

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Lactiplantibacillus plantarum が分泌するグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の免疫調節作用
Title(English)	
著者(和文)	工藤大夢
Author(English)	Hiromu Kudo
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12344号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山本 直之,一瀬 宏,柘植 丈治,小倉 俊一郎,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12344号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

Lactiplantibacillus plantarum が分泌する グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の 免疫調節作用

東京工業大学 生命理工学院

ライフエンジニアリングコース 山本直之研究室

工藤 大夢

2023年(令和5年)

目次

<u>略語表</u>	<u>5</u>
<u>第 1 章 序論</u>	<u>8</u>
1-1. <u>はじめに</u>	8
1-2. <u>プロバイオティクス乳酸菌の開発</u>	8
1-3. <u>腸管免疫系における自然免疫応答の概要</u>	9
1-4. <u>先行研究におけるプロバイオティクス乳酸菌の免疫調節因子と作用</u>	12
1-5. <u>本研究の目的と研究内容</u>	13
1-6. <u>参考文献</u>	14
<u>第 2 章 <i>L. plantarum</i> 由来免疫調節因子の同定</u>	<u>19</u>
2-1. <u>はじめに</u>	<u>19</u>
2-2. <u>実験材料および実験方法</u>	20
2-2-1. <u>使用菌株および主な試薬と機器</u>	20
2-2-2. <u>MRS-F broth の調製</u>	20
2-2-3. <u><i>L. plantarum</i> の培養と生育評価</u>	20
2-2-4. <u>EPS 画分の調製</u>	21
2-2-5. <u>EPS の定量</u>	21
2-2-6. <u>タンパク質濃度の測定</u>	21
2-2-7. <u>ヒト由来単球細胞 THP-1 の培養と分化</u>	22
2-2-8. <u>サイトカイン産生誘導と ELISA 法による定量</u>	22
2-2-9. <u>ゲル濾過カラムによる分画</u>	23
2-2-10. <u>表層タンパク質の抽出</u>	23
2-2-11. <u>SDS-PAGE によるタンパク質の分離</u>	23
2-2-12. <u>プロテオーム解析によるタンパク質の同定</u>	24
2-2-13. <u>ウェスタンブロッティングによる GAPDH の検出</u>	24
2-2-14. <u>抗 GAPDH 抗体添加による免疫調節作用の評価</u>	25
2-2-15. <u>抗 GAPDH 抗体を用いた <i>L. plantarum</i> JCM 1149 の免疫蛍光染色</u>	26
2-2-16. <u><i>L. plantarum</i> 株間での免疫調節活性と GAPDH 分泌能の比較</u>	26
2-2-17. <u>統計解析</u>	26

<u>2-3. 結果</u>	<u>28</u>
<u>2-3-1. MRS-F 培地における 11 種の <i>L. plantarum</i> 株の生育と EPS 生産能</u>	<u>28</u>
<u>2-3-2. 11 種の <i>L. plantarum</i> 株の EPS 生産能と免疫調節活性</u>	<u>31</u>
<u>2-3-3. ゲル濾過クロマトグラフィーによる JCM 1149 培養上清の分析</u>	<u>34</u>
<u>2-3-5. プロテオーム解析による免疫調節因子の同定</u>	<u>39</u>
<u>2-3-6. ウェスタンブロッティングによる GAPDH の検出</u>	<u>40</u>
<u>2-3-7. 免疫蛍光染色による JCM 1149 菌体表層 GAPDH の検出</u>	<u>41</u>
<u>2-3-8. 免疫調節作用における抗 GAPDH 抗体の影響</u>	<u>42</u>
<u>2-3-9. <i>L. plantarum</i> の免疫調節活性と GAPDH 分泌能の関係</u>	<u>43</u>
<u>2-4. 考察</u>	<u>47</u>
<u>2-5. 参考文献</u>	<u>54</u>
<u>第 3 章 JCM1149 株由来 GAPDH の免疫調節作用</u>	<u>58</u>
<u>3-1. 本章の研究背景</u>	<u>58</u>
<u>3-2 実験材料および実験方法</u>	<u>60</u>
<u>3-2-1. THP-1 DCs における GAPDH 認識レセプターの推測</u>	<u>60</u>
<u>3-2-3. 使用プライマー</u>	<u>61</u>
<u>3-2-4. GAPDH の免疫調節作用の経時的変化評価</u>	<u>61</u>
<u>3-2-5. RNA シークエンシングによる遺伝子発現への影響解析</u>	<u>61</u>
<u>3-2-6. qPCR 法</u>	<u>62</u>
<u>3-2-7. 統計解析</u>	<u>62</u>
<u>3-3. 結果</u>	<u>64</u>
<u>3-3-1. GAPDH の免疫調節作用における抗 TLR 抗体の影響</u>	<u>64</u>
<u>3-3-2. GAPDH の免疫調節作用の経時変化</u>	<u>66</u>
<u>3-3-3. GAPDH によって発現量の変化した遺伝子群</u>	<u>69</u>
<u>3-4. 考察</u>	<u>72</u>
<u>3-5. 参考文献</u>	<u>76</u>
<u>第 4 章 GAPDH 分泌と EPS 生産の関係</u>	<u>78</u>
<u>4-1. 本章の研究目的</u>	<u>78</u>
<u>4-2. 実験材料および実験方法</u>	<u>79</u>

<u>4-2-1. 使用菌株</u>	79
<u>4-2-2. <i>L. plantarum</i> JCM 1149 の生育に伴う EPS 生産および GAPDH 分泌傾向</u>	79
<u>4-2-3. EPS 合成阻害による EPS および GAPDH 分泌への影響</u>	80
<u>4-2-4. <i>L. bulgaricus</i> OLL1073 R-1 株及びその欠損株の免疫調節活性評価</u>	80
<u>4-2-5. JCM 1149 株由来 EPS に対する ¹³C-GAPDH 親和性の確認</u>	81
<u>4-2-6. JCM 1149 株由来 EPS と GAPDH の相互作用</u>	82
<u>4-2-7. 統計解析</u>	82
<u>4-3. 結果</u>	84
<u>4-3-1. JCM 1149 株の生育に伴う EPS 生産および GAPDH 分泌</u>	84
<u>4-3-2. <i>L. plantarum</i> JCM 1149 における EPS 合成阻害の影響</u>	86
<u>4-3-3. <i>L. bulgaricus</i> OLL1073 R-1 の <i>eps</i> 欠損株における GAPDH 分泌性</u>	88
<u>4-3-4. <i>L. plantarum</i> JCM 1149 由来 EPS と GAPDH の相互作用</u>	90
<u>4-4. 考察</u>	93
<u>4-5. 参考文献</u>	97
<u>第 5 章 総括</u>	100
<u>5-1. 先行研究に対する本研究の位置付け</u>	100
<u>5-2. 乳酸菌の EPS 生産能と GAPDH 分泌能について</u>	101
<u>5-3. 腸管免疫系を介した <i>L. plantarum</i> JCM 1149 株の免疫調節作用</u>	106
<u>5-4. 結論</u>	108
<u>5-5. 参考文献</u>	108
<u>付録</u>	111
<u>本研究と関連した報告</u>	147
<u>謝辞</u>	148

略語表

APC	Antigen presenting cell (抗原提示細胞)
BSA	Bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
CBB	Coomassie brilliant blue (クマシーブリリアントブルー)
CPS	Capsular polysaccharide (莢膜多糖)
DCs	Dendritic cells (樹状細胞)
DNA	Deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (酵素結合免疫吸着検定法)
EPS	Exopolysaccharide (分泌型細胞外多糖)
FBS	Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (フルオレセインイソチオシアネート)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)
IFN- γ	Interferon gamma (インターフェロンガンマ)
Ig	Immunoglobulin (免疫グロブリン)
IL	Interleukin (インターロイキン)

- KSCN Potassium thiocyanate
(チオシアン酸カリウム)
- L. bulgaricus* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
(ラクトバシルス デルブルッキー 亜種 ブルガリカス)
- L. plantarum* *Lactiplantibacillus plantarum*
(ラクティプランティバシルス プランタラム)
- LPS Lipopolysaccharide
(リポ多糖)
- MALDI-TOF/TOF MS Matrix-assisted laser desorption ionization - tandem time of flight mass spectrometry
(マトリックスレーザー支援型イオン化-タンデム飛行時間型質量分析装置)
- MAMPs Microbe associating molecular patterns
(微生物関連分子パターン)
- NF- κ B Nuclear factor kappa B
(核内因子 κ B)
- OD Optical density
(濁度)
- PBS Phosphate buffered saline
(リン酸緩衝食塩水)
- PBS-T PBS including 0.05% Tween 20
(Tween 20 含有 PBS)
- PMA Phorbol 12-myristate 13-acetate
(ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート)
- PVDF Polyvinylidene difluoride
(ポリフッ化ビニリデン)
- PRRs Pattern recognizing receptors
(パターン認識分子受容体)
- PS Penicillin-Streptomycin mixture
(ペニシリン-ストレプトマイシン混合物)

qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (定量的ポリメラーゼ連鎖反応法)
RNA	Ribonucleic acid (リボ核酸)
RPMI	Roswel Park Memorial Institute (ロズウェルパーク記念研究所)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)
SLPs	Surface layer proteins (菌体表層タンパク質)
TCA	Trichloroacetic acid (トリクロロ酢酸)
TLR	Toll-like receptor (トル様受容体)
TNF	Tumor necrosis factor (腫瘍壊死因子)
WT	Wild type (野生株)

第 1 章 序論

1-1. はじめに

我々の消化管には約 1000 種類ものの細菌種が生息し、総菌数は約 10^{14} 個、1 kg にもなるとされ、免疫系の発達により固有の安定な腸内細菌叢が形成され、常在菌として定着していると考えられている。イリヤ・イリイチ・メチニコフ (Ilya Ilyich Mechnikov) は、発酵乳の摂取により白血球が活性化することを発見し、「不老長寿説」を提唱し、1908 年、ノーベル生理学・医学賞を受賞した。その後、いわゆる、プロバイオティクス (Probiotics) の継続的摂取により、生体の健康維持が期待できることが示されている。プロバイオティクスは、「生体に利益をもたらす生きた微生物」として、Roy Fuller によって提案された¹。世界に先駆けた機能性食品の制度化 (1995 年度) がきっかけとなり、我が国は機能性乳酸菌開発において研究を牽引してきた。その後、次世代シーケンサーの普及により、腸内細菌と健康あるいは疾病との関係が次々と明らかになってきた。

1-2. プロバイオティクス乳酸菌の開発

成人までに安定化した腸内細菌叢を変えることは難しいとされるが、継続的にプロバイオティクスを摂取することにより、さまざまな有用な効果を示すことが実証されている。腸内細菌叢の正常化に伴う整腸作用²、便性改善作用²、栄養素の消化吸収改善作用²、血圧降下作用^{2,4}、脂質代謝改善作用²、免疫調節作用^{2,5,6}などが報告されている。中でも免疫調節作用は最も注目を集めているプロバイオティクス乳酸菌の機能性の一つで、より詳細には、T 細胞応答調節^{7,8,9}、経口免疫寛容の誘導¹⁰、抗体産生の促進⁹、上皮細胞・樹状細胞とのインタラクション¹¹⁻¹³、NK 細胞を介した免疫賦活作用¹⁴などが報告されており、花粉

症の改善やガン治療などにおいても効果が期待されている。

1-3. 腸管免疫系における自然免疫応答の概要¹⁵ (Fig. 1-1)

乳酸菌は経口摂取されることから、プロバイオティクスの免疫機能を発揮するためには主に腸管免疫系を介して誘導されると考えられている。消化管（小腸と大腸）の総表面積はテニスコートと同等（200 m²）以上とも言われ、その大部分は小腸の絨毛が占めており、腸管の内腔には多種多様な微生物が共生細菌（常在菌）として生息することが知られている。一方で腸管粘膜を通り抜け体内に侵入した場合には病原性を呈することもあり、このような微生物の侵襲に対して腸管免疫系による IgA の産生や、粘膜上皮細胞間のタイトジャンクションおよび粘液分泌による物理的・化学的な防御機構が備わっている。さらに粘膜上皮細胞の内側の粘膜固有層には樹状細胞やマクロファージ、自然リンパ球など免疫応答を惹起する様々な細胞が常在している。これらの細胞は、微生物特有の分子パターン (MAMPs: Microbe associated molecular patterns) を認識する受容体 (PRRs: Pattern recognition receptors) を発現しており、腸管上皮細胞を超えて侵入してきた微生物を速やかに認識する。これまで 100 種類近くの PRRs が報告されている中で、トル様受容体 (TLRs : Toll-like receptors) は微生物成分を認識する主要な受容体分子で、哺乳類では 13 種類、ヒトでは TLR1 から TLR9 まで 9 つの機能的な TLR 分子が多様な細胞で発現しており、それぞれ異なる微生物成分の認識に関与する (Table 1-1)。樹状細胞やマクロファージはこれらの PRRs 微生物の認識後、NF- κ B 活性化経路などのシグナル伝達経路を介して転写調節、その結果産生される各種サイトカインによる T 細胞の分化誘導やレセプター発現による抗原提示によって獲得免疫を誘導する。

Table 1-1. 哺乳類 TLR の種類と局在、および特異性¹⁵

TLR	局在	特異性
TLR1:TLR2	細胞膜	リポペプチド
TLR2	細胞膜	ペプチドグリカン
TLR3	エンドソーム	二本鎖DNA
TLR4	細胞膜	リポ多糖(LPS)
TLR5	細胞膜	フラジェリン(鞭毛タンパク質)
TLR2:TLR6	細胞膜	リポペプチド
TLR7	エンドソーム	一本鎖RNA
TLR8	エンドソーム	一本鎖RNA
TLR9	エンドソーム	CpG DNA

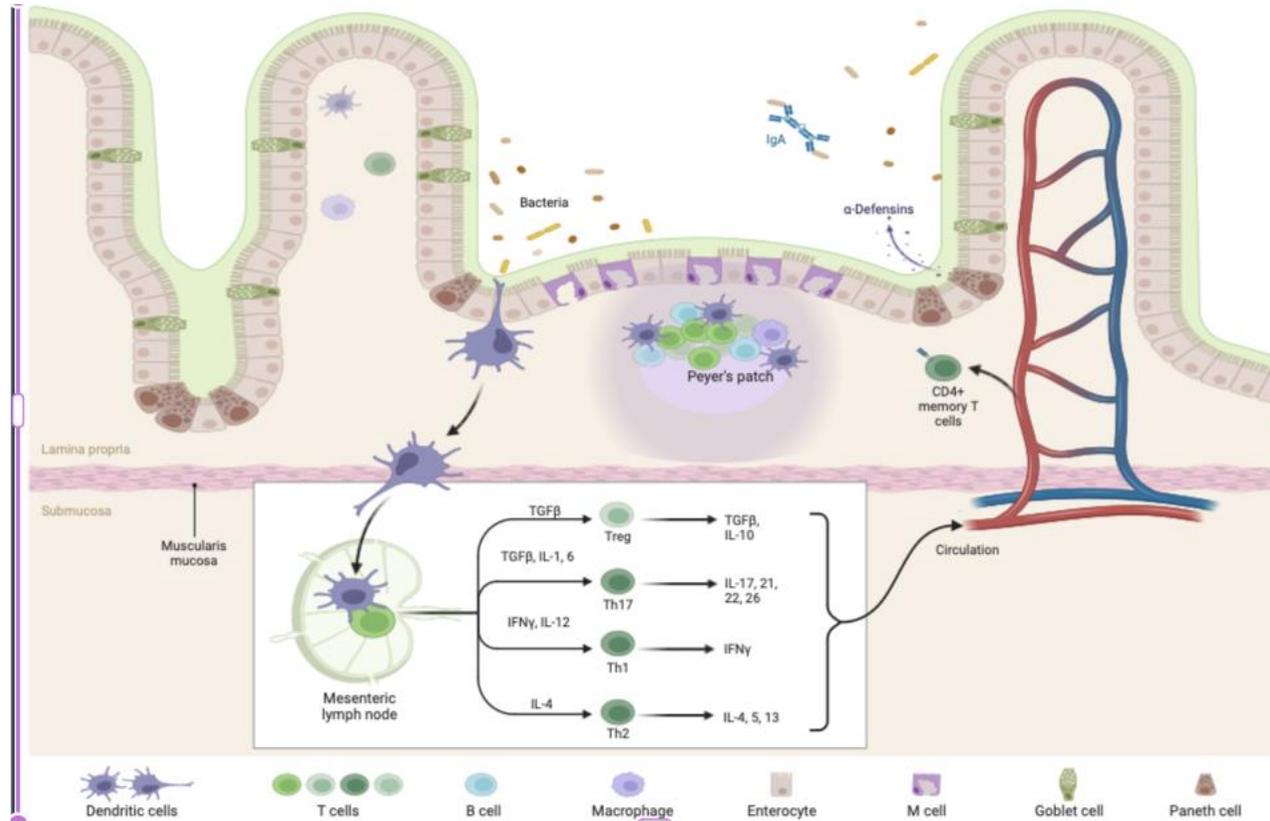


Fig. 1-1 腸管免疫系の略図 (<https://app.biorender.com>)

自然免疫では、樹状細胞が腸管内腔の微生物を迅速に認識し、サイトカインの分泌や抗原提示によって炎症（もしくは免疫寛容のための抗炎症）を誘導する。

1-4. 先行研究におけるプロバイオティクス乳酸菌の免疫調節因子と作用

これまでの研究で、様々な乳酸菌成分の免疫調節作用が報告されてきた(Table 1-1)。たとえば *Lactobacillus plantarum* WCFS1 のリポタンパク質は、TLR2 シグナルを刺激し、炎症反応を引き起す¹⁶。また別の *L. plantarum* CRL1506 株では、LTA による TLR3 を介した炎症が報告されている¹⁷。さらに *Lactobacillus rhamnosus* GG 株由来 CpG オリゴデキシヌクレオチドは、IL-12、TNF- α 、および TLR9 を有意に増加させ、LPS 刺激細胞において NF- κ B シグナルを増強することなどが報告されている¹⁸。TLR 以外のレセプターを介した応答では、*Levilactobacillus brevis* JCM 1059 株の S-layer protein B (SlpB) は樹状細胞表層上の DC-SIGN を介して、貪食作用の促進や IL-12 p40 や TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を誘導する²⁴。その他にも短鎖脂肪酸 (SCFA: Short chain fatty acid)、RNA などが報告¹⁹されており、中でも EPS や SCFA のような乳酸菌の代謝産物は、「腸内フローラにおいて生産されると菌叢改善や宿主に有益な効果をもたらす物質」を意味する新しい概念「ポストバイオティクス」として近年注目を集めている²⁰。このように多様な乳酸菌成分が、これまで免疫調節作用因子として報告されてきたが、プロバイオティクスの免疫調節作用を考えた時、どの因子がどの程度重要なのか、統一された実験系により菌種間、菌株間での免疫調節活性における効果を評価・議論した報告は極少ない。

Table 1-2 乳酸桿菌種の免疫調節作用に関わる主な MAMPs と認識に関わる PRRs

Strain	MAMPs	PRRs	Reference
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> WCFS1	Lipoprotein	TLR2	16
<i>Levilactobacillus brevis</i> JCM 1059	SlpB	DC-SIGN	24
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> IBM19	CPS	TLR2, TLR4	23
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> L26	EPS	TLRs	25
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CRL1506	LTA	TLR2	17
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DAP-PG	PG	TLR2-NOD1 (or NOD2)	22
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	CpG oligonucleotide	TLR2 or TLR9	18

1-5. 本研究の目的と研究内容

これまで様々な乳酸菌種（菌株）において、その免疫調節活性と活性因子が示されてきた。一方で、その作用因子やメカニズムは菌株単位で多様であり、その原因は未だ十分説明されるに至っていない。本研究では菌株間で構造的多様性が報告されている EPS に着目した。微生物が産生する EPS は糖やアミノ糖から構成される繰返し構造 (RU: Repeating unit) がいくつも連なった高分子多糖ポリマーの総称で、その特徴（構成糖の種類、結合様式、分子量など）は菌種間のみならず菌株間でも多様であることが知られている^{6,21}。そしてこのような構造的多様性が、プロバイオティクスとしての菌株特異的な生理保健効果を決定する要因と考えられている²²。多様な乳酸桿菌種で EPS の産生が報告されている中で、*L. plantarum* は最も EPS と関連した報告が多い(Fig. 1-4)。

そこで本研究では、11 種類の *L. plantarum* 株を用いて、EPS の生産性とヒト由来単球細胞 THP-1 の樹状細胞からの各種サイトカイン産生能の比較解析による真の免疫調節因子の探索・同定を試みた。さらに、主要免疫調節因子の免疫作用がどのような Pathway により免疫誘導に至るのかを解析した。また、免疫誘導因子がどのように菌体における主要因子として生産されているのかについても解析を加えた。

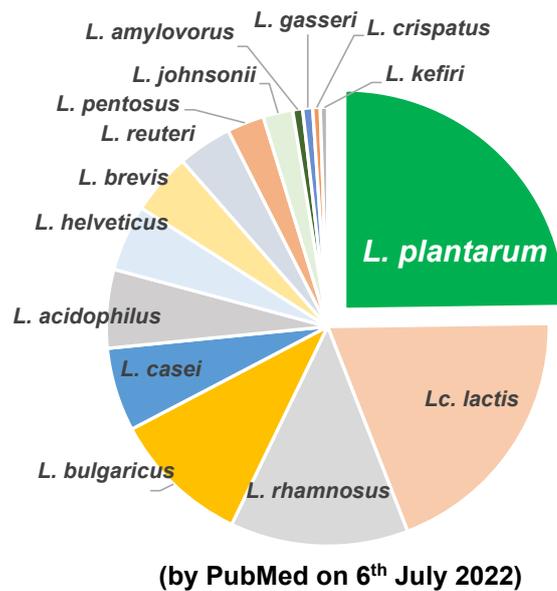


Fig. 1-4 PubMed における EPS と関連した乳酸桿菌の報告数 (2022 年 7 月時点)

1-6. 参考文献

1. Fuller, R. "Probiotics in man and animals." *The Journal of applied bacteriology* vol. 66,5 (1989): 365-78.
2. 日本乳酸菌学会, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会, 2010
3. Nakamura, Y et al. "Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme." *Journal of dairy science* vol. 78,6 (1995): 1253-7. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76745-5
4. Wakai, Taketo et al. "Repressive processing of antihypertensive peptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in *Lactobacillus helveticus* fermented milk by added peptides." *Journal of bioscience and bioengineering* vol. 114,2 (2012): 133-7. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.03.015

5. Parvez, S et al. "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health." *Journal of applied microbiology* vol. 100,6 (2006): 1171-85. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x
6. Rahbar Saadat, Yalda et al. "A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides." *Carbohydrate polymers* vol. 217 (2019): 79-89. doi:10.1016/j.carbpol.2019.04.025
7. Kanzato, Hiroki et al. "*Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces apoptosis of antigen-stimulated T cells by modulating dendritic cell function." *Immunobiology* vol. 213,5 (2008): 399-408. doi:10.1016/j.imbio.2007.10.001
8. Smits, Hermelijn H et al. "Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin." *The Journal of allergy and clinical immunology* vol. 115,6 (2005): 1260-7. doi:10.1016/j.jaci.2005.03.036
9. Fujiwara, Daisuke et al. "The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance." *International archives of allergy and immunology* vol. 135,3 (2004): 205-15. doi:10.1159/000081305
10. Huibregtse, Inge L et al. "Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin." *Gastroenterology* vol. 133,2 (2007): 517-28. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.073
11. Drakes, Maureen et al. "Bacterial probiotic modulation of dendritic cells." *Infection*

- and immunity vol. 72,6 (2004): 3299-309. doi:10.1128/IAI.72.6.3299-3309.2004
12. Deng, Zhaoxi et al. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Increases the Adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Host Mucin to Enhance Probiotic Effects." International journal of molecular sciences vol. 21,24 9756. 21 Dec. 2020, doi:10.3390/ijms21249756
 13. Ishida, Minori et al. "Ribosome-Engineered *Lactocaseibacillus rhamnosus* Strain GG Exhibits Cell Surface Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Accumulation and Enhanced Adhesion to Human Colonic Mucin." Applied and environmental microbiology vol. 86,20 e01448-20. 1 Oct. 2020, doi:10.1128/AEM.01448-20
 14. Makino, Seiya et al. "Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1." Journal of dairy science vol. 99,2 (2016): 915-923. doi:10.3168/jds.2015-10376
 15. Abul K. Abbas, et al. "アバス-リックマン-ピレ 分子細胞免疫学 原著第9版", エルゼビア・ジャパン, 2018
 16. Lee, I-Chiao et al. "Lipoproteins Contribute to the Anti-inflammatory Capacity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1." Frontiers in microbiology vol. 11 1822. 29 Jul. 2020, doi:10.3389/fmicb.2020.01822
 17. Mizuno, Hiroya et al. "Lipoteichoic Acid Is Involved in the Ability of the Immunobiotic Strain *Lactobacillus plantarum* CRL1506 to Modulate the Intestinal Antiviral Innate Immunity Triggered by TLR3 Activation." Frontiers in immunology vol. 11 571. 9 Apr. 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.00571
 18. Gao, Kan et al. "Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated

- by lipopolysaccharide.” Journal of microbiology, immunology, and infection = Weimian yu gan ran za zhi vol. 50,5 (2017): 700-713. doi:10.1016/j.jmii.2015.05.002
19. Piqué, Núria et al. “Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview.” International journal of molecular sciences vol. 20,10 2534. 23 May. 2019, doi:10.3390/ijms20102534
 20. Scarpellini, Emidio et al. “From Pre- and Probiotics to Post-Biotics: A Narrative Review.” International journal of environmental research and public health vol. 19,1 37. 21 Dec. 2021, doi:10.3390/ijerph19010037
 21. Zeidan, Ahmad A et al. “Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications.” FEMS microbiology reviews vol. 41,Supp_1 (2017): S168-S200. doi:10.1093/femsre/fux017
 22. Liu, Qing et al. “Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier.” Microbial cell factories vol. 19,1 23. 5 Feb. 2020, doi:10.1186/s12934-020-1289-4
 23. Garcia-Vello, Pilar et al. “Structural features and immunological perception of the cell surface glycans of *Lactobacillus plantarum*: a novel rhamnose-rich polysaccharide and teichoic acids.” Carbohydrate polymers vol. 233 (2020): 115857. doi:10.1016/j.carbpol.2020.115857
 24. Tan, Zheng Lin et al. “*Levilactobacillus brevis* surface layer protein B promotes liposome targeting to antigen-presenting cells in Peyer's patches.” International journal of pharmaceutics vol. 622 (2022): 121896. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.121896
 25. Kiššová, Zuzana et al. “Immunomodulatory Effect of *Lactobacillus reuteri* (*Limosilactobacillus reuteri*) and Its Exopolysaccharides Investigated on Epithelial

Cell Line IPEC-J2 Challenged with Salmonella Typhimurium.” *Life* (Basel, Switzerland) vol. 12,12 1955. 22 Nov. 2022, doi:10.3390/life12121955

第 2 章 *L. plantarum* 由来免疫調節因子の同定

2-1. はじめに

乳酸菌が産生する細胞外多糖 (EPS: Exocellular polysaccharide) は、糖およびその誘導体が独特な繰り返し構造、分岐鎖構造を有する単位構造が菌体内で合成され、その後、菌体外にて連結し、分泌された高分子多糖¹で、発酵食品中では食品の粘性増加や発酵乳ホエーの分離防止、風味の保持に効果があるとされる²。³。また EPS は、プロバイオティック乳酸菌の免疫調節作用の重要成分としてもよく研究されており、菌株により構成糖、結合様式、修飾など菌株により異なることから、多様な免疫調節作用を有するものと考えられてきた^{4,5}。一方、EPS の他にもリポタンパク質や DNA、リポテイコ酸など様々な乳酸菌成分が免疫調節因子として報告される中で EPS がどの程度免疫調節作用に重要であるのか明らかにされていない。

様々な乳酸菌種で EPS の生産およびその生理機能性について報告されているが、中でも *L. plantarum* は最も EPS 生産について報告が多い乳酸菌種である (Fig. 2-1)。そこで本章では当研究室で保有する 11 種の *L. plantarum* 株を対象として、EPS の生産能およびその免疫活性を評価することで、*L. plantarum* 種における EPS の免疫調節作用の関係を明らかにするとともに、EPS の免疫調節活性に対する役割を評価し、EPS 高生産株の特徴を明らかにすることを目標とした。

2-2. 実験材料および実験方法

2-2-1. 使用菌株および主な試薬と機器

本章で使用した *L. plantarum* 株については国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室 (Japan Collection of Microorganisms: JCM) から購入、または国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (National Agriculture and Food Research Organization: NARO) から提供を受けた(Table 2-2-1)。

本章では特に記述がない限り、1 x PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄, pH=7.2) をバッファーとして使用した。吸光測定には 96 穴マイクロプレート(アズワン製)およびマイクロプレートリーダー (iMark™ Microplate Absorbance Reader , Bio-Rad Laboratories, Inc.)を使用した。

2-2-2. MRS-F broth の調製

MRS broth (ベクトン・ディッキンソン製)を調製後、Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット(10K, MERCK & Co. Inc., USA) に供し、遠心分離 [5,000 x g、15 分間、25°C] によって 10 kDa 以下の成分を限外濾過によって回収した。回収濾液を減圧滅菌 [121°C、15 分間] し、MRS-F broth として乳酸菌用培地として使用した。

2-2-3. *L. plantarum* の培養と生育評価

Table 2-2-1 に示す各種 *L. plantarum* 株を MRS-F broth へ播種し、30°C で 20 時間インキュベートし前培養液を得た。その後、前培養液を 2 ml の MRS-F broth へ 1%播種し 30°C で 24 時間インキュベートした。乳酸菌の生育性評価は、培養液 100μl を 96 穴プレートへサンプリングし、595 nm の吸光度測定により行った。

2-2-4. EPS 画分の調製

L. plantarum の培養液 10 ml を遠心分離[5,000 x g、10 分間、4°C] し、培養上清を回収した。培養上清に対し 10% (V/V)量の 100% (W/V)トリクロロ酢酸 (ナカライテスク製) を添加し、攪拌後、4°C で 10 分間静置した。遠心分離 [12,000 x g、20 分間、4°C] によって上清を回収し、その後、体積比で 1.5 倍量の 100%冷エタノールを添加し混合した。4°C で 2 時間静置後、遠心分離 [12,000 x g、20 分間、4°C] によって沈殿を回収した。70%冷エタノールによって沈殿を洗浄後、デシケーター中で乾燥させた。1 ml の MilliQ 水を添加し、攪拌しながら 50°C で 1 時間インキュベートし沈殿を溶解した。シリンジフィルター(直径 4 mm, 孔径 0.2 μm) を用いて固形分を取り除き、濾液を EPS 画分として以降の実験に用いた。

2-2-5. EPS の定量

2-2-4 項に従って抽出した EPS 画分を 100 μl 取り、100 μl の 5% (vol/vol) フェノール-水溶液と混合した。500 μl の濃硫酸を添加後、25°C の水浴中で 10 分間静置した。よく攪拌した後、100 μl を 96 穴マイクロプレートに移し、490 nm の吸光度を測定した。D-(+)-glucose (ナカライ規格一級、ナカライテスク製) を標品として 500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.82、3.91 (μg/ml) に濃度を調製し、吸光度と濃度の検量線を作成し、サンプルの吸光度から算出された糖濃度を EPS 濃度とした。

2-2-6. タンパク質濃度の測定

96 穴マイクロプレート中で 100 μl のサンプルと 20 μl のプロテインアッセイ CBB 溶液 (5 倍濃縮、ナカライテスク社製) を混合した。室温で 10 分間静置後、595 nm の吸光度を測定した。BSA (ナカライテスク製)を標品として、25、20、

15、10、5 (μg/ml) に調製して同様の操作を行い、吸光度と濃度から検量線を作成し、サンプル中のタンパク質濃度を算出した。

2-2-7. ヒト由来単球細胞 THP-1 の培養と分化

THP-1 細胞の培養には、非働化したウシ胎児血清 (FBS: Fetal bovine serum、EU 産、Biowest 社製) および抗生物質としてペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (PS: Penicillin-Streptomycin mixture、ナカライテスク製) をそれぞれ最終濃度 10% (V/V), 1% (V/V) になるように添加した RPMI1640 培地を用いた。また細胞濃度が 1.0×10^5 - 5.0×10^6 (cells/ml) になるように 37°C、5% CO₂ 環境下で継代培養した。遠心分離 [200 x g、5 分間、25°C] で細胞を回収後、再度 RPMI1640 培地に懸濁した。細胞数及び生菌数はトリパンブルー溶液との混合により、血球計算盤 (Thoma) を用いて評価した。懸濁液中の細胞濃度を算出し、 5.0×10^5 (cells/ml) になるように RPMI1640 培地で調製した。PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate、Adipogen Life Sciences 製) を最終濃度 100 nM になるように細胞懸濁液へ添加し、ピペッティングによって混合後、96 穴プレートへ細胞懸濁液を注入 (100 μl/well) した。37°C、5% CO₂ 環境下で 3 日間インキュベートし分化を誘導し、以降の実験に用いた。

2-2-8. サイトカイン産生誘導と ELISA 法による定量

2-2-7 項に従って THP-1 細胞の分化誘導を行った後、培養上清を取り除き、その後 100 (ng/ml) の IFN-γ (PeproTech Inc. 製、IL-6 および IL-12 p40 評価時) または 100 (ng/ml) の IL-4 (PeproTech Inc. 製、IL-10 評価時) を含む RPMI1640 培地を 100 μl/well 添加した。10 μl のサンプルを添加し、37°C、5% CO₂ 環境下で 24 時間インキュベートした。培養上清を回収し、サイトカイン測定時まで -20°C で保存した。サイトカイン量は、96 穴型免疫プレート (Thermo Fisher Scientific 製)

を用いた ELISA 法 (IL-6、IL-10 測定キットは Biolegend 社製、IL-12 p40 測定キットは R&D systems 社製) によって測定した。

2-2-9. ゲル濾過カラムによる分画

ゲル濾過クロマトグラフィーの担体には Bio-gel P-100 gel (Bio-Rad Laboratories, Inc. 製)を使用し、製品の推奨プロトコールに従ってカラム [Φ 1.5 cm \times 50 cm] に充填した。溶媒には 1 x PBS buffer を使用し、流速が約 1.4 ml/フラクションとなるように調節した。各フラクションの EPS 濃度は 2-2-4 項, タンパク質濃度は 2-2-6 項の各方法に従い、免疫調節活性は 2-2-8 項の方法に従って測定した。

2-2-10. 表層タンパク質 (SLPs: Surface layer proteins) の抽出

L. plantarum の MRS-F 培養菌体を遠心分離 [5,000 x g、10 分間、4°C] によって回収後、0.2 x PBS buffer で洗浄した。0.5 M の LiCl 溶液を添加し、よく攪拌後、氷冷中で 15 分間静置した。遠心分離 [5,000 x g、10 分間、4°C] によって上清を回収した。その後、1.0 M、5.0 M と段階的に LiCl の濃度を濃くして、同様の操作を繰り返した。回収した上清は Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット (10K) および 0.2 x PBS buffer を用いてサンプル中のバッファー交換を行いながら 20 倍に濃縮した。これを SLPs 画分として以降の実験に用いた。

2-2-11. SDS-PAGE によるタンパク質の分離

濃縮ゲル、分離ゲルのアクリルアミド濃度をそれぞれ 4.5%、12.5% になるように調製したポリアクリルアミドゲルを使用し、Laemmli らの手法²³に従って分析を行った。サンプルをローディングバッファー (x6: 125 mM Tris-HCl、4% SDS、20% glycerol、0.012% bromophenol blue、10% 2-mercaptoethanol) と混合し、95°C で 5 分間処理し、SDS-APGE に供した。サイズマーカーには Protein ladder 1 plus

(ナカライテスク製)を用いた。タンパク質の検出は CBB 溶液 (2.5% クマシーブルーリアントブルー、10%酢酸、50%メタノール) による染色もしくはシルベスタイン ワン (ナカライテスク製) を用いたシルバーステイン法によって行った。バンドの強度はソフトウェア“ImageJ 1.53k (National Institutes of Health, USA)”によって解析した。

2-2-12. プロテオーム解析によるタンパク質の同定

2-2-11 項に従い分離および CBB 染色したゲルからカッターナイフを用いて目的のタンパク質バンドを切り出した。ゲル片を脱色液 (30%アセトニトリル、50 mM 炭酸水素アンモニウム) に浸し 30 分間インキュベートした。脱水液 (60%アセトニトリル、20 mM 炭酸水素アンモニウム) を用いてゲル片から水分を取り除いた。5% (w/w)トリプシン(Promega Japan、Tokyo) 溶液にゲル片を浸し 37°C で 12 時間インキュベートした。上清をチューブに回収後、50%アセトニトリルをゲル片へ添加し、37°C で 30 分間インキュベートし、上清を同じチューブに回収した。遠心エバポレーターによってサンプルを乾燥させ、その後サンプルに 100 μ l の Binding 溶液 (0.1% TFA、2%アセトニトリル) を添加し、室温で 5 分間静置した。Zip tip 0.6 μ L C₁₈ 樹脂充填 チップ(Merck 製) を用いてピペッティング操作によって樹脂へペプチドの吸着を促した。同じチップで 50 μ l の Elution 溶液(0.1% TFA、80% アセトニトリル) を回収した。溶出液中のペプチドの MS を MALDI-TOF/TOF MS (UltrafleXtreme: Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) によって解析し、 Mascot Server (<https://www.matrixscience.co.jp/server.html>) を用いてタンパク質の予測を試みた。

2-2-13. ウェスタンブロッティングによる GAPDH の検出

SLPs 画分は 2-2-10 項に従って調製した。培養上清画分は、*L. plantaurm* JCM 1149

株の培養上清を Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット (10K) および 0.2 x PBS buffer を用いてサンプルのバッファー交換を行いながら 20 倍に濃縮し調製した。その後、2-2-11 項に従い SDS-12.5%PAGE によってタンパク質を分離後、PVDF メンブレン (和光純薬工業株式会社製) またはニトロセルロースメンブレン (GVS ジャパン製) に [400 mA、60 分] の条件で転写した。転写後のメンブレンは PBS-T (0.05% Tween20 含有 PBS) へ浸し 5 分間 振とう後、1%カゼイン-PBS へ浸し 1 時間 室温で振とうしながらブロッキングを行った。3M-チオシアン酸カリウム溶液で 30 分間洗浄を行った後、抗 GAPDH 抗体 (GeneTex 製、Rabbit、polyclonal)、を 1 x PBS で 1000 倍に希釈し 20 時間、室温で振とうしながらメンブレンに反応させた。PBS-T で 5 分間洗浄後、抗 Rabbit IgG (H+L) 抗体 (NovusBiological 製、Biotin conjugated、sheep、polyclonal) を 1%カゼイン-PBS で 1000 倍に希釈し 3 時間室温で振とうし反応させた。PBS-T で 5 分間洗浄後、HRP-conjugated Streptoavidin (Proteintech 製) を 1%カゼイン-PBS で 1000 倍に希釈し 1 時間室温で振とうし反応させた。PBS-T で 5 分間 3 回洗浄後、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク製) を検出試薬として使用し、ルミノ・イメージアナライザー ImageQuant™ LAS 4000mini (富士フイルム株式会社製) を用いて観察した。

2-2-14. 抗 GAPDH 抗体添加による免疫調節作用の評価

2-2-4 項に従って JCM 1149 株の培養上清より EPS 画分を調製した。原液の 1000 倍希釈になるように抗 GAPDH 抗体 (GeneTex 製、Rabbit、polyclonal) を添加 (Anti GAPDH +) または無添加 (Anti GAPDH -) したサンプルを調製し、37°C で 1 時間攪拌しながらインキュベートした。2-2-8 項に従って培養上清中の IL-6、IL-10、IL-12 p40 量を測定し、免疫調節作用への影響を評価した。

2-2-15. 抗 GAPDH 抗体を用いた *L. plantarum* JCM 1149 の免疫蛍光染色

2-2-3 項に従い *L. plantarum* JCM 1149 株を培養し、遠心分離 [5,000 x g、10 分間、4°C] によって菌体を回収した。0.2 x PBS で菌体を洗浄後、2-2-10 項に従って 0.5 M の LiCl 溶液で処理した菌体と未処理の菌体を調製した。LiCl 処理菌体、未処理菌体ともに 0.2 x PBS で OD₅₉₅ = 1.0 になるように調製した。抗 GAPDH 抗体 (GeneTex 製、Rabbit、polyclonal) を 100 倍希釈して添加し、30°C で 3 時間インキュベートした。0.2 x PBS で菌体を洗浄後、抗 Rabbit IgG 抗体 (Rockland Immunochemicals 製、FITC conjugated、Goat、polyclonal) を 10 倍希釈になるように添加し、30°C で 2 時間インキュベートした。0.2 x PBS で菌体を洗浄後、プレパレートを作成し、蛍光セルイメージャー ZOE (Bio-Rad Laboratories 製) を用いて緑色蛍光を観察した。

2-2-16. *L. plantarum* 株間での免疫調節活性と GAPDH 分泌能の比較

2-2-3 項に従い、*L. plantarum* JCM 1149、JCM 1100、D64 株を培養した。培養上清より 2-2-4 項に従い EPS 画分を抽出した。また菌体より 2-2-10 項に従って 0.5 M の LiCl 溶液で SLPs を回収した。2-2-8 項に従い、EPS 画分および SLPs 画分のサイトカイン誘導活性 (IL-6、IL-10、IL-12 p40) を評価した。また培養上清および SLPs 画分を 2-2-11 項に従い SDS-12.5% PAGE によって分離・観察した。ウェスタンブロッティングは 2-2-13 項に従って行った。

2-2-17. 統計解析

特に記述がない限り総ての定量的実験は 3 回試行し、グラフには各要素の平均値と標準偏差を示した。また GraphPad Prism software package version 9.1. を用いて One-way ANOVA もしくは Two-way ANOVA 法によって統計解析し、 $P < 0.05$ の場合を統計的に有意であると判定した。

Table 2-2-1 本章で使用した *L. plantarum* 株

No	Strain	Origin
1	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> JCM 1149	JCM
2	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> JCM 1100	JCM
3	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> A73	NARO
4	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> D64	NARO
5	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> J21	NARO
6	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> OKI-51	NARO
7	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> OKI-58	NARO
8	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> OKI-59	NARO
9	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> 8-41	NARO
10	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> 12-38	NARO
11	<i>Lactiplantibacillus platarum</i> 12-71	NARO

JCM: Japan Collection of Microorganisms

NARO: National Agriculture and Food Research Organization

(農研機構: 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構)

2-3. 結果

2-3-1. MRS-F 培地における 11 種の *L. plantarum* 株の生育と EPS 生産能

MRS 培地の EPS 量は約 210 $\mu\text{g/ml}$ であったが、2-2-4 の操作によって限外濾過した MRS-F 培地では、EPS 量は約 50 $\mu\text{g/ml}$ であり、多糖成分が約 80%除去されていることを確認した (Fig. 2-3-1)。次に各 *L. plantarum* 株を MRS-F 培地に植菌して生育を観察したところ、24 時間培養後の OD₅₉₅ 値は最も低い A73 株で 3.7、最も高い OKI-58 株で 4.8 を示したが、いずれの菌株も良好な生育を示した (Fig. 2-3-2 A)。一方で、上清中の EPS 濃度は菌株によって異なり、D64 株では 27 $\mu\text{g/ml}$ と培養液に比べて減少していたが、JCM 1149 株では 168 $\mu\text{g/ml}$ と D64 株の約 6.2 倍高い値を示した (Fig. 2-3-2 B)。また培養 24 時間後の OD₅₉₅ 値と EPS 生産能に相関性が見られるか確かめたが、両要素は相関しないことが分かった (Fig. 2-3-3)。

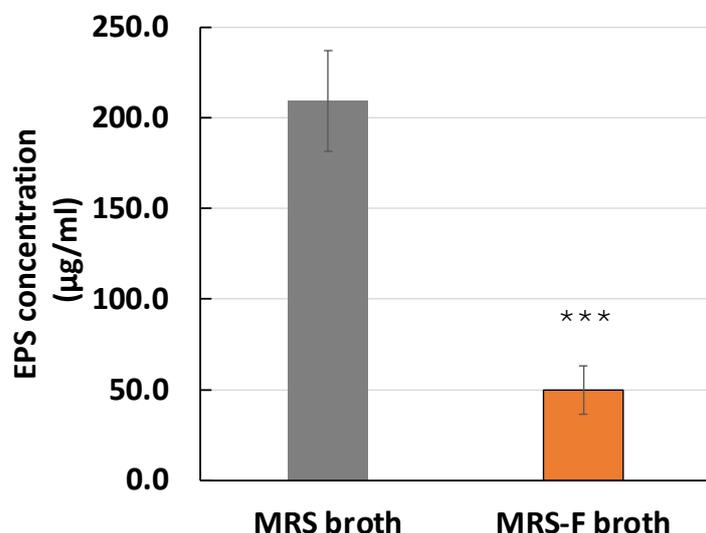


Fig. 2-3-1 MRS broth および MRS-F broth に含まれる EPS 量

***: $p > 0.001$

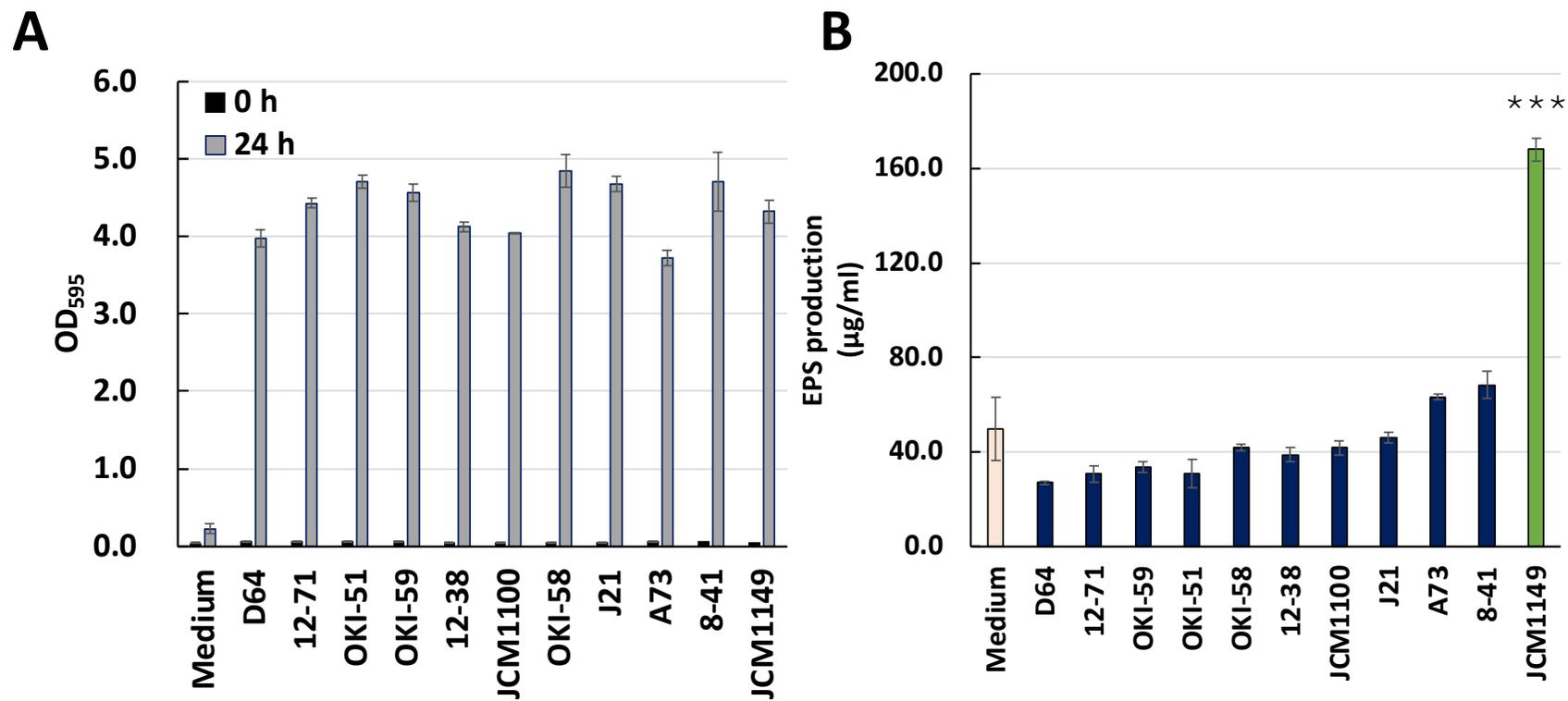


Fig. 2-3-2 MRS-F 培地における *L. planatarum* の生育(A)と EPS 生産能(B)

***: $p > 0.001$

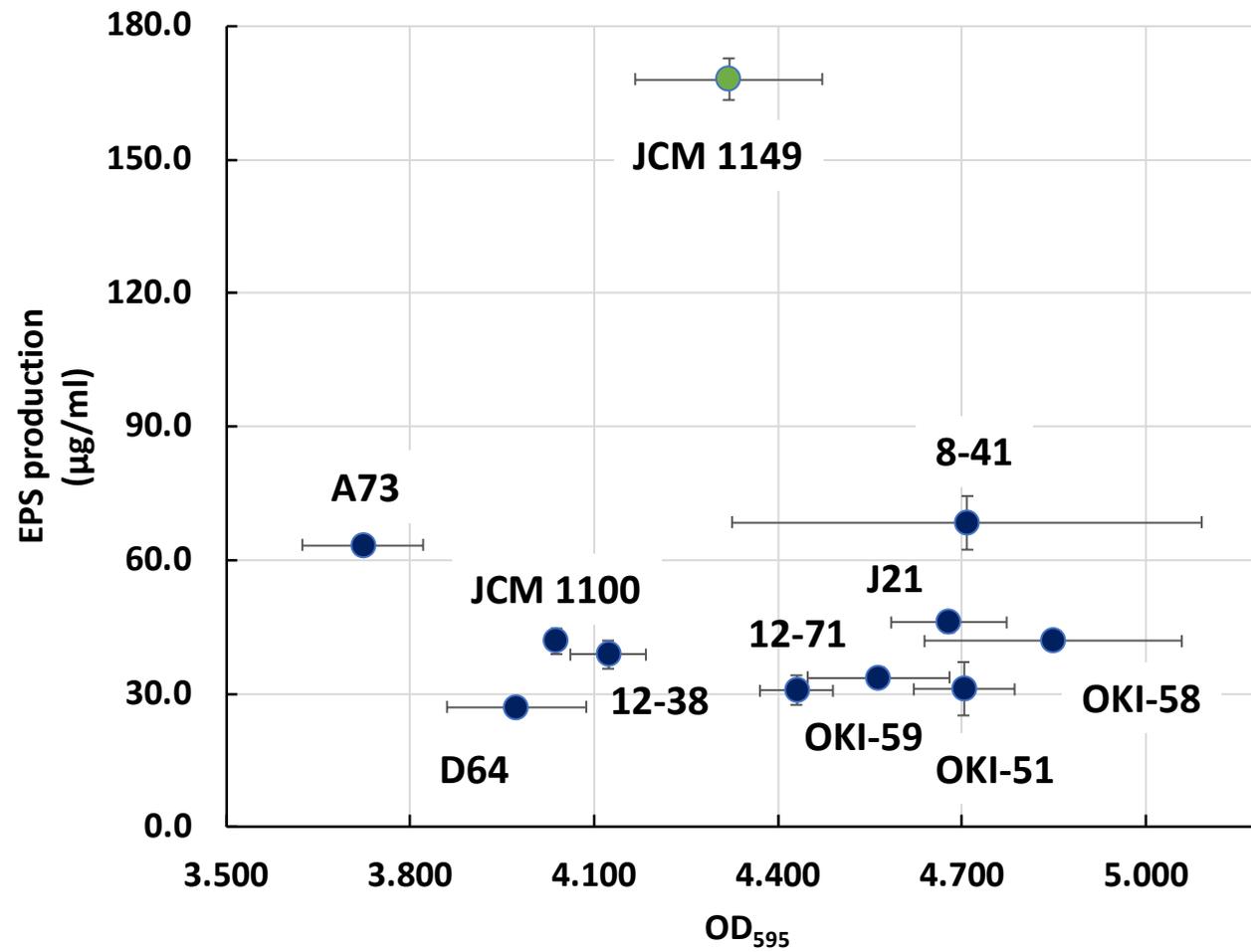


Fig. 2-3-3 *L. plantarum* の生育と EPS 生産能の関係

2-3-2. 11種の *L. plantarum* 株の EPS 生産能と免疫調節活性

L. plantarum 由来の EPS 画分の免疫調節活性を調べるため、ヒト由来の単球細胞 THP-1 を樹状細胞様 (THP-1 DC) に分化させ EPS 画分を供し、IL-6、IL-10、IL-12 p40 誘導能を評価した。その結果、JCM 1149, JCM 1100, A73 株由来の EPS 画分は IL-6、IL-10、IL-12 p40 共通して強いサイトカイン誘導能を示した一方で、D64、12-38、12-71 株由来の EPS は、どのサイトカインにおいてもほとんど活性を示さなかった (Fig. 2-3-4)。これらのサイトカイン誘導能が、各 *L. plantarum* 株の EPS 合成能 (EPS 画分中の EPS 濃度) と相関するか確かめたところ、IL-6、IL-10、IL-12 p40 全てで EPS 濃度が高くなるほど THP-1 DC のサイトカイン産生が高くなる傾向が見られ、最も EPS 生産能の高い JCM 1149 株が最も免疫調節活性が高いことが明らかとなった (Fig. 2-3-5)。

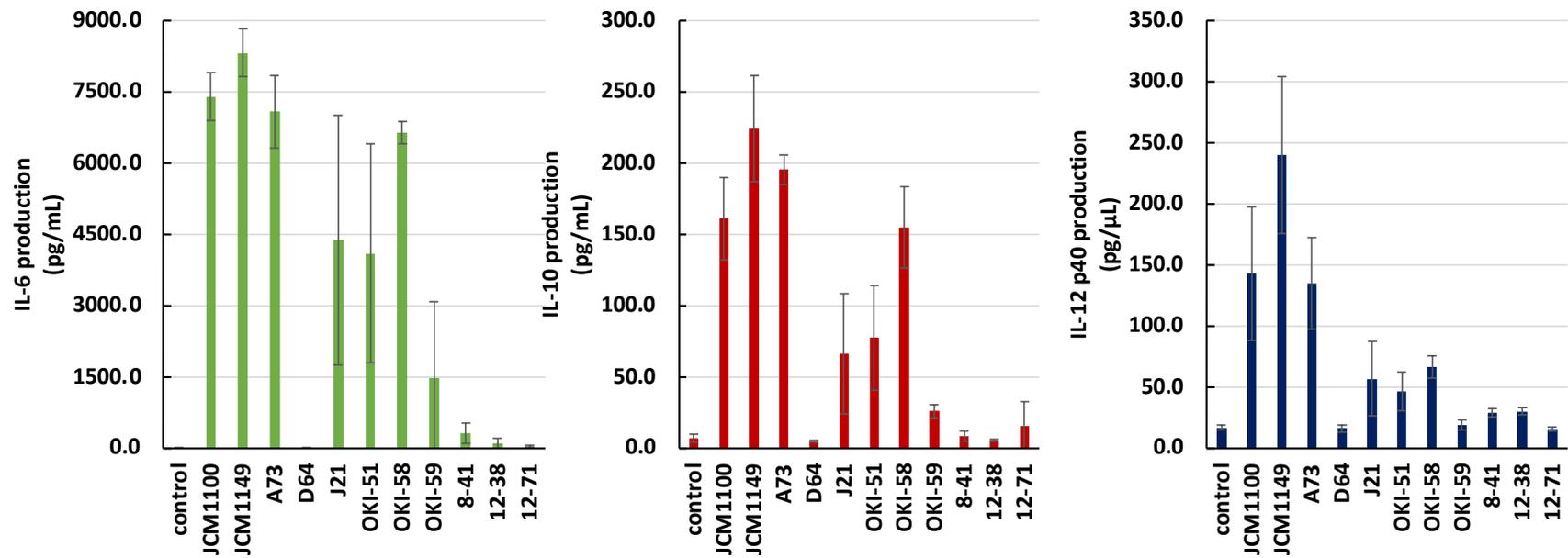


Fig. 2-3-4 11 種の *L. plantarum* 株由来 EPS 画分のサイトカイン産生誘導活性

control: MRS-F 由来 EPS 画分

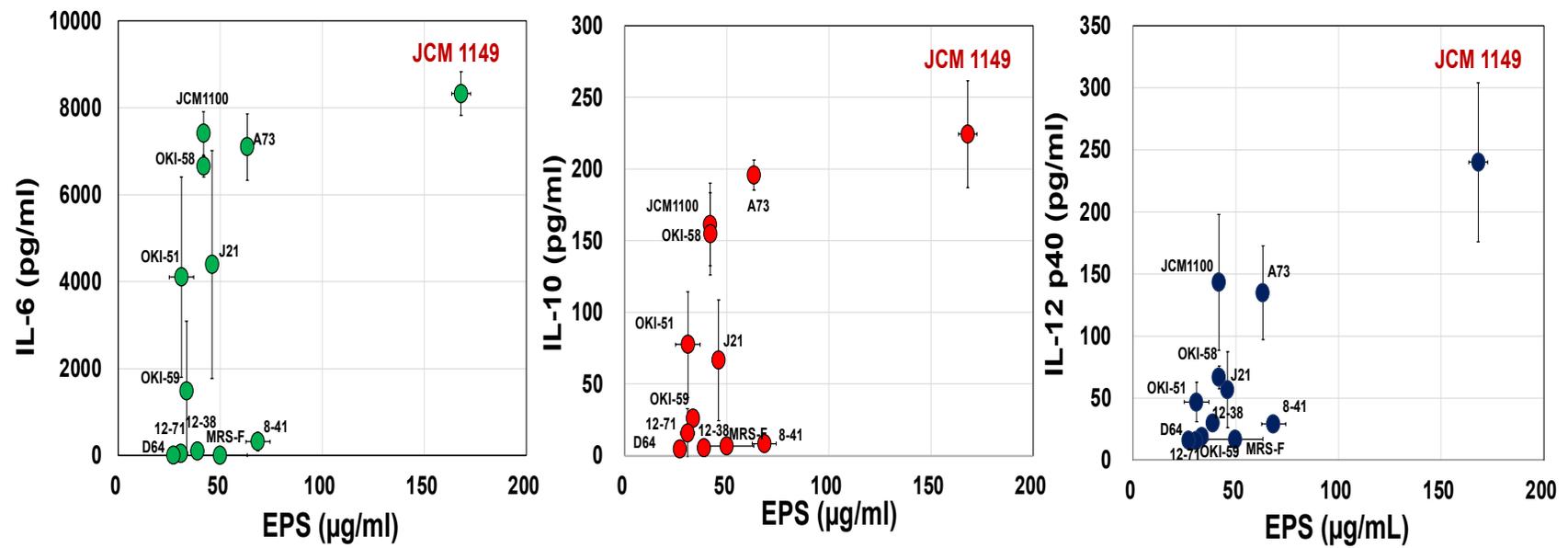


Fig. 2-3-5 *L. plantarum* 株の EPS 生産能と免疫調節活性の関係

2-3-3. ゲル濾過クロマトグラフィーによる JCM 1149 培養上清の分析

11 株中で EPS 画分に最も強い免疫調節活性が観察された JCM1149 株に着目し、免疫調節活性因子を明らかにするため、JCM 1149 株の培養上清をゲル濾過クロマトグラフィーによって分画し各フラクション中の成分とサイトカイン誘導能 (IL-6、IL-10、IL-12 p40) の関係を調べた。EPS は溶出開始から約 15-24 ml の位置に溶出された一方で、約 14-22 ml の位置にはタンパク質の溶出も確認された (Fig. 2-3-6 A)。さらに、これらのフラクションの IL-6、IL-10、IL-12 p40 誘導能を調べたところ、約 15-17 ml の溶出位置でタンパク質のピークとなることが明らかとなった (Fig. 2-3-6 B)。また約 15 ml の溶出画分を SDS-12.5% PAGE に供し分析したところ、本フラクションには分子量約 41 kDa のタンパク質が主要成分として含まれていることが確認された (Fig. 2-3-6 C)。

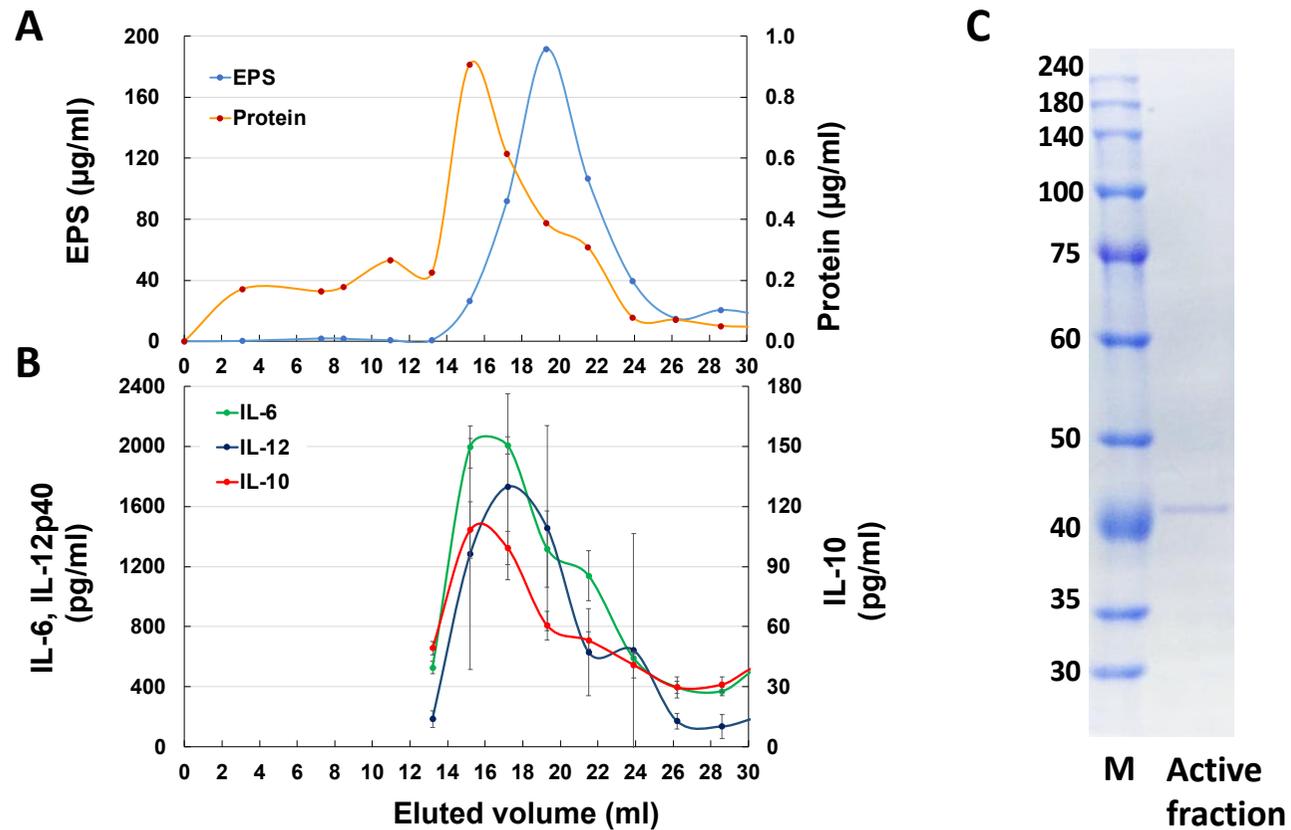


Fig. 2-3-6 ゲル濾過クロマトグラフィーによる *L. plantarum* JCM 1149 株の培養上清の分画分析

(A) フラクシオン中の EPS 量 またはタンパク質量 (n=1) 、(B) 各フラクシオンの免疫調節活性 (IL-6、IL-10、IL-12 p40)、
C) 15 ml 溶出時点フラクシオンの SDS-12.5% PAGE

2-3-4. 免疫調節因子のゲル濾過クロマトグラフィーによる分離

培養上清のゲル濾過クロマトグラフィーによる分画分析の結果から、興味深いことに、主要な活性因子として約 41 kDa のタンパク質の関与が示唆推定された。しかし当該フラクションは EPS のフラクションが重なることから、41 kDa タンパク質の活性を明らかにするために、菌体表層タンパク質 (SLPs) からの精製を試みた。

培養菌体を 0.2 x PBS での洗浄し、カオトロピック試薬である LiCl を用いて菌体表層にイオンの結合するとされる SLPs を、0.5、1.0、5.0 M と段階的に回収し、各画分の IL-10 誘導能を評価したところ、0.5 M 画分は wash 画分比べて有意に高い活性を示した (Fig.2-3-7A)。次に、これらの画分に含まれるタンパク質を SDS-12.5%PAGE にて観察したところ、約 41 kDa のバンドは全ての画分で観察されたが 0.5 M 画分で最も強く、さらに 1.0 M、5.0 M 画分と比べてその他のタンパク質の混入が少ないことがわかった (Fig. 2-3-7 B)。

そこで 0.5 M LiCl 溶液で回収した SLPs 画分をゲル濾過クロマトグラフィーに供しタンパク質の純化を試みたところ、EPS はどのフラクションにおいてもほとんど検出されなかった一方で、タンパク質はフラクション No. 15 (溶出量約 17.8 ml) にて明らかなピークが観察された (Fig. 2-3-8 A)。当該フラクションを含めフラクション No. 11-20 を SDS-12.5% PAGE に供したところ、No. 15 および No. 16 のフラクションにおいて約 41 kDa のバンドが観察された (Fig. 2-3-8 B)。これらのバンドの強度を ImageJ によって解析し、IL-6 誘導活性のグラフと重ね合わせたところフラクション No. 15 でピークが一致することを確認した (Fig. 2-3-8 C)。

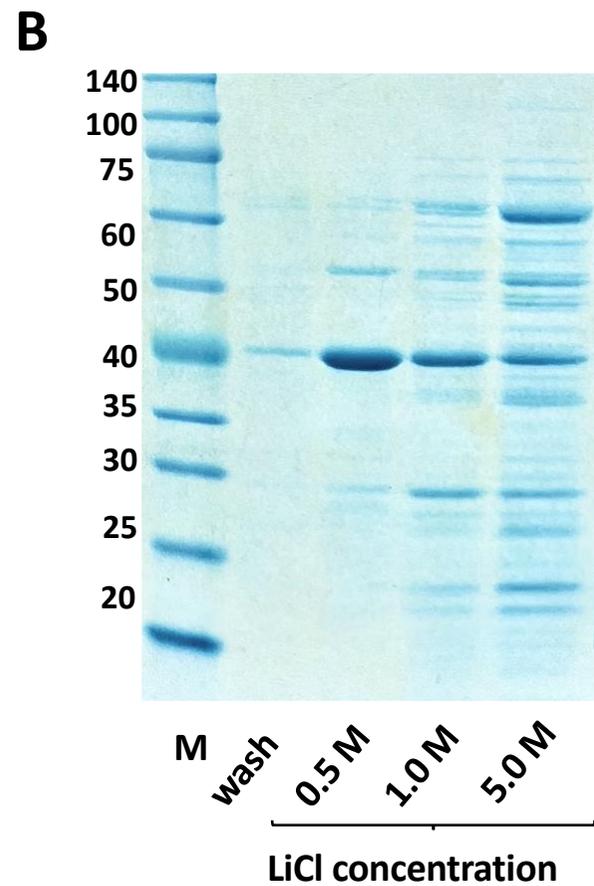
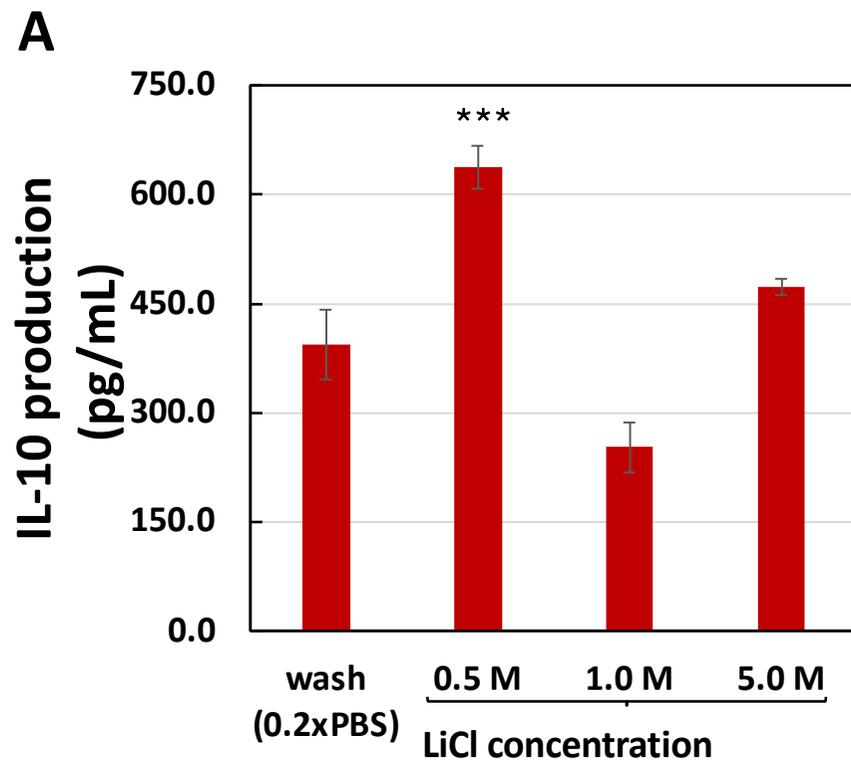


Fig. 2-3-7 異なる濃度の LiCl 溶液を用いた JCM 1149 菌体表層タンパク質の遊離

A) IL-10 産生誘導活性、B) SDS-12.5% PAGE

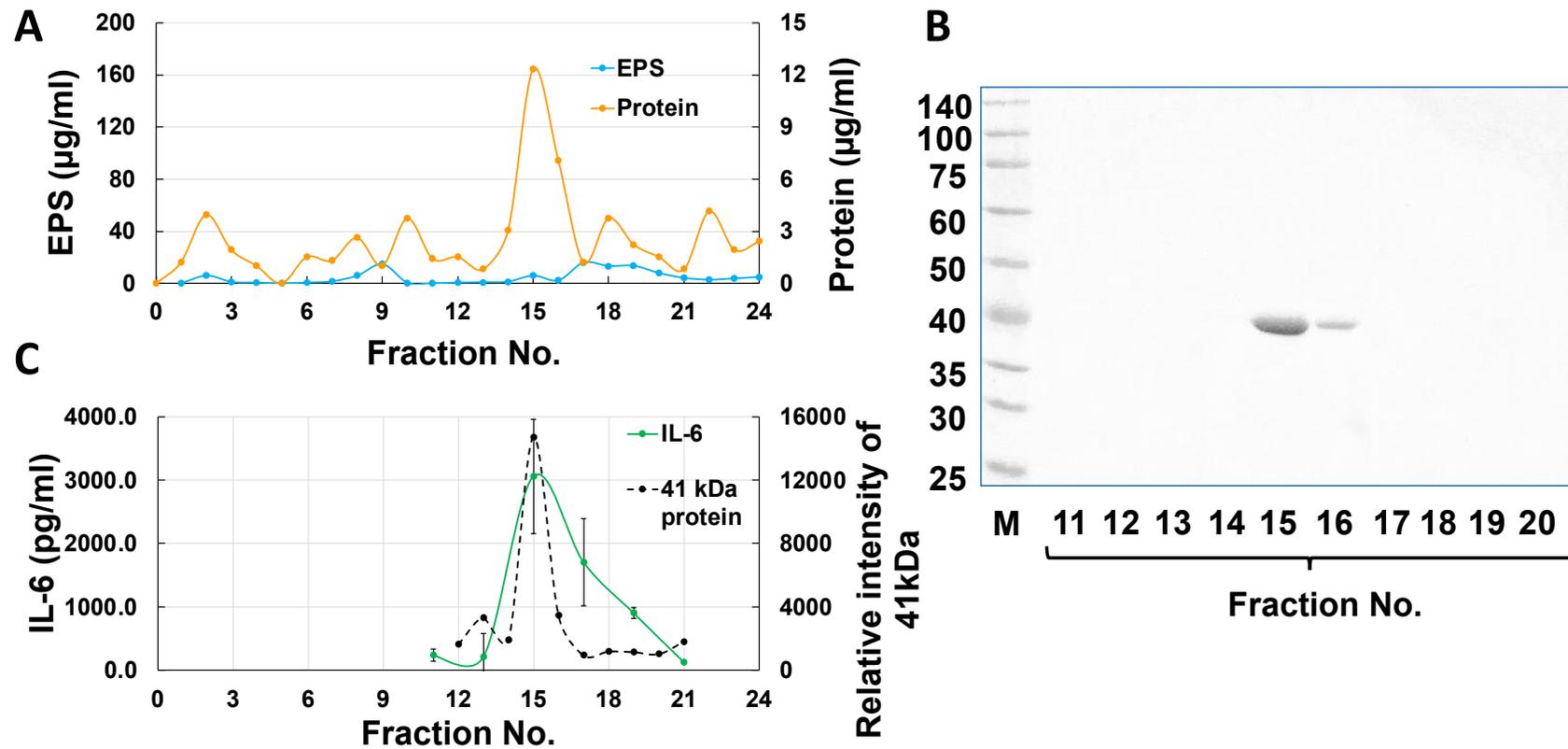


Fig. 2-3-8 ゲル濾過クロマトグラフィーによる *L. plantarum* JCM 1149 株の SLPs の分画

(A) フラクシオン中の EPS 量またはタンパク質量 (n=1)、(B) 主要フラクシオンの SDS-12.5%PAGE、

(C) 各フラクシオンの IL-6 産生誘導活性と 41 kDa タンパク質バンド強度

2-3-5. プロテオーム解析による免疫調節因子の同定

JCM 1149 株の主要な免疫調節因子として、本菌株が細胞外に分泌する 41 kDa のタンパク質が推測された。そこで当該タンパク質をトリプシンによって分解し得られたアミノ酸配列からプロテオーム解析による同定を試みた。

Mascot 解析におけるフラグメントが最も高いスコアを示したタンパク質は糖系酵素の一つグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH: Glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase) であった (Fig. 2-3-9 A, B)。

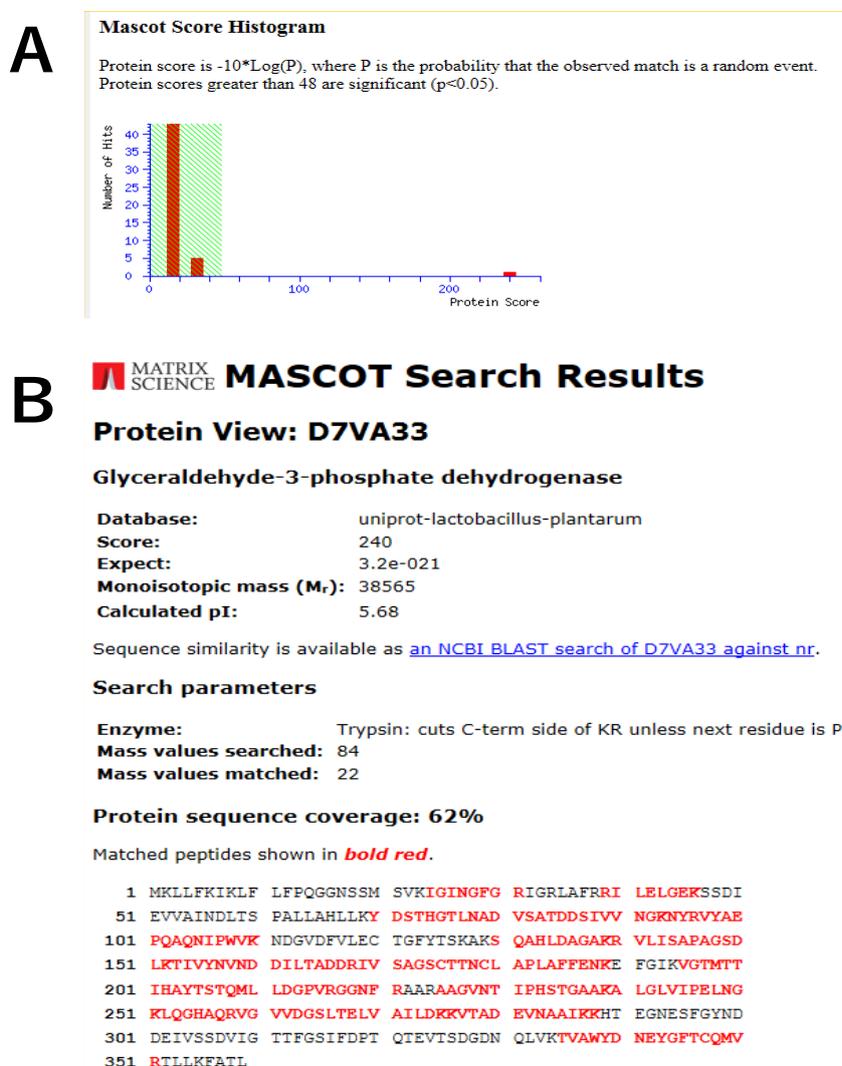


Fig. 2-3-9 分子量 41 kDa タンパク質のプロテオーム解析結果

A) マスコットスコアのヒストグラム、B) スコア 240 のタンパク質の詳細

2-3-6. ウェスタンブロッティングによる GAPDH の検出

これまでの結果から、JCM 1149 株は培養上清および菌体表層に主要な免疫調節因子である分子量約 41 kDa のタンパク質を分泌していることが示された。そこで、培養上清で検出された約 41 kDa のタンパク質が SLPs 内の 41 kDa タンパク質と同じ GAPDH であることを確かめるためウェスタンブロッティング (WB) による検出を試みた。

その結果、培養上清および SLPs どちらのサンプルにおいても約 41 kDa のバンドが検出された (Fig. 2-3-10)。このことから JCM1149 株は菌体内解糖系酵素である GAPDH を培養上清に分泌、また菌体表層に局在化することが示された。

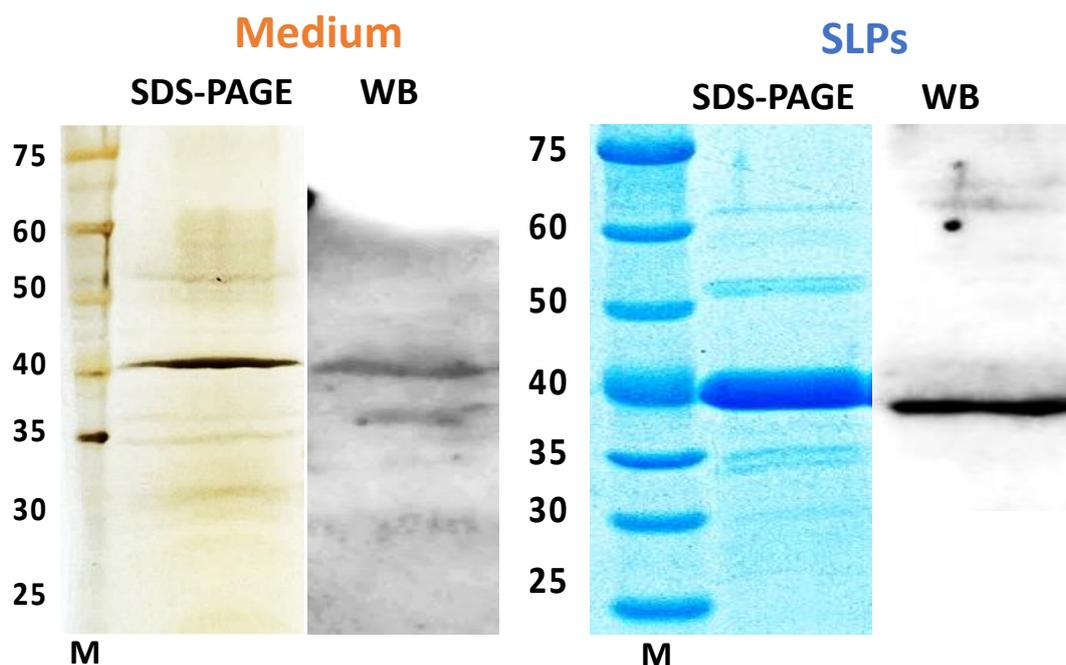


Fig. 2-3-10 JCM 1149 株の培養上清および SLPs 画分中の GAPDH

2-3-7. 免疫蛍光染色による JCM 1149 菌体表層 GAPDH の検出

2-3-4 項および 2-3-6 項より、JCM 1149 株の GAPDH は菌体外に分泌され、菌体表層に局在することが示唆された。一方、LiCl 処理により菌体内成分の遊離の可能性があるため、菌体を LiCl 処理の無い状態で、表層の GAPDH の存在を抗 GAPDH 抗体により確認した。その結果、LiCl 未処理菌体 (No-treated cell) では緑色蛍光検出時に視野全体に短桿菌型の緑色蛍光が観察された。一方で、LiCl 処理菌体 (LiCl treated cell) では同じ視野であっても緑色の蛍光はほとんど観察されず、表層の GAPDH は LiCl 処理により菌体内から遊離しているのではないことが示された (Fig. 2-3-11)。

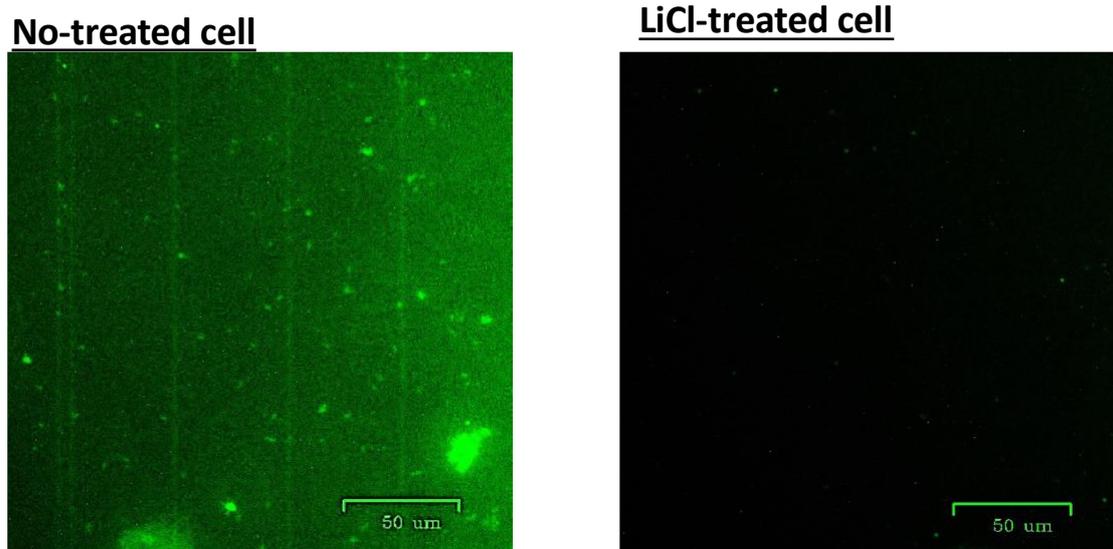


Fig. 2-3-11 免疫蛍光染色による *L. plantarum* JCM 1149 菌体表層上の GAPDH の検出

2-3-8. 免疫調節作用における抗 GAPDH 抗体の影響

JCM 1149 株由来 EPS 画分には強い免疫調節活性が確認され、これは培養液中に分泌される GAPDH による可能性が示唆された。そこで JCM 1149 株由来 EPS 画分と抗 GAPDH 抗体を反応させた時、IL-6、IL-10、IL-12 p40 の誘導能に影響が及ぶか確かめた。

その結果、抗 GAPDH 抗体を添加した場合、IL-6 および IL-10 誘導能の有意な低下が確認され、それぞれ未添加群に比較して、約 83%、約 92% となった。一方で、IL-12 p40 誘導能では抗体添加の有無によって大きな変化は確認されなかった (Fig. 2-3-12)。

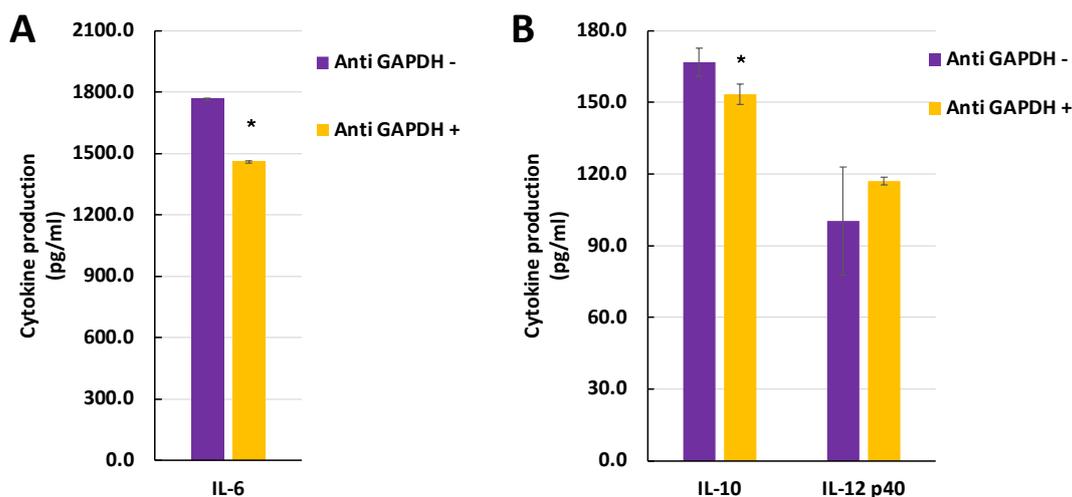


Fig. 2-3-12 抗 GAPDH 抗体が JCM1149 株由来 EPS 画分のサイトカイン誘導能に及ぼす影響 (A)IL-6、(B) IL-10, IL-12 p40, * $p < 0.05$

2-3-9. *L. plantarum* の免疫調節活性と GAPDH 分泌能の関係

GAPDH は JCM 1149 株における主要な免疫調節因子であることが明らかとなったが、EPS 合成能または免疫調節活性の異なる *L. plantarum* JCM 1149、JCM 1100、D64 株においても、各株の免疫調節活性が GAPDH 量に依存するかどうかに関して理解するために、培養上清画分または SLPs 画分中の GAPDH と免疫調節活性 (IL-6、IL-10、IL-12 p40 誘導活性) の関係を確認した。

SLPs 画分について、各種サイトカイン誘導活性を確認したところ、いずれのサイトカインにおいても D64 株が最も低く、一方で JCM 1100 株由来の SLPs 画分が最も高活性であることが明らかとなった (Fig. 2-3-13 A、B)。このとき各種 SLPs 画分を SDS-12.5%PAGE およびウェスタンブロッティングへ供したところ、D64 株ではほとんどタンパク質のバンドが観察されなかった一方で、JCM 1149 および JMC 1100 株では明瞭な約 41 kDa のバンドが観察され、さらにその強度は JCM 1149 株よりも JCM 1100 株の方が強いことが明らかとなった (Fig. 2-3-13 C、D)。

次に培養上清から EPS を抽出しサイトカイン誘導活性を確認したところ、SLPs と同様に D64 株がいずれのサイトカインにおいても最も活性が低いのに対し、最も活性が高い菌株は JCM 1149 株であった (Fig. 2-3-14 A、B)。このとき各菌株の培養上清中の約 41 kDa の GAPDH に相当するタンパク質バンドは JCM 1149 株と JCM 1100 株でわずかに観察されたが、D64 株では観察されなかった (Fig. 2-3-14 C、D)。

さらに SLPs 画分および EPS 画分の免疫調節活性 (IL-6、IL-10、IL-12 誘導活性) が、それぞれ SLPs 画分または培養上清画分中の GAPDH 量と関係するか調べたところ、どの組み合わせについても R^2 値が 0.8 以上の強い正の相関関係を示した (Fig. 2-3-15)。

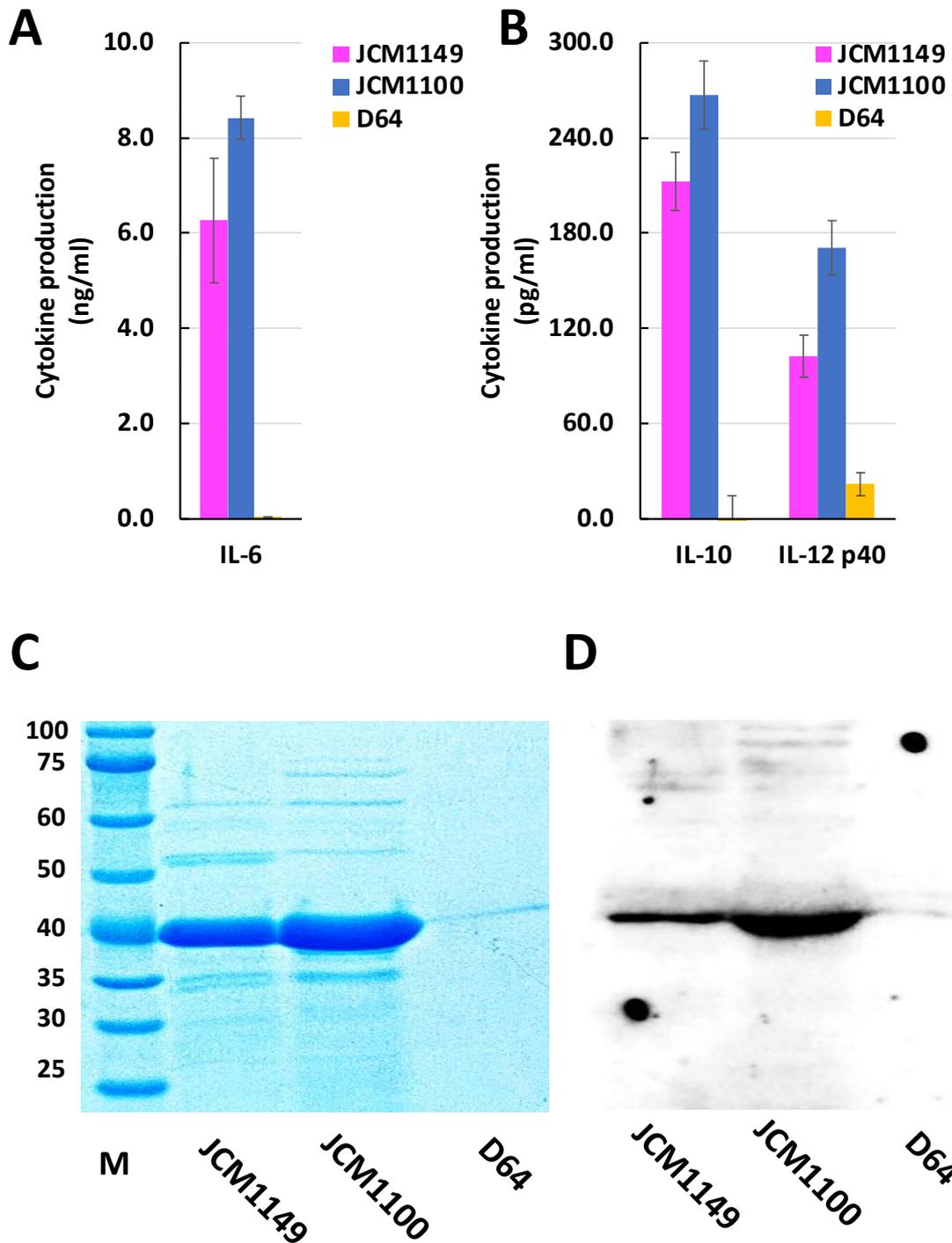


Fig. 2-3-13 *L. plantarum* JCM 1149、JCM1100、D64 株の SLPs 画分のサイトカイン誘導活性(A)IL-6、(B)IL-10、IL-12p40、SLPs 画分の SDS-12.5%PAGE(C) および抗 GAPDH 抗体を用いた SLPs 画分のウェスタンブロッティング画像 (D)

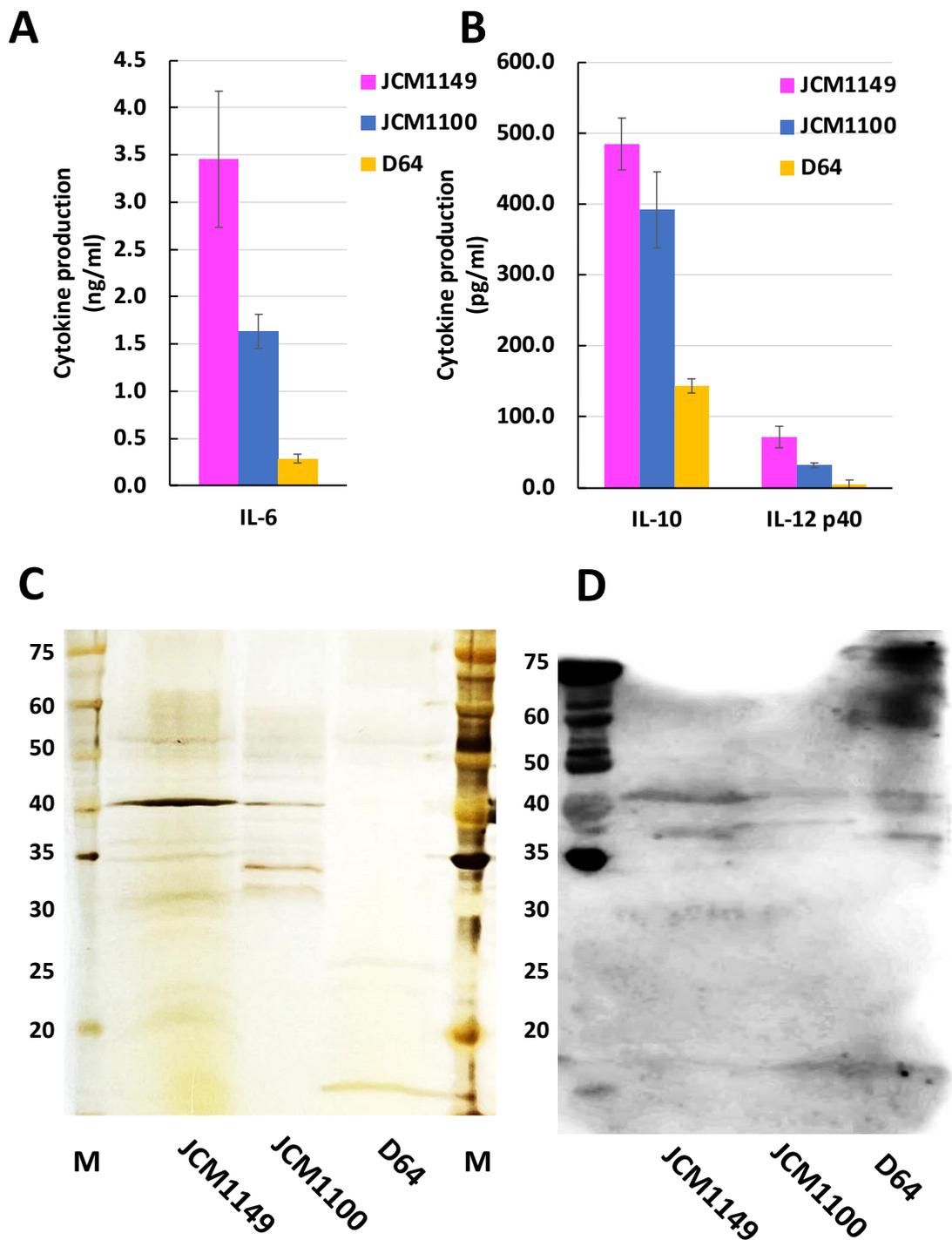


Fig. 2-3-14 *L. plantarum* JCM 1149、JCM1100、D64 株の SLPs 画分のサイトカイン誘導活性(A)IL-6、(B) IL-10、IL-12p40、SLPs 画分の SDS-12.5%PAGE(C) および抗 GAPDH 抗体を用いた SLPs 画分のウェスタンブロッティング画像 (D)

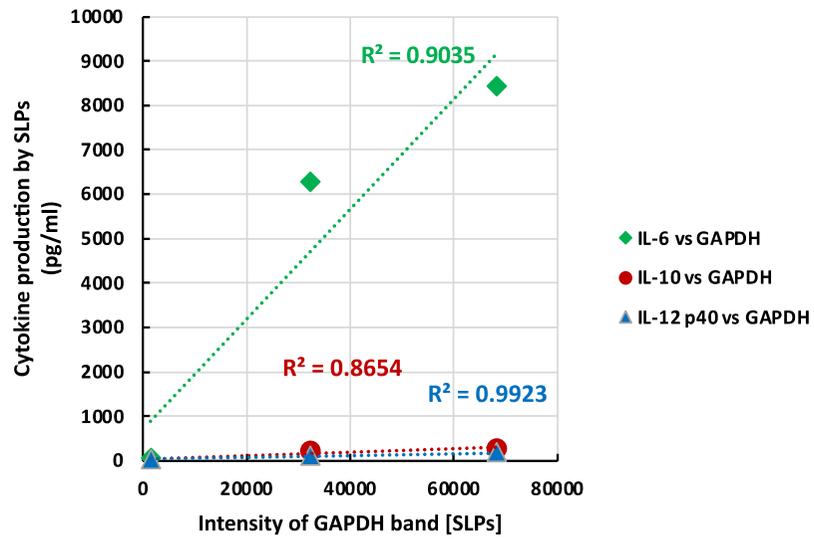
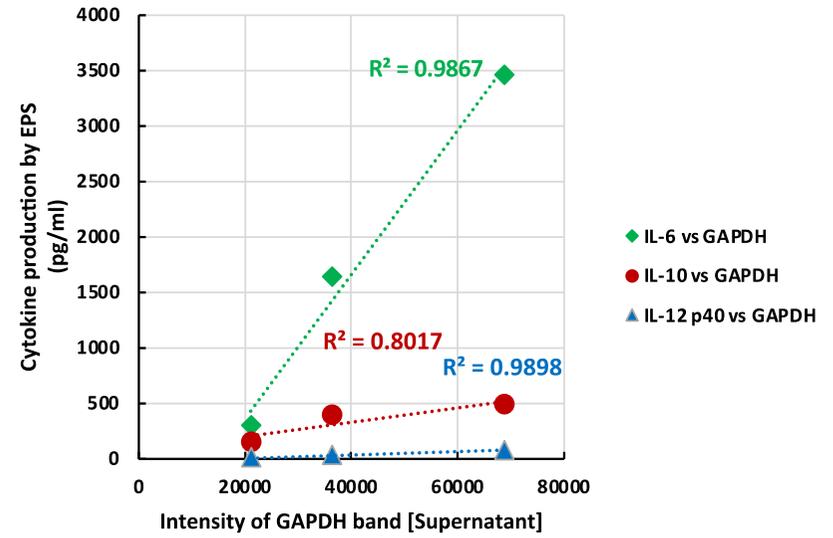
A**B**

Fig. 2-3-15 SLPs (A)または培養上清 (B) 中の GAPDH と免疫調節活性の関係

2-4. 考察

過去に *L. plantarum* をはじめ、様々な乳酸菌種で EPS と免疫調節活性の関係が多く報告されてきたが、EPS の他にも多様な乳酸菌成分が免疫調節活性への寄与が考えるが、EPS の貢献度がどの程度であるかについては明らかにされていなかった。本研究では EPS 生産に関する報告が最も多い *L. plantarum* を対象に、ランダムに 11 種の菌株を選択し、EPS 生産能と IL-6、IL-10、IL-12 p40 の誘導活性を比較解析することで *L. plantarum* の主要免疫調節因子の特定を目指した。

乳酸菌は生育に従って EPS の他にも有機酸、脂肪酸などの代謝産物を分泌するほか、溶菌によって流出する細胞壁成分、DNA などの細胞成分も免疫調節因子として報告⁸されており、EPS の免疫調節作用を論じるにはその他成分と比較した免疫調節作用への寄与率を調べるのが重要となる。そこで本研究では EPS 画分の免疫調節活性が最も高い *L. plantarum* JCM 1149 株の培養上清に着目し、EPS の分子量による免疫活性の違いにも注目し、ゲル濾過クロマトグラフィーによる免疫刺激因子の分子量分布を評価した。興味深いことに、JCM 1149 株の培養上清には、過去に報告がない EPS の他成分にサイトカイン誘導活性が存在することが示唆され、さらに、有効成分と考えられる 41 kDa タンパク質を菌体表面から精製を試みたことで、従来から報告されている EPS を含まず 41 kDa タンパク質の分離に成功した。

これまで EPS と関連したプロバイオティクス乳酸菌の免疫調節活性については、EPS の純化⁹、荷電による分離^{9,10}、遺伝子欠損による EPS 変異^{6,11} などのアプローチによる研究が主流であった。一方、本研究での解析により、EPS 抽出画分には GAPDH が存在し、主要な免疫活性を担っていることが示された。これらのことは、過去の研究における遺伝子欠損株の培地上清における免疫活性の低

下評価では GAPDH など、EPS と挙動を同一とする成分の存在が見過ごされてきた可能性があることを示唆している。一方、GAPDH と EPS の存在量が正の相関を示したことから、菌体内酵素である GAPDH の分泌に EPS が何らかの働きをしている可能性がある。我々の研究において GAPDH は EPS に親和性を示したことから（第 4 章参照）、過去の研究における EPS の抽出時に GAPDH が共存していた可能性が考えられる。そこで *L. plantarum* 種の免疫調節活性は EPS 生産能に隠れた GAPDH が担っていた可能性を確かめるため、2-3-2 項において EPS 生産能または免疫調節活性が異なることが示された JCM 1149、JCM 1100、D64 株を対象に培養上清（EPS）および SLPs 中の GAPDH と免疫調節活性の関係を確かめた。ウェスタンブロッティングの結果から SLPs 画分および培養上清画分の GAPDH バンド強度を解析し、SLPs 画分または EPS 画分の IL-6、IL-10、IL-12 p40 産生誘導活性との関係を調べると、驚くべきことに、すべての組み合わせにおいて R^2 値は 0.8 以上と強い正の相関が確認された (Fig. 2-3-15)。このことから *L. plantarum* 種における主要な免疫調節因子は GAPDH であり、その分泌能が菌株の免疫調節作用を決定していることが示唆された。この時、JCM 1149 株の SLP 画分の結果について SDS-PAGE とウェスタンブロッティングで同じサンプルを用いているにも関わらず GAPDH のバンド強度が一致しなかったことから、約 41 kDa のバンドには複数種のタンパク質が共存している可能性も考えられた。しかし本サンプルをゲル濾過クロマトグラフィーによって分子量依存的に分離後プロテオーム解析を行ったところ、2 番手以降と比べて高いスコアとアミノ酸配列のカバー率から GAPDH であると同定されていることから約 41 kDa のバンドはほとんど純粋な GAPDH であると推測され、バンド強度の違いについてはウェスタンブロッティングにおける転写や洗浄などの処理が影響したと考える。

本研究において、GAPDH が EPS 高生産 *L. plantarum* 株における主要な免疫調節因子であることが明らかとなった、一方、他の免疫調節に関与する因子に関しては不明である。電気泳動の結果からは(Fig. 2-3-6 C)、タンパク質の主な有効成分は GAPDH と推定されたが、さらに、JCM 1149 株の培養上清を用いたゲル濾過法による結果 (Fig. 2-3-6) から、活性成分に含まれる GAPDH の貢献度の推定を試みた (Fig. 2-4-1)。グラフから、EPS が担う活性は全体の約 20%以下であり、残りの 80%はタンパク質に起因する可能性が示唆された。以上より、GAPDH は、JCM 1149 の培養上清の免疫調節作用に関して約 80%程度の貢献をしていると考えられた。Fig. 2-3-6 A において、EPS はピーク時 190.3 $\mu\text{g/ml}$ 溶出されていた一方でタンパク質は 0.9 $\mu\text{g/ml}$ と、約 210 倍の差が見られたことからタンパク質は EPS に比べて最大で約 1000 倍高い免疫調節活性を示す可能性が推定された。また IL-6 および IL-12 p40 で計算した場合にも同様の傾向を確認した (Data not shown)。

以上のことから、*L. plantarum* JCM 1149 株の主要な免疫調節因子は EPS ではなく GAPDH であることが強く示された。

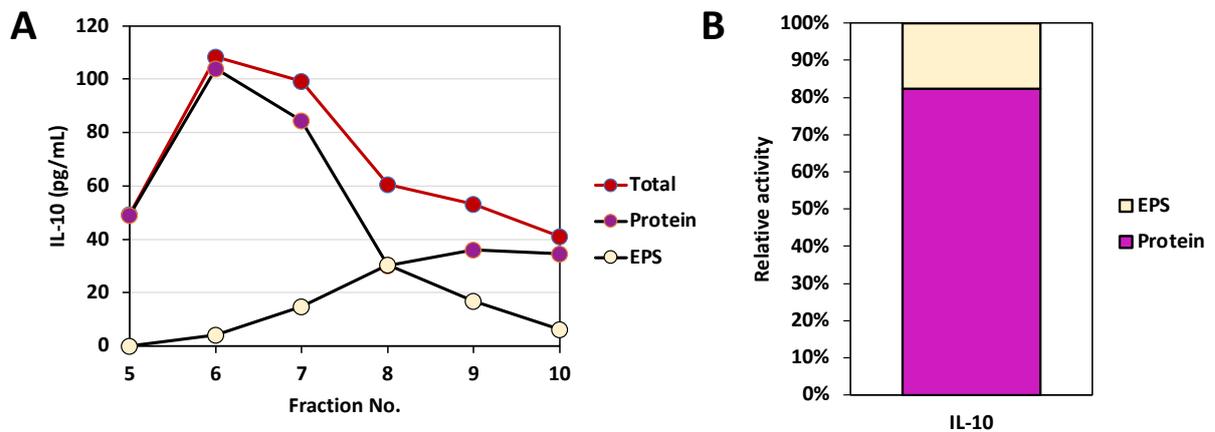


Fig. 2-4-1. IL-10 誘導活性に基づくタンパク質または EPS の貢献度予測

(A) フラクシオンごとの寄与率、(B) フラクシオン No. 5-10 の活性全体を 100% とした時の EPS またはタンパク質の占める割合

(算出方法: EPS の含まれないフラクシオン No.5 (Fig. 2-3-6 における 13 ml 溶出フラクシオン) における IL-10 誘導活性からタンパク質の寄与率を算出、フラクシオン No.10 (Fig. 2-3-6 における 24 ml 溶出フラクシオン) から EPS の寄与率を算出、各フラクシオンにおける IL-10 誘導活性にそれぞれの寄与率を掛け、タンパク質または EPS による活性を概算)

プロテオーム解析の結果から *L. plantarum* JCM 1149 株における主要免疫調節因子として精製された 41 kDa のタンパク質はムーンライティングプロテインの一種として知られる GAPDH と同定された。GAPDH は、一般に多くの生物種において細胞内で解糖系酵素の一種として、グリセルアルデヒド-3-リン酸から 1,3-ビスホスホグリセリン酸への可逆的な反応を触媒することで広く知られている。しかし、微生物ではしばしば細胞外への分泌が確認され、宿主細胞上のプラスミノーゲンと相互作用し病原菌の侵襲・感染¹²、B 細胞および T 細胞への免疫調節作用¹³、マクロファージにおけるアポトーシスの誘発¹⁴などに寄与することが報告されている。乳酸菌種では *Lactobacillus reuteri* や *Lactobacillus rhamnosus* などにおいて菌体表層に発現した GAPDH が腸管上皮細胞上のムチンと結合し相互作用する^{15, 16, 17}ことや *Lactobacillus johnsonii* の菌体表層 GAPDH

が腸管上皮細胞の JAM-2 タンパク質への結合を促し、細胞間のタイトジャンクション修復に寄与する¹⁸ことが報告されている。*L. plantarum* JCM 1149 株に関しても、過去に菌体表層に GAPDH を発現し血液型抗原との結合メカニズムなどが示されていた¹⁹。本研究においても免疫蛍光染色およびウェスタンブロッティングの結果から菌体表層における GAPDH の発現が確認された。加えて、興味深いことに本研究では培養上清中への分泌も確認され、EPS 画分に混入していることが明らかとなった。病原性 *Streptococcus* 種由来の GAPDH は IL-6 産生²⁰や IL-10 産生²¹を誘導することが報告されている。乳酸菌種における GAPDH の分泌と免疫調節作用に関して、*Lactobacillus gasseri*²²で報告されているが、EPS 分泌性乳酸菌において、高頻度に菌体外に分泌される免疫調節因子としての報告として新規な知見である。

L. plantarum JCM 1149 株にて GAPDH が主要免疫調節因子として同定されたことから、他の *L. plantarum* 株においても菌体外への GAPDH 分泌能が菌株特異的な免疫調節作用を決定している可能性が考えられたため、Fig. 2-3-5 を参考に 11 種の *L. plantarum* 株を A: EPS 高生産で高い免疫調節活性 (JCM 1149)、B: EPS 低生産だが高い免疫調節活性 (JCM 1100、A73、OKI-58)、C: EPS 低生産で低い免疫調節活性 (D64、12-38、12-71 など) に分類し、それぞれから JCM 1149、JCM 1100、D64 株に着目した。Fig. 2-3-15 から SLPs 画分または EPS 画分の免疫調節活性は、それぞれ SLPs 画分、培養上清画分中の GAPDH と強く相関することが示されたことから、*L. plantarum* 種における免疫調節活性は GAPDH 分泌能によって決定されることが強く示唆された。

Fig. 2-3-13 から SLPs 画分の SDS-PAGE 画像を見ると JCM 1149 および JCM 1100 株では約 41 kDa の GAPDH のバンドの他にいくつかのタンパク質のバンドが観察された一方で、D64 株では極薄く GAPDH のバンドが確認されたのみで

その他に目立ったバンドは観察されなかった。過去の研究で、Saad らは *L. plantarum* 299v 株における菌体表層への GAPDH 分泌は細胞膜の透過性と関係すると報告していた²⁴。このことから SLPs 画分中の GAPDH は菌株依存的な細胞膜の透過性によって異なっていると推測される。

一方で、Fig. 2-3-14 から培養液画分中の GAPDH について、*L. plantarum* JCM 1149 株は EPS 生産に伴って分泌されることが示唆されていることから、JCM 1100 株と D64 株についても僅かに EPS 生産能に差が見られるため、GAPDH 分泌能および免疫調節活性の差に繋がった可能性がある。また別の可能性として、EPS の構造は菌株依存的に多様^{1,4}であることから、JCM 1100 株由来の EPS は D64 株と比べて GAPDH に対する親和性が高く、そのため中程度の EPS 生産能であっても高い免疫調節活性を示した可能性も考えられるが、未だ仮説の域に留まっておりさらなる検討が必要とされる。

11 種の *L. plantarum* 株を用いた比較解析によって、*L. plantarum* の EPS 生産能は生育に依存しないこと、および EPS 生産能が高いほど EPS 画分の IL-6、IL-10、IL-12 p40 誘導活性も増加する傾向が示された。*L. plantarum* 株の中で、プロバイオティクスとして特に注目されている *L. plantarum* WCFS1 株では、ゲノム上に莢膜多糖 (CPS : Capsular polysaccharide) の合成に関わる 4 種の遺伝子クラスターが保持されており、これらのクラスターを全て欠失させることで CPS 生産能が著しく低下することが報告されている⁶。また EPS 合成関連遺伝子クラスターの数や構成遺伝子は菌種間のみならず、菌株間でも多様であることが知られており^{1,4,6}、菌株間での EPS の構造的多様性や EPS 生産能と深く関わっていると考えられている。さらに本研究で扱った 11 株の中で最も EPS 生産能の高い *L. plantarum* JCM 1149 株 (ATCC 14917 株) はゲノム情報が公開されており、(<https://www.atcc.org/products/14917>)、EPS 合成クラスターの構成遺伝子として報

告のある遺伝子⁴を対象に EPS 合成クラスターを推定すると、WCFS1 株とよく似た 4 種類のクラスターを保持していることが理解できる (Fig. 2-4-2)。

本研究で用いた 11 種の *L. plantarum* 株の菌株依存的な EPS 生産能の差および EPS 画分の免疫調節活性の差は、各 *L. plantarum* 株が保持する EPS 合成遺伝子クラスターの数および構成遺伝子の違いに起因すると推定され、中でも *L. plantarum* JCM 1149 株が EPS 高生産および EPS 画分のサイトカイン誘導能が高活性であったのは、免疫調節活性を示すプロバイオティクス株である *L. plantarum* WCFS1 株⁷と同様の EPS 合成クラスターを保持していたことに起因する可能性が考えられる。一方で EPS 生産が少ない菌株でもサイトカイン誘導活性の高い株 (JCM 1100, A73 株など) と活性の低い株 (D64, 12-38 株など) に分かれることから、サイトカイン誘導活性は単純に EPS 生産能にのみ依存するのではないと考えられ、EPS の構造的特徴や EPS 画分におけるその他の乳酸菌成分の有無についても検討する必要がある。

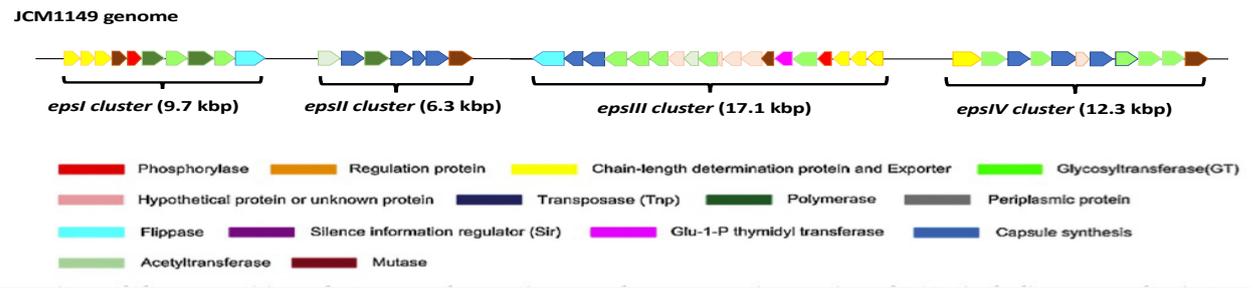


Fig. 2-4-2 *L. plantarum* JCM 1149 (ATCC14917) 株が保持する推定 EPS 合成クラスターの模式図

2-5. 参考文献

1. Zeidan, Ahmad A et al. "Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications." FEMS microbiology reviews. vol. 41, Supp_1 (2017): S168-S200. doi:10.1093/femsre/fux017
2. Caggianiello, Graziano et al. "Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. "Applied microbiology and biotechnology. vol. 100,9 (2016): 3877-86. doi:10.1007/s00253-016-7471-2
3. Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D. "Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products." International Dairy Journal vol. 52 (2016), 57–71.
4. Zhou, Yang et al. "Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review."Carbohydrate polymers vol. 207 (2019): 317-332. doi:10.1016/j.carbpol.2018.11.093
5. Wu, Jiayi et al. "The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria

- exopolysaccharides in vitro: A review.” *Carbohydrate polymers* vol. 253 (2021): 117308. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117308
6. Remus, Daniela M et al. “Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling.” *Microbial cell factories* vol. 11 149. 21 Nov. 2012, doi:10.1186/1475-2859-11-149
 7. van den Nieuwboer, Maurits et al. “*Lactobacillus plantarum* WCFS1 and its host interaction: a dozen years after the genome.” *Microbial biotechnology* vol. 9,4 (2016): 452-65. doi:10.1111/1751-7915.12368
 8. Scarpellini, Emidio et al. “From Pre- and Probiotics to Post-Biotics: A Narrative Review.” *International journal of environmental research and public health*. vol. 19,1 37. 21 Dec. 2021, doi:10.3390/ijerph19010037
 9. Kitazawa, H et al. “Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.” *International journal of food microbiology*. vol. 40,3 (1998): 169-75. doi:10.1016/s0168-1605(98)00030-0
 10. Murofushi, Yo et al. “The toll-like receptor family protein RP105/MD1 complex is involved in the immunoregulatory effect of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* N14. ” *Molecular immunology* vol. 64,1 (2015): 63-75. doi:10.1016/j.molimm.2014.10.027
 11. Mizuno, Hiroya et al. “Exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* ST538 modulate the antiviral innate immune response in porcine intestinal epitheliocytes.” *Frontiers in microbiology*. vol. 11 894. 19 May. 2020, doi:10.3389/fmicb.2020.00894

12. Peetermans, Marijke et al. "Bacterial pathogens activate plasminogen to breach tissue barriers and escape from innate immunity." *Critical reviews in microbiology*. vol. 42,6 (2016): 866-82. doi:10.3109/1040841X.2015.1080214
13. Madureira, Pedro et al. "Inhibition of IL-10 production by maternal antibodies against Group B Streptococcus GAPDH confers immunity to offspring by favoring neutrophil recruitment." *PLoS pathogens*. vol. 7,11 (2011): e1002363. doi:10.1371/journal.ppat.1002363
14. Oliveira, Liliana et al. "Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages." *PloS one* vol. 7,1 (2012): e29963. doi:10.1371/journal.pone.0029963
15. Deng, Zhaoxi et al. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Increases the Adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Host Mucin to Enhance Probiotic Effects." *International journal of molecular sciences* vol. 21,24 9756. 21 Dec. 2020, doi:10.3390/ijms21249756
16. Ishida, Minori et al. "Ribosome-engineered *Lactocaseibacillus rhamnosus* strain GG exhibits cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase accumulation and enhanced adhesion to human colonic mucin." *Applied and environmental microbiology* vol. 86,20 e01448-20. 1 Oct. 2020, doi:10.1128/AEM.01448-20
17. Kinoshita, Hideki et al. "Proposal of screening method for intestinal mucus adhesive lactobacilli using the enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)." *Animal science journal Nihon chikusan Gakkaiho* vol. 84,2 (2013): 150-8. doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01054.x
18. Bai, Yuying et al. "*Lactobacillus johnsonii* enhances the gut barrier integrity via the interaction between GAPDH and the mouse tight junction protein JAM-2." *Food &*

functionvol. 13,21 11021-11033. 31 Oct. 2022, doi:10.1039/d2fo00886f

19. 米田一成ら” 乳酸菌由来菌体表層 GAPDH の A 型血液型抗原結合メカニズムの解明” Milk Science Vol. 70 (2021), No. 2
20. Sun, Xiaoyu et al. “Subcutaneous immunization with *Streptococcus pneumoniae* GAPDH confers effective protection in mice via TLR2 and TLR4.”Molecular immunologyvol. 83 (2017): 1-12. doi:10.1016/j.molimm.2017.01.002
21. Kopeckova, Monika et al. “Diverse localization and protein binding abilities of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in pathogenic bacteria: The key to its multifunctionality ?.”Frontiers in cellular and infection microbiology vol. 10 89. 3 Mar. 2020, doi:10.3389/fcimb.2020.00089
22. Chen, Pei-Chi et al. “Moonlighting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein of *Lactobacillus gasseri* attenuates allergic asthma via immunometabolic change in macrophages.”Journal of Biomedical Science.vol. 29,1 75. 29 Sep. 2022, doi:10.1186/s12929-022-00861-8
23. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 1970, 227, 680.
24. Saad, N et al. “*Lactobacillus plantarum* 299v surface-bound GAPDH: a new insight into enzyme cell walls location.” Journal of microbiology and biotechnology vol. 19,12 (2009): 1635-43. doi:10.4014/jmb.0902.0102

第3章 JCM1149 株由来 GAPDH の免疫調節作用

3-1. 本章の研究背景

第2章において、11種の *L. plantarum* 株の EPS 生産性と各種サイトカイン生産誘導能の比較から高 EPS 生産株に含まれる GAPDH が主要な免疫誘導成分であることが示された。GAPDH は、微生物ではしばしば細胞外への分泌が観察され、特に病原性 *Streptococcus* 属を中心に研究されており、宿主腸管細胞への接着や免疫応答の誘導など様々な機能が報告されるムーンライティングタンパク質 (Moonlighting protein) として知られている¹⁻³。乳酸菌においては、いくつかのプロバイオティクス株に関して菌体外 GAPDH が腸管のムチンへ結合性を示すことが報告されている⁴⁻⁶ものの、免疫調節作用に関する報告は少なく、どのように免疫応答を誘導するか未だ十分に明らかになっていない。一般に経口摂取により消化管に取り込まれた乳酸菌は、腸管上皮細胞や粘膜固有層に存在する種々の抗原提示細胞 (APC: Antigen presenting cell) と相互作用することで免疫応答を惹起するとされる (Fig. 3-1-1)。免疫応答は APC が持つ多様なパターン認識受容体分子 (PRRs : Pattern recognizing receptors) を介したシグナル伝達により誘導されるが、PRRs の中でもトル様受容体 (TLRs : Toll-like receptors) は様々な微生物成分の認識に関与する受容体分子として知られている^{10,11}。

以上から乳酸菌 (および乳酸菌の分泌する GAPDH) の免疫作用を理解するにあたって、生体における最大の免疫器官である腸管免疫系の影響評価が最も重要であり、腸管免疫細胞 (樹状細胞やマクロファージなど) への作用解析が重要と考えた。そこで本章では *L. plantarum* JCM 1149 株由来 GAPDH が樹状化した THP-1 細胞 (THP-1 DCs) においてどのように免疫誘導を引き起こすのかを理解するために、精製 GAPDH を用いて 1) THP-1 細胞上の GAPDH 認識レセプター

の推定、2) GAPDH 刺激後の THP-1 DCs における遺伝子発現における影響を評価した。

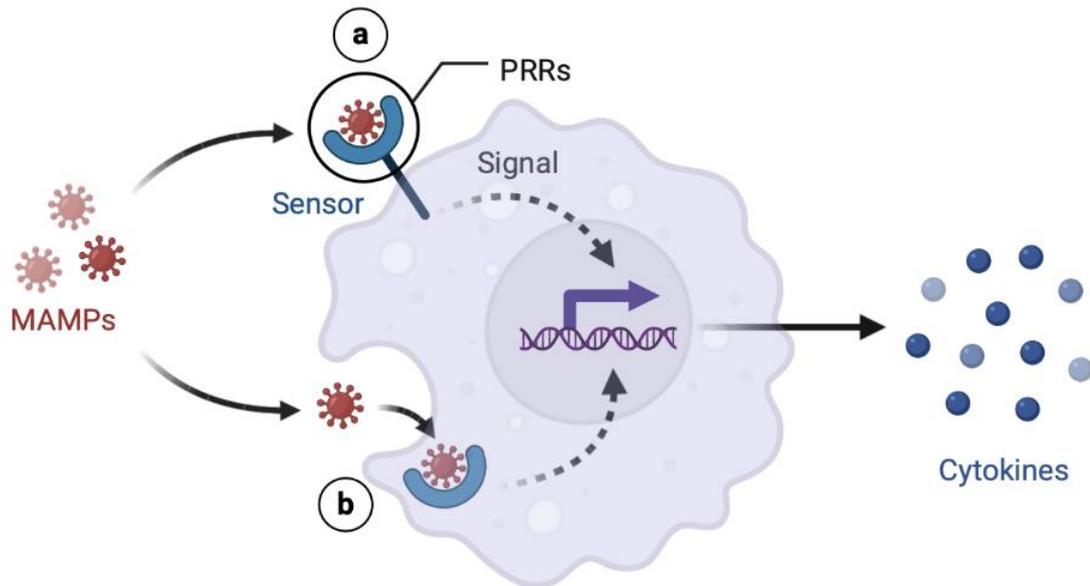


Fig. 3-1-1 樹状細胞による PRRs を介した MAMPs の認識と免疫応答の略図

3-2 実験材料および実験方法

3-2-1. THP-1 DCs における GAPDH 認識レセプターの推測

先行研究において GAPDH の認識レセプターとしての寄与が報告⁸されている TLR2 及び TLR4 について、THP-1 DCs における IL-6 産生および IL-10 産生のレセプターとして寄与するか評価した。2-2-7 項の方法に従って THP-1 細胞を分化させ (THP-1 DCs)、100 ng/ml の IL-4 を含む RPMI1640 培地で刺激し、抗 TLR2 抗体 (Sino Biological Inc., Peking, China) または抗 TLR4 抗体 (Sino Biological Inc., Peking, China) を 1000 倍希釈になるよう添加または無添加 (Positive control) し、37°C、5% CO₂ 環境下で 1 時間インキュベートした。その後、JCM 1149 株由来 GAPDH を 1 µg 添加し 37°C、5% CO₂ 環境下で 24 時間インキュベートした。培養上清を回収し、ELISA キットによって IL-6 量および IL-10 量を測定した。

3-2-2. THP-1 細胞からの RNA 抽出および cDNA 化

2-2-7 項に従って調製した THP-1 DCs を D-PBS(-) (ナカライテスク製) で洗浄後、Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて総 RNA を抽出した。抽出したサンプル中の RNA 濃度は NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて測定した。抽出後の RNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO. Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて速やかに cDNA 化または使用時まで -20°C で保存した。

3-2-3. 使用プライマー

本章で使用したプライマーは全て Integrated DNA Technologies, Inc. (<https://sg.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna/dna-oligos>)にて合成した (Table 3-2-1)。

3-2-4. GAPDH の免疫調節作用の経時的変化評価

2-2-10 項および 2-2-11 項に従って、JCM 1149 株の SLPs より GAPDH を単離した。2-2-7 項に従って THP-1 DCs を調製後、100 ng/ml の IL-4 を含む RPMI1640 培地で刺激し、その後 100 ng の GAPDH または等量の PBS を添加した。37°C、5% CO₂ 環境下で 1、5、20 時間インキュベートし、培養上清中の IL-6 量および IL-10 量を測定した。また 3-2-2 項に従って RNA を回収し、3-2-7 項に従って qPCR を行い IL-6 および IL-10 の相対的な遺伝子発現比率を評価した。

3-2-5. RNA シークエンシングによる遺伝子発現への影響解析

2-2-7 項に従って THP-1 DCs を調整後、100 ng/ml の IL-4 を含む RPMI1640 培地で刺激し、100 ng の GAPDH または PBS を添加し、37°C、5% CO₂ 環境下で 5 時間インキュベートした。3-2-2 項に従って RNA を抽出後、RNA シークエンス用のサンプルは GAPDH 区、PBS 区それぞれ独立した 3 サンプルを均等に配合し、総 RNA 量が 1 μg を超えるように調製し、株式会社 生物技研 (Kanagawa, Japan) にて RNA シークエンシングを行った(各 n=1)。データ解析時、PBS 区に比べて発現が 1.3 倍以上に増加したものを発現上昇、0.77 倍以下に減少したものを発現抑制と定義した。発現の変動した遺伝子は STRING ([https:// string-db.org/](https://string-db.org/)) を用いて関係性をマップ化した。また残りの RNA は 3-2-2 項に従って cDNA へ逆転写し、3-2-7 項に従って qPCR による遺伝子発現解析を行った。

3-2-6. qPCR 法

THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO. Co., Ltd., Osaka, Japan) のプロトコールに従って 10 ng の cDNA および最終濃度 0.6 pM のプライマーを用いて測定サンプルを調製し、StepOne™リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific 製) を使用して qPCR を行った。得られたデータは比較 Ct 法によって解析し、 β -actin をハウスキーピング遺伝子として相対発現比率を算出した。

3-2-7. 統計解析

特に記述がない限り総ての定量的実験は 3 回試行し、グラフには各要素の平均値と標準偏差を示した。また GraphPad Prism software package version 9.1.を用いて One-way ANOVA もしくは Two-way ANOVA 法によって統計解析し、 $P < 0.05$ の場合を統計的に有意であると判定した。

Table 3-2-1 本章の qPCR で使用したプライマー

Primer name	sequence (5'→3')	nt length	product size
Human_actin beta_F	TGGCACCCAGCACAATGAA	19	186
Human_actin beta_R	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	25	
Human_TLR2_F	GGCGTTCTCTCAGGTGACTG	20	119
Human_TLR2_R	TGTCTTCCTGCCTTCACTTGG	21	
Human_TLR4_F	TCCTGCGTGAGACCAGAAAG	20	125
Human_TLR4_R	AATGGAATCGGGGTGAAGGG	20	
Human_MAPK1_F	TCCCCAGTTCTTGACCCCTG	20	100
Human_MAPK1_R	GCCACAACACTACCAGAAACCG	20	
Human_JUN_F	GTGCCGAAAAAGGAAGCTGG	20	175
Human_JUN_R	CTGCGTTAGCATGAGTTGGC	20	
Human_STAT3_F	CTGGCCCCCTGGATTGAGAG	20	216
Human_STAT3_R	CACAATCCGGGCAATCTCCA	20	
Human_STAT5A_F	AATGAACAGAGGCTGGTCCG	20	201
Human_STAT5A_R	CCTCAGGCTCTCCTGGTACT	20	
Human_IL1B_F	CTCTGGGATTCTCTTCAGCCA	21	227
Human_IL1B_R	TTGCTGTAGTGGTGGTCCG	19	
Human_IL-6_F	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	23	149
Human_IL-6_R	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	23	
Human_IL-10_F	CTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTC	24	121
Human_IL-10_R	GGATCATCTCAGACAAGGCTTGGC	24	
Human_TNFAIP3_F	GCCGCCAAGAGAGATCACA	19	149
Human_TNFAIP3_R	TTCGCAAAGTCCCAAGTCCT	20	
Human_NFKBIA_F	AAGTGATCCGCCAGGTGAAG	20	188
Human_NFKBIA_R	CTGCTCACAGGCAAGGTGTA	20	
Human_NFKB1_F	ACCCGGCTTCAGAATGGC	18	209
Human_NFKB1_R	GGGATGGGCCTTCACATACA	20	
Human_CD40_F	ACTGATGTTGTCTGTGGTCCC	21	118
Human_CD40_R	TCTTGGCCACCTTTTTGATAAAGAC	25	
Human_CXCL1_F	TTGTGAAGGCAGGGGAATGT	20	231
Human_CXCL1_R	AAGCCCCTTTGTTCTAAGCCA	21	

3-3. 結果

3-3-1. GAPDH の免疫調節作用における抗 TLR 抗体の影響

第二章において *L. plantarum* JCM 1149 株由来 GAPDH は THP-1 DCs において、主に IL-6 および IL-10 生産を誘導することが明らかとなった。*Streptococcus pneumoniae* 由来の GAPDH は TLR2 や TLR4 を介して IL-6 産生を誘導することが報告されている⁸。そこで本研究においても、TLR2 および TLR4 を GAPDH の認識レセプターと仮定し、抗 TLR2 抗体および抗 TLR4 抗体を用いて各レセプターをクエンチングしたとき GAPDH の免疫調節作用はどのように変化するか確かめた。

その結果 IL-6 産生では、抗体未添加のコントロール (Positive control) と比較して、抗 TLR4 抗体添加時には約 83% に抑制傾向、抗 TLR2 抗体供与時では有意な産生抑制が確認され、74% に低下した (Fig. 3-3-1 A)。一方で IL-10 産生に関しては抗 TLR2 抗体、抗 TLR4 抗体ともに生産抑制は観察されなかった (Fig 3-3-1 B)。

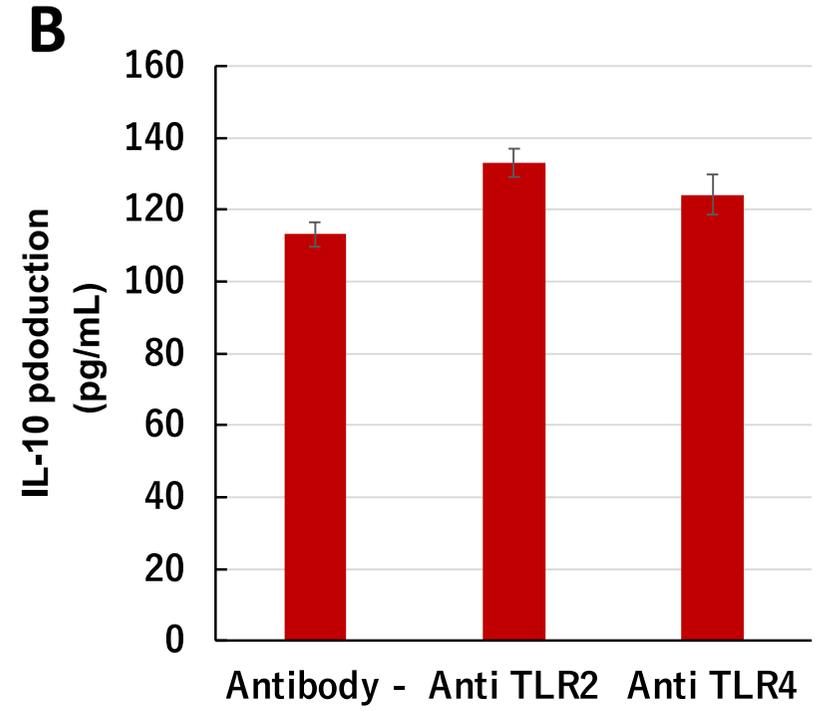
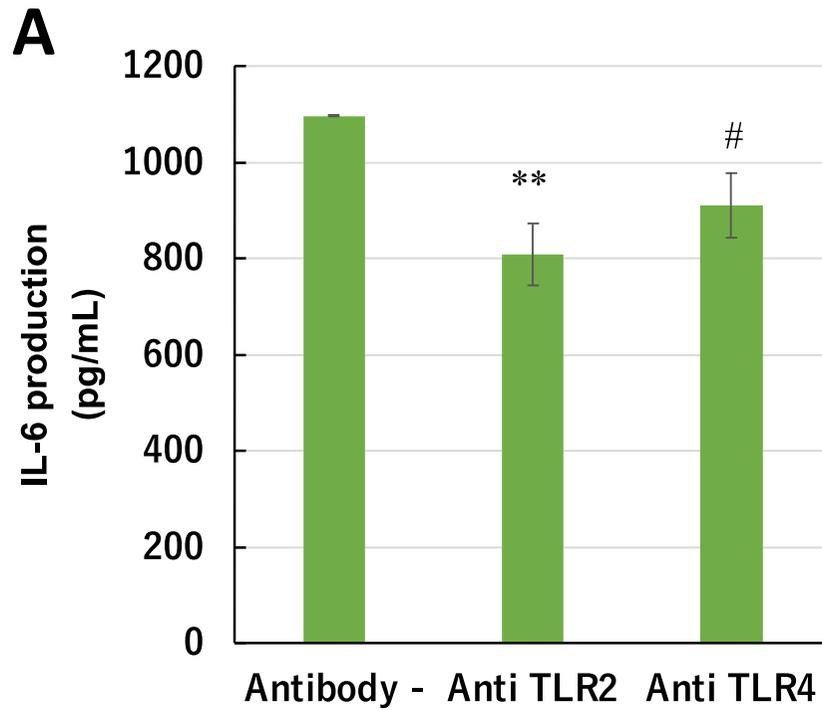


Fig. 3-3-1 抗 TLR2 抗体または抗 TLR4 抗体による GAPDH の免疫調節作用への影響

A) IL-6、B) IL-10、# $p < 0.1$, ** $p < 0.01$ vs Antibody -

3-3-2. GAPDH の免疫調節作用の経時変化

JCM 1149 株由来 GAPDH が THP-1 細胞に十分な免疫応答を引き起こすにはどのくらいの時間が必要か調べるため、GAPDH を与えてから経時的に培養上清および RNA をサンプリングし、その変化を観察した。その結果、培養上清中に分泌される IL-6 量および IL-10 量は 1 時間から 5 時間にかけて大きく増加するものの、5 時間から 20 時間にかけてはほとんど変化が見られなかった (Fig. 3-3-2 A、B)。このとき RNA の発現量を調べてみると、IL-6 は 1 時間のインキュベートではほとんど発現が見られないが、1 時間から 5 時間にかけて約 35 倍に発現量が上昇し、その後 20 時間にかけては約 30% に低下していた (Fig. 3-3-3 A)。一方で IL-10 の発現の推移は IL-6 と異なる傾向が観察され、インキュベート後 1 時間でピークを迎え、その後は減少するのみであった (Fig. 3-3-3 B)。

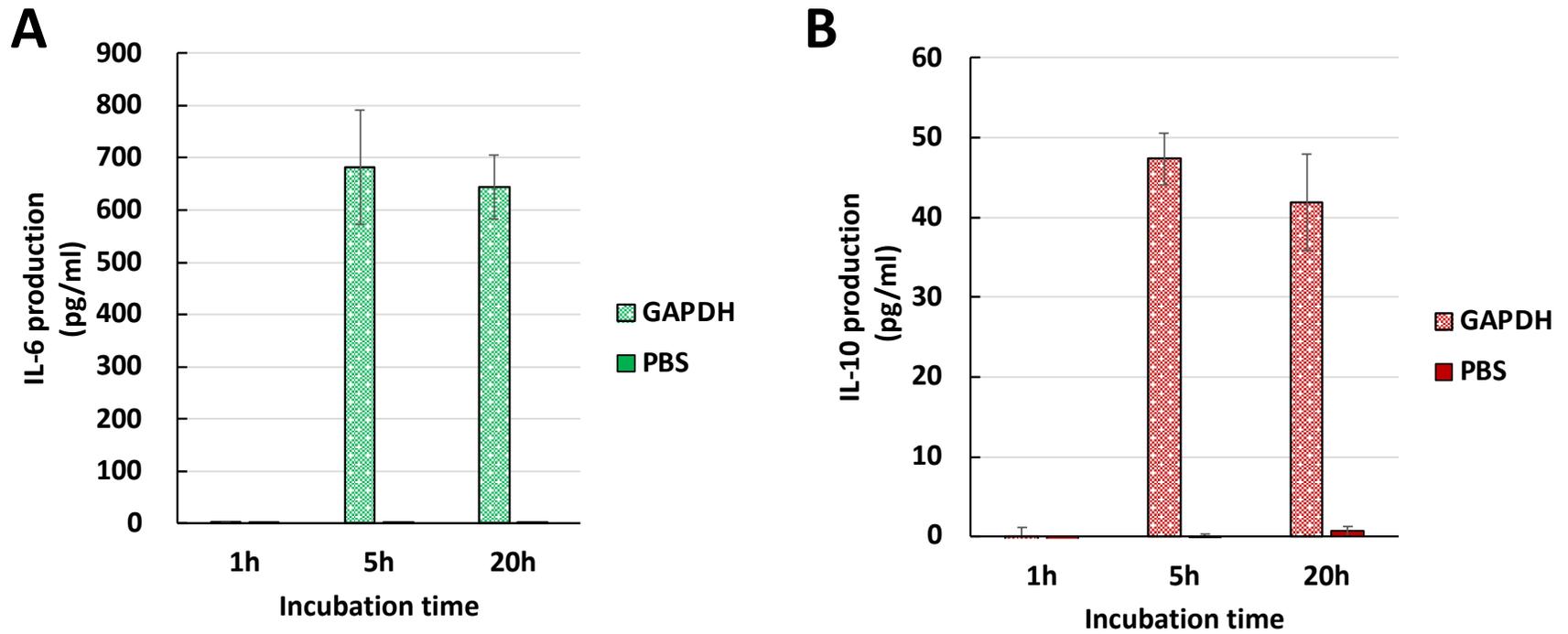


Fig. 3-3-2 *L. planatarum* JCM 1149 株由来 GAPDH が誘導するサイトカイン量の経時変化

(A) IL-6、(B) IL-10

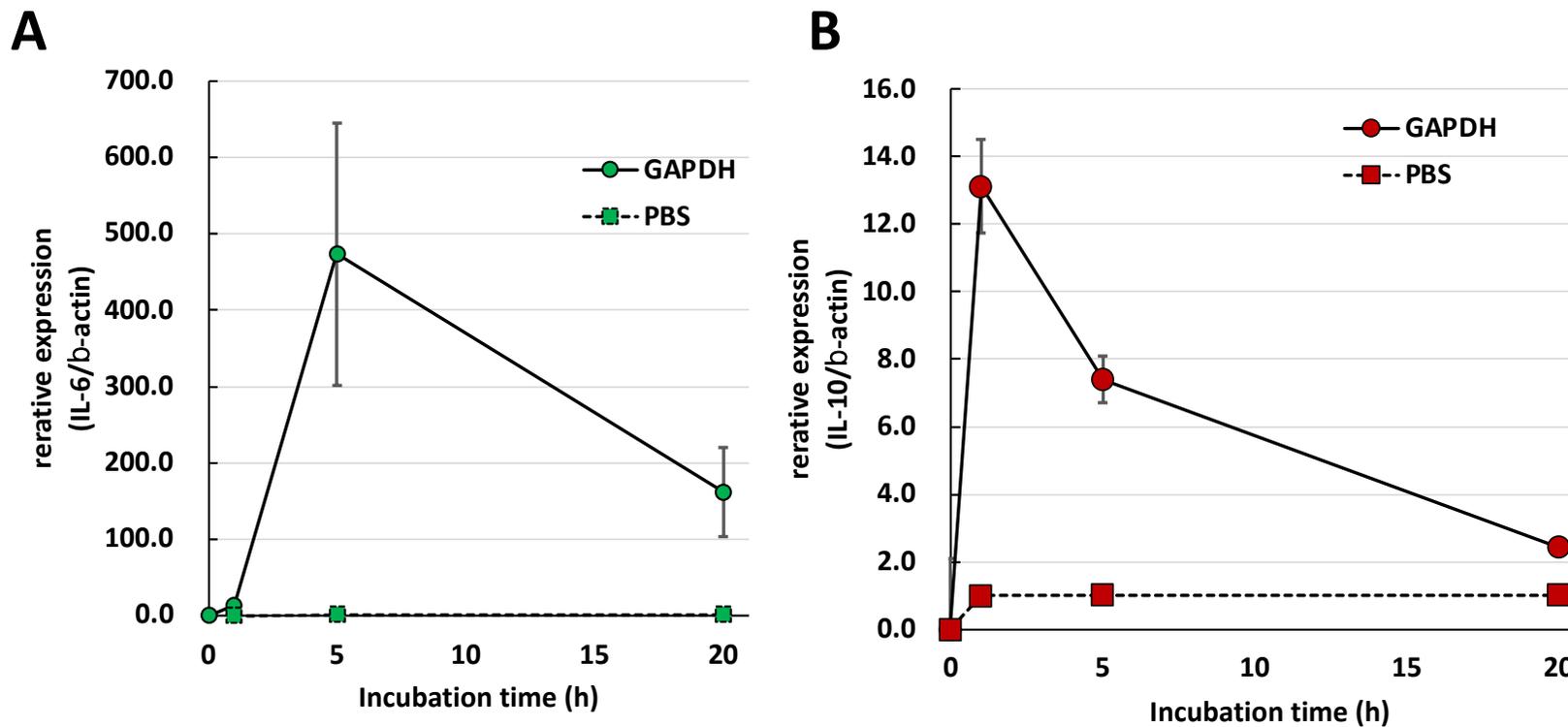


Fig. 3-3-3 JCM1149 株由来 GAPDH による遺伝子発現の経時変化

(A):IL-6、(B):IL-10

3-3-3. GAPDH によって発現量の変化した遺伝子群

JCM 1149 株由来 GAPDH は THP-1 に供与してから 5 時間のインキュベーターで IL-6 および IL-10 の RNA の発現量を増加させ、これらのサイトカインを培養上清中に分泌させることが明らかとなった。そこで、GAPDH によってどのような遺伝子が発現変動し、サイトカインの分泌に至っているのか調べるため RNA シークエンシングを試みた。その結果、発現上昇した遺伝子は 315 種類確認され、免疫応答や細胞表層レセプターのシグナリング、転写制御因子などに関わる遺伝子が多く見られた (Supplementary Table 1)。一方で発現抑制した遺伝子は 789 種類確認され、細胞分裂や DNA のダメージ応答に関与する遺伝子などが見られた (Supplementary Table 2)。さらにネットワーク解析によって主な発現変動遺伝子の関係性をマップ化すると、転写調節因子である NFkB1、NFkB2、REL、JUNB、MAP3K8、TRAF1、STAT5A、レセプター分子である TLR1、TLR2、TLR4、CD40、CD44、シグナル伝達に関与する IRAK、サイトカインやケモカインとして知られる TNFAIP2、TNFAIP3、IL1B、CXCL1、CCL4 細胞の構成タンパク質である ITGA2 免疫、ITGA4、ICAM、VCAM など、免疫応答に関連した遺伝子を中心として幅広く多様な遺伝子の発現が変動していることが明らかとなった (Fig 3-3-4)。さらに RNA シークエンスによって変動していた遺伝子の中で、免疫応答のポイントとなる遺伝子を対象に qPCR で定量したところ、IL10、IL1B、CXCL1 のようなサイトカイン (ケモカイン) や細胞表層に発現するレセプター的一种である CD40 で有意な発現上昇を確認したほか、転写制御因子的一种である NFkBIA で上昇傾向であることを確認した (Fig. 3-3-5)

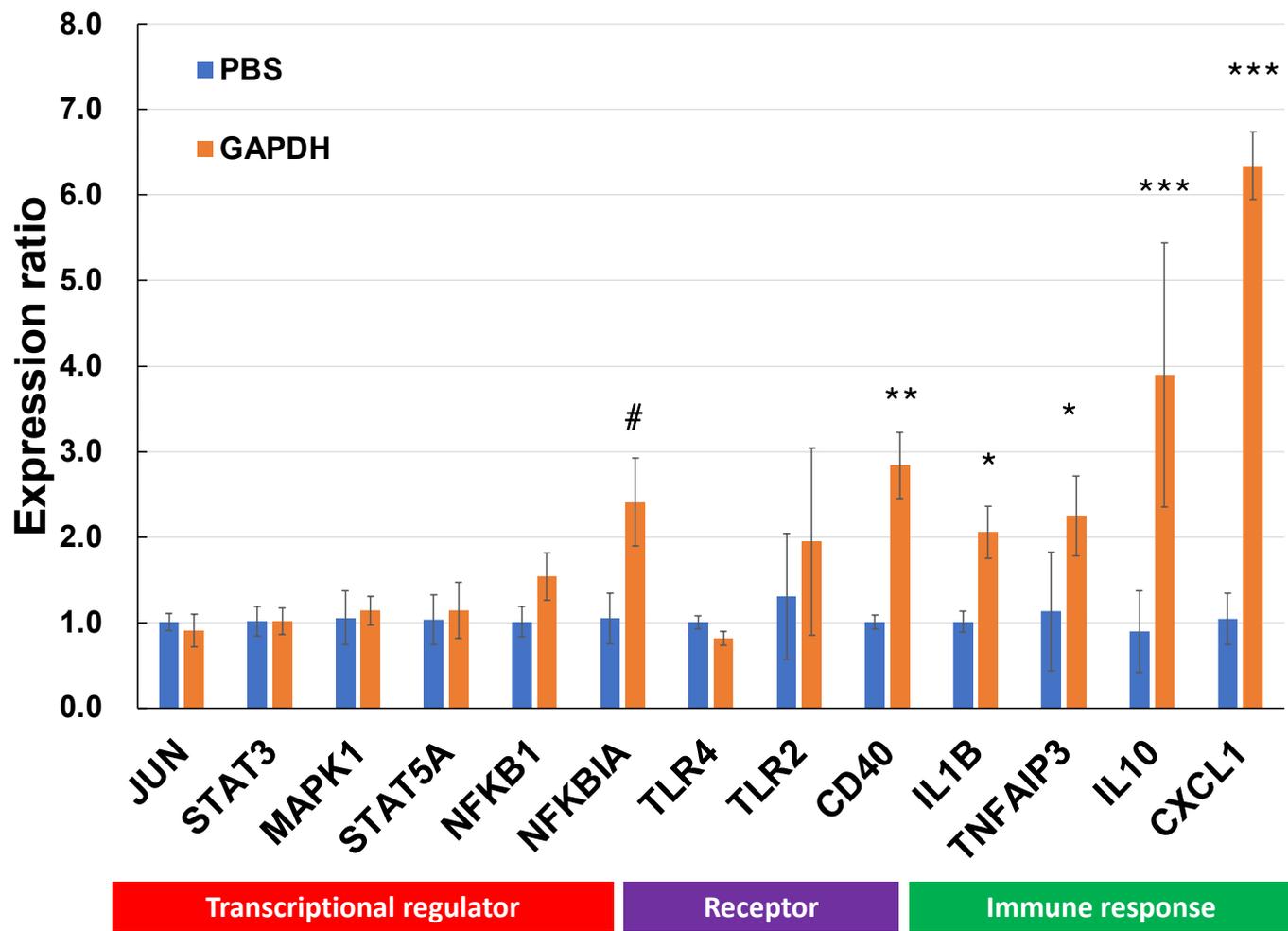


Fig. 3-3-5 RT-qPCR による GAPDH 刺激時の遺伝子発現解析

3-4. 考察

GAPDH の免疫調節作用については病原性 *Streptococcus* 属で報告^{7,8}されているものの、乳酸菌種においてはほとんど報告されていなかった。そこで本章では、GAPDH が免疫調節活性の主要因子であることが示唆された *L. plantarum* JCM 1149 株から GAPDH を分離し、免疫細胞モデル THP-1 DCs において GAPDH がどのように免疫応答を誘導するか確かめた。

THP-1 細胞は PMA によって樹状細胞様に分化するとマクロファージと類似したレセプターが細胞表層に発現することが報告されている⁹。またマクロファージは自然免疫系において様々な PRRs を発現させ、それぞれ特徴的な微生物またはウイルス分子の認識に寄与する¹⁰。PRRs の中でも TLRs は様々な微生物成分の認識に関与する受容体分子で、哺乳類では 13 種類、ヒトでは TLR1 から TLR9 まで 9 つの機能的な TLR 分子が多様な細胞で発現していることが報告されている^{10,11}。過去に本研究と同様に抗 TLR2 抗体および抗 TLR4 抗体を用いた研究によって、*Streptococcus pneumoniae* 由来 GAPDH は TLR2 および TLR4 を介して TNF- α および IL-6 産生を誘導することが示されており、さらにその影響は TLR2 に比べて TLR4 の方が強いことが報告されている⁸。本研究においても同様に、JCM 1149 株由来 GAPDH の IL-6 誘導活性は抗 TLR2 抗体および抗 TLR4 抗体によって抑制されることが示されたことから、TLR2 および TLR4 は GAPDH の認識レセプターとして機能していることが示唆された。マクロファージや樹状細胞は生体内において TLR2 や TLR4 を介して損傷細胞から流出したタンパク質を認識することが知られている¹⁰ ことから、生物種間で保存性の高い GAPDH についても同様にこれらのレセプターを介して作用したと考えられる。一方、本研究では抗 TLR 抗体添加により、IL-6 の有意な抑制がみられたものの、抗体添

加による抑制程度が比較的低かったことから、GAPDH と抗体の事前インキュベートや抗体と GAPDH の比率を変えるなどにより、より明確な TLR への作用実証が必要と考える。

一方で、驚くべきことに、抗 TLR2 抗体および抗 TLR4 抗体の添加は GAPDH の IL-10 誘導活性に影響しなかった。GAPDH の免疫調節活性の経時変化においてもこれらのサイトカインは異なる傾向を示し、IL-6 はインキュベート 5 時間後にピークに達した一方で、IL-10 の RNA 発現はインキュベート後 1 時間であった。以上のことから、IL-6 および IL-10 は THP-1 DCs において異なる複数種のレセプターを介して免疫応答を誘導する可能性が示唆される。本研究では TLR を対象として GAPDH の認識レセプターとして機能するか検討したが、自然免疫系に関与する PRRs には他にも C 型レクチン受容体や細胞質内に発現する NOD 様受容体、RIG 様受容体など 100 種類近くの受容体が知られて¹⁰おり、IL-10 の産生誘導にはこのような受容体の関与が予想される。

Fig. 3-3-2 より GAPDH 添加 5 時間後に、IL-6、IL-10 のどちらも遺伝子発現が上昇していたことに着目し、GAPDH 添加 5 時間後の THP-1 DC から RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行った結果、GAPDH は THP-1 DCs において転写調節因子、免疫調節、細胞応答、細胞の構成タンパク質など多様な遺伝子発現を変動させることが明らかとなった。またいくつかの免疫応答関連遺伝子を対象とした qPCR により、サイトカイン(ケモカイン)である IL1B、IL10、CXCL1、TNFAIP3 で著しい発現上昇を確認した。さらに GAPDH は TLR2 や TLR4 を介して認識されることが示されたことから、これらをまとめると、JCM 1149 株由来 GAPDH に対して Fig. 3-4-1 のような免疫応答を誘導している可能性が示唆された。つまり、GAPDH は TLR2 に結合することで、TRAF の活性化を経て、RelB、FOS、NF- κ B などの転写因子を活性化させ、核内において、炎症性サイトカイン

である TNF α 、IL-1、IL-6 のほかケモカインである CXCL8 の産生など炎症反応に関連する遺伝子群を誘導すると考えられる¹⁰。一方で、興味深いことに、THP-1 DC は GAPDH 刺激に対して炎症性サイトカインとともに抗炎症サイトカインである IL-10 産生も誘導した。炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインが同時に発現される応答は一見矛盾しているように思われるが、免疫寛容を誘導する寛容型樹状細胞では様々な微生物分子に対して TLR2 を介したシグナル伝達によりこれらのサイトカインが同時に誘導されることが報告されている¹²。

その他に遺伝子発現上昇の見られた CD40、CD44、CD83 は抗原提示に寄与するとされ、特に CD40 は CD4 陽性 T 細胞やナイーブ T 細胞の持つ CD40 リガンド (CD154) と相互作用することで抗原提示に働くことで知られており、タンパク質抗原に対する T 細胞応答を誘導し、貪食作用を増強させる¹⁰。このことから本研究で扱った *L. plantarum* JCM 1149 株をはじめ菌体表層に GAPDH を高発現させる乳酸菌種は生体内において、上述の様に自然免疫系で免疫調節作用を惹起するだけでなく獲得免疫系の誘導を促進することで、GAPDH 非発現株と比べて強い免疫調節作用を示す可能性がある。

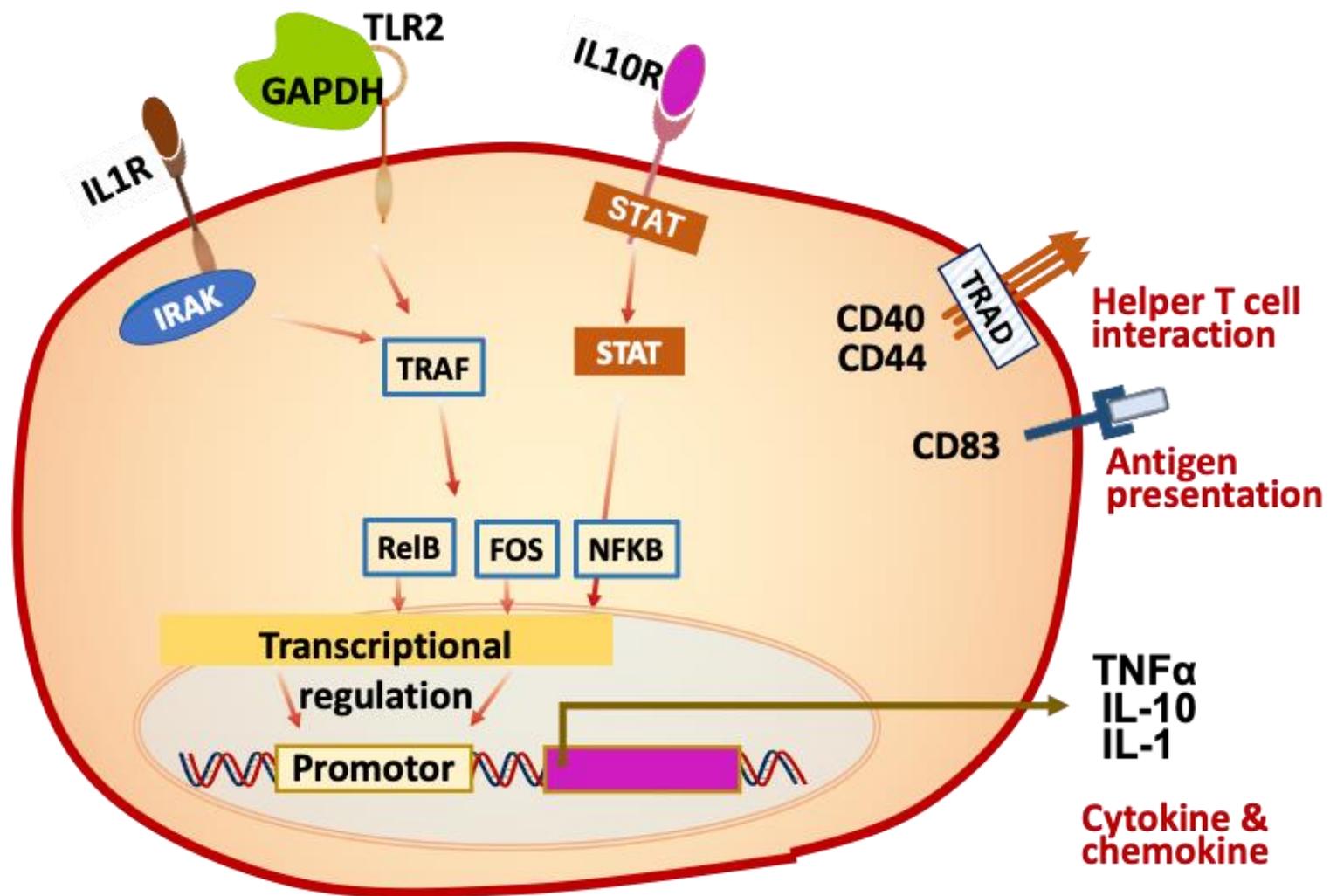


Fig. 3-4-1 本研究から推測された GAPDH に対する THP-1 DCs の免疫応答の略図

3-5. 参考文献

1. Peetermans, Marijke et al. "Bacterial pathogens activate plasminogen to breach tissue barriers and escape from innate immunity." *Critical reviews in microbiology* vol. 42,6 (2016): 866-82. doi:10.3109/1040841X.2015.1080214
2. Oliveira, Liliana et al. "Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages." *PloS one* vol. 7,1 (2012): e29963. doi:10.1371/journal.pone.0029963
3. Kopeckova, Monika et al. "Diverse localization and protein binding abilities of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in pathogenic bacteria: The key to its multifunctionality?." *Frontiers in cellular and infection microbiology* vol. 10 89. 3 Mar. 2020, doi:10.3389/fcimb.2020.00089
4. Deng, Zhaoxi et al. "Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase increases the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to host mucin to enhance probiotic effects." *International journal of molecular sciences* vol. 21,24 9756. 21 Dec. 2020, doi:10.3390/ijms21249756
5. Ishida, Minori et al. "Ribosome-engineered *Lactocaseibacillus rhamnosus* strain GG exhibits cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase accumulation and enhanced adhesion to human colonic mucin." *Applied and environmental microbiology* vol. 86,20 e01448-20. 1 Oct. 2020, doi:10.1128/AEM.01448-20
6. Kinoshita, Hideki et al. "Proposal of screening method for intestinal mucus adhesive lactobacilli using the enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)." *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* vol. 84,2 (2013): 150-8. doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01054.x
7. Madureira, Pedro et al. "Inhibition of IL-10 production by maternal antibodies against Group

- B Streptococcus GAPDH confers immunity to offspring by favoring neutrophil recruitment.” PLoS pathogens vol. 7,11 (2011): e1002363.
doi:10.1371/journal.ppat.1002363
8. Sun, Xiaoyu et al. “Subcutaneous immunization with *Streptococcus pneumoniae* GAPDH confers effective protection in mice via TLR2 and TLR4.” Molecular immunology vol. 83 (2017): 1-12. doi:10.1016/j.molimm.2017.01.002
 9. Chanput, Wasaporn et al. “THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach.” International immunopharmacology vol. 23,1 (2014): 37-45.
doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002
 10. Abul K. Abbas, et al. ”アバス-リックマン-ピレ 分子細胞免疫学 原著第9版”, エルゼビア・ジャパン, 2018
 11. 植松智ら, ”Toll-like receptor と自然免疫”, 生化学 第79巻 第8号 (2007)
 12. Schülke, Stefan. “Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses.” Frontiers in immunology vol. 9 455. 19 Mar. 2018, doi:10.3389/fimmu.2018.00455

第 4 章 GAPDH 分泌と EPS 生産の関係

4-1. 本章の研究目的

第 2 章、第 3 章を通して、11 種の *L. plantarum* の中で最も免疫調節活性の高い JCM 1149 株において、GAPDH が主要な免疫調節因子であること、そして THP-1 DCs における GAPDH の免疫調節作用を明らかにしてきた。さらに 2-3-8 項にて *L. plantarum* の免疫調節活性は EPS 生産能ではなく共存する GAPDH の量に依存することを明らかにしたが、一方で GAPDH が EPS 画分から検出された背景は明らかではない。

筆者は JCM 1149 株の主要免疫調節活性因子である GAPDH の菌体外の分泌が EPS 合成に関連していると仮説した。このことを確かめるために、本章では、EPS 高生産株である *L. plantarum* JCM 1149 株について、1) 生育ステージと EPS 生産と GAPDH 分泌の関係、2) 薬剤による EPS 合成阻害がと GAPDH 分泌に関して評価した。さらに本章では、EPS 生産性プロバイオティクス株である *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 株¹⁴ について、先行研究にて作出された EPS 合成遺伝子群欠損株 $\Delta epsIE$ および $\Delta epsIF$ 株 (Supplementarl figure 1、2⁵⁻⁷) を用いて、遺伝子変異による EPS 生産への影響が免疫調節作用、さらには GAPDH 分泌性に関係するか評価した。

4-2. 実験材料および実験方法

4-2-1. 使用菌株

本章では EPS 高生産で免疫調節活性の高い *L. plantarum* JCM 1149、および EPS に免疫調節作用が報告されており先行研究で *eps* 遺伝子欠損株が作出されている *L. bulgaricus* OLL1073R-1 株を研究対象とした。*L. bulgaricus* OLL1073 R-1 株および同菌株の $\Delta epsIE$ ⁵、 $\Delta epsIF$ ⁶ 株は明治大学農学部農芸化学科 佐々木 泰子 博士より提供を受けた (Table 4-2-1)。

4-2-2. *L. plantarum* JCM 1149 の生育に伴う EPS 生産および GAPDH 分泌傾向

MRS-F 培地で 20 時間培養した *L. plantarum* JCM 1149 株の前培養菌液を、MRS-F 培地 40 ml へ 2% (V/V) 播種した。30°C でインキュベートし、培養 0、4、8、12、24 時間後にサンプリングを行った。培養液 100 μ l を 96 穴マイクロプレートへサンプリングし、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc. 製) を用いて 595 nm の吸光波長を測定した。また培養液を、滅菌した 1 x PBS で段階的に希釈後、MRS agar を用いて 100 mm ディッシュに混釈を行い、30°C で 24 時間培養後のコロニー数から生菌数(CFU/ml)を算出した。遠心分離 [5,000 x g、10 分間、4°C] によって培養上清を 500 μ l 回収し、2-2-4 項に従って EPS 画分を抽出後 2-2-5 項に従って EPS 濃度を測定した。OD₅₉₅ = 2.0 に培養液を調製後、遠心分離 [5,000 x g、10 分間、4°C] によって菌体を回収し、2-2-10 項に従って 0.5 M の LiCl 溶液で SLPs 画分を回収した。SLPs 画分中のタンパク質濃度は 2-2-6 項に従って測定した。またウェスタンブロッティングは 2-2-13 項に従って行った。

4-2-3. EPS 合成阻害による EPS および GAPDH 分泌への影響

MRS-F 培地にて *L. plantarum* JCM 1149 株の前培養を行った。遠心分離 [5,000 x g、10 分間、4°C] によって上清を除去後、1 x PBS で菌体を洗浄した。MRS-F 培地に菌体懸濁液を 10% (V/V) 播種した。2-(4-methoxyphenyl)ethylamine (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を 0.15% (V/V) 添加 (Inhibitor +) または無添加 (Inhibitor -) し、30°C で 1.5 時間インキュベートした。その後、培養液 100 µl を 96 穴マイクロプレートへサンプリングし、マイクロプレートリーダー (Rad Laboratories, Inc. 製) を用いて 595 nm の吸光波長を測定し生育を評価した。EPS 画分は培養上清を回収し 2-2-4 項に従って抽出し、2-2-5 項に従って評価した。SLPs は 2-2-10 項に従って 0.5 M の LiCl 溶液で回収し、2-2-11 項に従って SDS-12.5% PAGE によって分離・分析した。また LiCl 処理後の菌体を 0.2 x PBS で洗浄・懸濁後、超音波ホモジェナイザー (Nikkyo Technos, Co., Ltd; HOM-100) を用いて氷上で 30 秒間超音波処理した。遠心分離 [5,000 x g、10 分間、4°C] によって上清を回収し、これを CPS 画分として EPS と同様に 2-2-5 項に従って定量した。各測定項目における glycosylation inhibitor の影響は Inhibitor - 区を 100% として相対的に評価した。

4-2-4. *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 株及びその欠損株の免疫調節活性評価

L. bulgaricus OLL1073 R-1 野生株 (WT)、 $\Delta epsIE$ 、 $\Delta epsIF$ 株のスキムミルク培養液は明治大学発酵食品学研究室より提供を受けた。培養液 10 ml に対して 1 ml の 100 (w/v) % TCA を混合し 4°C で 10 分間静置した。遠心分離 [12,000 x g、20 分間、4°C] によって上清を回収し 3.0 倍量の 100% 冷エタノールと混合後 4°C で 24 時間静置した。遠心分離 [12,000 x g、20 分間、4°C] によって沈殿を回収し、70% 冷エタノールによって沈殿を洗浄後、デシケーター中で乾燥させた。沈殿は 1 ml の MilliQ 水に溶解し、EPS 画分とした。免疫調節活性は 2-2-7 項に

従って分化させた THP-1 を 1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS で刺激後、20 μl の EPS 画分を添加し 37°C、5% CO₂ 環境下で 24 時間インキュベートした。培養上清を回収し、上清中に含まれる IL-6、IL-10、IL-12 p40 量を ELISA キットによって測定した。MRS-F 培地における培養液は、前培養液を 1%(V/V)播種後、37°C、24 時間のインキュベートによって調製した。培養上清画分は遠心分離 [5,000 x g、10 分間、4°C] によって培養上清を回収、Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット (10K) および 0.2 x PBS buffer を用いてサンプルのバッファー交換を行いながら 20 倍に濃縮し調製した。調製後のサンプルは 2-2-11 項に従って SDS-12.5% PAGE にて分離・観察および 2-2-13 項に従ってウェスタンブロッティングを行い GAPDH を検出した。

4-2-5. JCM 1149 株由来 EPS に対する Cy³GAPDH 親和性の確認

2-2-4 項に従って調製した *L. plantarum* JCM 1149 株由来 EPS 画分に終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ の RNase (NIPPON GENE. Co., Ltd, Tokyo, Japan) および 12 U の DNase (NIPPON GENE. Co., Ltd, Tokyo, Japan) を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。続けて Proteinase K (Merck & Co., Inc., USA)を 0.2 U 相当量添加し 55°C で 30 時間インキュベートした。その後、サンプルを Visking Tubing (As One. Co., Ltd, Osaka, Japan) へ移し、蒸留水で透析した。これを純化した *L. plantarum* JCM1149 株由来 EPS とした。純化した EPS を 10 $\mu\text{g/ml}$ になるように MilliQ 水で調製し、100 μl を免疫プレート (ThermoFisher 製) へ添加後、各ウェルへグルタルアルデヒドを終濃度 4%になるよう添加した。4°C で 24 時間静置後、PBS-T でウェルを洗浄し 1% BSA-PBS で 1 時間ブロッキングした。3 M-KSCN 溶液でウェルを洗浄後、100 ng の Cy³GAPDH を添加し 4°C で 24 時間静置した。上清を除去し PBS-T でウェルを 1 回洗浄後、100 μl の 1 x PBS を各ウェルへ添加し、

プレートリーダー (Varioskan LUX SkanIt Software 4.0; Thermo Fisher Scientific) で蛍光 (励起波長: 550 nm, 蛍光波長: 498 nm) を測定した。

4-2-6. JCM 1149 株由来 EPS と GAPDH の相互作用

4-2-8 項に従って純化した *L. plantarum* JCM 1149 株由来 EPS を、2-2-8 項に従ってゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、各フラクションの EPS 量を 2-2-5 項に従って測定した。2-2-10 項に従って 0.5 M の LiCl 溶液で回収した SLPs 画分を Cy3-labeling kit (Amersham CyTM3 Mono-Reactive Dye Pack, GE Healthcare. Co., USA) を用いて蛍光標識した。2-2-8 項に従ってゲル濾過クロマトグラフィーで分画後、各フラクションの蛍光 (励起波長: 550 nm, 蛍光波長: 498 nm) をプレートリーダー (Varioskan LUX SkanIt Software 4.0; Thermo Fisher Scientific 製) で測定した。上述の通り純化した 1 µg の EPS および 1 µg の Cy³GAPDH を混合し、常温で 30 分間静置した。その後、2-2-8 項に従ってゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、各フラクションの EPS 量および蛍光強度を測定した。全ての測定は 1 度のみ行った。

4-2-7. 統計解析

特に記述がない限り総ての定量的実験は 3 回試行し、グラフには各要素の平均値と標準偏差を示した。また GraphPad Prism software package version 9.1.を用いて One-way ANOVA もしくは Two-way ANOVA 法によって統計解析し、 $P < 0.05$ の場合を統計的に有意であると判定した。

Table 4-2-1 本章で使用した *L. bulgaricus* OLL1073R-1 株および *eps* 遺伝子変異株の特徴

Species	Strain	Feature	Source
<i>L. bulgaricus</i>	OLL1073 R-1 (WT)	A probiotic strain known of immunomodulatory effects of EPS. WT can produce two types of EPS; High molecular weight EPS (H-EPS) and low molecular weight EPS (L-EPS)	Meiji univ.
	OLL1073 R-1 $\Delta epsIE$ ($\Delta epsIE$)	A derivative of OLL1073 R-1 which completely lose H-EPS productivity	Meiji univ.
	OLL1073 R-1 $\Delta epsIF$ ($\Delta epsIF$)	A derivative of OLL1073 R-1 which can produce half amount of H-EPS comparing with WT	Meiji univ.

4-3. 結果

4-3-1. JCM 1149 株の生育に伴う EPS 生産および GAPDH 分泌

GAPDH 分泌は *L. plantarum* JCM 1149 株の生育と EPS 生産および GAPDH 分泌がどのように関連するか確かめるため、MRS-F 培養時の生育曲線を調べた。その結果、OD₅₉₅ 値および生菌数ともに培養 4-8 時間後にかけて著しい増加が観察されたが、その後は、OD₅₉₅ 値は緩やかに増加したものの生菌数はほとんど変化しなかった (Fig. 4-3-1 A)。培養上清中の EPS 量について、培養 12 時間後までは僅かしか増加が確認されなかったが培養 24 時間後では培養 12 時間後と比べて約 2 倍に増加していた。また各培養時間において OD₅₉₅ = 2.0 に菌体濃度を揃えて SLPs 画分を抽出しタンパク質量を測定したところ、培養 4、8、12 時間後までは約 12-18 µg/ml と大きな変化は見られなかったが、培養 24 時間後では約 207 µg/ml と培養 12 時間後に比べて 10 倍以上の増加を示した (Fig. 4-3-1 B)。次に各 SLPs 画分を SDS-12.5%PAGE に供したところ、培養 4 時間、8 時間画分ではタンパク質のバンドは観察されなかったが、培養 12 時間後では約 41 kDa と約 50 kDa の位置に薄いバンドが観察され、培養 24 時間後では GAPDH に相当する約 41 kDa の明瞭なバンドが観察された (Fig. 4-3-1 C)。さらに同サンプルについてウェスタンブロッティングにより GAPDH の検出を試みたところ、約 41 kDa のバンドは GAPDH であることが確認され、そのバンドは培養 24 時間に増加していた (Fig. 4-3-1 D)。

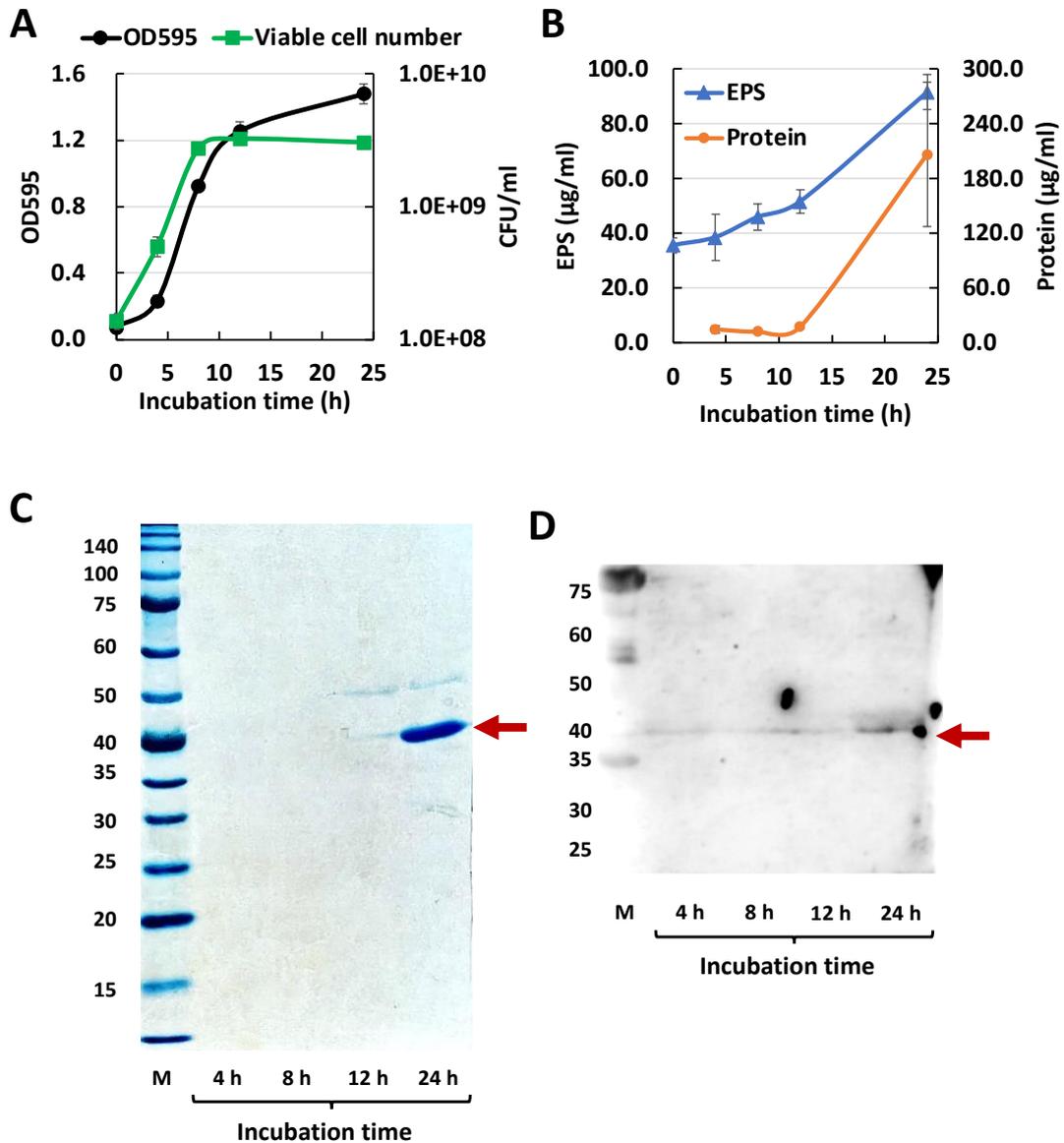


Fig. 4-3-1 *L. plantarum* JCM 1149 株の生育曲線(A)、培養上清中の EPS 濃度および SLPs 画分中のタンパク質濃度の推移(B)、SLPs 画分の SDS-12.5%PAGE (C)、ウェスタンブロッティングによる SLPs 画分中の GAPDH の検出 (D)

4-3-2. *L. plantarum* JCM 1149 における EPS 合成阻害の影響

前項において、*L. plantarum* JCM 1149 株の生育に伴う GAPDH 分泌と EPS 生産には相関性がみられたため、EPS 合成における Glycosylation inhibitor である化合物、2-(4-methoxyphenyl)-N-(3-{[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]imino}-1,4-dihydro-2-quinoxalinylidene) ethanamine⁸ と部分的に同様の構造を持つ 2-(4-methoxyphenyl) ethylamine を用いて、EPS 合成や CPS 合成を抑制し、GAPDH 分泌に対するを確認した。

その結果、Glycosylation inhibitor 添加区の SLPs 画分は未添加区に比べてタンパク質の分泌が全体的に少なく、GAPDH と考えられる約 41 kDa のバンド強度も低いことが確認された (Fig. 4-3-2 A)。Glycosylation inhibitor 添加に伴う EPS 生産性、CPS 生産性、GAPDH 分泌性を Fig. 4-3-2 B に示した。生育性には大きな差は見られなかった一方で、莢膜多糖である CPS では約 75%に減少傾向、分泌多糖である EPS は有意な減少を示し、約 69%に低下した。また GAPDH のバンド強度を解析したところ、Glycosylation inhibitor 添加によって著しく減少した (約 31%) (Fig. 4-3-2 B)。

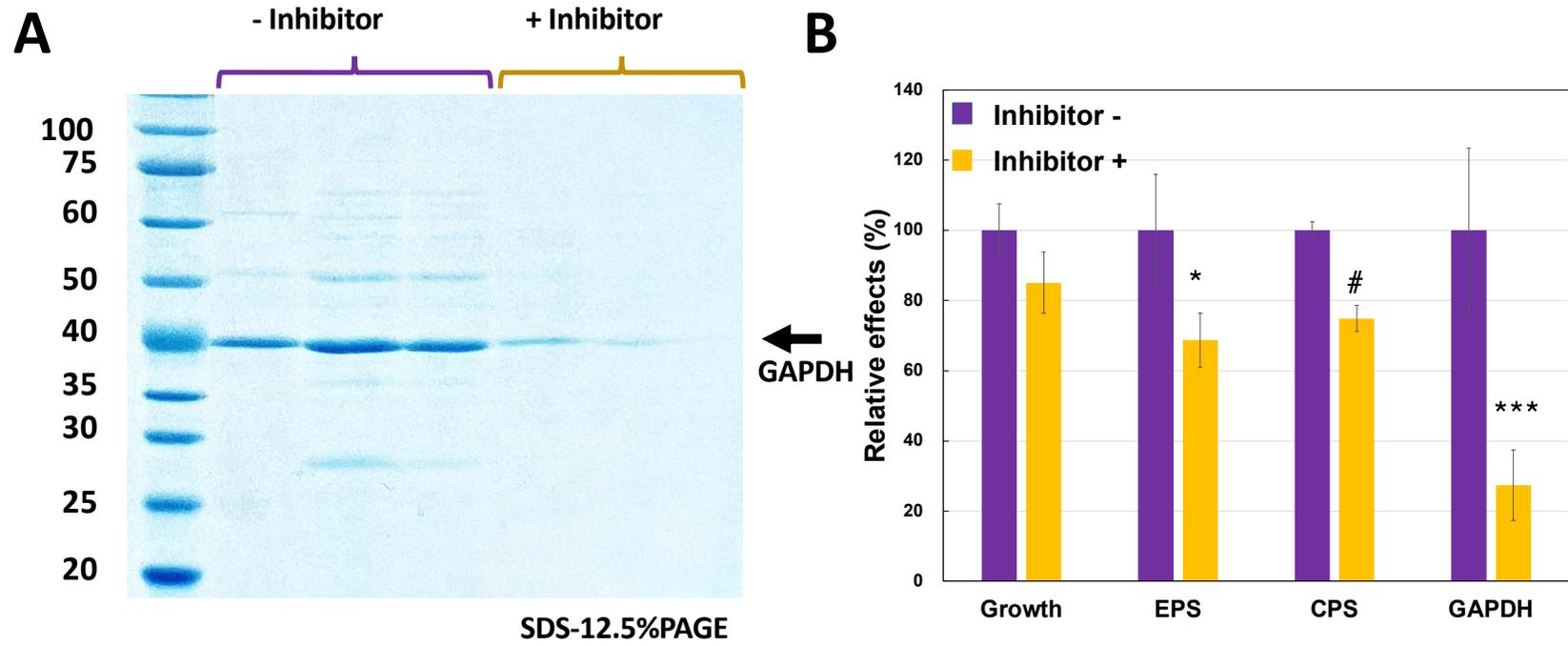


Fig. 4-3-2 Glycosylation inhibitor による *L. plantarum* JCM 1149 株の生育、EPS および CPS 生産能、菌体表層 GAPDH への影響

(A) 菌体表層 GAPDH の SDS-PAGE、(B) 各種要素の比較グラフ、 # $p < 0.1$ 、* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$

4-3-3. *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 の *eps* 欠損株における GAPDH 分泌性

L. plantarum JCM 1149 株において、EPS 合成阻害剤を用いた試験において EPS 生産抑制により、菌体表層への GAPDH 分泌が著しく低下することが示された。そこで、過去に EPS 合成遺伝子を欠失させたプロバイオイクス株 *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 の変異株を用いて、EPS 生産の評価とそれに伴う GAPDH の分泌性評価を行った。OLL1073 R-1 は高分子を EPS (H-EPS) と低分子 EPS (L-EPS) を生産するが、H-EPS 合成能を欠失した $\Delta epsIE$ 、H-EPS 合成能を約 50%に低下した $\Delta epsIF$ 株を用いて評価した。

その結果、IL-10 誘導活性に関しては、H-EPS 合成能を欠失した $\Delta epsIE$ では IL-10 誘導活性が有意な低下が示された一方で、H-EPS 合成能を半分程度保有する $\Delta epsIF$ 株でも有意な抑制がみられた。一方、IL-6 および IL-12 p40 誘導活性においては、減少程度は少ないものの、 $\Delta epsIF$ 株において IL-6、IL12 の生産が抑制された (Fig. 4-3-3 A、B)。これらの菌株が培養上清中に GAPDH を分泌するか調べるため MRS-F 培地で培養を行ったところ、SDS-12.5%PAGE の結果では全ての菌株で約 41 kDa のバンドが観察されていた一方で、ウェスタンブロッティングでは WT および $\Delta epsIE$ 株でのみ GAPDH のバンドが検出され、 $\Delta epsIF$ 株では検出されなかった (Fig. 4-3-3 C、D)。

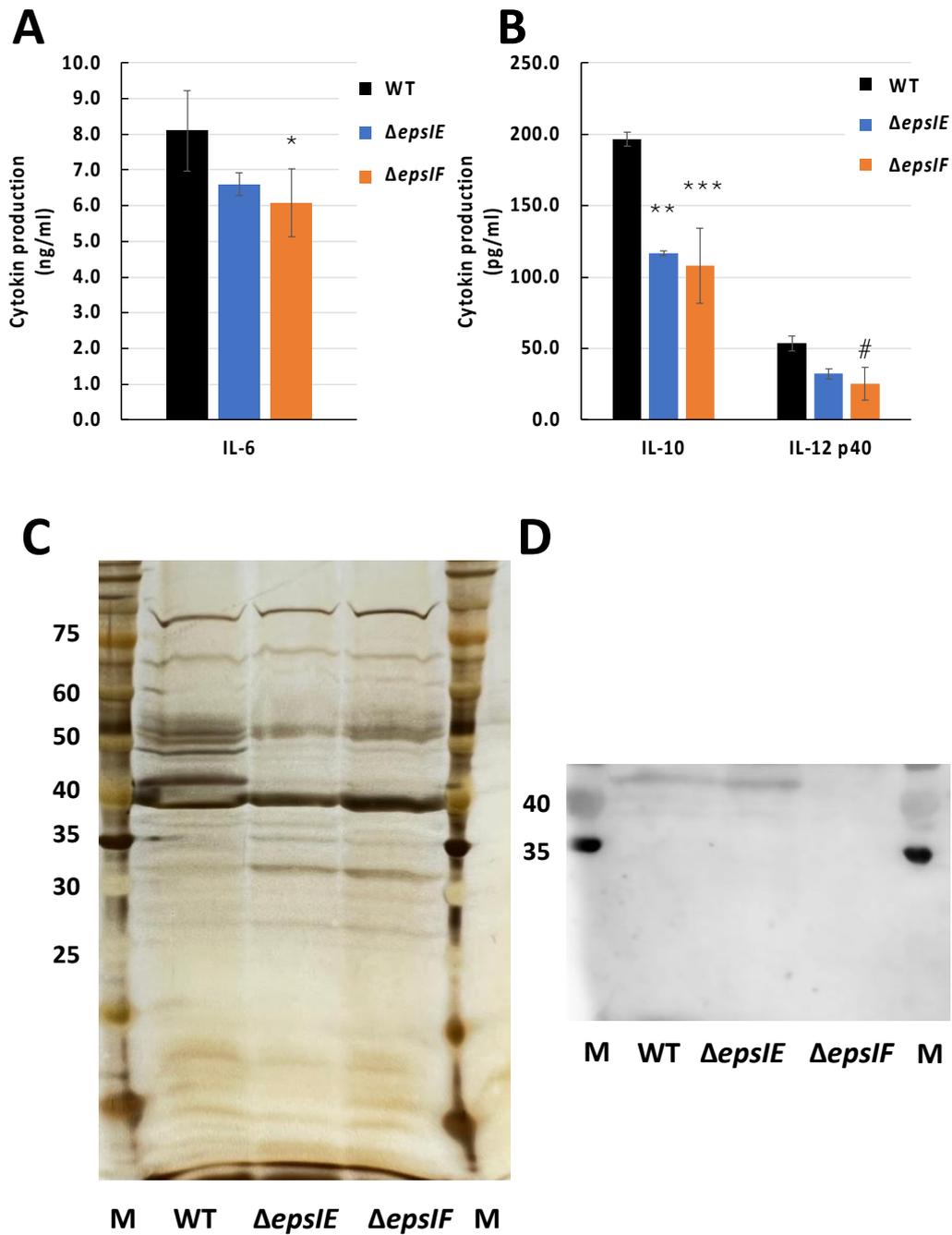


Fig. 4-3-3 *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 WT、 $\Delta epsIE$ 、 $\Delta epsIF$ 株由来 EPS 画分の免疫調節活性 (A)、MRS-F 培養上清画分の SDS-12.5% PAGE (B)、ウェスタンブロッティング結果 (C)

$p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4-3-4. *L. plantarum* JCM 1149 由来 EPS と GAPDH の相互作用

EPS 生産株である *L. plantarum* JCM 1149 に glycosylation inhibitor を添加して培養した場合、または *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 株の EPS 遺伝子欠損により、EPS 生産能だけでなく GAPDH 分泌量にも変化が確認された。GAPDH の分泌と EPS 生産には何らかの関連性があると思われる。また、2 章に示すように、菌体培養上清から EPS を抽出・回収した際に、GAPDH が EPS 画分に含有されていたことから、GAPDH は EPS に親和性を示すことが示唆された。そこで、EPS に対する GAPDH の親和性を改めて確認した。

GAPDH が EPS に対して本当に親和性を示すかどうかを確認するために、JCM 1159 株由来 EPS をイムノプレート表層に固定し Cy3 標識した GAPDH(Cy³GAPDH)の結合性を評価した。その結果、*L. plantarum* JCM 1149 株由来 EPS は EPS を固定化していない EPS -と比較して有意に高い蛍光強度を示した (Fig 4-3-4)。

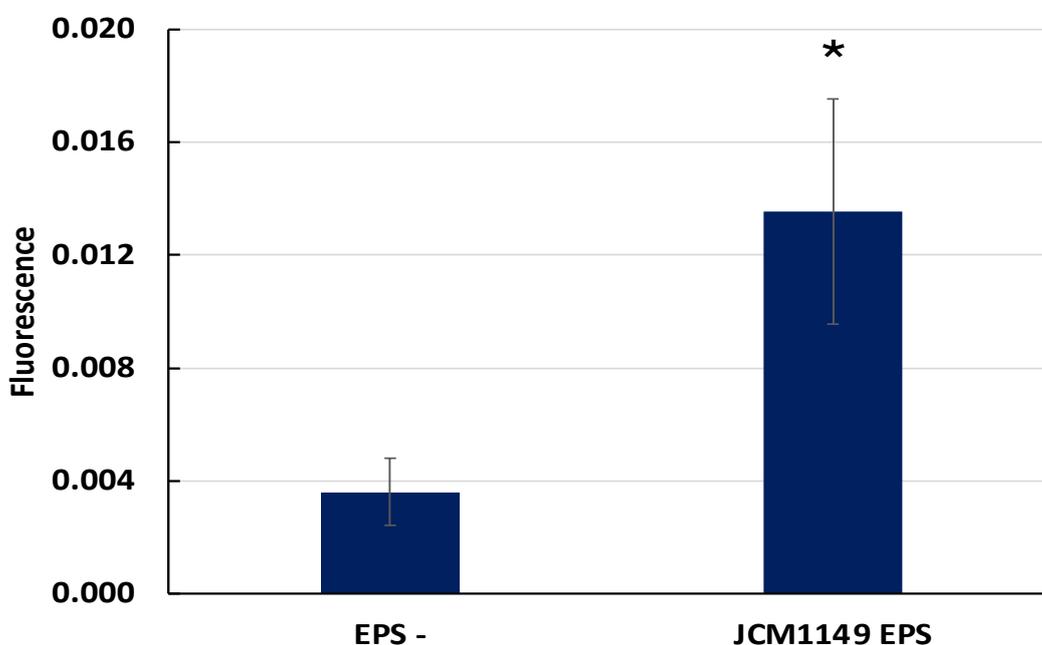


Fig. 4-3-4 Cy³GAPDH の *L. plantarum* JCM1149 由来 EPS への結合性

* $p < 0.05$

次に、*L. plantarum* JCM 1149 株由来 EPS の EPS-GAPDH 間の相互作用を調べるため、ゲル濾過クロマトグラフィーによる EPS-GAPDH 複合体の検出を試みた。その結果、EPS のみをゲル濾過に供した場合、約 25 ml の溶出位置にピークが確認された。Cy³GAPDH の場合、約 21 ml の位置に溶出が確認された。一方、これらを混合した後に分画を行うと、EPS、Cy³GAPDH とともに本来の溶出位置におけるピークが減少し、より高分子側の早い溶出位置、約 11、14、18、21 ml にピークが重り溶出された (Fig. 4-3-5)。以上から、JCM 1149 株 GAPDH と EPS は親和性を示すこと、R-1 株由来の EPS (H-EPS と L-EPS) には低い親和性が確認されたことから、JCM 1149 株と R-1 株由来 EPS は異なる性質を有することが示唆された。

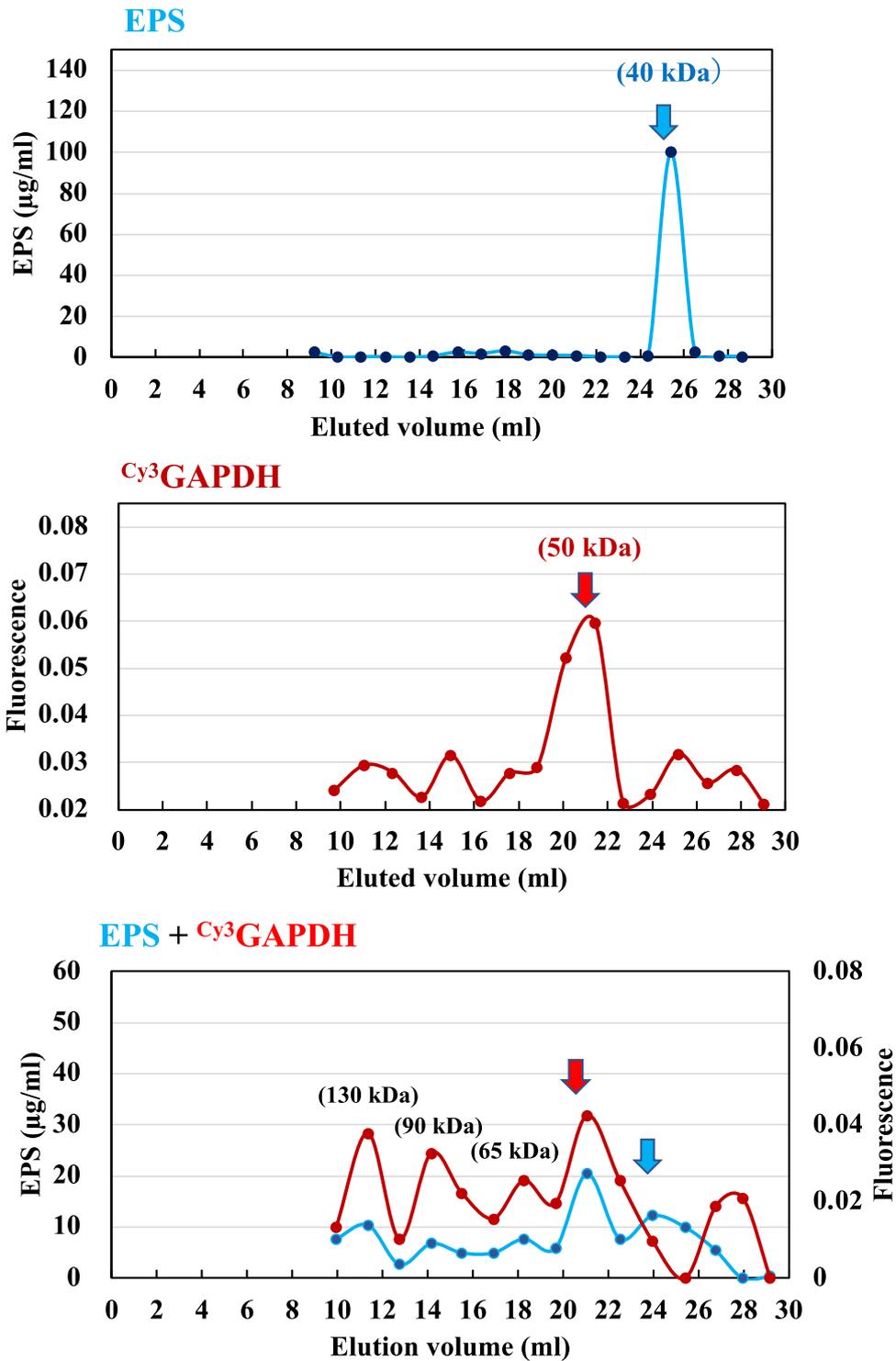


Fig. 4-3-5 (上)純化した EPS、(中)Cy³ 染色した GAPDH および(下)EPS と Cy³GAPDH の混合物のゲル濾過クロマトグラフ

4-4. 考察

L. plantarum 株間の比較解析から、*L. plantarum* の EPS 画分の免疫調節作用は EPS 濃度に相関する傾向が見られたが、EPS 画分に含まれる GAPDH が主要な免疫調節因子であることが明らかとなった。そこで本章では、GAPDH の分泌が EPS との親和性に影響を受ける可能性を考察するために、両分子の結合性を明らかにしようとした。

微生物の EPS は対数増殖期後期から定常期にかけて二次代謝産物として分泌されることが報告されている^{9,10}。本研究においても *L. plantarum* JCM 1149 は生育曲線から定常期であることが示された培養 12-24 時間にかけて、EPS は著しい生産上昇を示した。さらに、驚くべきことに、SLPs 画分中のタンパク質濃度についても、EPS と同様に培養 12-24 時間にかけて著しい上昇を示し両者の分泌は関連する可能性が示された。またウェスタンブロッティングの結果において SLPs 画分中の GAPDH のバンドは培養後期において濃くなることから、GAPDH 分泌には EPS 生産が関連することを強く示唆している。

EPS が定常期に分泌される理由として生産にクオラムセンシングが影響する可能性が示唆されている⁹。*L. plantarum* JCM 1149 株においても、菌数が一定以上となった定常期において EPS 生産が強く誘導され、EPS 生産に連れて GAPDH が分泌される可能性がある。一方、増殖後期における EPS 高生産メカニズムに関しては膜透過性なども影響している可能性があり、今後の詳細解析が必要である。培養時期による GAPDH と EPS の生産能比較によって GAPDH と EPS 生産が相関することが示されたが、EPS 生産と GAPDH 分泌が互いに異なる機構によって生産されている可能性があるが、EPS 生産阻害剤により GAPDH 分泌

を有意に抑制した。さらに興味深いことに、2-(4-methoxyphenyl)ethylamine 添加は SLPs 画分中の GAPDH 量も著しく低下させた。このことから *L. plantarum* JCM 1149 株の GAPDH は EPS 生産に依存して菌体外に分泌される可能性が強く示唆された。

L. plantarum JCM 1149 株において GAPDH 分泌が EPS 生産に依存することが示唆されていたが、OLL1073 R-1 株の遺伝子欠損株 $\Delta epsIE$ 、 $\Delta epsIF$ 株では、WT および $\Delta epsIE$ 株において分泌された一方、 $\Delta epsIF$ 株では培養上清中に分泌が確認されず、サイトカイン誘導活性と類似した傾向を示した。このことから *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 株においても GAPDH は菌体外に分泌されており免疫調節因子として寄与することが示された。先行研究において $\Delta epsIE$ と $\Delta epsIF$ では、EPS 生産性が異なることが確認されている (Supplementary figure 2)。また EPS は一般に、繰り返し構造 (RU: Repeating unit) 合成、菌体外へ排出・伸長といくつかの段階を経て分泌されることが知られている (Fig. 4-4-1)^{6, 12}。このとき undecaprenyl-phosphate galactose phosphotransferase コードする *epsIE* は菌体膜内に局在し EPS の RU 合成の初期反応を担う priming glycosyltransferase^{12, 13} として機能することから EPS 合成に致命的な影響を及ぼすと考えられ、実際に $\Delta epsIE$ 株では H-EPS 合成能の欠損が確認されている⁷。これに対し alpha(1,3)galactosyltransferase をコードする *epsIF* を欠損した $\Delta epsIF$ 株は、H-EPS、L-EPS とともに生産が確認されている⁷が、*EpsIF* 欠損によって RU の構造が変化したと考えられる。本研究において、 $\Delta epsIF$ 株でのみ GAPDH 分泌が観察されなかったことから、H-EPS ではなく L-EPS (もしくはその他の糖鎖関連物質) に特徴的な単位構造に付随して GAPDH が分泌されていた可能性が推測される。

しかし別の可能性として、EPS 生産に関係なく GAPDH が分泌されていた可能性も考えられる。過去に、*Streptococcus pneumoniae* において GAPDH は本菌に

おける主要な溶菌酵素の一つ LytA による溶菌の結果として菌体外へ分泌されることが報告されている¹⁴。また *L. plantarum* 299v 株では細胞膜の透過性と比例して GAPDH の菌体外への流出が増加することも報告されている¹⁵。本研究においても *L. plantarum* 種 (Fig. 2-3-14 C) と比べて *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 株および変異株は培養液画分において多様なタンパク質が観察されていた (Fig. 4-3-3 C)。このことから *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 株の GAPDH 分泌は EPS 生産ではなく、溶菌などその他の要因によって分泌されていた可能性も推測される。

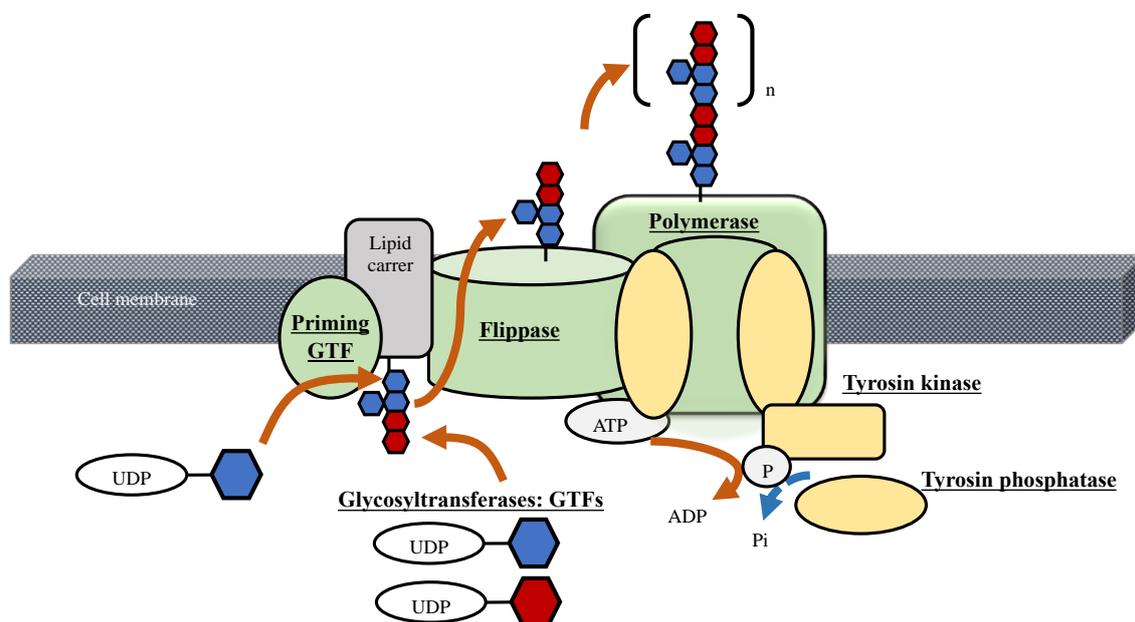


Fig. 4-4-1 EPS の生合成模式図¹²

ここまで、*L. plantarum* JCM 1149 株では EPS 生産と GAPDH 分泌の相関性について多様な実験により示してきた。しかし、なぜ両者が相関を示すのかという点について、本研究では EPS-GAPDH 間の親和性に着目して検討を行った。

当初、GAPDH は解糖系酵素の一種という背景から、どのような EPS (糖鎖) であっても親和性を示す可能性を想定した。しかし Fig. 4-3-6 から、GAPDH の親和性は EPS の種類によって左右されることが示され、さらに Fig. 4-3-7 から JCM 1149 株由来 EPS は GAPDH に対して多様な分子量の複合体を形成し得るこ

とが示唆された。EPS の多様性には主に、構成糖 (グルコース、ガラクトース、ラムノース、グルコサミン、ガラクトサミンなど、さらにこれらの立体異性体、光学異性体についても考慮する必要がある)、糖鎖の結合様式、糖鎖の修飾 (アセチル基、リン酸基、ピルボイル基、グリセロールリン酸など)、修飾した官能基に起因する荷電、RU の結合数による分子量などが知られている¹²。また過去に、ドッキングシミュレーションによって *L. plantarum* JCM 1149 由来の GAPDH は A 型血液型抗原の糖鎖におけるガラクトサミンやガラクトース、フコースなどと水素結合を形成する可能性が示されている¹⁶。今後、*L. plantarum* JCM 1149 由来 EPS の構造的特徴を他菌種または菌株間で比較・解析することで GAPDH が親和性を示す EPS の特徴を明らかにする際の手掛かりとなるだろう。

4-5. 参考文献

1. Kitazawa, H et al. “Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.” International journal of food microbiology vol. 40,3 (1998): 169-75. doi:10.1016/s0168-1605(98)00030-0
2. Makino, S et al. “Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1.” Journal of dairy science vol. 89,8 (2006): 2873-81. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72560-7
3. Makino, Seiya et al. “Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1.” Journal of dairy science vol. 99,2 (2016): 915-923. doi:10.3168/jds.2015-10376
4. Kanmani, Paulraj et al. “Exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* OLL1073R-1 modulate innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells.” Molecular immunology vol. 93 (2018): 253-265. doi:10.1016/j.molimm.2017.07.009
5. 藤澤みのり ら, ”*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 株の細胞外多糖合成遺伝子欠損が生育と EPS 合成に与える影響”, 日本乳酸菌学会 2020 年度大会, 20-L1-9, 2020
6. 工藤大夢, ”*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 600 における分泌型細胞外多糖の機能解明”, 明治大学, 2020
7. 中野美咲, ”*L. bulgaricus* 1073R-1 株における細胞外多糖の生理的機能および生合成遺伝子群の機能解明”, 明治大学, 2023

8. Ren, Zhi et al. "Molecule targeting glucosyltransferase inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 60,1 126-35. 19 Oct. 2015, doi:10.1128/AAC.00919-15
9. Sengupta, Dipanjan et al. "Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters." *Applied microbiology and biotechnology* vol. 102,4 (2018): 1587-1598. doi:10.1007/s00253-018-8745-7
10. Parthiban Karuppiah, et al., "Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Producing Bacteria from Pak Bay (Mandapam).", *International Journal of Oceanography and Marine Ecological System*, 3: 1-8., 2014
11. 日本乳酸菌学会, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会, 2010
12. Zeidan, Ahmad A et al. "Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications." *FEMS microbiology reviews* vol. 41,Supp_1 (2017): S168-S200. doi:10.1093/femsre/fux017
13. Zhou, Yang et al. "Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review." *Carbohydrate polymers* vol. 207 (2019): 317-332. doi:10.1016/j.carbpol.2018.11.093
14. Terrasse, Rémi et al. "*Streptococcus pneumoniae* GAPDH Is Released by Cell Lysis and Interacts with Peptidoglycan." *PloS one* vol. 10,4 e0125377. 30 Apr. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0125377
15. Saad, N et al. "*Lactobacillus plantarum* 299v surface-bound GAPDH: a new insight into enzyme cell walls location." *Journal of microbiology and biotechnology* vol. 19,12 (2009): 1635-43. doi:10.4014/jmb.0902.0102

16. 米田一成ら” 乳酸菌由来菌体表層 GAPDH の A 型血液型抗原結合メカニズムの解明” *Milk Science* Vol. 70 (2021), No. 2

第5章 総括

5-1. 先行研究に対する本研究の位置付け

過去に様々な乳酸菌種を用いた免疫調節活性と活性に寄与する成分（LTA、リポプロテイン、ペプチドグリカン、EPS、SCFA など）が報告^{1,2}されているが、中でも乳酸菌の産生する EPS（画分）は宿主細胞に作用し強い免疫応答を引き起こすことが示されていた^{3,4}。EPS は菌種間のみならず菌株間でも構造的多様性（構成糖、糖鎖結合様式、糖鎖の修飾、分子量など）が見られることから菌株特異的な免疫調節作用の主要因子とされてきた。これまでの EPS と関連したプロバイオティクス乳酸菌の免疫調節作用に関する研究を見ると、EPS の純化や遺伝子欠損による EPS 欠損などのアプローチによって免疫調節作用への寄与を示した報告が多く見られる。しかし、より正確にプロバイオティクスの免疫調節作用を評価するには EPS を含む乳酸菌成分について、多様な菌株を用いて同一実験条件下で比較・解析し、EPS が主要因子であるならばその中での EPS の重要度（寄与率）を議論するのが肝要であると考えた。そこで本研究では EPS と関連した報告の多い *L. plantarum* 種に着目し、11 種類の菌株間で EPS 生産能と免疫調節作用を比較解析することで、主たる免疫調節因子とその作用、また EPS との関係性を明らかにすることを目的とした。

5-2. 乳酸菌の EPS 生産能と GAPDH 分泌能について

本研究第 2 章では、11 種の *L. plantarum* 株を用いた比較解析によって EPS 高生産株である JCM 1149 株由来 EPS が樹状細胞モデル THP-1 DC において高い IL-6、IL-10、IL-12 産生誘導活性を示すことに着目し、その背後に存在するムーンライティングプロテインの一種 GAPDH を同定、GAPDH が本菌株の主要免疫調節因子であることを明らかにした。その後、第 4 章では、JCM 1149 株が主に定常期において EPS 産生と GAPDH 分泌が促進されること、および EPS 産生を化学的に抑制したとき GAPDH 分泌にも深刻な影響が観察されることを示した。さらに、第 2 章において EPS 生産能（EPS 画分中の多糖濃度）では十分に説明することのできなかつた *L. plantarum* 株間の免疫調節活性の違いが、菌体外への GAPDH 分泌に着目することで説明されることが明らかとなった。以上から、*L. plantarum* 種における免疫調節活性は GAPDH に起因する可能性が強く示唆された。

また GAPDH が菌体外に分泌された背景として、これまでは溶菌による流出⁵や細胞膜の透過性と関連することが示唆⁶されていたが、*L. plantarum* JCM 1149 株においては SLPs 画分、培養上清画分ともにその他のタンパク質の流出が少ないことから EPS 産生と関連して分泌されているものと考えられた。通常、微生物がタンパク質を菌体外に排出する際には翻訳直後のタンパク質が疎水性のシグナル配列を起点に膜外へ排出され、その後シグナル配列が分解されフォールディングが起こる。しかし GAPDH には既知のシグナル配列に相当する配列は確認されなかつた。本研究において *L. plantarum* JCM 1149 株由来 EPS は GAPDH と高い親和性を示したことから、本菌株では Fig. 5-1 のように、EPS がシグナル配列の代わりにガイド役となり菌体外に分泌されている可能性が推測された。

EPS は単位構造(RU)が菌体内で合成された後、フリッパーゼにより菌体外へ排出され、ポリメラーゼにより多糖化することが知られている⁹。このことから JCM 1149 菌体内において GAPDH は RU に結合し、前述の EPS 生合成プロセスに従って菌体外へ排出、その後、菌体表層へ結合または環境中にて単体もしくは EPS と共存すると考えられる(Fig. 5-2)。

一方で、EPS 高生産で免疫調節作用と関連した報告^{7,8}のある *L. bulgaricus* OLL1073R-1 株では、*L. plantarum* 種と比べて培養上清中に多種多様なタンパク質が検出されたこと、さらに同菌株の $\Delta epsIE$ 株では H-EPS 生産能を欠失しているにもかかわらず GAPDH 分泌が確認されたこと、反対に $\Delta epsIF$ 株では H-EPS 生産能を保持しているにもかかわらず GAPDH 分泌が観察されなかったことからなどから、EPS を介した GAPDH 分泌メカニズムは全ての EPS 生産株に適用できるとは限らないと考えられる。さらに本研究において、JCM 1149 株由来 GAPDH は同株由来 EPS に親和性を示すことを確認した (Fig. 4-3-6)。多糖合成酵素に加えて多糖修飾酵素の存在により、免疫活性に影響があることも示されていることから、EPS との親和性により GAPDH の菌体外分泌性の違いが生じている可能性も考えられる。細胞内に存在するはずの GAPDH がシグナル配列を保有しなくても、何故、細胞外に分泌されるのかその全体像は明らかとなっていないが、これまで報告のある溶菌や細胞膜の透過性、あるいは未だ明らかになっていないメカニズムの存在、さらにはこれらが複合的に働いているのではないかと推測する。

GAPDH が認識する糖鎖の特徴は一部報告されており、*L. plantarum* JCM 1149 株由来 GAPDH は EPS の構成糖にもなり得るガラクトサミンやガラクトース⁹ と水素結合する可能性が示唆¹⁰されている。さらに *L. plantarum* 株間で比較解析を行った際、EPS の低生産株であってもその免疫調節活性は大きく異なる場合

があったことからこの仮説は支持される。今後、本研究の知見を基に EPS の構成糖、糖鎖の結合様式、糖鎖の修飾などを調べることで、GAPDH 親和性 EPS の特徴は明らかにされるかもしれない。

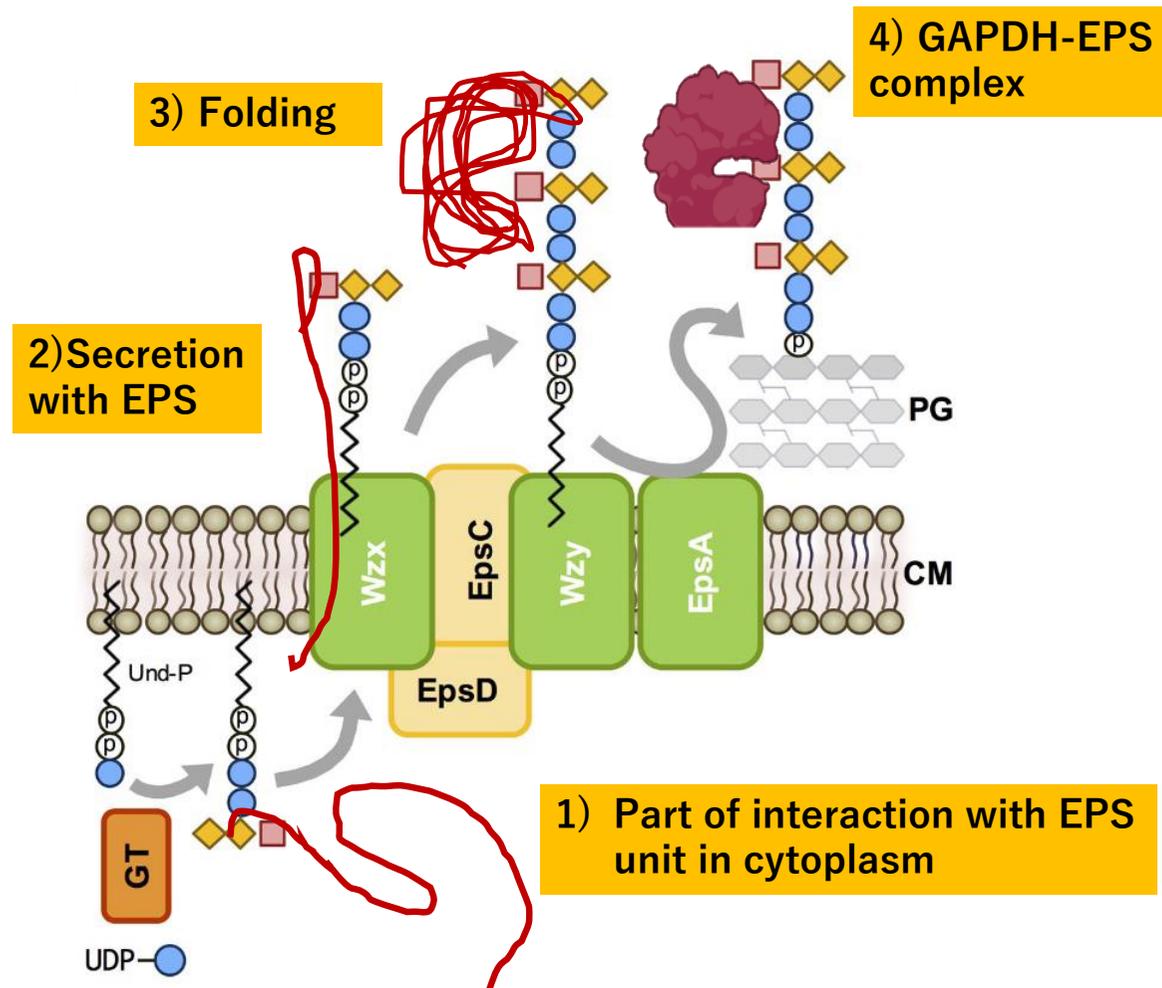


Fig. 5-1 EPS 生合成を介した GAPDH の排出と EPS-GAPDH コンプレックス形成の推測

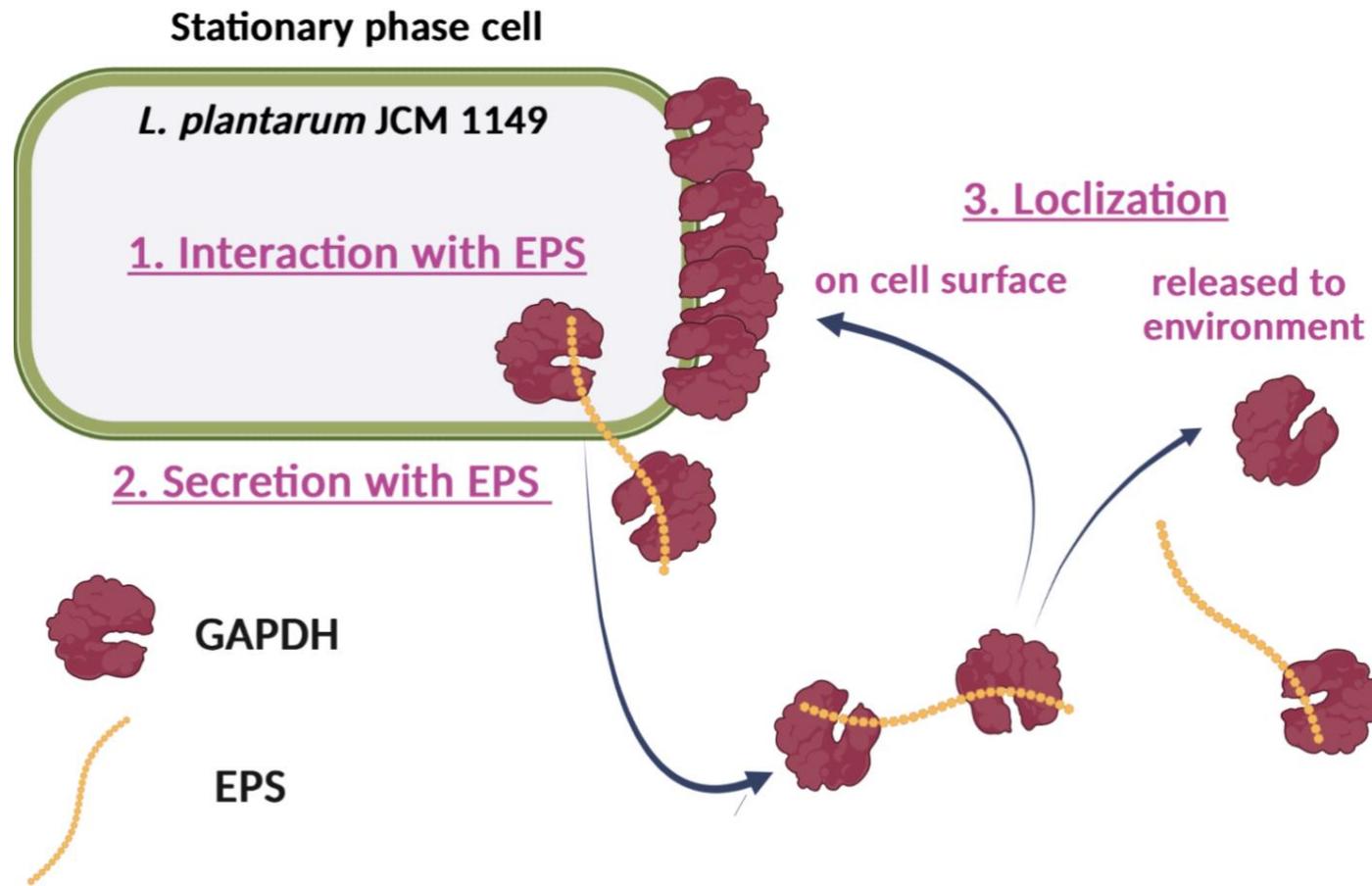


Fig. 5-2 本研究から推測される *L. plantarum* JCM 1149 株における EPS を介した GAPDH の菌体外分泌

5-3. 腸管免疫系を介した *L. plantarum* JCM 1149 株の免疫調節作用

本研究第3章では、*L. plantarum* JCM 1149 株由来 GAPDH が主に THP-1 DC 表層上の TLR2 によって認識され NF- κ B 経路を介した免疫応答を惹起することで免疫調節作用を誘導することを明らかにした。これまでムーンライティングプロテインとしての GAPDH の機能性は病原性 *Streptococcus* 属を中心に研究され、菌体表層に発現した場合は宿主体内への侵襲・感染、環境中に分泌されるとアポトーシスの誘導や免疫応答を誘導することが報告されていた¹¹⁻¹³。またいくつかの乳酸菌種でも GAPDH の分泌は報告されており、主に菌体表層 GAPDH を介した腸管上皮細胞への接着性とプロバイオティクス作用に関して研究されてきた¹⁴⁻¹⁶ が、一方で乳酸菌種の GAPDH の免疫調節作用に関する報告は極僅かであった。

本研究において *L. plantarum* JCM 1149 株は菌体表層および培養上清どちらにも GAPDH 分泌が観察されたことから、上述の過去の知見も踏まえると、腸管免疫系において、GAPDH は Fig. 5-2 のような免疫調節作用を発現すると推測される。通常、乳酸菌種は鞭毛や繊毛を持たないことから腸管内に定住することが難しいとされるが、これまでの GAPDH 分泌性の乳酸菌種による報告から JCM 1149 株も菌体表層の GAPDH を介して腸管上皮細胞上のムチンや JAM-2 タンパク質などと結合し定着性を示すと予想される。その後、腸管内において EPS と共に分泌された GAPDH は、樹状細胞やマクロファージのような抗原提示細胞 (APC: Antigen presenting cell) 表層上の TLR2 を介して認識され、種々のサイトカイン (IL-1b、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α など) 産生および CD40 レセプターの発現などによる T 細胞への抗原提示によって免疫調節作用を惹起すると考えられる (Fig. 5-2)。本研究は THP-1 DC を樹状細胞モデルとした *in vitro* の研究に留まっているため、Fig 5-2 の証明のためにも今後 *in vivo* での研究等が期待される。

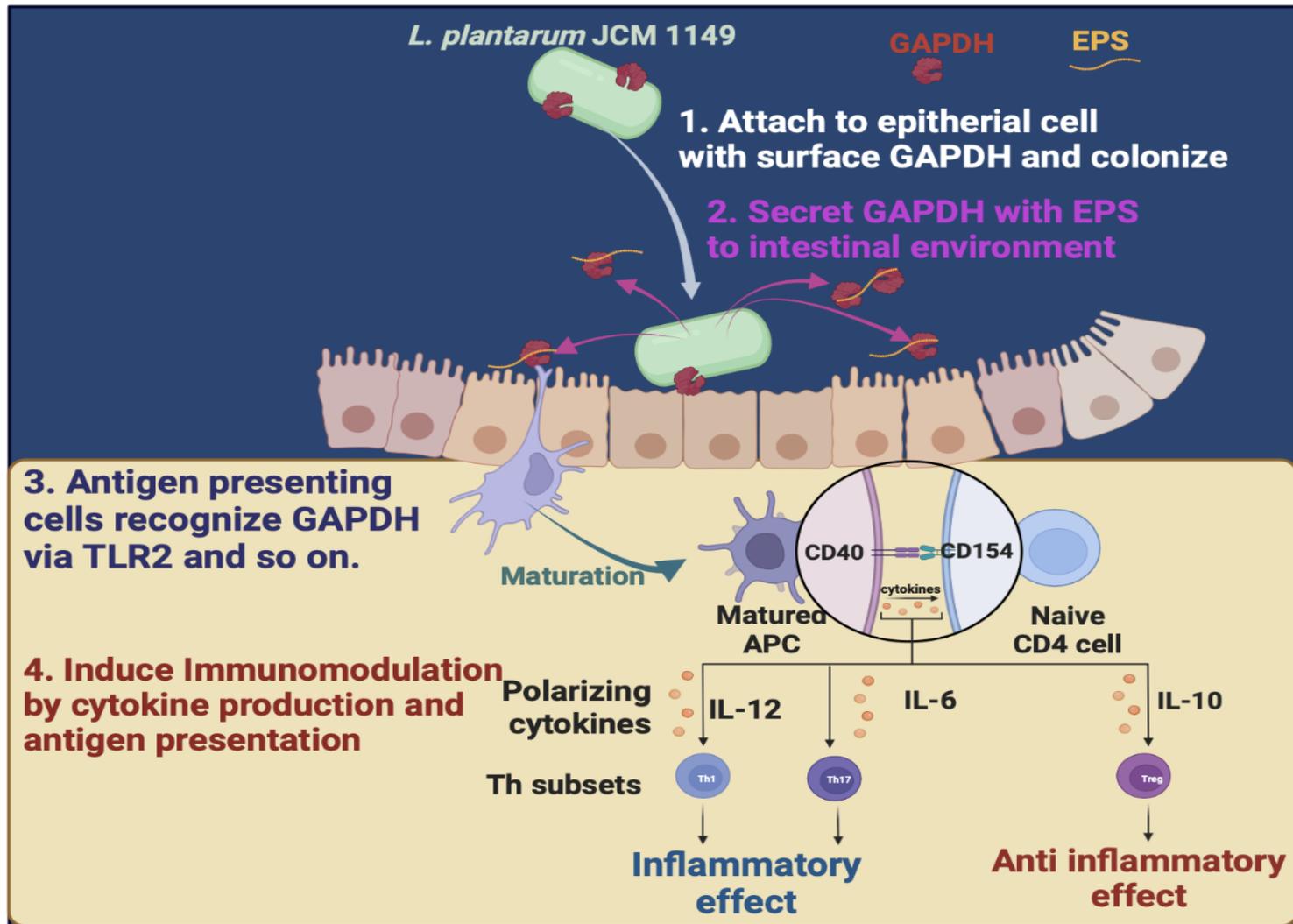


Fig. 5-2 腸管免疫系における *L. plantarum* JCM 1149 株の免疫調節作用の予想

5-4. 結論

本研究では、先行研究を参考に EPS を主要免疫調節因子として仮定し 11 種の *L. plantarum* 間で比較を行い、さらに EPS 画分を複合系として捉えてゲル濾過クロマトグラフィーによる分離を試みるなどのアプローチによって EPS 高生産株における GAPDH を真の免疫調節活性因子として同定することに成功した。また乳酸菌種では報告の少ない GAPDH の免疫調節作用について、THP-1 DC 上の認識レセプターや遺伝子発現を調べることで、TLR2 を介して NF- κ B 経路を活性化し炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α)産生を誘導すると同時に、誘導経路は不明であるが抗炎症性サイトカイン IL-10 も産生誘導されることを明らかにした。さらに、GAPDH が EPS に親和性を示すことから、EPS の生合成に伴う GAPDH の菌体外分泌への可能性を初めて提案した。

5-5. 参考文献

1. Piqué, Núria et al. “Health benefits of heat-killed (tyndallized) probiotics: An Overview.” *International journal of molecular sciences* vol. 20,10 2534. 23 May. 2019, doi:10.3390/ijms20102534
2. Scarpellini, Emidio et al. “From pre- and probiotics to post-biotics: A narrative Review.” *International journal of environmental research and public health* vol. 19,1 37. 21 Dec. 2021, doi:10.3390/ijerph19010037
3. Zhou, Yang et al. “Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review.” *Carbohydrate polymers* vol. 207 (2019): 317-332. doi:10.1016/j.carbpol.2018.11.093

4. Rahbar Saadat, Yalda et al. “A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides.” *Carbohydrate polymers* vol. 217 (2019): 79-89. doi:10.1016/j.carbpol.2019.04.025
5. Terrasse, Rémi et al. “*Streptococcus pneumoniae* GAPDH Is Released by Cell Lysis and Interacts with Peptidoglycan.” *PloS one* vol. 10,4 e0125377. 30 Apr. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0125377
6. Saad, N et al. “*Lactobacillus plantarum* 299v surface-bound GAPDH: a new insight into enzyme cell walls location.” *Journal of microbiology and biotechnology* vol. 19,12 (2009): 1635-43. doi:10.4014/jmb.0902.0102
7. Makino, S et al. “Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1.” *Journal of dairy science* vol. 89,8 (2006): 2873-81. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72560-7
8. Makino, Seiya et al. “Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1.” *Journal of dairy science* vol. 99,2 (2016): 915-923. doi:10.3168/jds.2015-10376
9. Zeidan, Ahmad A et al. “Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications.” *FEMS microbiology reviews* vol. 41,Supp_1 (2017): S168-S200. doi:10.1093/femsre/fux017
10. 米田一成ら” 乳酸菌由来菌体表層 GAPDH の A 型血液型抗原結合メカニズムの解明” *Milk Science* Vol. 70 (2021), No. 2
11. Oliveira, Liliana et al. “Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine

- macrophages.” PloS one vol. 7,1 (2012): e29963. doi:10.1371/journal.pone.0029963
12. Kopeckova, Monika et al. “Diverse localization and protein binding abilities of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in pathogenic bacteria: The key to its multifunctionality?.” *Frontiers in cellular and infection microbiology* vol. 10 89. 3 Mar. 2020, doi:10.3389/fcimb.2020.00089
 13. Sun, Xiaoyu et al. “Subcutaneous immunization with *Streptococcus pneumoniae* GAPDH confers effective protection in mice via TLR2 and TLR4.” *Molecular immunology* vol. 83 (2017): 1-12. doi:10.1016/j.molimm.2017.01.002
 14. Deng, Zhaoxi et al. “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase increases the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to host mucin to enhance probiotic effects.” *International journal of molecular sciences* vol. 21,24 9756. 21 Dec. 2020, doi:10.3390/ijms21249756
 15. Ishida, Minori et al. “Ribosome-engineered *Lactocaseibacillus rhamnosus* strain GG exhibits cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase accumulation and enhanced adhesion to human colonic mucin.” *Applied and environmental microbiology* vol. 86,20 e01448-20. 1 Oct. 2020, doi:10.1128/AEM.01448-20
 16. Kinoshita, Hideki et al. “Proposal of screening method for intestinal mucus adhesive lactobacilli using the enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).” *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* vol. 84,2 (2013): 150-8. doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01054.x
 17. Angelin, J, and M Kavitha. “Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential.” *International journal of biological macromolecules* vol. 162 (2020): 853-865. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190

付録

Supplementary Table 1. GAPDH 刺激時、発現促進された THP-1 DC の遺伝子群

GPADH/PBS	Gene	Product
11.19	EEF1D	eukaryotic translation elongation factor 1 delta, transcript variant X2
9.02	SQSTM1	sequestosome 1, transcript variant 1
7.48	MARCKS	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
6.68	BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3, transcript variant 1
4.82	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon, transcript variant 2
4.68	ACTN4	actinin alpha 4, transcript variant 1
4.56	SOD2	superoxide dismutase 2, transcript variant 1
4.56	CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1, transcript variant 2
4.40	TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2, transcript variant X6
4.33	TRAF1	TNF receptor associated factor 1, transcript variant 3
4.02	EIF3K	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K, transcript variant 1
3.85	MCOLN2	mucolipin 2, transcript variant X3
3.70	PUF60	poly(U) binding splicing factor 60, transcript variant 5
3.58	TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase
3.41	MIR10392	hsa-miR-10392-3p
3.39	SERPINE2	serpin family E member 2, transcript variant 2
3.34	EHD1	EH domain containing 1, transcript variant 1
3.22	ABTB2	ankyrin repeat and BTB domain containing 2
3.10	BMP8A	bone morphogenetic protein 8a
3.08	DDIT4	DNA damage inducible transcript 4
3.03	IRAK2	interleukin 1 receptor associated kinase 2
3.00	CD40	CD40 molecule, transcript variant X5
2.99	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1, transcript variant 3
2.94	BCL3	BCL3 transcription coactivator, transcript variant X2
2.94	SNN	stannin
2.83	N4BP2L1	NEDD4 binding protein 2 like 1, transcript variant 5
2.79	SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase, transcript variant 2
2.74	CCL3L3	C-C motif chemokine ligand 3 like 3
2.69	CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3
2.62	TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3, transcript variant X6

2.60	CCL1	C-C motif chemokine ligand 1
2.57	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
2.53	CYP7B1	cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1, transcript variant X1
2.53	CD83	CD83 molecule, transcript variant 3
2.51	STX11	syntaxin 11, transcript variant X1
2.41	RCC2	regulator of chromosome condensation 2, transcript variant 1
2.41	KYNU	kynureninase, transcript variant 3
2.41	CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8, transcript variant 2
2.40	ZC3H12C	zinc finger CCCH-type containing 12C
2.39	ELOVL7	ELOVL fatty acid elongase 7, transcript variant 2
2.36	SSBP1	single stranded DNA binding protein 1, transcript variant X2
2.36	GIMAP8	GTPase, IMAP family member 8, transcript variant X2
2.33	CCL3P1	
2.32	REL	REL proto-oncogene, NF-kB subunit, transcript variant X2
2.32	KCNQ4	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 4, transcript variant 2
2.31	CFLAR	CASP8 and FADD like apoptosis regulator, transcript variant 13
2.27	STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A, transcript variant 2
2.26	CLDN1	claudin 1
2.26	NINJ1	ninjurin 1, transcript variant X1
2.25	KCNN2	potassium calcium-activated channel subfamily N member 2, transcript variant 1
2.24	EBI3	Epstein-Barr virus induced 3, transcript variant X1
2.23	CCL3L1	C-C motif chemokine ligand 3 like 1, transcript variant 2
2.19	GPR35	G protein-coupled receptor 35, transcript variant 1
2.16	IFI27L2	interferon alpha inducible protein 27 like 2
2.15	ABR	ABR activator of RhoGEF and GTPase, transcript variant 3
2.12	ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A, transcript variant 1
2.10	PVR	PVR cell adhesion molecule, transcript variant 1
2.09	EEF2K	eukaryotic elongation factor 2 kinase
2.08	TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1, transcript variant X2
2.07	NFKBIA	NFKB inhibitor alpha
2.07	NFKB1	nuclear factor kappa B subunit 1, transcript variant 1
2.06	FGF2	fibroblast growth factor 2
2.06	CCL4L1	C-C motif chemokine ligand 4 like 1, transcript variant CCL4L

2.04	PDXDC1	pyridoxal dependent decarboxylase domain containing 1, transcript variant X2
2.02	MAFF	MAF bZIP transcription factor F, transcript variant 3
2.02	NAP1L4	nucleosome assembly protein 1 like 4, transcript variant 11
2.01	UNC13A	unc-13 homolog A, transcript variant X2
1.98	G0S2	G0/G1 switch 2
1.95	LSS	lanosterol synthase, transcript variant 3
1.95	POU2F2	POU class 2 homeobox 2, transcript variant X20
1.95	CD274	CD274 molecule, transcript variant 2
1.94	NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2, transcript variant X4
1.92	RELB	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit, transcript variant X2
1.91	TNFAIP8	TNF alpha induced protein 8, transcript variant 3
1.91	AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3, transcript variant 2
1.87	ICOSLG	inducible T cell costimulator ligand, transcript variant 3
1.86	SERPINA1	serpin family A member 1, transcript variant 5
1.86	CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1, transcript variant X9
1.84	GIMAP5	GTPase, IMAP family member 5
1.83	KLF5	Kruppel like factor 5, transcript variant 1
1.83	NUB1	negative regulator of ubiquitin like proteins 1, transcript variant 1
1.83	GIMAP1-GIMAP5	GIMAP1-GIMAP5 readthrough, transcript variant 2
1.81	MFSD2A	major facilitator superfamily domain containing 2A, transcript variant 5
1.81	TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9
1.81	ATP1B1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 1
1.81	CCL4	C-C motif chemokine ligand 4
1.80	ZYX	zyxin, transcript variant 3
1.80	PXDC1	PX domain containing 1, transcript variant X2
1.80	OLR1	oxidized low density lipoprotein receptor 1, transcript variant 1
1.80	CCL20	C-C motif chemokine ligand 20, transcript variant 1
1.80	IL1B	interleukin 1 beta, transcript variant X1
1.79	IL4I1	interleukin 4 induced 1, transcript variant 1
1.77	FLVCR2	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor family member 2, transcript variant 2
1.76	BTG2	BTG anti-proliferation factor 2
1.75	SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1, transcript variant 2

1.73	MIR4751	hsa-miR-4751
1.73	LIF	LIF interleukin 6 family cytokine, transcript variant X1
1.72	RNA28SN4	RNA, 28S ribosomal RNA N4
1.72	RNF19B	ring finger protein 19B, transcript variant X1
1.71	RNA45SN4	RNA, 45S pre-ribosomal N4
1.70	NCF1C	neutrophil cytosolic factor 1C pseudogene
1.70	MOB3C	MOB kinase activator 3C, transcript variant 1
1.69	NLGN4Y	neuroligin 4 Y-linked, transcript variant X15
1.69	LOC100507403	uncharacterized LOC100507403, transcript variant X6
1.69	KDM6B	lysine demethylase 6B, transcript variant X7
1.69	FRY	FRY microtubule binding protein, transcript variant X4
1.68	PTGER4	prostaglandin E receptor 4, transcript variant X4
1.68	TNIP2	TNFAIP3 interacting protein 2, transcript variant 1
1.66	PCGF5	polycomb group ring finger 5, transcript variant X3
1.66	MGLL	monoglyceride lipase, transcript variant X12
1.66	ETV3L	ETS variant 3 like, transcript variant X1
1.66	DENND3	DENN domain containing 3, transcript variant X16
1.66	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3, transcript variant X1
1.65	MSC	musculin
1.65	RGS16	regulator of G protein signaling 16, transcript variant X1
1.64	TLR2	toll like receptor 2, transcript variant X1
1.63	ESPL1	extra spindle pole bodies like 1, separase, transcript variant X5
1.63	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1
1.63	ECE1	endothelin converting enzyme 1, transcript variant 4
1.63	RBFOX2	RNA binding fox-1 homolog 2, transcript variant 6
1.63	CHST2	carbohydrate sulfotransferase 2
1.63	MPND	MPN domain containing, transcript variant 2
1.62	IL7R	interleukin 7 receptor, transcript variant X1
1.62	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8, transcript variant 3
1.62	TFAP2A	transcription factor AP-2 alpha, transcript variant 1
1.61	WT1	WT1 transcription factor, transcript variant G
1.61	UTP4	UTP4 small subunit processome component, transcript variant X1
1.61	LOC105378047	uncharacterized LOC105378047
1.61	GABARAPL1	GABA type A receptor associated protein like 1, transcript variant 1
1.61	ATF5	activating transcription factor 5, transcript variant 3

1.60	JUNB	JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
1.60	PIM3	Pim-3 proto-oncogene, serine/threonine kinase
1.59	ALAS1	5'-aminolevulinate synthase 1, transcript variant X4
1.59	CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
1.59	RHOF	ras homolog family member F, filopodia associated
1.57	TJP2	tight junction protein 2, transcript variant 5
1.57	EPB41L3	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3, transcript variant 2
1.57	PRKD3	protein kinase D3, transcript variant X5
1.57	TIPARP	TCDD inducible poly(ADP-ribose) polymerase, transcript variant 1
1.56	TNFRSF10B	TNF receptor superfamily member 10b, transcript variant 2
1.56	GCH1	GTP cyclohydrolase 1, transcript variant 1
1.56	PLK3	polo like kinase 3
1.56	CSF1	colony stimulating factor 1, transcript variant 3
1.56	LOC728743	zinc finger protein pseudogene
1.55	SDC4	syndecan 4, transcript variant X1
1.55	IFNGR2	interferon gamma receptor 2, transcript variant X2
1.55	MYB	MYB proto-oncogene, transcription factor, transcript variant 13
1.54	CYP1B1	cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1
1.53	PVT1	Pvt1 oncogene
1.53	HCK	HCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase, transcript variant 3
1.53	CEBPB	CCAAT enhancer binding protein beta, transcript variant 1
1.53	LHX2	LIM homeobox 2
1.52	SIX5	SIX homeobox 5
1.52	BCL9L	BCL9 like, transcript variant X5
1.52	VAV2	vav guanine nucleotide exchange factor 2, transcript variant X7
1.51	USP12	ubiquitin specific peptidase 12, transcript variant X3
1.51	YBX3	Y-box binding protein 3, transcript variant X4
1.50	SVIL	supervillin, transcript variant X17
1.50	OGFRL1	opioid growth factor receptor like 1, transcript variant 1
1.50	GPR132	G protein-coupled receptor 132, transcript variant 1
1.50	RIPK2	receptor interacting serine/threonine kinase 2, transcript variant X1
1.50	CD70	CD70 molecule, transcript variant 1
1.50	SLC16A6	solute carrier family 16 member 6, transcript variant 1
1.50	PTP4A3	protein tyrosine phosphatase 4A3, transcript variant 2
1.50	LOC101929932	

1.50	SLC9B2	solute carrier family 9 member B2, transcript variant 6
1.49	CD58	CD58 molecule, transcript variant 2
1.49	PLA2G7	phospholipase A2 group VII, transcript variant 2
1.49	ETV3	ETS variant 3, transcript variant X1
1.49	RRAD	RRAD, Ras related glycolysis inhibitor and calcium channel regulator, transcript variant 1
1.48	LRG1	leucine rich alpha-2-glycoprotein 1
1.48	TRIM47	tripartite motif containing 47, transcript variant X2
1.48	TRIP10	thyroid hormone receptor interactor 10, transcript variant 1
1.47	BOLA2	bola family member 2, transcript variant 3
1.47	ATP2B1	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 1, transcript variant X4
1.47	44629	membrane associated ring-CH-type finger 9
1.47	PPFIBP2	PPFIA binding protein 2, transcript variant 2
1.46	RASSF4	Ras association domain family member 4, transcript variant X10
1.46	NRP2	neuropilin 2, transcript variant 5
1.46	HIVEP1	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1, transcript variant X3
1.46	DUSP4	dual specificity phosphatase 4, transcript variant X1
1.45	SEMA4A	semaphorin 4A, transcript variant X1
1.45	STK26	serine/threonine kinase 26, transcript variant 3
1.45	LOC730101	uncharacterized LOC730101, transcript variant 1
1.44	B4GALT5	beta-1,4-galactosyltransferase 5
1.44	DUXAP8	double homeobox A pseudogene 8
1.44	BHLHE40	basic helix-loop-helix family member e40
1.44	BMP6	bone morphogenetic protein 6
1.44	ZNF169	zinc finger protein 169, transcript variant 1
1.44	BAHCC1	BAH domain and coiled-coil containing 1, transcript variant X3
1.44	INSIG1	insulin induced gene 1, transcript variant 4
1.43	ZC3H12D	zinc finger CCCH-type containing 12D
1.43	NRG1	neuregulin 1, transcript variant X11
1.43	PLD6	phospholipase D family member 6
1.43	LOC105375566	uncharacterized LOC105375566, transcript variant X6
1.43	CPNE8	copine 8, transcript variant X2
1.43	IL10RA	interleukin 10 receptor subunit alpha, transcript variant X1
1.42	CNKSR3	CNKSR family member 3, transcript variant 4

1.42	PHF19	PHD finger protein 19, transcript variant X3
1.42	LYRM4	LYR motif containing 4, transcript variant X1
1.42	GATAD2B	GATA zinc finger domain containing 2B, transcript variant X2
1.41	KCNQ3	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 3, transcript variant 1
1.41	UXS1	UDP-glucuronate decarboxylase 1, transcript variant 3
1.41	OSGIN1	oxidative stress induced growth inhibitor 1
1.41	EBF1	EBF transcription factor 1, transcript variant 15
1.41	TMEM123	transmembrane protein 123
1.41	PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5, transcript variant 4
1.41	SLC7A11	solute carrier family 7 member 11, transcript variant X1
1.41	CYP27B1	cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1
1.40	UNKL	unk like zinc finger, transcript variant 10
1.40	FOSL2	FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit, transcript variant X3
1.40	FAM107B	family with sequence similarity 107 member B, transcript variant X3
1.40	RCN1	reticulocalbin 1
1.40	MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3, transcript variant X3
1.40	SLC7A2	solute carrier family 7 member 2, transcript variant 5
1.39	NFE2L2	nuclear factor, erythroid 2 like 2, transcript variant 8
1.39	TBX3	T-box transcription factor 3, transcript variant 1
1.39	LRFN5	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 5, transcript variant 3
1.39	TSC22D3	TSC22 domain family member 3, transcript variant 3
1.39	MIR636	microRNA 636
1.39	ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2, transcript variant 1
1.39	NCF1	neutrophil cytosolic factor 1
1.39	SMAD1	SMAD family member 1, transcript variant 4
1.39	PRPF8	pre-mRNA processing factor 8
1.38	PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2
1.38	PDPN	podoplanin, transcript variant X3
1.38	MAMLD1	mastermind like domain containing 1, transcript variant X4
1.38	LDLR	low density lipoprotein receptor, transcript variant 4
1.38	CHST7	carbohydrate sulfotransferase 7
1.38	FKBP5	FKBP prolyl isomerase 5, transcript variant 4
1.37	TPRA1	transmembrane protein adipocyte associated 1, transcript variant 10

1.37	AHR	aryl hydrocarbon receptor
1.37	RASSF8	Ras association domain family member 8, transcript variant 3
1.37	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1, transcript variant X1
1.37	RFTN1	raftlin, lipid raft linker 1, transcript variant X5
1.37	GRAMD1A	GRAM domain containing 1A, transcript variant X9
1.37	FAM118A	family with sequence similarity 118 member A, transcript variant 3
1.37	OPTN	optineurin, transcript variant 1
1.37	TAF4B	TATA-box binding protein associated factor 4b, transcript variant X1
1.37	TRAF3	TNF receptor associated factor 3, transcript variant 4
1.37	MCTP1	multiple C2 and transmembrane domain containing 1, transcript variant X19
1.37	LOC112268324	polycystin-1-like
1.36	NUTM2B-AS1	NUTM2B antisense RNA 1, transcript variant 2
1.36	BTG3	BTG anti-proliferation factor 3, transcript variant X2
1.36	PTEN	phosphatase and tensin homolog, transcript variant 1
1.36	TMEM52B	transmembrane protein 52B, transcript variant 2
1.36	PDSS1	decaprenyl diphosphate synthase subunit 1, transcript variant X1
1.36	ELL2	elongation factor for RNA polymerase II 2, transcript variant X1
1.36	BID	BH3 interacting domain death agonist, transcript variant 7
1.36	HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1, transcript variant 31
1.36	RCN1P2	
1.35	ARHGAP23	Rho GTPase activating protein 23, transcript variant X6
1.35	SLC39A8	solute carrier family 39 member 8, transcript variant X4
1.35	SLC1A3	solute carrier family 1 member 3, transcript variant 3
1.35	MYO10	myosin X, transcript variant X4
1.35	NIPA2	NIPA magnesium transporter 2, transcript variant X10
1.35	MFNG	MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase, transcript variant 1
1.35	VCAN	versican, transcript variant 2
1.35	C4orf48	chromosome 4 open reading frame 48, transcript variant X1
1.35	SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family member 3A1, transcript variant X3
1.35	BOLA2-SMG1P6	BOLA2-SMG1P6 readthrough, transcript variant 4
1.34	MREG	melanoregulin
1.34	CD44	CD44 molecule (Indian blood group), transcript variant 5

1.34	TNFRSF11B	TNF receptor superfamily member 11b
1.34	NDUFS1	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S1, transcript variant 5
1.34	CLEC2D	C-type lectin domain family 2 member D, transcript variant 5
1.34	EXOSC7	exosome component 7, transcript variant X5
1.34	APOO	apolipoprotein O, transcript variant X3
1.34	ARRDC3	arrestin domain containing 3, transcript variant 6
1.33	TANK	TRAF family member associated NFKB activator, transcript variant 2
1.33	GPR68	G protein-coupled receptor 68, transcript variant X4
1.33	NLE1	notchless homolog 1, transcript variant 2
1.33	LOC339192	uncharacterized LOC339192
1.33	F3	coagulation factor III, tissue factor, transcript variant 1
1.33	PPIF	peptidylprolyl isomerase F, transcript variant X1
1.33	COL27A1	collagen type XXVII alpha 1 chain, transcript variant X4
1.33	RAP2C	RAP2C, member of RAS oncogene family, transcript variant 4
1.33	MED27	mediator complex subunit 27, transcript variant 3
1.33	CYB561	cytochrome b561, transcript variant 2
1.32	MIR3916	hsa-miR-3916
1.32	PLD2	phospholipase D2, transcript variant X6
1.32	TRIM16	tripartite motif containing 16, transcript variant 3
1.32	MRPS36	mitochondrial ribosomal protein S36
1.32	TIFA	TRAF interacting protein with forkhead associated domain
1.32	PRDM1	PR/SET domain 1, transcript variant 1
1.32	USP31	ubiquitin specific peptidase 31, transcript variant X5
1.31	NEDD4L	NEDD4 like E3 ubiquitin protein ligase, transcript variant X7
1.31	EFHD2	EF-hand domain family member D2
1.31	MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, transcript variant 3
1.31	USP49	ubiquitin specific peptidase 49, transcript variant 1
1.31	FCER2	Fc fragment of IgE receptor II, transcript variant 2
1.31	RAB12	RAB12, member RAS oncogene family, transcript variant X1
1.31	BIK	BCL2 interacting killer
1.31	CREBL2	cAMP responsive element binding protein like 2
1.31	FAM49A	family with sequence similarity 49 member A
1.31	RASA4B	RAS p21 protein activator 4B, transcript variant X6
1.31	CBWD5	COBW domain containing 5, transcript variant X13

1.31	LOC102724250	neuroblastoma breakpoint family member 1, transcript variant X1
1.30	PDIA5	protein disulfide isomerase family A member 5, transcript variant 2
1.30	RRAS2	RAS related 2, transcript variant 1
1.30	SMAD7	SMAD family member 7, transcript variant 2
1.30	KLF3	Kruppel like factor 3, transcript variant X2
1.30	SLC37A1	solute carrier family 37 member 1, transcript variant X1
1.30	SLC22A18	solute carrier family 22 member 18, transcript variant 4
1.30	HOPX	HOP homeobox, transcript variant X8
1.30	RPS2P12	
1.30	CLEC7A	C-type lectin domain containing 7A, transcript variant 5
1.30	AP2A2	adaptor related protein complex 2 subunit alpha 2, transcript variant X2
1.30	TRNR	tRNA-Arg
1.30	FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1, transcript variant X2
1.30	FAM20C	FAM20C golgi associated secretory pathway kinase
1.30	IRF1	interferon regulatory factor 1, transcript variant 5
1.30	POLR2J3	RNA polymerase II subunit J3
1.30	C3orf80	chromosome 3 open reading frame 80
1.30	CYB5A	cytochrome b5 type A, transcript variant X1

Supplementary Table 2. GAPDH 刺激によって発現抑制された THP-1 DC の遺伝子群

GAPDH/PBS	GENE	Products
0.08	RPL7A	ribosomal protein L7a
0.10	CYFIP1	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1, transcript variant 10
0.11	RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase A1, transcript variant 3
0.14	HNRNPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, transcript variant 6
0.16	SLC25A6	solute carrier family 25 member 6
0.16	SEMA7A	semaphorin 7A (John Milton Hagen blood group), transcript variant 2
0.17	EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A, transcript variant A
0.17	PSME2	proteasome activator subunit 2, transcript variant X1
0.31	INTS3	integrator complex subunit 3, transcript variant 1
0.31	CCL5	C-C motif chemokine ligand 5, transcript variant 1
0.31	PHF1	PHD finger protein 1, transcript variant 3
0.33	MGAT4B	alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase B, transcript variant 2
0.37	PIP4K2B	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2 beta
0.39	IPO4	importin 4, transcript variant 2
0.39	PSMB3	proteasome subunit beta 3, transcript variant 3
0.39	CEP170	centrosomal protein 170, transcript variant X12
0.40	RNH1	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1, transcript variant 4
0.41	PTPRC	protein tyrosine phosphatase receptor type C, transcript variant 1
0.42	HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1, transcript variant 20
0.45	NCF4	neutrophil cytosolic factor 4, transcript variant 2
0.47	EIF3C	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C, transcript variant 3
0.48	GPRIN3	GPRIN family member 3, transcript variant X4
0.52	GPR89A	G protein-coupled receptor 89A, transcript variant X5
0.52	RGS4	regulator of G protein signaling 4, transcript variant 3
0.53	ADORA3	adenosine A3 receptor, transcript variant A
0.54	UBASH3B	ubiquitin associated and SH3 domain containing B, transcript variant 2
0.55	NOMO1	NODAL modulator 1
0.55	RASA3	RAS p21 protein activator 3, transcript variant 2
0.55	CARS	cysteinyl-tRNA synthetase, transcript variant 4
0.56	TBC1D9B	TBC1 domain family member 9B, transcript variant 2
0.57	TCEA1P2	
0.57	MERTK	MER proto-oncogene, tyrosine kinase

0.57	EME1	essential meiotic structure-specific endonuclease 1, transcript variant X2
0.58	LOC107986031	uncharacterized LOC107986031
0.58	NXPH3	neurexophilin 3
0.59	ITGA2	integrin subunit alpha 2, transcript variant 3
0.59	KIAA0754	KIAA0754
0.59	LRRC25	leucine rich repeat containing 25, transcript variant X2
0.59	CRIPAK	cysteine rich PAK1 inhibitor
0.59	B3GALNT2	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2, transcript variant 1
0.59	NUP160	nucleoporin 160, transcript variant 1
0.59	RTN4R	reticulon 4 receptor
0.59	SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1, transcript variant 4
0.59	CLPTM1L	CLPTM1 like, transcript variant X5
0.59	HMCN1	hemicentin 1, transcript variant X2
0.60	CDCA7	cell division cycle associated 7, transcript variant 1
0.60	SOCS6	suppressor of cytokine signaling 6, transcript variant X1
0.60	GAREM1	GRB2 associated regulator of MAPK1 subtype 1, transcript variant X3
0.60	GRAMD1B	GRAM domain containing 1B, transcript variant 7
0.60	PGBD5	piggyBac transposable element derived 5
0.61	RHOBTB1	Rho related BTB domain containing 1, transcript variant 11
0.61	ABHD10	abhydrolase domain containing 10, transcript variant 2
0.61	EFR3B	EFR3 homolog B, transcript variant 1
0.61	CDK5R1	cyclin dependent kinase 5 regulatory subunit 1, transcript variant X2
0.61	GALM	galactose mutarotase
0.61	THSD7A	thrombospondin type 1 domain containing 7A, transcript variant X4
0.61	LPAR5	lysophosphatidic acid receptor 5, transcript variant 1
0.61	TAL1	TAL bHLH transcription factor 1, erythroid differentiation factor, transcript variant X3
0.61	CCR1	C-C motif chemokine receptor 1
0.61	MTHFD2L	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2 like, transcript variant 7
0.61	HHEX	hematopoietically expressed homeobox
0.62	CNIH3	cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 3, transcript variant 12
0.62	CORO2A	coronin 2A, transcript variant 2
0.62	DDIT4L	DNA damage inducible transcript 4 like

0.62	HYOU1	hypoxia up-regulated 1, transcript variant X8
0.62	ST8SIA5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5, transcript variant X1
0.62	HDAC6	histone deacetylase 6, transcript variant 10
0.62	CANX	calnexin, transcript variant 3
0.63	LAIR1	leukocyte associated immunoglobulin like receptor 1, transcript variant c
0.63	PCDH1	protocadherin 1, transcript variant 1
0.63	ZNF652	zinc finger protein 652, transcript variant 2
0.63	STARD13	StAR related lipid transfer domain containing 13, transcript variant 4
0.63	EPN2	epsin 2, transcript variant 2
0.63	ARID5B	AT-rich interaction domain 5B, transcript variant X3
0.63	SASH3	SAM and SH3 domain containing 3, transcript variant X1
0.63	ETV5	ETS variant 5
0.63	MX2	MX dynamin like GTPase 2, transcript variant X1
0.64	RAD51C	RAD51 paralog C, transcript variant 4
0.64	GPR65	G protein-coupled receptor 65
0.64	LGR4	leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4, transcript variant 1
0.64	SPRED1	sprouty related EVH1 domain containing 1, transcript variant X2
0.64	ZNF347	zinc finger protein 347, transcript variant 3
0.64	TNFRSF21	TNF receptor superfamily member 21, transcript variant X1
0.64	ZNF395	zinc finger protein 395
0.64	TLR4	toll like receptor 4, transcript variant 3
0.64	MTUS1	microtubule associated scaffold protein 1, transcript variant 6
0.64	SLAMF6	SLAM family member 6, transcript variant 4
0.64	SCRN1	secernin 1, transcript variant 1
0.65	GCNT1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, transcript variant 3
0.65	ANKRD63	ankyrin repeat domain 63
0.65	STRIP2	striatin interacting protein 2, transcript variant X1
0.65	RTTN	rotatin, transcript variant X8
0.65	CSGALNACT1	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1, transcript variant 21
0.65	SUCNR1	succinate receptor 1
0.65	CLIC1	chloride intracellular channel 1, transcript variant 1
0.65	SCAI	suppressor of cancer cell invasion, transcript variant 2
0.65	LRATD2	LRAT domain containing 2, transcript variant 1
0.65	SH3RF2	SH3 domain containing ring finger 2, transcript variant X3

0.65	SYNE1	spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1, transcript variant 3
0.65	DACT1	dishevelled binding antagonist of beta catenin 1, transcript variant 1
0.65	BRCA2	BRCA2 DNA repair associated
0.65	NRSN1	neurensin 1
0.66	TLE3	TLE family member 3, transcriptional corepressor, transcript variant X12
0.66	TLR6	toll like receptor 6
0.66	LOC101928429	uncharacterized LOC101928429
0.66	SLC35E4	solute carrier family 35 member E4, transcript variant X1
0.66	ARFGEF3	ARFGEF family member 3
0.66	ZC3H6	zinc finger CCCH-type containing 6, transcript variant X1
0.66	KCNJ2	potassium voltage-gated channel subfamily J member 2
0.66	CNR1	cannabinoid receptor 1, transcript variant 7
0.66	CHST14	carbohydrate sulfotransferase 14
0.66	DLG3	discs large MAGUK scaffold protein 3, transcript variant X5
0.66	MAP7	microtubule associated protein 7, transcript variant 7
0.66	EOMES	eomesodermin, transcript variant X1
0.66	PTPRO	protein tyrosine phosphatase receptor type O, transcript variant 2
0.66	CUX2	cut like homeobox 2, transcript variant X1
0.66	CDCP1	CUB domain containing protein 1, transcript variant X3
0.66	P2RY1	purinergic receptor P2Y1
0.67	TRANK1	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1, transcript variant X1
0.67	MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1, transcript variant X1
0.67	SPECC1	sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1, transcript variant X1
0.67	ORC1	origin recognition complex subunit 1, transcript variant 2
0.67	IGFN1	immunoglobulin like and fibronectin type III domain containing 1, transcript variant X6
0.67	TRIB2	tribbles pseudokinase 2, transcript variant 1
0.67	TMEM117	transmembrane protein 117, transcript variant X4
0.67	ARHGAP12	Rho GTPase activating protein 12, transcript variant 4
0.67	SNTB2	syntrophin beta 2
0.67	ITGAE	integrin subunit alpha E, transcript variant X6
0.67	ZNF281	zinc finger protein 281, transcript variant 2
0.67	ARMC10	armadillo repeat containing 10, transcript variant A
0.67	IFI16	interferon gamma inducible protein 16, transcript variant X3

0.67	DAAM1	dishevelled associated activator of morphogenesis 1, transcript variant X2
0.67	EIF3CL	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C like, transcript variant 1
0.68	ZNF521	zinc finger protein 521, transcript variant X7
0.68	TNRC6C-AS1	TNRC6C antisense RNA 1
0.68	TRIM2	tripartite motif containing 2, transcript variant X4
0.68	LOC100049716	uncharacterized LOC100049716
0.68	USP18	ubiquitin specific peptidase 18
0.68	PLEKHG4	pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G4, transcript variant 3
0.68	MAN1C1	mannosidase alpha class 1C member 1, transcript variant X2
0.68	PPP1R14C	protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 14C
0.68	ZNF469	zinc finger protein 469, transcript variant X2
0.68	FZD1	frizzled class receptor 1
0.68	FANCF	FA complementation group F
0.68	FUT8	fucosyltransferase 8, transcript variant 5
0.68	TREML1	triggering receptor expressed on myeloid cells like 1, transcript variant 2
0.68	SNX30	sorting nexin family member 30
0.68	MNAT1	MNAT1 component of CDK activating kinase, transcript variant X6
0.68	RHOBTB2	Rho related BTB domain containing 2, transcript variant 2
0.68	NHLRC3	NHL repeat containing 3, transcript variant 2
0.68	ABHD15	abhydrolase domain containing 15
0.68	LHFPL2	LHFPL tetraspan subfamily member 2, transcript variant X6
0.68	PODXL	podocalyxin like, transcript variant 2
0.68	RABL2A	RAB, member of RAS oncogene family like 2A, transcript variant X24
0.68	FBXO4	F-box protein 4, transcript variant 2
0.68	FANCE	FA complementation group E, transcript variant X6
0.68	CD300A	CD300a molecule, transcript variant X1
0.68	HTRA3	HtrA serine peptidase 3, transcript variant 1
0.68	TMEM246	transmembrane protein 246, transcript variant 3
0.68	ZNF618	zinc finger protein 618, transcript variant 1
0.69	TRERF1	transcriptional regulating factor 1, transcript variant X27
0.69	SHROOM2	shroom family member 2, transcript variant X2
0.69	LOC102724985	pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1, transcript variant X16
0.69	TMEM87B	transmembrane protein 87B, transcript variant X3
0.69	NNT-AS1	NNT antisense RNA 1

0.69	OSBPL3	oxysterol binding protein like 3, transcript variant 6
0.69	ANKMY2	ankyrin repeat and MYND domain containing 2
0.69	GPR88	G protein-coupled receptor 88
0.69	CHD9	chromodomain helicase DNA binding protein 9, transcript variant 4
0.69	LBR	lamin B receptor, transcript variant X3
0.69	NRSN2-AS1	NRSN2 antisense RNA 1
0.69	FAM8A1	family with sequence similarity 8 member A1
0.69	ATP10D	ATPase phospholipid transporting 10D (putative)
0.69	GBP3	guanylate binding protein 3, transcript variant X6
0.69	FNBP1L	formin binding protein 1 like, transcript variant X3
0.69	SRGAP1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1, transcript variant X2
0.69	LOC101928716	uncharacterized LOC101928716
0.69	NR2F1	nuclear receptor subfamily 2 group F member 1, transcript variant X1
0.69	PIAS2	protein inhibitor of activated STAT 2, transcript variant 4
0.69	AK9	adenylate kinase 9, transcript variant X12
0.69	DNA2	DNA replication helicase/nuclease 2, transcript variant X3
0.69	CD1C	CD1c molecule, transcript variant X1
0.69	C2orf68	chromosome 2 open reading frame 68, transcript variant X2
0.69	TRAJ23	
0.69	RGS14	regulator of G protein signaling 14, transcript variant X1
0.69	PRIM1	DNA primase subunit 1
0.69	HRH2	histamine receptor H2, transcript variant X5
0.69	LOC112268437	uncharacterized protein FLJ45252
0.69	RIN1	Ras and Rab interactor 1, transcript variant 2
0.70	TRPS1	transcriptional repressor GATA binding 1, transcript variant 2
0.70	ZMYM3	zinc finger MYM-type containing 3, transcript variant 1
0.70	TBC1D16	TBC1 domain family member 16, transcript variant 4
0.70	LRRC4	leucine rich repeat containing 4, transcript variant X1
0.70	PIGC	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class C, transcript variant 1
0.70	CDC45	cell division cycle 45, transcript variant 4
0.70	ARHGAP6	Rho GTPase activating protein 6, transcript variant 6
0.70	ENDOD1	endonuclease domain containing 1
0.70	SPTBN5	spectrin beta, non-erythrocytic 5, transcript variant X5
0.70	SRGAP2C	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2C, transcript variant 1
0.70	MTBP	MDM2 binding protein

0.70	TRIM32	tripartite motif containing 32, transcript variant 1
0.70	MVB12B	multivesicular body subunit 12B, transcript variant 1
0.70	MAF	MAF bZIP transcription factor, transcript variant X2
0.70	KIF13A	kinesin family member 13A, transcript variant 4
0.70	TNS1	tensin 1, transcript variant X18
0.70	LBH	LBH regulator of WNT signaling pathway
0.70	NEK10	NIMA related kinase 10, transcript variant X24
0.70	SESN1	sestrin 1, transcript variant 1
0.70	LPCAT4	lysophosphatidylcholine acyltransferase 4, transcript variant X5
0.70	ATP7A	ATPase copper transporting alpha, transcript variant 2
0.70	EVI2B	ecotropic viral integration site 2B
0.70	NRIP1	nuclear receptor interacting protein 1
0.70	ZNF44	zinc finger protein 44, transcript variant X3
0.70	JMJD1C	jumonji domain containing 1C, transcript variant X10
0.70	SYT7	synaptotagmin 7, transcript variant 3
0.70	ZNF616	zinc finger protein 616, transcript variant 2
0.70	ADRA2B	adrenoceptor alpha 2B
0.70	TICRR	TOPBP1 interacting checkpoint and replication regulator, transcript variant 2
0.70	MRTFB	myocardin related transcription factor B, transcript variant 8
0.70	FAM217B	family with sequence similarity 217 member B, transcript variant X1
0.70	IRS1	insulin receptor substrate 1
0.70	NXPH4	neurexophilin 4, transcript variant X1
0.70	TMEM215	transmembrane protein 215
0.70	DOP1B	DOP1 leucine zipper like protein B, transcript variant X2
0.70	SH3RF1	SH3 domain containing ring finger 1
0.70	ABHD6	abhydrolase domain containing 6, transcript variant 1
0.70	ARHGAP18	Rho GTPase activating protein 18
0.70	TNRC6B	trinucleotide repeat containing adaptor 6B, transcript variant 1
0.71	STK38L	serine/threonine kinase 38 like, transcript variant X13
0.71	SLC30A1	solute carrier family 30 member 1
0.71	ALAD	aminolevulinate dehydratase, transcript variant X3
0.71	PHF3	PHD finger protein 3, transcript variant 3
0.71	VARS	valyl-tRNA synthetase, transcript variant X2
0.71	ZNF708	zinc finger protein 708, transcript variant X3
0.71	KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12

0.71	DTL	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog, transcript variant 3
0.71	VANGL1	VANGL planar cell polarity protein 1, transcript variant 2
0.71	RAB3IL1	RAB3A interacting protein like 1, transcript variant X6
0.71	B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5, transcript variant X4
0.71	ZBTB42	zinc finger and BTB domain containing 42, transcript variant 2
0.71	ALMS1	ALMS1 centrosome and basal body associated protein
0.71	DENND5B	DENN domain containing 5B, transcript variant 1
0.71	EML1	EMAP like 1, transcript variant X2
0.71	ANKRD28	ankyrin repeat domain 28, transcript variant 12
0.71	RERE	arginine-glutamic acid dipeptide repeats, transcript variant 2
0.71	GPT2	glutamic--pyruvic transaminase 2, transcript variant X1
0.71	LINC00941	long intergenic non-protein coding RNA 941
0.71	FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2, transcript variant X1
0.71	TTBK2	tau tubulin kinase 2, transcript variant X1
0.71	VIPR1	vasoactive intestinal peptide receptor 1, transcript variant X3
0.71	TRAM2	translocation associated membrane protein 2, transcript variant X1
0.71	SFMBT2	Sem like with four mbt domains 2, transcript variant X1
0.71	TTK	TTK protein kinase, transcript variant X1
0.71	C11orf45	chromosome 11 open reading frame 45, transcript variant 4
0.71	B4GALNT3	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 3
0.71	PPM1E	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1E, transcript variant 2
0.71	PRR12	proline rich 12
0.71	RNF168	ring finger protein 168
0.71	LOC145783	uncharacterized LOC145783
0.71	ZBTB37	zinc finger and BTB domain containing 37, transcript variant X3
0.71	ADGRE4P	adhesion G protein-coupled receptor E4, pseudogene
0.71	SH3PXD2A	SH3 and PX domains 2A, transcript variant 2
0.71	CCDC85B	coiled-coil domain containing 85B
0.71	GIMAP6	GTPase, IMAP family member 6, transcript variant 2
0.71	SNRNP48	small nuclear ribonucleoprotein U11/U12 subunit 48, transcript variant X1
0.71	NBPF1	NBPF member 1
0.71	ZNF670	zinc finger protein 670, transcript variant 2
0.72	AP5S1	adaptor related protein complex 5 subunit sigma 1, transcript variant 2
0.72	GPC6	glypican 6

0.72	IL12RB2	interleukin 12 receptor subunit beta 2, transcript variant X8
0.72	SLC16A7	solute carrier family 16 member 7, transcript variant X1
0.72	PRUNE1	prune exopolyphosphatase 1, transcript variant 5
0.72	SIRT5	sirtuin 5, transcript variant 3
0.72	FAM76A	family with sequence similarity 76 member A, transcript variant X1
0.72	PLEKHA2	pleckstrin homology domain containing A2
0.72	TLR1	toll like receptor 1
0.72	LDLRAD4	low density lipoprotein receptor class A domain containing 4, transcript variant X27
0.72	XKR8	XK related 8
0.72	VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4, transcript variant 2
0.72	GDPGP1	GDP-D-glucose phosphorylase 1, transcript variant 1
0.72	UBA6-AS1	UBA6 antisense RNA 1 (head to head)
0.72	CCSAP	centriole, cilia and spindle associated protein, transcript variant X2
0.72	SULT1A1	sulfotransferase family 1A member 1, transcript variant X14
0.72	LOC100130992	uncharacterized LOC100130992
0.72	RSC1A1	regulator of solute carriers 1
0.72	BARD1	BRCA1 associated RING domain 1, transcript variant X3
0.72	KIF14	kinesin family member 14, transcript variant X8
0.72	STARD8	StAR related lipid transfer domain containing 8, transcript variant 1
0.72	HAVCR2	hepatitis A virus cellular receptor 2
0.72	FLJ32255	uncharacterized LOC643977
0.72	C19orf44	chromosome 19 open reading frame 44, transcript variant X4
0.72	RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family
0.72	TCAIM	T cell activation inhibitor, mitochondrial, transcript variant 2
0.72	ARMCX5	armadillo repeat containing X-linked 5, transcript variant 1
0.72	MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
0.72	DDAH1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1, transcript variant 1
0.72	ZYG11B	zyg-11 family member B, cell cycle regulator, transcript variant X2
0.72	ILDR2	immunoglobulin like domain containing receptor 2, transcript variant X3
0.72	PEX3	peroxisomal biogenesis factor 3
0.72	PXMP4	peroxisomal membrane protein 4, transcript variant 2
0.72	EEPD1	endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing 1
0.72	LRMP	lymphoid restricted membrane protein, transcript variant 2
0.72	TRIM58	tripartite motif containing 58

0.72	MGAT4A	alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A, transcript variant 1
0.72	RNF125	ring finger protein 125
0.72	LOC105374809	uncharacterized LOC105374809, transcript variant X2
0.72	SGIP1	SH3 domain GRB2 like endophilin interacting protein 1, transcript variant X46
0.72	FAM111B	family with sequence similarity 111 member B, transcript variant 3
0.72	RAPGEFL1	Rap guanine nucleotide exchange factor like 1, transcript variant X3
0.72	NUDT17	nudix hydrolase 17, transcript variant X2
0.72	AIG1	androgen induced 1, transcript variant 11
0.72	CCDC189	coiled-coil domain containing 189, transcript variant X19
0.72	LOC102723817	uncharacterized LOC102723817, transcript variant X2
0.72	PKD3	pyruvate dehydrogenase kinase 3, transcript variant 1
0.72	POMGNT2	protein O-linked mannanose N-acetylglucosaminyltransferase 2 (beta 1,4-), transcript variant X2
0.72	KIF24	kinesin family member 24, transcript variant X6
0.72	TBX18	T-box transcription factor 18, transcript variant X4
0.72	ACCS	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homolog (inactive), transcript variant X21
0.72	ATP2B2	ATPase plasma membrane Ca ²⁺ transporting 2, transcript variant X12
0.72	LOC101927727	uncharacterized LOC101927727
0.72	DIPK2A	divergent protein kinase domain 2A, transcript variant X1
0.72	RBM43	RNA binding motif protein 43
0.72	CCDC51	coiled-coil domain containing 51, transcript variant 5
0.72	EFNB1	ephrin B1
0.72	ITPRID2	ITPR interacting domain containing 2, transcript variant 5
0.72	ABRAXAS1	abraxas 1, BRCA1 A complex subunit, transcript variant X1
0.72	TENT5A	terminal nucleotidyltransferase 5A
0.72	SPTLC2	serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2
0.72	SH3D19	SH3 domain containing 19, transcript variant 3
0.72	ARHGAP19-SLIT1	ARHGAP19-SLIT1 readthrough (NMD candidate)
0.72	TP73	tumor protein p73, transcript variant 12
0.72	SUOX	sulfite oxidase, transcript variant X3
0.72	PARP3	poly(ADP-ribose) polymerase family member 3, transcript variant X2
0.72	CDC20P1	

0.72	CD2AP	CD2 associated protein, transcript variant X3
0.73	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9, transcript variant 2
0.73	PPP1R13B	protein phosphatase 1 regulatory subunit 13B
0.73	KIF18A	kinesin family member 18A, transcript variant X1
0.73	SATB1	SATB homeobox 1, transcript variant X3
0.73	TSPAN14	tetraspanin 14, transcript variant 4
0.73	DMAC2L	distal membrane arm assembly complex 2 like, transcript variant 2
0.73	ZBTB47	zinc finger and BTB domain containing 47
0.73	ADCY7	adenylate cyclase 7, transcript variant X12
0.73	SESN3	sestrin 3, transcript variant 2
0.73	LOC107984282	uncharacterized LOC107984282
0.73	FYB1	FYN binding protein 1, transcript variant X8
0.73	SOX13	SRY-box 13, transcript variant X1
0.73	RUNX2	RUNX family transcription factor 2, transcript variant 7
0.73	PIK3CG	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma, transcript variant X3
0.73	CCDC183-AS1	CCDC183 antisense RNA 1
0.73	NICN1	nicolin 1
0.73	FAN1	FANCD2 and FANCI associated nuclease 1, transcript variant X5
0.73	TTC28	tetratricopeptide repeat domain 28, transcript variant X6
0.73	TREX1	three prime repair exonuclease 1, transcript variant 4
0.73	DHRS3	dehydrogenase/reductase 3, transcript variant 2
0.73	WIPF3	WAS/WASL interacting protein family member 3
0.73	CDON	cell adhesion associated, oncogene regulated, transcript variant X7
0.73	SLCO4C1	solute carrier organic anion transporter family member 4C1, transcript variant X2
0.73	LINC02246	long intergenic non-protein coding RNA 2246
0.73	NFATC3	nuclear factor of activated T cells 3, transcript variant 2
0.73	NIPBL-DT	NIPBL divergent transcript
0.73	TGFBR2	transforming growth factor beta receptor 2, transcript variant 1
0.73	ZNF92	zinc finger protein 92, transcript variant 3
0.73	SGMS2	sphingomyelin synthase 2, transcript variant X7
0.73	NLRC5	NLR family CARD domain containing 5, transcript variant X17
0.73	GPAT3	glycerol-3-phosphate acyltransferase 3, transcript variant X1
0.73	ARRDC1-AS1	ARRDC1 antisense RNA 1, transcript variant 2

0.73	INA	internexin neuronal intermediate filament protein alpha
0.73	ANKRD13B	ankyrin repeat domain 13B, transcript variant X9
0.73	TBC1D8B	TBC1 domain family member 8B, transcript variant 2
0.73	DBN1	drebrin 1, transcript variant X4
0.73	PPBP	pro-platelet basic protein
0.73	WDR27	WD repeat domain 27, transcript variant 5
0.73	FBXL4	F-box and leucine rich repeat protein 4, transcript variant X4
0.73	ZNF252P	zinc finger protein 252, pseudogene
0.73	RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family
0.73	LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2
0.73	UBXN7	UBX domain protein 7
0.73	ATP8A1	ATPase phospholipid transporting 8A1, transcript variant X9
0.73	PRSS23	serine protease 23, transcript variant 4
0.73	LRRC37BP1	
0.73	ZFYVE26	zinc finger FYVE-type containing 26, transcript variant X6
0.73	PIKFYVE	phosphoinositide kinase, FYVE-type zinc finger containing, transcript variant X20
0.73	FBP1	fructose-bisphosphatase 1, transcript variant X1
0.73	DDX28	DEAD-box helicase 28
0.73	FIGNL1	fidgetin like 1, transcript variant X1
0.73	NUDT15	nudix hydrolase 15, transcript variant 2
0.73	KALRN	kalirin RhoGEF kinase, transcript variant 4
0.73	RASAL3	RAS protein activator like 3, transcript variant 3
0.73	ALKBH8	alkB homolog 8, tRNA methyltransferase, transcript variant X6
0.73	TFPI	tissue factor pathway inhibitor, transcript variant 1
0.73	EXO1	exonuclease 1, transcript variant X3
0.73	PAK1	p21 (RAC1) activated kinase 1, transcript variant X16
0.73	LIN54	lin-54 DREAM MuvB core complex component, transcript variant 7
0.73	NRDE2	NRDE-2, necessary for RNA interference, domain containing, transcript variant X3
0.73	ASB16-AS1	ASB16 antisense RNA 1, transcript variant 1
0.73	LOC93622	Morf4 family associated protein 1 like 1 pseudogene, transcript variant 2
0.73	MIR3605	microRNA 3605
0.73	C20orf96	chromosome 20 open reading frame 96, transcript variant 2
0.74	PTPN14	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14

0.74	CAPRN2	caprin family member 2, transcript variant 4
0.74	MDK	midkine, transcript variant 5
0.74	GSPT2	G1 to S phase transition 2
0.74	ARID1B	AT-rich interaction domain 1B, transcript variant X9
0.74	XKRX	XK related X-linked
0.74	FUT10	fucosyltransferase 10, transcript variant X3
0.74	HEG1	heart development protein with EGF like domains 1
0.74	CROCC	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin, transcript variant X6
0.74	SCX	scleraxis bHLH transcription factor, transcript variant X1
0.74	LINC00702	long intergenic non-protein coding RNA 702
0.74	GMCL1	germ cell-less 1, spermatogenesis associated, transcript variant X4
0.74	DCHS1	dachsous cadherin-related 1
0.74	CYB5RL	cytochrome b5 reductase like, transcript variant 2
0.74	SUSD3	sushi domain containing 3, transcript variant X4
0.74	FCF1P2	FCF1 pseudogene 2
0.74	MTFR2	mitochondrial fission regulator 2, transcript variant X2
0.74	ADAP2	ArfGAP with dual PH domains 2, transcript variant 4
0.74	DUSP18	dual specificity phosphatase 18, transcript variant 4
0.74	LOC729603	calcineurin like EF-hand protein 1 pseudogene
0.74	MCM10	minichromosome maintenance 10 replication initiation factor, transcript variant 1
0.74	PTPRF	protein tyrosine phosphatase receptor type F, transcript variant X15
0.74	RNF135	ring finger protein 135, transcript variant X5
0.74	TTC39C	tetratricopeptide repeat domain 39C, transcript variant 4
0.74	SYNE3	spectrin repeat containing nuclear envelope family member 3, transcript variant 2
0.74	OXSRL1	oxidative stress responsive kinase 1, transcript variant X4
0.74	RASAL2	RAS protein activator like 2, transcript variant X5
0.74	TMEM135	transmembrane protein 135, transcript variant X1
0.74	PPFIA4	PTPRF interacting protein alpha 4, transcript variant X5
0.74	RUBCNL	rubicon like autophagy enhancer, transcript variant 6
0.74	PAQR4	progesterin and adipoQ receptor family member 4, transcript variant 3
0.74	TMEM243	transmembrane protein 243, transcript variant 3
0.74	TSPAN18	tetraspanin 18, transcript variant X5
0.74	TRAC	

0.74	CEP131	centrosomal protein 131, transcript variant X2
0.74	NMD3	NMD3 ribosome export adaptor, transcript variant X3
0.74	KIF3C	kinesin family member 3C, transcript variant X1
0.74	RPUSD3	RNA pseudouridine synthase D3, transcript variant X2
0.74	SHC2	SHC adaptor protein 2, transcript variant X3
0.74	EXOC6	exocyst complex component 6, transcript variant 5
0.74	CHD6	chromodomain helicase DNA binding protein 6, transcript variant X6
0.74	LNPk	lunapark, ER junction formation factor, transcript variant X5
0.74	LDLRAD3	low density lipoprotein receptor class A domain containing 3, transcript variant 3
0.74	APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1, transcript variant X1
0.74	LCOR	ligand dependent nuclear receptor corepressor, transcript variant 4
0.74	MIR12127	microRNA 12127
0.74	SRGAP2D	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2D (pseudogene)
0.74	MLKL	mixed lineage kinase domain like pseudokinase, transcript variant X9
0.74	CCDC88C	coiled-coil domain containing 88C, transcript variant X3
0.74	C21orf58	chromosome 21 open reading frame 58, transcript variant X6
0.74	C18orf54	chromosome 18 open reading frame 54, transcript variant X5
0.74	ANKRD42	ankyrin repeat domain 42, transcript variant 3
0.74	MYCL	MYCL proto-oncogene, bHLH transcription factor, transcript variant 2
0.74	FAM76B	family with sequence similarity 76 member B, transcript variant X7
0.74	TRIM59	tripartite motif containing 59
0.74	SPICE1	spindle and centriole associated protein 1, transcript variant 3
0.74	FCHO2	FCH domain only 2, transcript variant X5
0.74	SPIN1	spindlin 1
0.74	KCNE3	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 3, transcript variant X1
0.74	PPCDC	phosphopantothencycysteine decarboxylase, transcript variant X4
0.74	GFOD1	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1, transcript variant 2
0.74	GABPB1-IT1	GABPB1 intronic transcript
0.74	CORO2B	coronin 2B, transcript variant 1
0.74	PLEKHA8	pleckstrin homology domain containing A8, transcript variant 1
0.74	SPATA5	spermatogenesis associated 5, transcript variant 1
0.74	DAB2	DAB adaptor protein 2, transcript variant 2
0.74	NAA40	N(alpha)-acetyltransferase 40, NatD catalytic subunit, transcript variant 1

0.74	GSTCD	glutathione S-transferase C-terminal domain containing, transcript variant X3
0.74	ZNF518A	zinc finger protein 518A, transcript variant 4
0.74	DNM3	dynamamin 3, transcript variant X4
0.74	MMS22L	MMS22 like, DNA repair protein, transcript variant X10
0.74	DOCK5	dedicator of cytokinesis 5, transcript variant 2
0.75	ADD3	adducin 3, transcript variant X16
0.75	ZNF93	zinc finger protein 93
0.75	LINC01605	long intergenic non-protein coding RNA 1605, transcript variant 1
0.75	SNX18	sorting nexin 18, transcript variant X2
0.75	RBMS2	RNA binding motif single stranded interacting protein 2, transcript variant X5
0.75	SLA	Src like adaptor, transcript variant 5
0.75	COMMD8	COMM domain containing 8, transcript variant X1
0.75	CDC6	cell division cycle 6, transcript variant X1
0.75	CCDC9B	coiled-coil domain containing 9B
0.75	ZNF445	zinc finger protein 445, transcript variant X5
0.75	CDYL2	chromodomain Y like 2, transcript variant X1
0.75	SETDB2	SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 2, transcript variant 1
0.75	SRPK2	SRSF protein kinase 2, transcript variant X7
0.75	IFT88	intraflagellar transport 88, transcript variant X15
0.75	CLIP4	CAP-Gly domain containing linker protein family member 4, transcript variant 4
0.75	HTATSFP2	HIV-1 Tat specific factor 1 pseudogene 2
0.75	DDX12P	DEAD/H-box helicase 12, pseudogene
0.75	SLC11A1	solute carrier family 11 member 1, transcript variant X9
0.75	ZFP28	ZFP28 zinc finger protein, transcript variant X2
0.75	FAM131B	family with sequence similarity 131 member B, transcript variant X2
0.75	ATP10A	ATPase phospholipid transporting 10A (putative), transcript variant X3
0.75	ZNF451	zinc finger protein 451, transcript variant X7
0.75	CMTM7	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 7, transcript variant X1
0.75	LRRC28	leucine rich repeat containing 28, transcript variant X3
0.75	HELLS	helicase, lymphoid specific, transcript variant X2
0.75	FANCC	FA complementation group C, transcript variant 1
0.75	MBD4	methyl-CpG binding domain 4, DNA glycosylase, transcript variant 5
0.75	PCM1	pericentriolar material 1, transcript variant 14

0.75	TMEM86A	transmembrane protein 86A
0.75	TEX2	testis expressed 2, transcript variant X5
0.75	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2, transcript variant 3
0.75	DOK2	docking protein 2, transcript variant 3
0.75	CRYBG3	crystallin beta-gamma domain containing 3, transcript variant X1
0.75	TRIM3	tripartite motif containing 3, transcript variant 5
0.75	DDX52	DExD-box helicase 52, transcript variant 1
0.75	ELK3	ETS transcription factor ELK3, transcript variant 2
0.75	ILF3-DT	ILF3 divergent transcript
0.75	ZNF786	zinc finger protein 786
0.75	KCNJ1	potassium voltage-gated channel subfamily J member 1, transcript variant 2
0.75	DEPDC1	DEP domain containing 1, transcript variant 1
0.75	GUCY1A2	guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2, transcript variant 2
0.75	NSD1	nuclear receptor binding SET domain protein 1, transcript variant X14
0.75	NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1, transcript variant MENepsilon
0.75	CD84	CD84 molecule, transcript variant X1
0.75	NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9, transcript variant 4
0.75	SLC7A8	solute carrier family 7 member 8, transcript variant 5
0.75	RNF217	ring finger protein 217, transcript variant X14
0.75	MFAP3	microfibril associated protein 3, transcript variant 2
0.75	GOLGA7B	golgin A7 family member B
0.75	POC5	POC5 centriolar protein, transcript variant X6
0.75	TSPAN32	tetraspanin 32, transcript variant X13
0.75	KSR1	kinase suppressor of ras 1, transcript variant 1
0.75	PNPLA7	patatin like phospholipase domain containing 7, transcript variant X4
0.75	RTL5	retrotransposon Gag like 5
0.75	TBC1D10C	TBC1 domain family member 10C, transcript variant 2
0.75	MDFIC	MyoD family inhibitor domain containing, transcript variant 1
0.75	DBR1	debranching RNA lariats 1
0.75	POLR3GL	RNA polymerase III subunit G like, transcript variant 2
0.75	ZC3H3	zinc finger CCCH-type containing 3, transcript variant X4
0.75	AFAP1L1	actin filament associated protein 1 like 1, transcript variant 1
0.75	DENND4C	DENN domain containing 4C, transcript variant X5
0.75	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin,

		subfamily a like 1, transcript variant 1
0.75	CNTRL	centriolin, transcript variant X14
0.75	C12orf76	chromosome 12 open reading frame 76, transcript variant 3
0.75	CALHM2	calcium homeostasis modulator family member 2, transcript variant 3
0.75	MGME1	mitochondrial genome maintenance exonuclease 1, transcript variant 3
0.75	FOXP2	forkhead box P2, transcript variant 7
0.75	ZNF283	zinc finger protein 283, transcript variant X8
0.75	VWA8	von Willebrand factor A domain containing 8, transcript variant 2
0.75	IFT74	intraflagellar transport 74, transcript variant X3
0.75	FAM214A	family with sequence similarity 214 member A, transcript variant X2
0.75	SLC2A9	solute carrier family 2 member 9, transcript variant X22
0.75	C9orf85	chromosome 9 open reading frame 85, transcript variant 6
0.75	BBS10	Bardet-Biedl syndrome 10
0.75	CARD6	caspase recruitment domain family member 6, transcript variant X1
0.75	ITPKB	inositol-trisphosphate 3-kinase B, transcript variant X2
0.75	CKAP2	cytoskeleton associated protein 2, transcript variant 4
0.75	ARL11	ADP ribosylation factor like GTPase 11
0.75	SESTD1	SEC14 and spectrin domain containing 1, transcript variant X6
0.75	LARP4	La ribonucleoprotein domain family member 4, transcript variant 30
0.75	ZNF407	zinc finger protein 407, transcript variant 2
0.75	LINC00847	long intergenic non-protein coding RNA 847, transcript variant 3
0.75	PLD1	phospholipase D1, transcript variant X7
0.75	SLC38A2	solute carrier family 38 member 2, transcript variant 2
0.75	TSPYL4	TSPY like 4
0.75	RNASEH2A	ribonuclease H2 subunit A
0.75	RGPD8	RANBP2 like and GRIP domain containing 8
0.75	MINDY2	MINDY lysine 48 deubiquitinase 2, transcript variant X1
0.75	FNDC3A	fibronectin type III domain containing 3A, transcript variant X2
0.75	TBCD	tubulin folding cofactor D, transcript variant X28
0.75	TMEM65	transmembrane protein 65
0.75	XRCC3	X-ray repair cross complementing 3, transcript variant X1
0.75	C17orf80	chromosome 17 open reading frame 80, transcript variant 3
0.75	TMLHE	trimethyllysine hydroxylase, epsilon, transcript variant X2
0.75	FKBP14	FKBP prolyl isomerase 14, transcript variant 3
0.75	BMS1P4	BMS1 pseudogene 4

0.75	INPP4A	inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A, transcript variant c
0.75	SLC37A3	solute carrier family 37 member 3, transcript variant 9
0.75	HOXA11	homeobox A11
0.75	C9orf139	chromosome 9 open reading frame 139, transcript variant X3
0.75	EVI2A	ecotropic viral integration site 2A, transcript variant 2
0.75	DST	dystonin, transcript variant X33
0.75	CLCN3	chloride voltage-gated channel 3, transcript variant X1
0.75	CDCA7L	cell division cycle associated 7 like, transcript variant 3
0.75	HIST2H2BB	histone cluster 2 H2B family member b (pseudogene), transcript variant 2
0.75	SLC20A1	solute carrier family 20 member 1
0.75	BEST1	bestrophin 1, transcript variant 8
0.75	CREB3L2	cAMP responsive element binding protein 3 like 2, transcript variant 1
0.76	ZNF506	zinc finger protein 506, transcript variant 2
0.76	DPF3	double PHD fingers 3, transcript variant 3
0.76	RANBP6	RAN binding protein 6, transcript variant 2
0.76	HERC3	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 3, transcript variant X9
0.76	DCSTAMP	dendrocyte expressed seven transmembrane protein, transcript variant 1
0.76	DTWD2	DTW domain containing 2, transcript variant 1
0.76	TPST1	tyrosylprotein sulfotransferase 1, transcript variant X6
0.76	CEP57L1	centrosomal protein 57 like 1, transcript variant X11
0.76	SEPTIN3	septin 3, transcript variant C
0.76	SSX2IP	SSX family member 2 interacting protein, transcript variant X3
0.76	PANK2	pantothenate kinase 2, transcript variant X5
0.76	NSL1	NSL1 component of MIS12 kinetochore complex, transcript variant 1
0.76	DNMBP	dynamamin binding protein, transcript variant 2
0.76	SKP2	S-phase kinase associated protein 2, transcript variant 3
0.76	PXK	PX domain containing serine/threonine kinase like, transcript variant X3
0.76	PCDH7	protocadherin 7, transcript variant X6
0.76	SPAST	spastin, transcript variant X4
0.76	MITF	melanocyte inducing transcription factor, transcript variant 12
0.76	ERCC4	ERCC excision repair 4, endonuclease catalytic subunit, transcript variant X3
0.76	RBL1	RB transcriptional corepressor like 1, transcript variant 2
0.76	PIGZ	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class Z, transcript variant X4
0.76	C19orf47	chromosome 19 open reading frame 47, transcript variant X5

0.76	HJURP	Holliday junction recognition protein, transcript variant 3
0.76	ACTR6	actin related protein 6, transcript variant 1
0.76	RSPH3	radial spoke head 3, transcript variant X2
0.76	SLF1	SMC5-SMC6 complex localization factor 1, transcript variant X1
0.76	UPRT	uracil phosphoribosyltransferase homolog, transcript variant 4
0.76	CKAP2L	cytoskeleton associated protein 2 like, transcript variant 2
0.76	ARHGAP32	Rho GTPase activating protein 32, transcript variant X5
0.76	ZNF701	zinc finger protein 701, transcript variant X3
0.76	ITGA4	integrin subunit alpha 4, transcript variant 1
0.76	ANKRD44	ankyrin repeat domain 44, transcript variant X6
0.76	KIAA1211	KIAA1211, transcript variant X8
0.76	ZFYVE9	zinc finger FYVE-type containing 9, transcript variant X1
0.76	MOSPD2	motile sperm domain containing 2, transcript variant 3
0.76	CCDC107	coiled-coil domain containing 107, transcript variant B
0.76	ENO2	enolase 2
0.76	MCEMP1	mast cell expressed membrane protein 1
0.76	BTD	biotinidase, transcript variant 4
0.76	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2, transcript variant 5
0.76	CEP250	centrosomal protein 250, transcript variant X15
0.76	PUS10	pseudouridine synthase 10, transcript variant X10
0.76	FAM168A	family with sequence similarity 168 member A, transcript variant 2
0.76	SLC49A3	solute carrier family 49 member 3, transcript variant X5
0.76	STAC2	SH3 and cysteine rich domain 2, transcript variant 2
0.76	ABCB9	ATP binding cassette subfamily B member 9, transcript variant X12
0.76	DCLRE1C	DNA cross-link repair 1C, transcript variant X1
0.76	C17orf75	chromosome 17 open reading frame 75
0.76	YPEL3	yippee like 3, transcript variant X1
0.76	ADCK2	aarF domain containing kinase 2, transcript variant X1
0.76	HEMK1	HemK methyltransferase family member 1, transcript variant X10
0.76	PANK1	pantothenate kinase 1, transcript variant alpha
0.76	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1, transcript variant X9
0.76	METTL6	methyltransferase like 6, transcript variant 2
0.76	WIPF1	WAS/WASL interacting protein family member 1, transcript variant 2
0.76	GLUL	glutamate-ammonia ligase, transcript variant X1

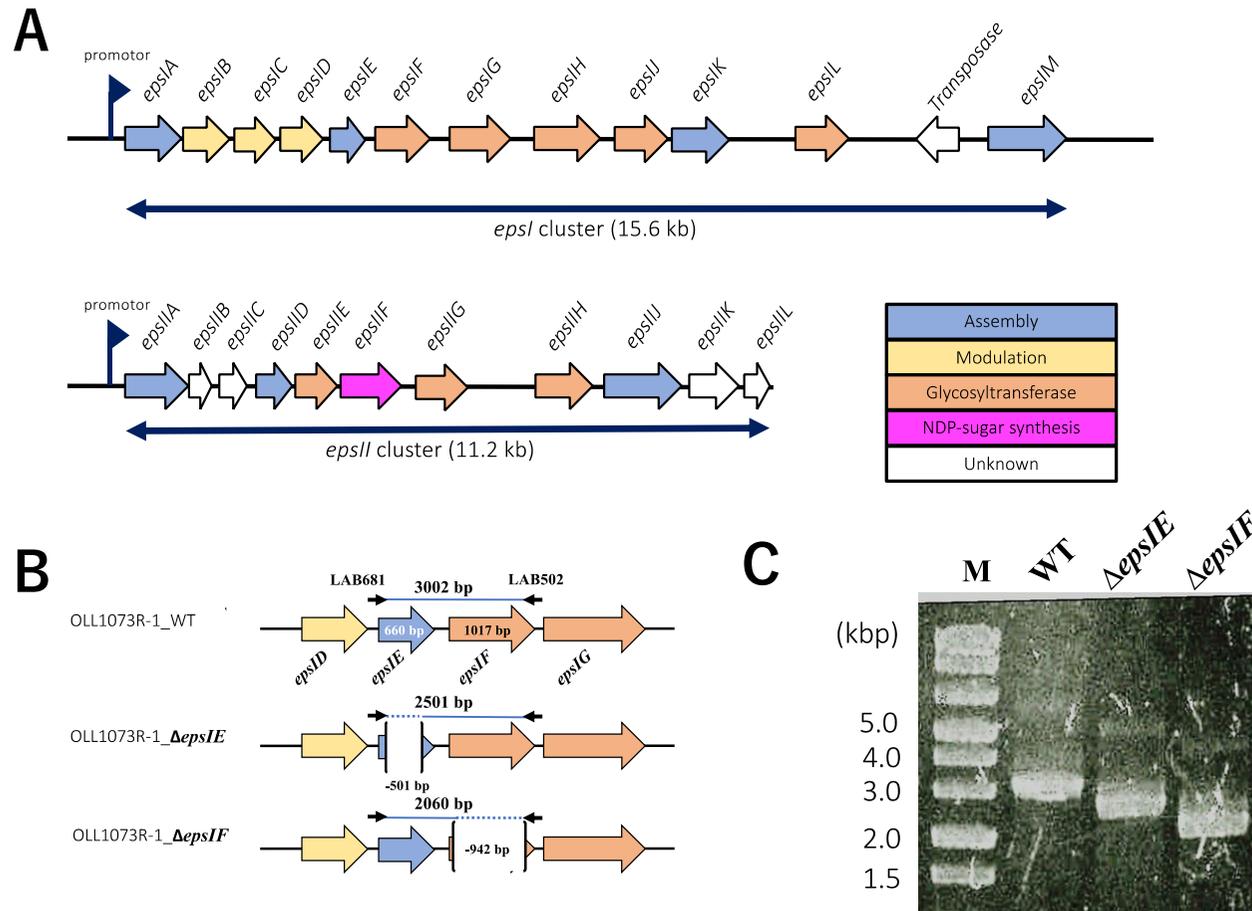
0.76	D2HGDH	D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, transcript variant X20
0.76	ENTPD5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5 (inactive), transcript variant X9
0.76	DOK3	docking protein 3, transcript variant X3
0.76	LIN7A	lin-7 homolog A, crumbs cell polarity complex component, transcript variant 3
0.76	SLC38A1	solute carrier family 38 member 1, transcript variant X3
0.76	TSPAN2	tetraspanin 2, transcript variant 1
0.76	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9 like, transcript variant 5
0.76	PDS5B	PDS5 cohesin associated factor B, transcript variant X3
0.76	ACAD8	acyl-CoA dehydrogenase family member 8, transcript variant X8
0.76	TBC1D13	TBC1 domain family member 13, transcript variant 2
0.76	PCCA	propionyl-CoA carboxylase subunit alpha, transcript variant X12
0.76	MCM8	minichromosome maintenance 8 homologous recombination repair factor, transcript variant X2
0.76	SOX4	SRY-box 4
0.76	LOC105375855	uncharacterized LOC105375855
0.76	ARHGAP22	Rho GTPase activating protein 22, transcript variant X18
0.76	NTSR1	neurotensin receptor 1, transcript variant X1
0.76	POGLUT3	protein O-glucosyltransferase 3, transcript variant 2
0.76	KNTC1	kinetochore associated 1, transcript variant X1
0.76	STK39	serine/threonine kinase 39, transcript variant X6
0.76	PRMT9	protein arginine methyltransferase 9, transcript variant 5
0.76	RCAN3	RCAN family member 3, transcript variant 9
0.76	LCORL	ligand dependent nuclear receptor corepressor like, transcript variant X9
0.76	UBXN2A	UBX domain protein 2A, transcript variant X7
0.76	EGLN1	egl-9 family hypoxia inducible factor 1, transcript variant X3
0.76	PARP9	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9, transcript variant 4
0.76	CCDC186	coiled-coil domain containing 186, transcript variant X1
0.76	SURF4	surfeit 4, transcript variant 3
0.76	GINS3	GINS complex subunit 3, transcript variant 3
0.76	AMBRA1	autophagy and beclin 1 regulator 1, transcript variant X7
0.76	CD101	CD101 molecule, transcript variant X1
0.76	CUEDC1	CUE domain containing 1, transcript variant X4
0.76	CXADR	CXADR Ig-like cell adhesion molecule, transcript variant X3
0.76	OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase, transcript variant 1h

0.76	TUBA4A	tubulin alpha 4a, transcript variant X1
0.76	TFDP2	transcription factor Dp-2, transcript variant 3
0.76	CEP120	centrosomal protein 120, transcript variant 2
0.76	FAM72A	family with sequence similarity 72 member A, transcript variant X7
0.76	PCDHB5	protocadherin beta 5
0.76	TBC1D9	TBC1 domain family member 9
0.76	ETV1	ETS variant 1, transcript variant 8
0.76	DOCK9	dedicator of cytokinesis 9, transcript variant 7
0.76	RAB15	RAB15, member RAS oncogene family, transcript variant X1
0.76	ANKS6	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6
0.76	GCLC	glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, transcript variant X1
0.76	ZNF808	zinc finger protein 808, transcript variant 4
0.76	RECK	reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs, transcript variant X5
0.76	DTNA	dystrobrevin alpha, transcript variant X27
0.76	MGA	MAX dimerization protein MGA, transcript variant X22
0.76	FZD3	frizzled class receptor 3, transcript variant X2
0.76	PRSS36	serine protease 36, transcript variant 3
0.76	SWT1	SWT1 RNA endoribonuclease homolog, transcript variant X10
0.76	FIGN	fidgetin, microtubule severing factor, transcript variant 1
0.76	MSH2	mutS homolog 2, transcript variant 1
0.76	HMX3	H6 family homeobox 3
0.76	ING5	inhibitor of growth family member 5, transcript variant X7
0.76	ATAD5	ATPase family AAA domain containing 5, transcript variant X1
0.76	CASP8	caspase 8, transcript variant X11
0.76	ZMYM5	zinc finger MYM-type containing 5, transcript variant 1
0.76	METTL15	methyltransferase like 15, transcript variant X3
0.76	DENND1B	DENN domain containing 1B, transcript variant X12
0.76	TBC1D31	TBC1 domain family member 31, transcript variant X5
0.76	KCNIP2	potassium voltage-gated channel interacting protein 2, transcript variant 6
0.76	PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase, transcript variant 3
0.76	C14orf93	chromosome 14 open reading frame 93, transcript variant 5
0.76	CAMK2B	calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta, transcript variant 1
0.76	ANKZF1	ankyrin repeat and zinc finger peptidyl tRNA hydrolase 1, transcript variant 2
0.76	SBF2	SET binding factor 2, transcript variant X11
0.76	DISP1	dispatched RND transporter family member 1, transcript variant X6

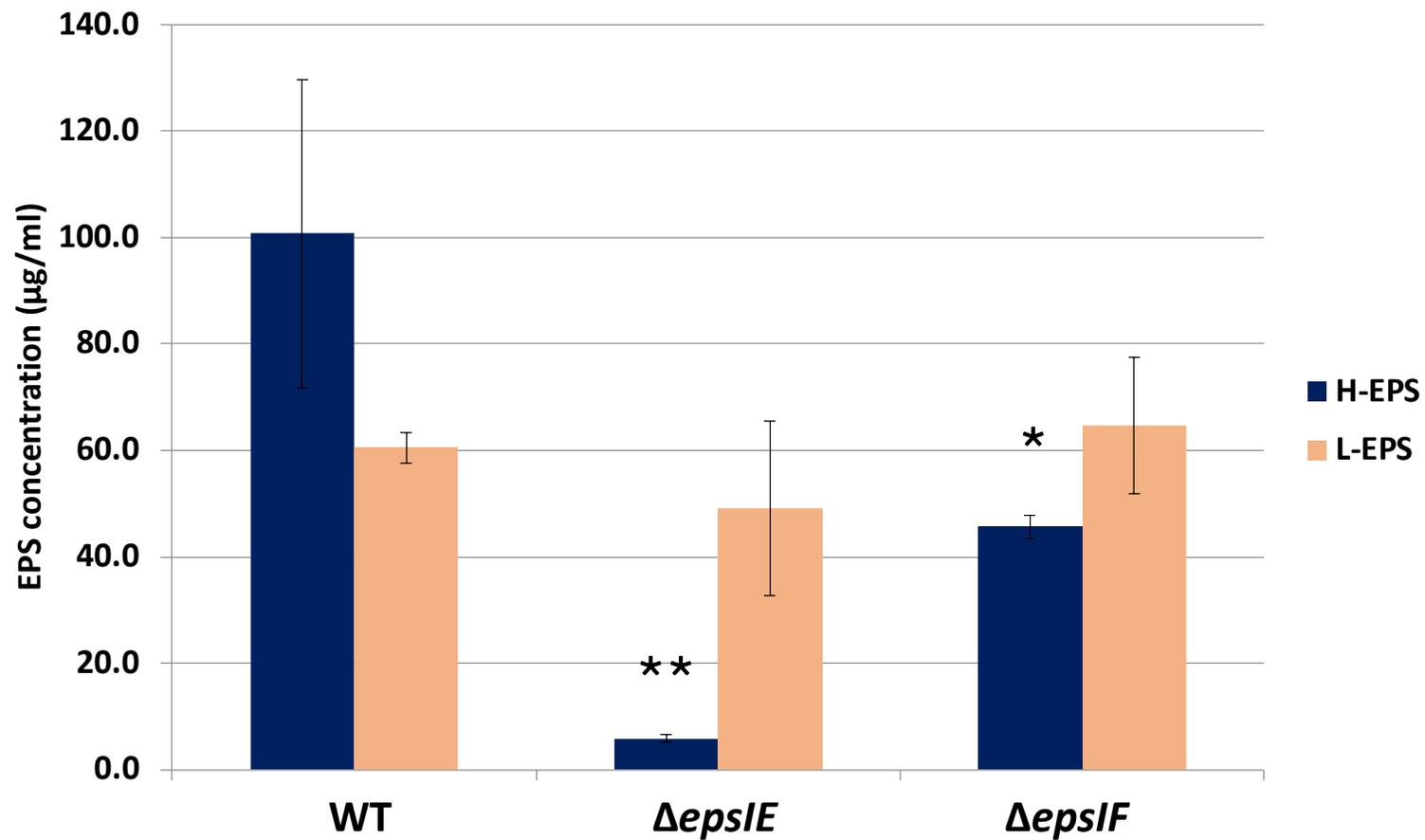
0.76	TMEM144	transmembrane protein 144, transcript variant X2
0.76	ASB13	ankyrin repeat and SOCS box containing 13, transcript variant 2
0.76	STK17B	serine/threonine kinase 17b
0.76	PITPNM2	phosphatidylinositol transfer protein membrane associated 2, transcript variant 1
0.76	DGKD	diacylglycerol kinase delta, transcript variant X14
0.76	FHL2	four and a half LIM domains 2, transcript variant 9
0.76	PTPDC1	protein tyrosine phosphatase domain containing 1, transcript variant X2
0.76	BLM	BLM RecQ like helicase, transcript variant 2
0.76	MOB1B	MOB kinase activator 1B, transcript variant X2
0.76	FCHSD1	FCH and double SH3 domains 1, transcript variant X10
0.76	JRK	Jrk helix-turn-helix protein, transcript variant 2
0.76	CHST13	carbohydrate sulfotransferase 13
0.76	LINC00623	long intergenic non-protein coding RNA 623, transcript variant 1
0.76	CDK20	cyclin dependent kinase 20, transcript variant 5
0.76	TPRG1	tumor protein p63 regulated 1, transcript variant X15
0.76	UGT8	UDP glycosyltransferase 8, transcript variant X3
0.76	DIS3L	DIS3 like exosome 3'-5' exoribonuclease, transcript variant 4
0.76	MAP3K12	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12, transcript variant X1
0.76	SLC25A13	solute carrier family 25 member 13, transcript variant X7
0.76	PTCD2	pentatricopeptide repeat domain 2, transcript variant X2
0.76	BMP2K	BMP2 inducible kinase, transcript variant 1
0.76	SIGLEC9	sialic acid binding Ig like lectin 9, transcript variant X1
0.76	PTPN13	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 13, transcript variant X6
0.76	RRAGB	Ras related GTP binding B, transcript variant X8
0.76	FGL2	fibrinogen like 2
0.76	LANCL3	LanC like 3, transcript variant 1
0.76	KAZN	kazrin, periplakin interacting protein, transcript variant G
0.76	B4GALNT1	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 1, transcript variant X2
0.76	HAUS1	HAUS augmin like complex subunit 1, transcript variant 2
0.76	PPP1R12B	protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B, transcript variant X4
0.76	LMBR1L	limb development membrane protein 1 like, transcript variant X3
0.76	PRDM10	PR/SET domain 10, transcript variant 4
0.76	MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14, transcript variant X2
0.76	DHTKD1	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1

0.76	ERI1	exoribonuclease 1, transcript variant 3
0.76	ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1, transcript variant X2
0.76	MACO1	macoilin 1, transcript variant X1
0.76	WDR19	WD repeat domain 19, transcript variant X6
0.76	TMEM39B	transmembrane protein 39B, transcript variant X2
0.76	ADCY1	adenylate cyclase 1, transcript variant 1
0.76	THEMIS2	thymocyte selection associated family member 2, transcript variant X1
0.76	PAQR5	progesterin and adipoQ receptor family member 5, transcript variant X10
0.76	GTPBP10	GTP binding protein 10, transcript variant 1
0.76	ST7	suppression of tumorigenicity 7, transcript variant 10
0.76	PCDHGB4	protocadherin gamma subfamily B, 4, transcript variant 2
0.76	RFX8	RFX family member 8, lacking RFX DNA binding domain, transcript variant X1
0.76	ACBD5	acyl-CoA binding domain containing 5, transcript variant X11
0.76	VLDLR	very low density lipoprotein receptor, transcript variant X2
0.76	SGO1	shugoshin 1, transcript variant 14
0.76	ZNF528	zinc finger protein 528, transcript variant X6
0.76	JADE1	jade family PHD finger 1, transcript variant X4
0.76	ZNF141	zinc finger protein 141, transcript variant X1
0.76	MRPL55	mitochondrial ribosomal protein L55, transcript variant 3
0.76	CHRM3	cholinergic receptor muscarinic 3, transcript variant X4
0.76	VSIG10	V-set and immunoglobulin domain containing 10, transcript variant X6
0.76	ZBTB7C	zinc finger and BTB domain containing 7C, transcript variant X8
0.76	DOK1	docking protein 1, transcript variant X1
0.76	VASH1	vasohibin 1, transcript variant X6
0.76	SCAMP5	secretory carrier membrane protein 5, transcript variant X2
0.76	HPS4	HPS4 biogenesis of lysosomal organelles complex 3 subunit 2, transcript variant 13
0.76	ZNF213	zinc finger protein 213, transcript variant 2
0.76	PEX6	peroxisomal biogenesis factor 6, transcript variant X2
0.76	TK2	thymidine kinase 2, transcript variant 7
0.76	LOC105369828	uncharacterized LOC105369828, transcript variant X2
0.76	PRIMPOL	primase and DNA directed polymerase, transcript variant 7
0.76	ABCA1	ATP binding cassette subfamily A member 1, transcript variant X12
0.76	AMDHD2	amidohydrolase domain containing 2, transcript variant X1

0.76	BMI1	BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger
0.76	TRIM38	tripartite motif containing 38, transcript variant X6
0.76	MUTYH	mutY DNA glycosylase, transcript variant X10
0.76	NAA16	N(alpha)-acetyltransferase 16, NatA auxiliary subunit, transcript variant X6
0.76	CRLS1	cardiolipin synthase 1, transcript variant 6
0.76	TPX2	TPX2 microtubule nucleation factor, transcript variant X3
0.76	KIAA1109	KIAA1109, transcript variant X3
0.76	DAPK1	death associated protein kinase 1, transcript variant 1
0.76	PAQR3	progesterin and adipoQ receptor family member 3, transcript variant 6
0.76	SLC36A1	solute carrier family 36 member 1, transcript variant X23
0.76	FANCM	FA complementation group M, transcript variant X6
0.76	RAP1GAP	RAP1 GTPase activating protein, transcript variant X23
0.76	ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6, transcript variant 18
0.76	IL4R	interleukin 4 receptor, transcript variant X8
0.76	LIN9	lin-9 DREAM MuvB core complex component, transcript variant 6
0.76	MIS18BP1	MIS18 binding protein 1, transcript variant X5
0.76	CDCA2	cell division cycle associated 2, transcript variant 1
0.76	IQSEC2	IQ motif and Sec7 domain 2, transcript variant X13
0.76	CHEK2	checkpoint kinase 2, transcript variant X3



Supplementary Figure 1. *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 株の持つ *eps* 合成クラスターの模式図 (A)、*eps* 遺伝子欠損株の構築模式図 (B)、欠損周辺領域を増幅した PCR 産物の電気泳動写真 (C)



Supplementary Figure 2. *L. bulgaricus* OLL1073 R-1 野生株 (WT)、*epsIE* 欠損株 ($\Delta epsIE$)、*epsIF* 欠損株($\Delta epsIF$) が産生する高分子 EPS 量 (H-EPS) および低分子 EPS 量(L-EPS) (明治大学 中野, 2023) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

本研究と関連した報告

原著論文発表

- **Kudo H**, Miyanaga K, Yamamoto N. Immunomodulatory effects of extracellular glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of exopolysaccharide-producing *Lactiplantibacillus plantarum* JCM 1149. *Food Funct.* 2023;14(1):489-499. Published 2023 Jan 3. doi:10.1039/d2fo02927h
- **H. Kudo**, M. Nakano, A. Kikuchi, M. Fujisawa, S. Suzuki, R. Sekiguchi, N. Yamamoto, S. Fujiwara and Y. Sasaki, Identification of *eps* genes need for two types of exopolysaccharide syntheses in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 with gene-knockout strains 投稿準備中(2023年1月24日時点)

学会発表

- 演題：*Lactiplantibacillus plantarum* 株の免疫誘導活性比較による主要成分の探索
著者：工藤 大夢、守谷 直子、木元 広実、岩谷 駿、宮永 一彦、山本 直之
学会：日本乳酸菌学会 2022 年度大会
形式：口頭発表
時期：2022 年 7 月 8 日
- 演題：*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 株の細胞外多糖合成遺伝子欠損が生育と EPS 合成に与える影響
著者：藤澤 みのり、工藤 大夢、松本 悠輔、関口 里菜、鈴木 駿吾、藤原 慎、佐々木 泰子
学会：日本乳酸菌学会 2020 年度大会
形式：口頭発表
時期：2020 年 11 月 27 日

謝辞

本研究を遂行し博士論文を作成するにあたって、研究方針に関して技術的な側面も含め多様な観点から御指導いただいただけでなく、学生生活においても様々な相談に応じていただくなど多大な御助力をいただきました。

本学教授 山本 直之 博士に心から感謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究における実験手法、解析手法等について多くの御助言をいただきました。

自治医科大学准教授 宮永 一彦 博士並びにアステラス製薬株式会社 岩谷 駿 博士に深く、深く感謝いたします。

貴重な財産である *L. gularicus* OLL1073R-1 株、同菌株 $\Delta epsIE$ 株、同菌株 $\Delta epsIF$ 株の菌株ストックおよび関連情報を提供いただき、本研究を一層深めることができました。

明治大学農学部農芸化学科 佐々木 泰子 博士および同大学応用生化学研究室 中野 美咲氏並びに同大学発酵食品学研究室の皆様にご心からの感謝を申し上げます。

9種類もの *L. plantarum* 株ストックを提供いただき、本研究の根幹である *L. plantarum* 株間での多様な比較解析を行うことができました。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 木元 広実 博士並びに 畜産研究部門 守谷 直子 博士に心より御礼申し上げます。

本研究に関して、共に様々な議論を行い、また様々な観点で研究生生活を充実したものにさせていただいた本学の諸先輩方、同級生および後輩の皆様にご心から感謝いたします。

博士課程において様々な御支援をいただきました本学生命理工学院生命理工学系ライフエンジニアリングコース事務員の方々に心より感謝いたします。

最後に、私生活を充実したものと研究に一層の励みを与えてくれた大切な友人諸氏に、そして、いつも研究に集中できるよう実生活を支えてくれた大切な家族に、深く感謝いたします。

令和5年2月

工藤 大夢

