

## D315

## 乳酸菌結合ペプチドの探索と細胞付着の誘導

(名大院工・生物機能) (正)大河内美奈, 浅井祐司, 杉田智哉, (正)本多 裕之\*

## 【 緒言 】

健康志向や予防医学の観点から食品による健康維持に関心が高まり、乳酸菌などを利用した腸内細菌叢のバランスを改善することによる整腸作用や免疫作用が注目されている。プロバイオティクスやプレバイオティクスにより多彩な生理調節機能や免疫応答の調節を介した、アレルギー、炎症性腸疾患、感染症、がんをはじめとする種々の疾患抑制効果も明らかとなりつつある。しかし、これらの作用機構については未解明な点も多く、腸管を模倣した発酵リアクターによる代謝解析が進められている。これらのリアクターは浮遊状態で単一の腸内細菌を用いたものが多く、腸内菌叢という複雑系を模倣しきれていない。そこで、ペプチドを腸内細菌の付着制御因子として利用することで、より生体環境に近い腸管菌叢模倣リアクターを構築できるのではないかと考えた。本研究では、乳酸菌の付着を誘導するペプチドの探索を目的とし、グラム陽性菌の認識受容体である Toll 様受容体 (TLR2) のアミノ酸配列をペプチドとして切り出し、腸内乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG の付着に効果的な配列を探索した。ペプチドにより腸内細菌の付着制御が可能となれば、腸内菌叢を模倣したバイオフィーム形成状態での代謝変換や遺伝子発現解析が可能となり、プレバイオティクスの機能解析に貢献できると考えられる。

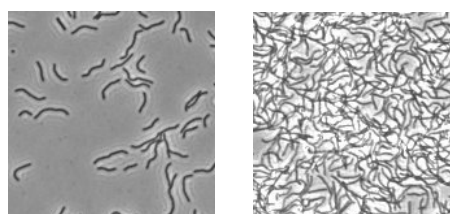
## 【方法および結果】

Toll 様受容体 (TLR2) の外膜タンパク質のアミノ酸配列をもとに 8 残基ペプチドライブラリー (291 配列) を、セルロース膜上に Fmoc 固相合成法を用いた SPOT 合成により作製した。*L. rhamnosus* GG は、MRS 培地にて 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で静置培養した。生理食塩水で菌体を洗浄した後、D-MEM 培地で再懸濁し、付着試験に用いた。ペプチドアレイ上に付着した菌体量は、CFDA (carboxyfluorescein diacetate) を用いた蛍光染色により評価した。

ペプチドアレイ上で菌体を 3 時間インキュベートした結果、ペプチドを合成していないセルロース膜と比較して 4 倍以上、付着誘導が確認された配列が 24 個、

探索された。平滑なガラス面にペプチドを合成した際にも *L. rhamnosus* GG の付着誘導効果はみられ、図 1 の顕微鏡写真に示すとおり、付着量を大きく増加することが確認された。これらのペプチド配列の等電点および疎水性に共通点はなく、配列特異的に結合している可能性が示唆された。そこで、腸内の菌叢形成に影響を与えることが知られている pH の影響について検討した。pH 7.4 と pH 5.5 における付着量を比較した結果、半数の配列において *L. rhamnosus* GG の付着を保持できることが確認された (図 2)。また、これらのペプチドは、グラム陰性菌である大腸菌の付着誘導効果はみられず、特異性があることが示唆された。

以上のことから、腸内乳酸菌の付着を制御するペプチドを探索することができた。腸内乳酸菌が一定のプロバイオティック特性を示すには、腸管上皮細胞上および粘膜層中で菌叢化することが重要であることから、これらのペプチドを用い、菌叢化型リアクターを構築することで新たな知見を提供できるものと考えられる。



ペプチドなし

高結合配列

図 1 ペプチドを合成したガラス基板上に付着した *L. rhamnosus* GG の顕微鏡写真 (3 時間後)

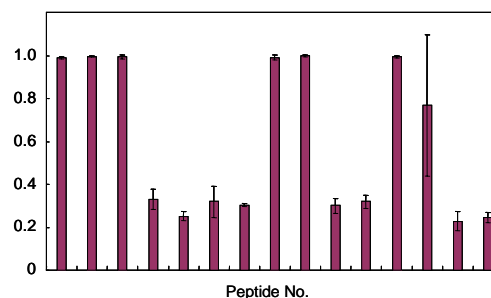


図 2 pH 5.5 におけるペプチド基板上への乳酸菌付着量 (pH 7.4 における付着量を 1 として評価)

\*Tel : 052-789-3215 Fax : 052-789-3214  
E-mail : honda@nubio.nagoya-u.ac.jp