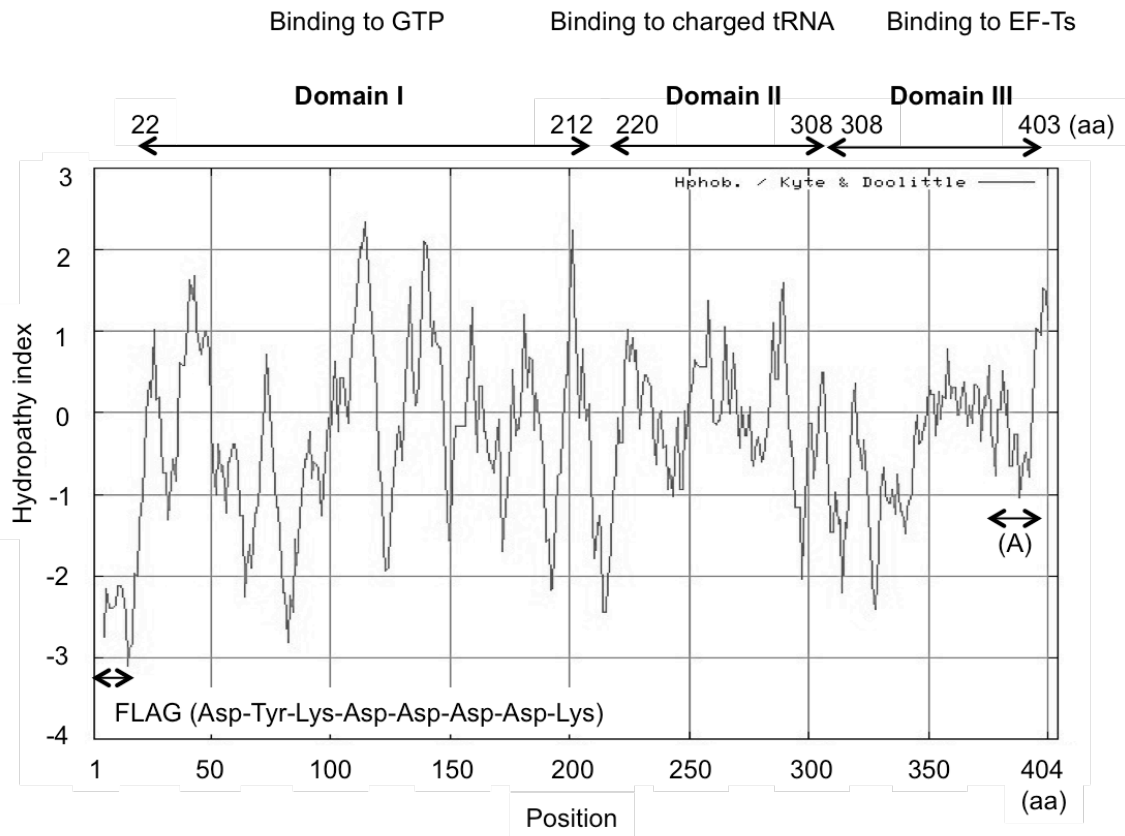


図32 *L. reuteri* JCM1081 由来EF-Tuの疎水プロットと各構成ドメイン
 N末端にFLAGタグ(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)を付加したEF-Tuの疎水プロットと、EF-Tuに保存される3つのドメインの位置と特徴を示した。

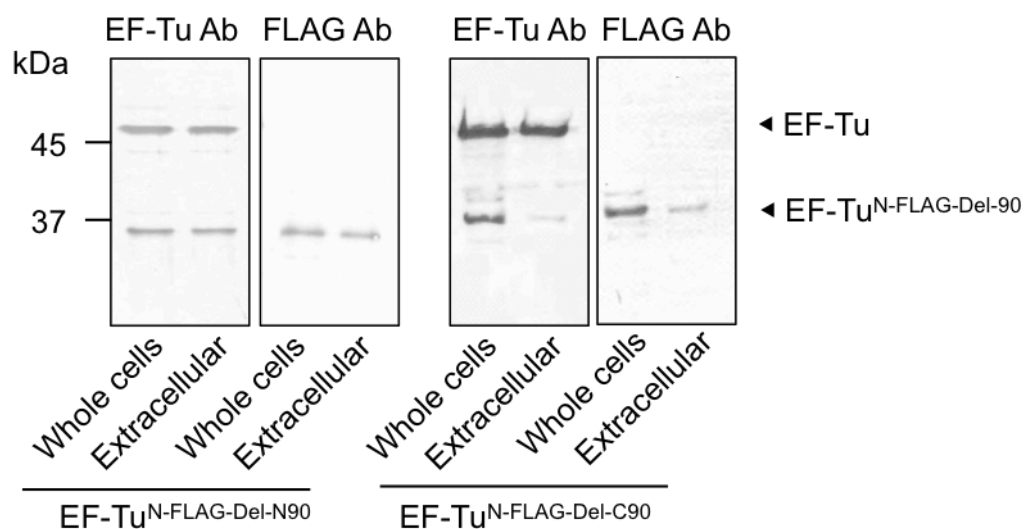


図33 *L. reuteri* JCM1081における変異EF-Tuの分泌

EF-TuのN末端あるいはC末端の90アミノ酸残基を欠損し、N末端にFLAGタグを付加した変異EF-Tu^{N-FLAG-Del-90}をpIL253プラスミドに構築し、*L. reuteri* JCM1081野生株に形質転換した。抗EF-Tu抗体あるいは抗FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Extracellularは、培養上清と細胞表層画分を合わせた画分を示す。

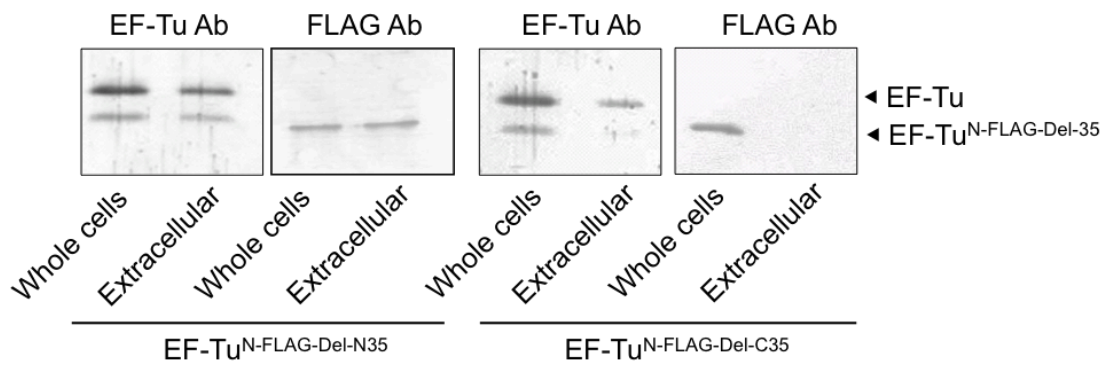


図34 *L. reuteri* JCM1081における変異EF-Tuの分泌

EF-TuのN末端あるいはC末端の35アミノ酸残基を欠損し，N末端にFLAGタグを付加した変異EF-Tu^{N-FLAG-Del-35}をpIL253プラスミドに構築し，*L. reuteri* JCM1081野生株に形質転換した。EF-Tuの分泌は，抗EF-Tu抗体あるいは抗FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Extracellularは，培養上清と細胞表層画分を合わせた画分を示す。

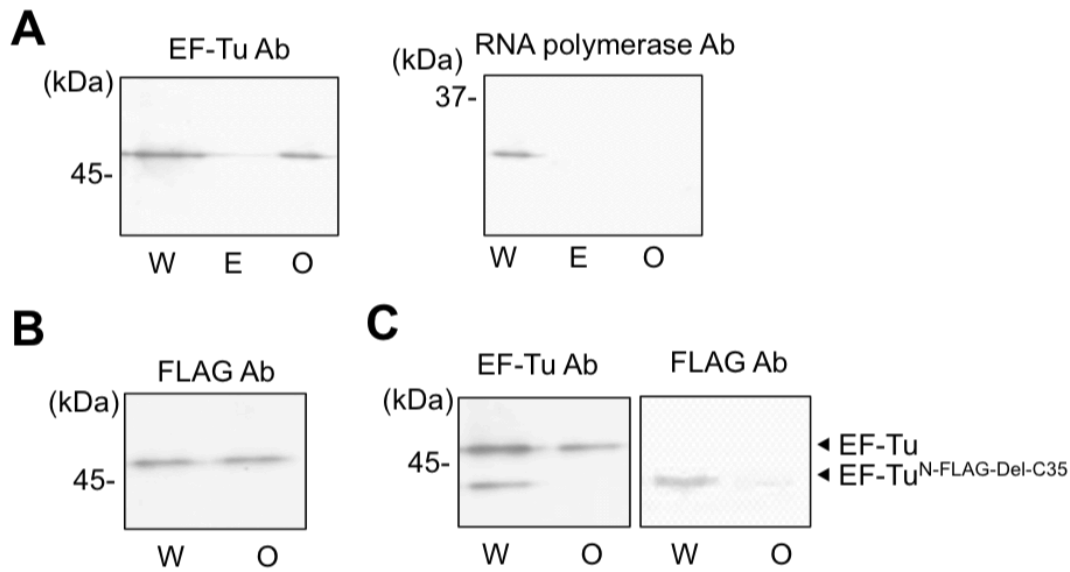


図35 *E. coli* JM109におけるEF-TuとEnolaseの分泌

(A) *E. coli* JM109におけるEF-Tu, Enolase, RNA polymeraseの局在を各抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。W: Whole cell lysate, E: Extracellular supernatant, O: Outer membraneを示す。(B) *L. reuteri* JCM1081由来EF-TuのN末端にFLAGタグを付加した変異EF-Tu^{FLAG-N}をpGEM-T easyプラスミドに構築し, *E. coli* JM109野生株に形質転換した。EF-Tuの分泌は, 抗FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。(C) *L. reuteri* JCM1081由来EF-TuのC末端の35アミノ酸残基を欠損し, N末端にFLAGタグを付加した変異EF-Tu^{N-FLAG-Del-C35}をpGEM-T easyプラスミドに構築し, *E. coli* JM109野生株に形質転換した。EF-Tuの分泌は, 抗EF-Tu抗体または抗FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。

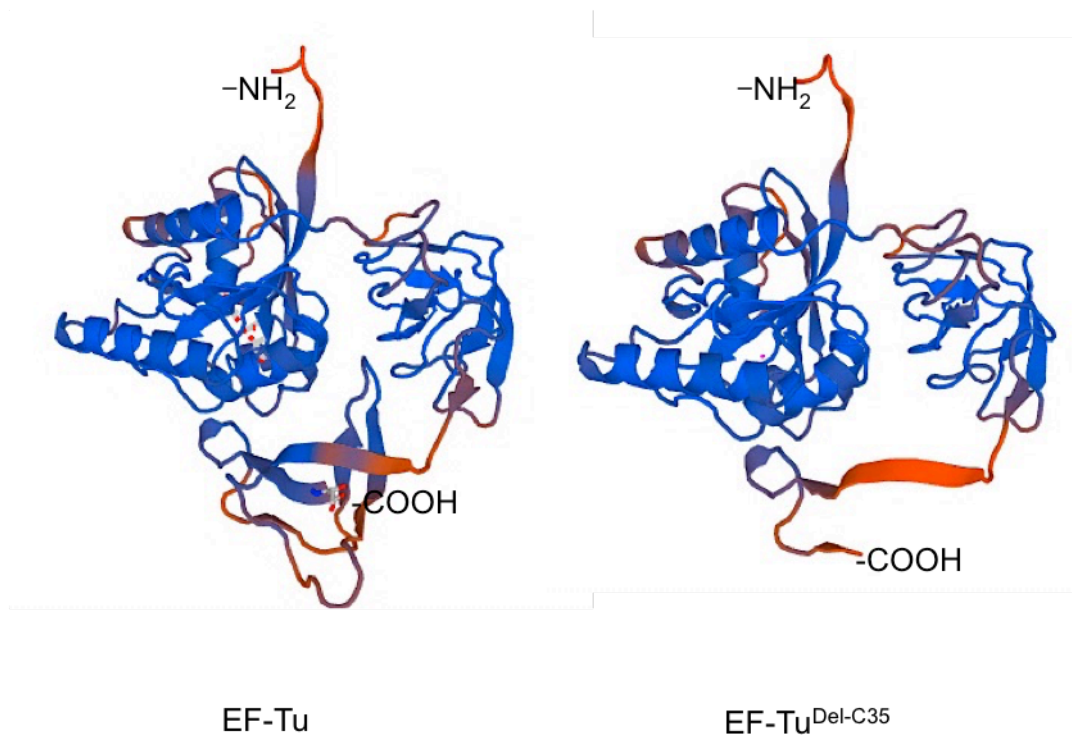


図36 *L. reuteri* JCM1081 EF-Tuの立体構造予測モデル

SWISS-MODELを用いて、*E. coli* K12株のEF-Tu(相同性75%)のX線解析モデルをリファレンスとして、*L. reuteri* JCM1081のEF-Tuの構造を予測した。EF-Tu^{Del-C35} は、EF-TuのC末端の35アミノ酸領域を欠損した変異EF-Tuを示す。

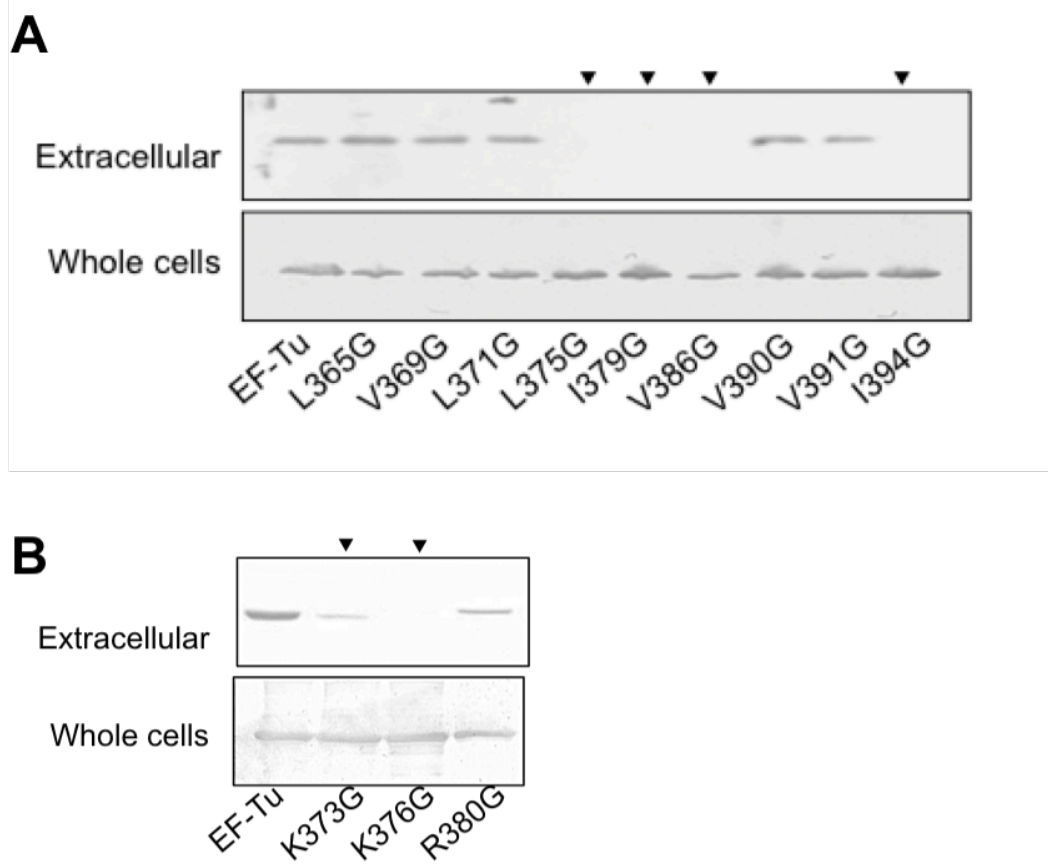
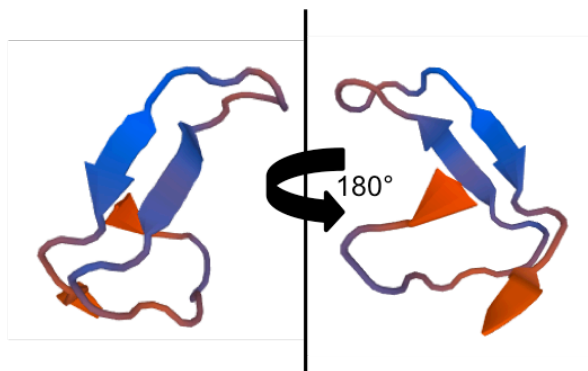
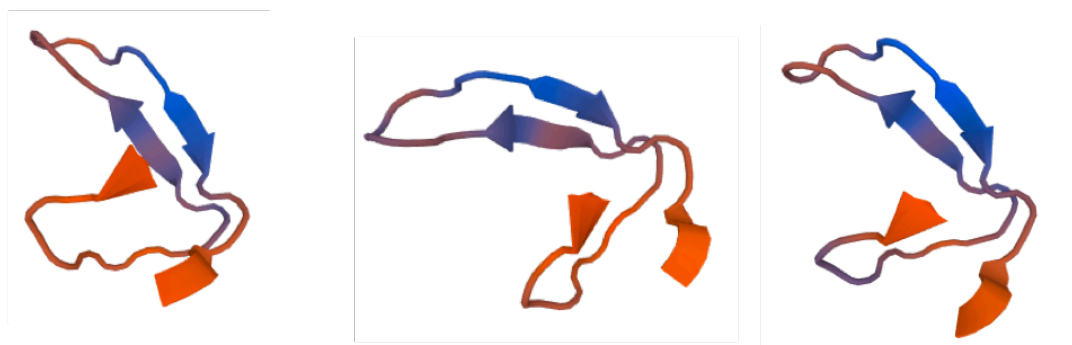


図37 *L. reuteri* JCM1081における変異EF-Tuの分泌

EF-TuのC末端の(A)疎水性アミノ酸あるいは(B)塩基性アミノ酸をグリシンに置換した変異EF-Tu^{N-FLAG}をpIL253プラスミドに構築し, *L. reuteri* JCM1081野生株に形質転換した。EF-Tuの分泌は, 抗FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Extracellularは, 培養上清と細胞表面層画分を合わせた画分を示す。▼は, EF-Tuの分泌が変化した変異体を示す。



EF-Tu C35



(K373G)

(L375G)

(K376G)



(I379G)

(V386G)

(I394G)

図38 *L. reuteri* JCM1081 EF-Tuの立体構造予測モデル

SWISS-MODELを用いて、*E. coli* K12株のEF-Tu(相同性75%)のX線解析モデルをリファレンスとして、*L. reuteri* JCM1081のEF-TuのC末端の35アミノ酸領域の各アミノ酸置換体の3次構造を予測した。括弧内にアミノ酸を置換した部位とアミノ酸を示した。

<i>Lactobacillus reuteri</i>	TVNLQKPVALE ⁺ K ⁺⁺ G ⁺ L ⁺ KFT ⁺ I REGGHTV ⁺ GAGVVSD ⁺ I GD	396 (aa)
<i>Bacillus subtilis</i>	NVELISTIAIEEGTRFSIREGGRTV ⁺ GSGVVST ⁺ ITE	396
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	TVELIQPIAMEEGLTFAVREGGHTV ⁺ GSGRVTK ⁺ IGA	399
<i>Escherichia coli</i>	VVTLIHPIAMDDGLRFAIREGGRTV ⁺ GAGVVAKVGG	394
<i>Listeria monocytogenes</i>	AVELIAPIAIEDGTKFSIREGGRTV ⁺ GAGVVSNI ⁺ SK	395
<i>Mycobacterium pneumonia</i>	SVKLIQPVAMDEGLRFAIREGGRTV ⁺ GAGRVTKI ⁺ GK	397
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	

図39 EF-TuのC末端領域のマルチプルアライメント

EF-Tuの分泌が報告されている細菌における, EF-TuのC末端領域のマルチプルアライメント。* は全細菌に共通したアミノ酸, +(赤)は*L. reuteri* JCM1081のEF-Tuの分泌に寄与するアミノ酸を示す。

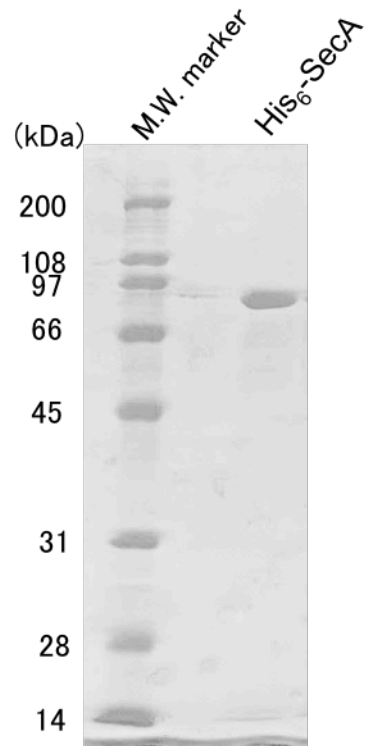


図40 *L. reuteri* JCM1081由来His₆-SecAの電気泳動図

E. coli Rosetta2 を宿主として発現し、ニッケルカラム、イオン交換カラムおよび疎水カラムによって精製したHis₆-SecAを10%アクリルアミドSDS-PAGEに供した。CBB-R250により染色した。

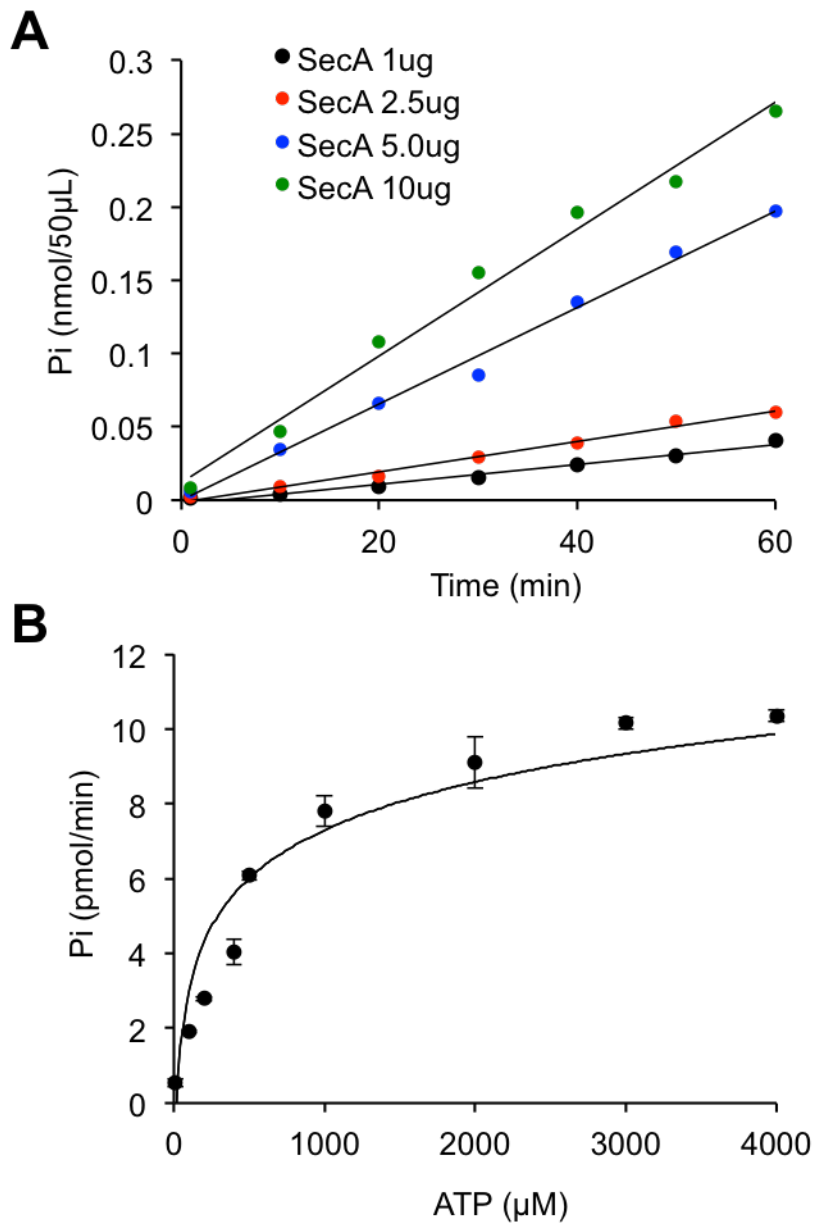


図41 His₆-SecAのATPase活性

(A) His₆-SecA (1, 2.5, 5.0, 10μg) と1 mM ATPを22°Cで反応させた際の、Piの測定を行った。反応系は、50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.4 mg/mL BSA (pH8.0), 50μLとした。Piは、マラカイトグリーン法により検出した。(B) His₆-SecA (5μg) と各濃度のATPを22°Cで反応させた際のPiを測定した。ミカエリスメンテンスの式から求めた*K_m*と*k_{cat}*は本文中に示した。

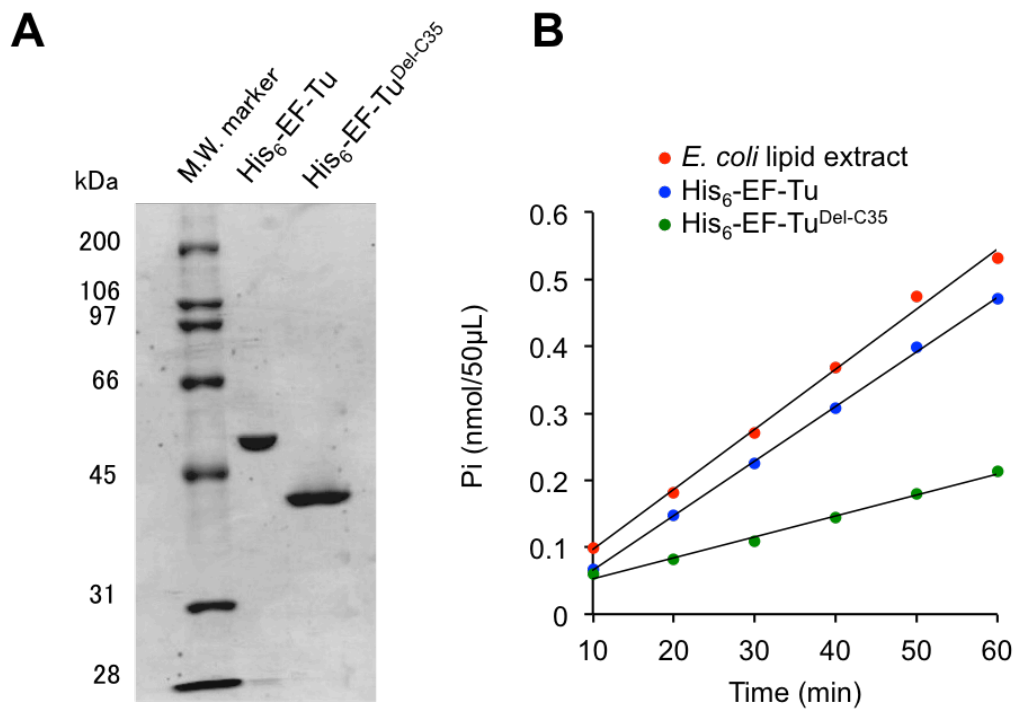


図42 His₆-SecAのATPase活性

(A) His₆-EF-Tu, His₆-EF-Tu^{Del-C35}の電気泳動図。*E. coli* Rosetta2を宿主として発現し、ニッケルカラムおよびイオン交換カラムによって精製したタンパク質を、12.5%アクリルアミドSDS-PAGEに供し、CBB-R250により染色した。(B) 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.4 mg/mL BSA (pH8.0)にHis₆-SecA(5.0 μg)と1 mM ATPを加え、これに2.5μgのHis₆-EF-Tu, His₆-EF-Tu^{Del-C35}, His₆-Enolase, *E. coli* lipid extract加えた際のPiの測定を行った。

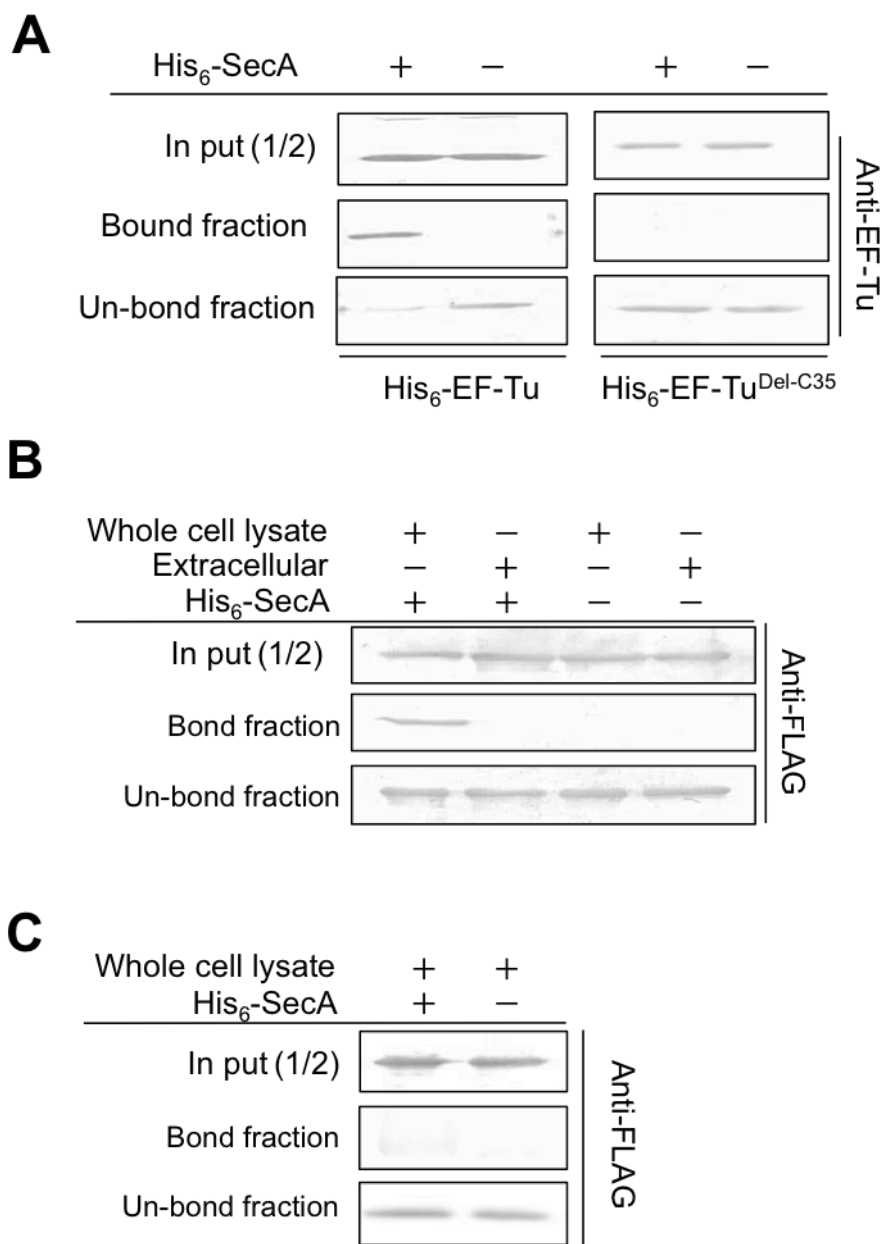


図43 *L. reuteri* JCM1081SecAとEF-Tuの相互作用の評価

プルダウン法を用いて、ニッケルカラムに固定したHis₆-SecAに対して、(A) His₆-EF-TuおよびHis₆-EF-Tu^{Del-C35}タンパク質、または(B) EF-Tu^{N-FLAG}、(C) EF-Tu^{N-FLAG-Del-35}を発現した*L. reuteri* JCM1081のWhole cell lysateまたはExtracellularを添加した際のEF-Tuの結合を評価した。タンパク質の検出は、抗EF-Tu抗体あるいは抗FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。Bond fractionはカラムに結合した画分を示す。

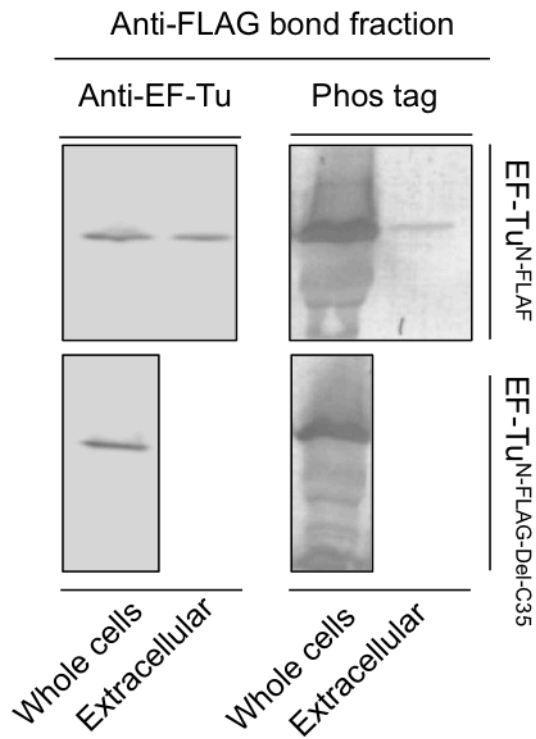
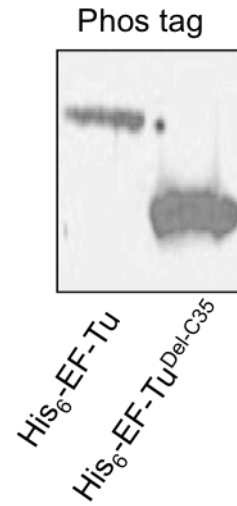
A**B**

図44 *L. reuteri* JCM1081 EF-TuおよびHis₆-EF-Tuのリン酸化の検出
(A) FLAGビーズを用いた免疫沈降法により精製したEF-Tu^{N-FLAG}, FLAFとEF-Tu^{N-FLAG-Del-C35} あるいは**(B)** His₆-EF-Tu, His₆-EF-Tu^{Del-C35}のリン酸化状態をPhos tagを用いて調べた。

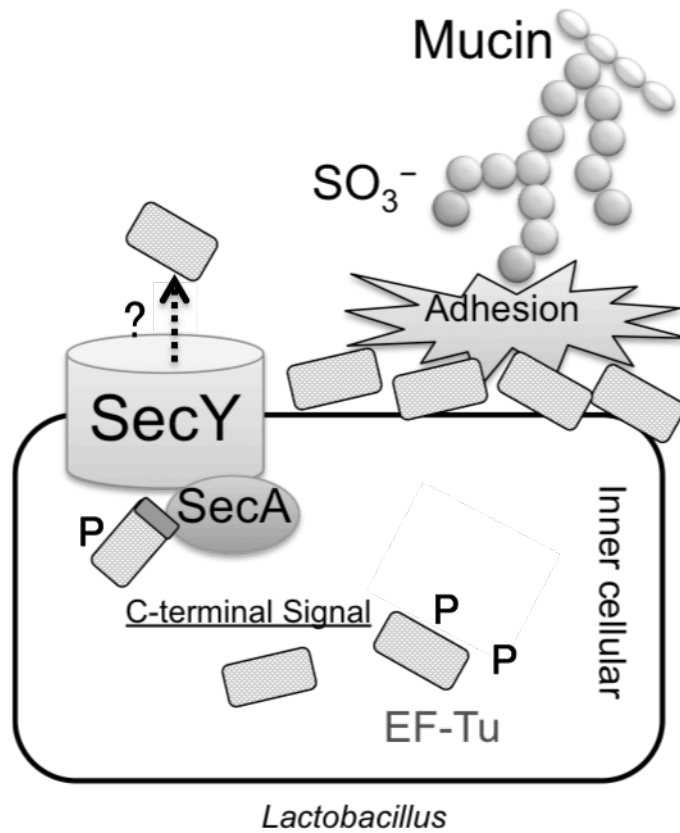


図45 本研究により得られた*L. reuteri*におけるEF-Tuの分泌と細胞外での付着因子としての役割に関する新知見

EF-Tuの細胞外への分泌には、C末端の塩基性と疎水性アミノ酸からなる分泌シグナル配列が重要であり、さらにリン酸化状態が関与することが示唆された。また、EF-Tuの分泌には、Sec輸送経路が関与する。また、細胞外へと分泌されたEF-Tuは、弱酸性pHで細胞表面にとどまり、ムチンの硫酸化糖鎖を特異的に認識する付着因子として機能する。

表 1 *Lactobacillus* のムチン付着性に関わる細胞表層タンパク質

付着因子	菌種	結合特性や特徴など	文献
CmbA	<i>L. reuteri</i>	ムチンと Caco-2 細胞に結合	(56)
EF-Tu*	<i>L. johnsonii</i>	ムチンと複数の上皮細胞に結合	(65)-(68)
	<i>L. reuteri</i> 他	硫酸化糖鎖に結合	
GAPDH*	<i>L. plantarum</i>	ムチンおよび血液型抗原に結合	(69)(70)
GroEL	<i>L. johnsonii</i>	HT-29 細胞由来粘液に結合	(71)
Lar_0958	<i>L. reuteri</i>	Ig-様の構造がムチンへの結合に関与	(57)
Lam29*	<i>L. mucosae</i>	ムチンおよび血液型抗原に結合	(64)
MapA	<i>L. reuteri</i>	ムチンと Caco-2 細胞に結合	(61)(62)
MBF	<i>L. rhamnosus</i>	ムチンと ECM タンパク質に結合	(54)(55)
Msa	<i>L. plantarum</i>	マンノースに結合	(75)
Mub*	<i>L. reuteri</i> 他	MucBD がムチン結合に関与	(48)-(52)
Pili	<i>L. rhamnosus</i>	SpaC サブユニットがムチンに結合	(12), (43)-(47)
32-Mmubp	<i>L. fermentum</i>	ブタ胃および小腸ムチンに結合	(63)

* : 結合エピトープが明らかにされている付着因子。

表 2 *Bifidobacterium* のムチン付着性に関わる細胞表層タンパク質

付着因子	菌種	結合特性や特徴など	文献
BopA	<i>B. bifidum</i>	ムチンや細胞付着性に関与するマイナー因子	(58)-(60)
FimA	<i>B. bifidum</i>	ムチンや ECM タンパク質に結合	(45)
Tal (Transaldolase)	<i>B. bifidum</i>	凝集とムチン付着性に関与	(72)
Type IV Tad Pili	<i>B. breve</i>	無菌マウスの消化管定着性に寄与	(47)

表3 ブタ大腸由来ムチンに対するレクチンの反応性

レクチン	エピトープ	濃度 (μg/mL)	結合活性
UEA-1	Fuc α1-2 Gal	0.01	+1
ECA	Gal β1-4 GlcNAc	0.1	+2
PNA	Gal β1-3 GalNAc	10	+1
SBA	GalNAc α1-3Gal	0.1	+1
SSA	NANA α2-3Gal	1.0	+3
MSM	NANA α2-6Gal	10	+2

+3(Abs > 1.5), +2(Abs > 1.0), +1(Abs > 0.5), 0(Abs < 0.5)を判断基準とした

表 4 MALDI-TOF/MS により得られたシアル化または硫酸化ムチンオリゴ糖を含む各ピークの糖組成

[M-H] ⁻ (m/z)	シアル酸化糖アルコールの予測糖構成	未処理	脱シアル化後
675.24	(NeuAc)(Hex)GalNAc-ol	+	-
878.31	(NeuAc)(Hex)(HexNAc)GalNAc-ol	+	-
1040.4	(NeuAc)(Hex) ₂ (HexNAc)GalNAc-ol / (NeuGc)(dHex)(Hex)(HexNAc)GalNAc-ol	+	-
1243.54	(NeuAc)(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ GalNAc-ol / (NeuGc)(dHex)(Hex)(HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	-
1389.59	(NeuAc)(dHex)(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ GalNAc-ol / (NeuGc)(dHex) ₂ (Hex)(HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	-
1852.05	(NeuAc)(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol / (NeuGc)(dHex)(Hex)(HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	-
2055.3	(NeuAc)(Hex) ₂ (HexNAc) ₆ GalNAc-ol / (NeuGc)(dHex)(Hex)(HexNAc) ₆ GalNAc-ol	+	-
2096.37	(NeuAc)(Hex)(HexNAc) ₇ GalNAc-ol	+	-
[M-H] ⁻ (m/z)	硫酸化糖アルコールの予測糖構成	未処理	脱シアル酸後
829.21	(SO ₃ H)(Hex) ₃ (HexNAc)GalNAc-ol	+	+
870.24	(SO ₃ H)(Hex)(HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	+
975.5	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₂ (HexNAc)GalNAc-ol	+	+
1016.34	(SO ₃ H)(dHex)(Hex)(HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	-
1032.55	(SO ₃ H)(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	+
1073.34	(SO ₃ H)(Hex)(HexNAc) ₃ GalNAc-ol	-	+
1121.58	(SO ₃ H)(dHex) ₂ (Hex) ₂ (HexNAc)GalNAc-ol	+	-
1178.61	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	+

1194.42	(SO ₃ H)(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	+
1219.47	(SO ₃ H)(dHex)(Hex)(HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	-
1235.46	(SO ₃ H)(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	+
1324.54	(SO ₃ H)(dHex) ₂ (Hex) ₂ (HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	+
1340.54	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	+
1381.59	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	+
1397.59	(SO ₃ H)(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	+
1486.66	(SO ₃ H)(dHex) ₂ (Hex) ₃ (HexNAc) ₂ GalNAc-ol	+	-
1527.72	(SO ₃ H)(dHex) ₂ (Hex) ₂ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	-
1543.72	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	+
1559.7	(SO ₃ H)(Hex) ₄ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol	-	+
1584.73	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ GalNAc-ol	+	+
1600.76	(SO ₃ H)(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ GalNAc-ol	-	+
1689.88	(SO ₃ H)(dHex) ₂ (Hex) ₃ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	-
1705.84	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₄ (HexNAc) ₃ GalNAc-ol	+	+
1730.92	(SO ₃ H)(dHex) ₂ (Hex) ₂ (HexNAc) ₄ GalNAc-ol	+	+
1746.9	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ GalNAc-ol	+	+
1762.92	(SO ₃ H)(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ GalNAc-ol	-	+
1909.07	(SO ₃ H)(dHex)(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ GalNAc-ol	+	+

dHex, deoxy-hexose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; Hex, hexose; HexNAc, *N*-acetylhexosamine; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid; NeuGc, *N*-glycolylneuraminic acid; SO₃H, sulfo group.

表 5 付着性の評価に用いた分離源の異なる *Bifidobacterium* 22 菌株

菌株	由来
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC15700 ^T	Human
<i>Bifidobacterium breve</i> M-16V	Human
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC15697 ^T	Human
<i>Bifidobacterium infantis</i> M-63	Human
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC15707 ^T	Human
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	Human
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC29521 ^T	Human
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC15696	Human
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC15703 ^T	Human
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC15706	Human
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> PNC-2-9G ^T	Swine
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> J18-P2-91 ^T	Swine
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> S-501	Swine
<i>Bifidobacterium suis</i> MCC-1552	Swine
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM1253	Chicken
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> M-602	Chicken
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> R101-8 ^T	Rat
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> MCC-1489	Guinea pig
<i>Bifidobacterium asteroides</i> JCM1193 ^T	Hive bee
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> MCC-1536	Rabbit
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM10140 ^T	Milk product
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> MCC-0525	Milk product

表 6 第三章・第二節, 実験 3-1) 欠損変異 EF-Tu^{FLAG} の作製で用いたプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')
KN523	ATCCGACATCTTAGACTAA
KN524	ATGTCGGGGACAACACCGGC
KN525	CGGGGACAACACCGGCACCAAC
KN526	GGAGGAAACACCGGCACCAACAGT
KN527	GTGGGAACCTTCACGAATAGTGAAC
KN528	CCTGGACGAATAGTGAACCTAAGA
KN529	TAGGGAACCTTAAGACCCTTTTCAAG
KN530	AACTTAGGACCCTTTTCAAGAGCAACT
KN531	TTAAGAGGATTTTCAAGAGCAACTGGC
KN532	CAAGGACAACCTGGCTTTTGT
KN533	TACCGTCCACAATTCTACTTCCACACAACCTGATG
KN534	ACATCAGTTGTGTGGAAGTAGAATTGTGG
KN535	CTTGAAAAGGGTCTTAAGTTCA
KN536	ACCGGCACCAACAGTGTGTCCACCT
KN561	ACCCTTTTCAAGAGCAACTGGCTT
KN562	TCACTGTAACTTACAAAAGCCAGTTG
KN563	ACCGGCACCAACAGTGTGTCCAC
KN564	AAGATGTCGGATACAACACCGGC
KN565	TGACTAAGGAAGAAGGGGGACGTC
KN566	GTAAGTTAACAGTGAATGTAACGTTCCA