

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Bacillus subtilis natto が産生する分子シャペロンGroELの免疫調節作用
Title(English)	
著者(和文)	上杉泰介
Author(English)	Taisuke Uesugi
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12520号, 授与年月日:2023年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山本 直之,小畠 英理,小倉 俊一郎,平沢 敬,門之園 哲哉
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12520号, Conferred date:2023/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

Bacillus subtilis natto が産生する 分子シャペロン GroEL 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

上杉 泰介

2023 年 (令和 5 年)

目次

第 1 章 序論	9
1-1. はじめに	9
1-2. 納豆の健康増進効果	9
1-3. 先行研究における <i>Bacillus</i> 属細菌の免疫調節因子と作用	10
1-4. 納豆菌の遺伝的および生化学的特徴	11
1-5. 腸管免疫系における自然免疫応答	12
1-6. 本研究の目的と研究内容	14
1-7. 参考文献	16
第 2 章 <i>Bacillus subtilis</i> natto 由来免疫調節因子の同定	18
2-1. はじめに	18
2-2. 実験材料および実験方法	20
2-2-1. 使用菌株および主な試薬と機器	
2-2-2. Trypticase soy broth の調製	
2-2-3. <i>B. subtilis</i> natto の分離と同定	
2-2-4. 培養菌体および上清画分の調製	
2-2-5. ヒト由来単球細胞 THP-1 の培養と分化	
2-2-6. サイトカイン産生誘導と ELISA 法による定量	
2-2-7. 表層タンパク質およびリポタイコ酸の抽出	
2-2-8. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画	
2-2-9. SDS-PAGE によるタンパク質の分離	
2-2-10. プロテオーム解析によるタンパク質の同定	
2-2-11. ウェスタンブロッティングによる GroEL の検出	
2-2-12. 抗体を用いた GroEL のアフィニティー精製	
2-2-13. 抗体添加による免疫調節作用の評価	
2-2-14. 統計解析	

2-3. 結果	25
2-3-1. 市販納豆から 23 種の <i>B. subtilis</i> natto 株の分離と同定	
2-3-2. <i>B. subtilis</i> natto 株の免疫調節活性評価	
2-3-3. 表層タンパク質および LTA を含む各種画分の分析	
2-3-4. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる <i>B. subtilis</i> natto 培養上清の分析	
2-3-5. プロテオーム解析による免疫調節因子の同定	
2-3-6. ウェスタンブロッティングによる GroEL の検出	
2-3-7. 免疫調節作用における抗 GroEL 抗体の影響	
2-3-8. 免疫調節作用における抗 GroEL 抗体による活性阻害評価	
2-4. 参考文献	35
第 3 章 <i>B. subtilis</i> natto 由来 GroEL の免疫調節作用	36
3-1. はじめに	36
3-2. 実験材料および実験方法	38
3-2-1. 樹状細胞における GroEL 認識レセプターの推測	
3-2-2 q-PCR 法	
3-2-3. GroEL の免疫調節作用の経時的変化評価	
3-2-4. RNA シークエンシングによる樹状細胞内の遺伝子発現解析	
3-2-5. 統計解析	
3-3. 結果	40
3-3-1. GroEL の免疫調節作用における抗 TLR 抗体の影響	
3-3-2. GroEL の免疫調節作用の経時変化	
3-3-3. GroEL による樹状細胞内遺伝子発現の変化	
3-4. 参考文献	45

第4章 <i>B. subtilis</i> natto の GroEL 分泌に関する解析	46
4-1. はじめに	46
4-2. 実験材料および実験方法	48
4-2-1. 使用菌株	
4-2-2. <i>B. subtilis</i> natto の全ゲノム解析	"
4-2-3. RNA シークエンシングによる菌体内の遺伝子発現解析	
4-2-4. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察	
4-2-5. <i>B. subtilis</i> natto 菌体の蛍光免疫染色	
4-2-6. 培養上清のメタボローム解析	
4-2-7. LC-MS/MS による分析	
4-2-8. 芽胞形成率の測定	
4-3. 結果	52
4-3-1. <i>B. subtilis</i> natto の全ゲノム解析	
4-3-2. 菌株間での菌体内遺伝子発現の比較	
4-3-3. 走査型電子顕微鏡による菌体形態の比較	
4-3-4. 免疫蛍光染色による菌体表層での GroEL 発現比較	
4-3-5. 培養上清中の代謝物と免疫調節作用の相関解析	
4-3-6. 免疫調節作用に対する芽胞化の影響	
4-4. 参考文献	64
 第5章 総括	 65
5-1. 本研究のまとめ	65
5-2. 考察	68
5-2-1. 腸管免疫系を介した <i>B. subtilis</i> natto 株の免疫調節作用	
5-2-2. 分子シャペロン GroEL の抗炎症機能	
5-2-3. 納豆菌の細胞外 GroEL 分泌メカニズム	
5-2-4. 納豆の免疫調節作用	
5-3. 結論	75

5-4. 参考文献	76
付録	78
本研究と関連した報告	96
謝辞	97

略語表

APC : Antigen presenting cell

(抗原提示細胞)

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

(バチルス サブチルス)

B. subtilis natto : *Bacillus subtilis natto*

(バチルス サブチルス 亜種 ナットウ)

CBB : Coomassie brilliant blue

(クマシーブリリアントブルー)

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)

FBS : Fetal bovine serum

(ウシ胎児血清)

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. acidophilus : *Lactobacillus acidophilus*

(ラクトバシルス アシドフィラス)

LPS : Lipopolysaccharide

(リポ多糖)

MALDI-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)

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)

第 1 章 序論

1-1. はじめに

我々の消化管には約 1,000 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、遺伝的要因や外部環境からの刺激による免疫系発達などにより、個人それぞれが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¹。乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスの保健効果に関する報告は、メチニコフ博士が発酵乳の摂取により白血球が活性化することを発見したことから「不老長寿説」を提唱し、1908 年ノーベル生理学・医学賞を受賞したことから始まる。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、Fuller 博士らによって提案された¹。その後、世界に先駆けて機能性食品の制度化（1995 年度）がきっかけとなり、我が国が機能性プロバイオティクス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これまで困難であった腸内細菌叢の網羅的解析が容易になったことで、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。

1-2. 納豆の健康増進効果

日本の伝統的な発酵食品として長年親しまれている大豆発酵製品「納豆」は、1985 年頃から比べると、現在の国内売上は約 2 倍の 2,000 億円に達しており、国民的発酵食品といっても過言ではない²。納豆の製造工程は、蒸煮した大豆に枯草菌 *Bacillus subtilis* の亜種である納豆菌 *B. subtilis* natto の胞子を添加し、適温適湿にて発酵させることにより製造される。その製造工程の簡素さとは対照的に、納豆発酵は複雑な生物学的過程から構成されていると考えられる。すなわち、①大豆表面上での納豆菌の生育、②プロテアーゼの分泌と大豆蛋白質の分解、③オリゴペプチドやアミノ酸の細胞内への取り込みと代謝、④ D,L-グルタミン酸 (Glu) のラセミ化と合成、⑤納豆の糸の主成分ポリグルタミン酸 (γ -PGA) の生産と分泌などである。そして、これらの複雑な過程から製造される納豆が有する健康増進効果に近年に注目が集まっている³。納豆の代表的な健康機能として、ナットウキナーゼによる血栓予防や、ビタミン K2 による骨折予防、大豆イソフラボンによる更年期症状の改善、納豆独自の粘着成分であるポリグルタミン酸 (γ -PGA) による血糖値上昇の抑制など、様々な効果が知られている³。これらの効果のうち、ナットウキナーゼやビタミン K2、 γ -PGA などは納豆菌による発酵生産において産生される⁵。45-74 歳の男女約 9 万人を対象に約 15 年間追跡した調査において、大豆食品と発酵性大豆食品（納豆、みそ）の摂取量と死亡リスクの

関連を調べた結果、総大豆食品の摂取量は死亡との間には関連が見られなかった一方、納豆に代表される発酵性大豆食品の摂取量が多いと死亡のリスクが低くなる可能性が示唆された⁴。

1-3. 先行研究における *Bacillus* 属細菌の免疫調節因子と作用

納豆菌が属する *Bacillus* 属細菌は自然環境に広く生息するグラム陽性細菌であり、タンパク質を分解するプロテアーゼ活性が比較的高く、環境中の蛋白質分解により遊離したペプチドやアミノ酸を窒素源として効率的に利用することができる⁶。また、*Bacillus* 属細菌は芽胞形成細菌であり、環境によって菌体増殖や代謝活動が活性化状態である栄養細胞および休眠状態である芽胞細胞の 2 つの状態に切り替えることが可能である。このような特徴を有する *Bacillus* 属細菌は近年、新たなプロバイオティクスとしての報告も増加しており、乳酸菌など他のプロバイオティクスが有していない機能として、ヒトが経口摂取した場合に芽胞形成によって胃酸や胆汁由来の酵素分解を受けにくく、熱や水分などに対しても高い安定性を有するという特徴がある⁷。*Bacillus* 属細菌は好気性細菌であり、比較的嫌気性の高い環境である小腸や大腸などの消化管内に定着することは稀であるが、腸内細菌叢の多様性や構成を変化させる効果があることが特に豚や鶏などの動物試験において多く報告されている⁸。ヒトにおいても、さまざまな *Bacillus* 属細菌が抗菌活性、抗酸化活性、免疫調節活性などを示すことが報告されている⁹。これらの活性は、抗菌ペプチドや小さな細胞外エフェクター分子を産生する能力、および腸管上皮への接着および付着機能により宿主とクロストークすることで機能している¹⁰。最近の研究では、*B. subtilis* がカンジダ属菌の増殖を有意に抑制することが示され、口腔カンジダ症に対する代替療法として提案され¹¹、*Bacillus clausii* がヒトの腸粘膜における炎症抑制や腸管防御作用に効果があることが報告されている¹²。また、以下に示すように現在も *Bacillus* 属細菌を用いた免疫調節作用に関する複数のヒト臨床試験が進行中であり、*Bacillus* 属細菌に対するプロバイオティクスとしての研究は今後さらに発展すると考えられている⁹ (Table 1-1)。

Table 1-1. *Bacillus* 属細菌を用いた免疫調節に関するヒト臨床試験⁹

Strain	Marker	Phenotype
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC11782BP	IL-12	pro-inflammatory
<i>Bacillus subtilis</i> CU1	IFN- γ	
<i>Bacillus coagulans</i> GBI-30	IL-6	
<i>Bacillus coagulans</i> GBI-30	IL-10	anti-inflammatory
<i>Bacillus subtilis</i> PB6	IL-10	
<i>Bacillus coagulans</i> MTCC5856	IL-22	
<i>Bacillus clausii</i>	IL-10	enhance intestinal barrier function

1-4. 納豆菌の遺伝的および生化学的特徴

納豆菌 *B. subtilis* natto は遺伝的に不安定である上にコンピテンス能が低く遺伝学的操作に適していないこと、さらに同種とされる枯草菌 *B. subtilis* 168 株の分子生物学的扱いが極めて容易であることから、これまで *B. subtilis* 種細菌としては 168 株を対象とした解析が中心に行われ、納豆菌を対象とした孢子形成やタンパク質分泌などの生化学的事象の解析を含め、納豆発酵そのものを分子レベルで理解しようとする試みはほとんどなされてこなかった¹³。しかし近年になり、*B. subtilis* 168 株では納豆を製造できず、得られた知見をそのまま納豆菌には適用できないため、納豆製造が可能な *B. subtilis* natto 株を用いて解析を行う必要性が生じ、*B. subtilis* natto の遺伝的特徴に関する解析も実施されるようになった。*B. subtilis* natto BEST195 株と *B. subtilis* 168 株の比較ゲノムの結果、 γ -PGA を生産できない *B. subtilis* 168 株では、 γ -PGA 生産に関連する *degQ* と *swrAA* の 2 領域において、*degQ* プロモーター領域における 1 塩基置換や *swrAA* 領域での 1 塩基挿入があり、その結果、ORF が破壊され、*swrAA* の偽遺伝子化が誘導されていることが明らかとなっている¹⁴。また、*B. subtilis* natto は ComX フェロモンと呼ばれる 27 アミノ酸からなるペプチドを細胞内で産生することができ、この ComX は細胞膜に存在する ComQ を介して細胞外に分泌される。発酵において培地中に排出された ComX が一定濃度以上に高まると細胞膜上の受容体 ComP に結合し、下流の ComA を活性化させることにより γ -PGA 産生に関連する遺伝子発現が活性化され、Com 遺伝子群が γ -PGA 産生のクオラムセンシング分子として機能しているが *B. subtilis* 168 株ではこの Com 遺伝子群のほとんどが欠失していることが分かった¹⁴ (Fig. 1-1)。また、 γ -PGA は Glu 代謝とも密接に関わっていること

が知られており、栄養の不足する定常期になると、 γ -PGA が分解された結果生じる Glu が直ちに菌体内に取り込まれて利用され、タンパク合成等に使われることで納豆生産における糸引きが悪化することが報告されている¹⁵。

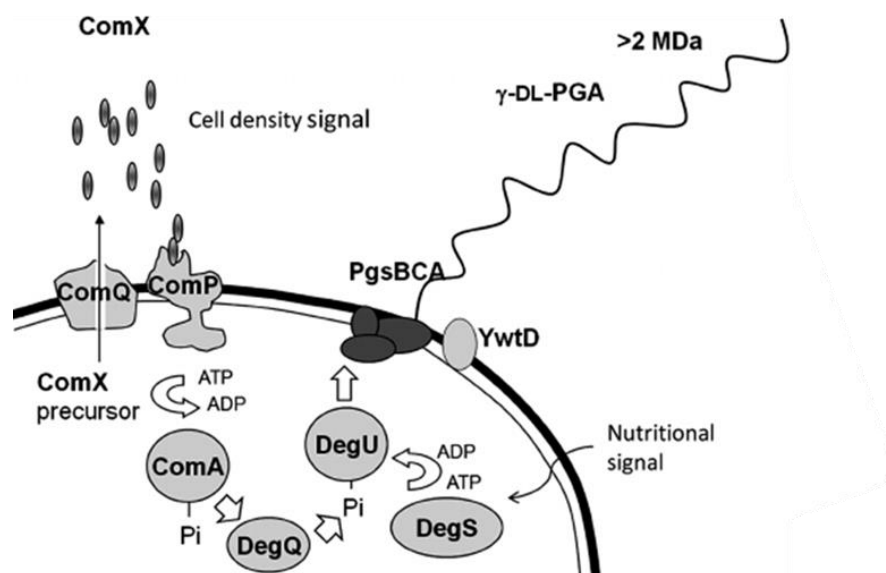


Fig. 1-1. *Bacillus subtilis* natto の γ -PGA 合成に関する制御機構

1-5. 腸管免疫系における自然免疫応答

乳酸菌などのプロバイオティクスは経口摂取されることから、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¹⁶。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）以上とも言われており、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、病原性を呈する場合があります、腸管免疫系により 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¹⁷。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¹⁸（Table. 1-2）。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（Fig. 1-2）。

Table 1-2. 哺乳類 TLR の種類と局在、および特異的結合成分

TLR	局在	特異的結合成分
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

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。乳酸菌に関してはこれまで様々な菌体成分に免疫調節作用が報告されてきているが、納豆菌の効果に関しても近年いくつか報告されてきている¹⁹⁻²¹。例えば、*B. subtilis* natto B4 株のマウスマクロファージに対する免疫調節作用を解析した結果、芽胞細胞による刺激によってマクロファージ細胞内の一酸化窒素（NO）を増加させるとともに、炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-6、IL-12 や抗炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-10 を増加させることで免疫機能を高めることが報告されている²²。

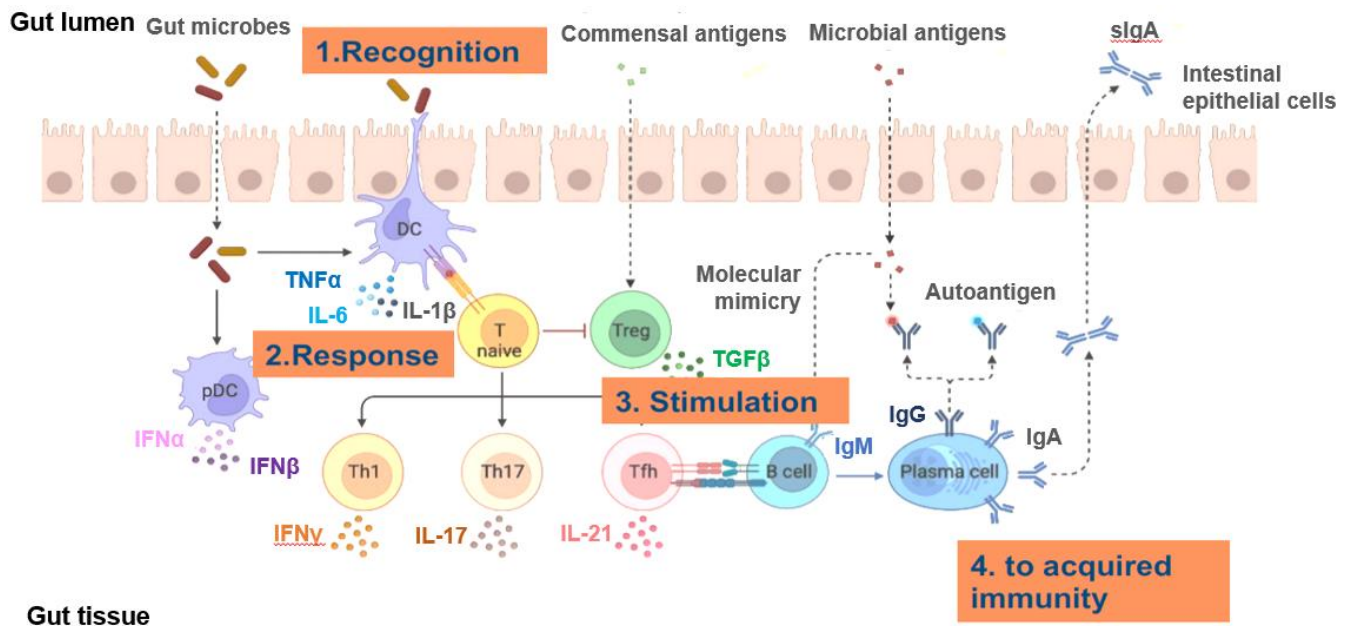


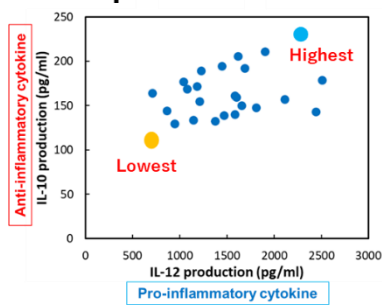
Fig. 1-2. プロバイオティクスによる腸管免疫系の活性化

1-6. 本研究の目的と研究内容

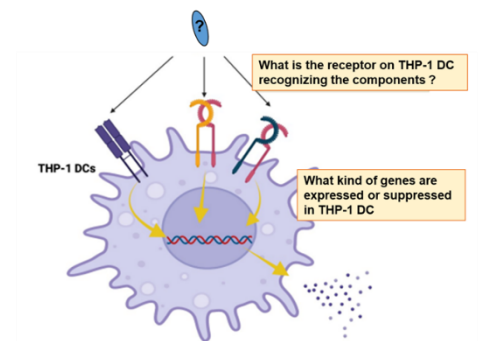
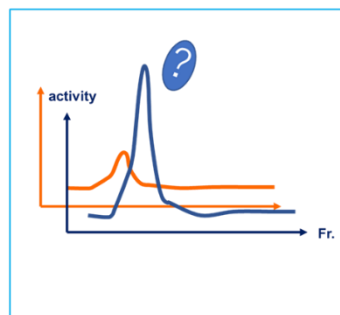
これまで納豆の健康増進作用に関する多くの報告がなされているが、そのほとんどが発酵過程で産生されるナットウキナーゼやビタミン K2 などの成分に関する効果であり、納豆菌自身の機能について解析された報告は多くない。一方で、納豆の食習慣と各種死因リスクに関するコホート研究では、納豆の食習慣が多いほど感染症などの循環器系疾患による死亡リスクが顕著に低減されるといった報告があることから納豆に高い免疫調節作用がある可能性が考えられる⁴。近年では、乳酸菌などのプロバイオティクス同様に様々な *Bacillus* 属細菌に高い免疫調節活性が報告され、ヒト臨床試験が実施されている背景からも納豆菌に同等以上の免疫調節作用が確認できれば十分に食経験があり安全性の高い新たなプロバイオティクスとして開発し産業利用することも可能となる。また、*Bacillus* 属細菌でも免疫調節作用が確認されている一方で、その主たる作用因子やメカニズムはほとんどの報告において十分説明されるに至っていない。

そこで、本研究では 23 種類の *B. subtilis* natto 株を用いて、ヒト由来単球細胞 THP-1 を分化させた樹状細胞からの各種免疫サイトカイン産生能の比較解析による納豆菌の免疫調節作用について評価し、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経路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内で発現誘導され生産されているのかに関しても解析を加えた (Fig. 1-3)。

① Identification of key immunomodulatory components from comparative study



② Elucidation of immunomodulatory actions on dendritic cells (DC)



③ Prediction of secretion mechanism of active component in *B. subtilis* natto

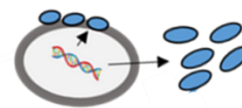


Fig. 1-3. 本研究の目的のイラスト

1-7. 参考文献

1. Mackowiak, PA. et al. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Front. Public. Health.*, **2013**, *1*, 52.
2. Afzaal, M. et al. Nutritional Health Perspective of Natto: A Critical Review. *Biochemistry Research International*, **2022**, 9–18.
3. Ashiuchi, M. et al. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly-gamma-glutamate. *J. Biochem.*, **1998**, *123*, 1156–1163.
4. Katagiri, R. et al. Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Association of soy and fermented soy product intake with total and cause specific mortality: Prospective cohort study. *BMJ*, **2020**, *29*, m34.
5. Ogawa, Y. et al. Efficient Production of γ -Polyglutamic Acid by *Bacillus subtilis* (natto) in Jar Fermenters. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **1997**, *61*, 1684-1687.
6. Nugroho, F. et al. Characterization of a new sigma-K-dependent peptidoglycan hydrolase gene that plays a role in *Bacillus subtilis* mother cell lysis. *J. Bacteriol.*, **1999**, *181*, 6230–6237.
7. Palop, A. et al. Heat Resistance of Native and Demineralized Spores of *Bacillus subtilis* Sporulated at Different Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1999**, *65*, 1316–1319.
8. Inooka, S. et al. The effect of *Bacillus* natto on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. *Poult. Sci.*, **1986**, *65*, 1217–1219.
9. Hong, HA. et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2005**, *29*, 813–835.
10. Thomas, CM. et al. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbe.*, **2010**, *1*, 148–163.
11. Lei, S. et al. Capability of iturin from *Bacillus subtilis* to inhibit *Candida albicans* in vitro and in vivo. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2019**, *103*, 4377-4392.
12. Bueno, CP. et al. *Bacillus clausii* for Gastrointestinal Disorders: A Narrative Literature Review. *Adv. Ther.*, **2022**, *39*, 4854-4874.
13. Zeigler, DR. et al. The Origins of 168, W23, and Other *Bacillus subtilis* Legacy Strains. *J. Bacteriol.*, **2008**, *190*, 6983–6995.
14. Nishito, Y. et al. Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data. *BMC Genomics*, **2010**, *11*, 243.
15. Kubo, Y. et al. A high-accuracy method for quantifying poly-gamma-glutamic

- acid content in natto. *Food Science and Technology Research*, **2021**, *27*, 463-471
16. Llewellyn, A. et al. Probiotic modulation of innate cell pathogen sensing and signaling events. *Nutrients*, **2017**, *9*, 1156.
 17. Macfarlan, GT. et al. Probiotics, infection and immunity. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **2002**, *15*, 501–506.
 18. Rescigno, M. et al. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J. Exp. Med.*, **2006**, *203*, 2841–2852.
 19. Hosoi, T. et al. Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (natto) spores are dependent upon dietary components. *Can. J. Microbiol.*, **1999**, *45*, 59–66.
 20. Hosoi, T. et al. Improved growth and viability of *Lactobacilli* in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin. *Can. J. Microbiol.*, **2000**, *46*, 892–897.
 21. Samanya, M. et al. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **2002**, *133*, 95–104.
 22. Xu X. et al. Immunomodulatory effects of *Bacillus subtilis* (natto) B4 spores on murine macrophages. *Microbiol. Immunol.*, **2012**, *56*, 817-824.

第 2 章 *Bacillus subtilis* natto 由来免疫調節因子の同定

2-1. はじめに

納豆製造においては、 γ PGA などの粘性物質の産生が品質を左右すると考えられることから、市販品に使用される *B. subtilis* natto 株を市販製品から分離し、主要菌株の同定と各種サイトカインの産生評価を行った。納豆の製造においては、原料に大豆を用いて、浸漬、蒸煮、納豆菌散布、充填、発酵、熟成の順に工程が進み、殺菌処理はされずに製品化されるのが一般的である。このため、市販の納豆製品中には、ほとんどの納豆菌が芽胞化した生細胞の状態で存在している¹。

自然免疫では、樹状細胞（Dendritic cell：DC）が腸管内腔の腸内細菌を認識し、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。乳酸菌などのプロバイオティクスに関してはこれまで様々な菌について免疫調節作用があることが報告されている²。

そこで、本章でも腸管免疫においてプロバイオティクスを認識し免疫調節作用の制御を司る樹状細胞と同様の表現型を有する培養細胞を使用するために、ヒト単球由来培養細胞である THP-1 細胞を用いて樹状細胞様表現型に分化させた THP-1 DC を調製し、納豆菌の免疫調節作用について評価することとした。また、樹状細胞が免疫機能を高めるために様々なサイトカインを産生することが知られている³。特に代表的な成分として炎症性サイトカインである IL-12 や抗炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-10 を指標に、プロバイオティクスによる刺激に対し、DC のサイトカイン産生量変化を解析することで、免疫機能にどのような変化が生じたか解析することが一般的である³。そこで、納豆菌の免疫調節作用の指標として、炎症性サイトカイン：IL-12、抗炎症性サイトカイン：IL-10 を指標に誘導活性を解析することとした。

公的研究機関などに寄託されている *B. subtilis* natto 菌株の種類は少なく、市販納豆に使用される納豆菌は一般的に各メーカーが保有し、発酵による風味や臭い、テクスチャなどが最適となるように菌株を改良している⁴。そのため、本研究において使用する納豆菌は、各メーカーが保有する多様な表現型の納豆菌の免疫調節作用を比較することを目的とし、全国各地の市販納豆を収集して分離することから着手することとした。

さらに、本章では市販納豆から分離された 23 種類の *B. subtilis* natto 株の中から、THP-1 DC に対する各サイトカイン誘導活性が顕著に異なる 2 種類の *B. subtilis* natto 株を比較解析した。高活性株にどのような特徴がみられるかを解析

し、さらに *B. subtilis* natto においてこれまでほとんど報告のない免疫調節作用の主要因子を同定することを目的に解析を実施した。

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 *B. subtilis* natto については全て市販の納豆から分離し、培養を実施して作製した。また、乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* JCM1132 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) から購入した。本章では特に記述がない限り、1 x Phosphate-buffered saline (以下、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. Trypticase soy 液体培地 および 寒天培地の調製

Trypticase soy broth (ベクトン・ディッキンソン製) を調製後、調整液を減圧滅菌 (121°C、15 分間) し、TS 液体培地 として納豆菌用培地として使用した。また、TS 液体培地に培地用寒天 (伊那食品工業製) を 1.5 % (w/v) 添加し、TS 寒天培地も作製した。

2-2-3. *B. subtilis* natto の分離と同定

各種市販納豆 約 5.0g を 20mL の滅菌水に懸濁し、懸濁液 100 μ L を白金耳でかきとり TS 寒天培地 へ塗抹し、37°C で 18 時間インキュベートにて培養した。培養後、TS 寒天培地上に生育したコロニーを白金耳でかきとり、10 mL の TS broth に懸濁し、37°C、120 rpm で 18 時間、恒温水槽 (タイテック製) にて振盪培養した。培養液にグリセロール (WAKO 製) を 15 % (v/v) 添加し、各分離菌のグリセロール溶液を作製した。分離菌が *B. subtilis* natto であることを確認するために、Table. 2-1 に示したプライマーとポリメラーゼ試薬 KOD plus (TOYOBO 製) を用いて 16SrDNA 領域を標的とした PCR を行った。

Table 2-1.	使用したプライマー
27F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
1406R	5'-ACG GGC GGT GTG TAC-3'

得られた PCR 産物について QIAquick PCR purification kit (QIAGEN 製) を用い

て精製を行い、精製 PCR 産物を用いてプライマー27F と混合しシーケンス反応を行った。得られた全長約 1,500bp の配列情報を用いて相同性解析を実施し、菌種同定を行った。

2-2-4. 培養菌体および上清画分の調製

各種 *B. subtilis* natto の凍結グリセロール溶液を白金耳でかきとり、10ml の TS 液体培地に植菌し、37°C、120 rpm で 18 時間振盪培養した。10,000×*g*、4°Cで 10 分間遠心分離を行い、培地上清を回収後、菌体ペレットを培養液と等量の PBS で再懸濁し、10,000×*g*、4°Cで 10 分間遠心分離を行い、上清を除去した培養菌体を調製した。回収した培養上清は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、濾液を上清 (=Sup) 画分として以降の実験に用いた。また、培養菌体に関しては、菌体濃度を 5×10^7 cells/ml になるように PBS に懸濁後、100°Cで 10 分間熱処理した試料を菌体画分として以降の実験に用いた。

2-2-5. 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 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 × *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 製) 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、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誘導し、以降の実験に用いた。

2-2-6. サイトカイン産生誘導と ELISA 法による定量

2-2-5 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 製、IL-6 および IL-12 p40 評価時) または 100 ng/ml の IL-4 (PeproTech 製、IL-10 評価時) を含む RPMI1640 培地を 100 μl/well 添加 (1well あたりの THP-1 細胞数: 5.0×10^4 cells) した。10 μl の各種試料 (菌体画分の場合、 5×10^5 cells) 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℃で保存した。サイトカイン量は、96穴型イムノプレート（Thermo Fisher Scientific 製）²³を用いた。ELISA法（IL-6、IL-10測定キットはELISA MAXTM Deluxe Set Human、Biolegend 製、IL-12 p40測定キットはHuman IL-12/IL-23 p40 DuoSet、R&D systems 製）によってキットの手順に従い測定した。

2-2-7. 表層タンパク質およびリポタイコ酸の抽出

2-2-4項で調製した菌体画分を、氷上で10分間(1分間 ON、1分間 OFF、10サイクル)の超音波破（HOM-100、Nikkyo Technos 製）の処理を行った後、10,000×g、4℃で10分間遠心分離を行い、上清を除去後、菌体ペレットを5M LiCl溶液に懸濁し、室温で30分間インキュベートした（=LiCl懸濁液）。その後、10,000×g、4℃で10分間遠心分離し、上清を表層タンパク質画分として回収した。また、LiCl懸濁液に対し、10%(w/v)となるようトリクロロ酢酸（以下、TCA）を添加し、90℃で10分間加熱処理し、10,000×g、4℃で10分間遠心分離し、上清を表層タンパク質（以下、SLPs: : Surface layer proteins）およびリポタイコ酸（以下、LTA : Lipoteichoic acid）画分として回収した。上清を取り除いた。回収した両画分は、LiClを除去するため透析用セルロースチューブ(孔径50Å、ケニス 製)に入れ、PBS溶液中で1晩透析処理を行った。

2-2-8. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画

陰イオン交換クロマトグラフィーの担体には DEAE-Sepharose Fast Flow (Sigma-Aldrich 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 × 50 cm] に充填した。溶媒には 10mM Tris-HCl(pH7.5)を使用し、カラム充填の5倍量の 10mM Tris-HCl(pH7.5)で平衡化後、カラム充填の3倍量の上清画分をカラムに添加後、再びカラム充填の5倍量の 10mM Tris-HCl(pH7.5)でカラムを洗浄した。その後、カラム充填の2倍量の NaCl : 0mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 250mM, 300mM, 500mM を含有する 10mM Tris-HCl(pH7.5)の順に NaCl の濃度を上げていき、計8画分を回収した。回収後、各画分は PBS 溶液中で1晩透析処理を行った。

2-2-9. 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%, 10.0% 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⁵に従って分析を行った。各種調製した試料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-PAGE に供した。サイズマーカーには Protein ladder 1 plus⁶ (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% クマシーブリリアントブルー、10 % 酢酸、50 % メタノール) による染色もしくはシルベスト ステイン 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。

2-2-10. プロテオーム解析によるタンパク質の同定

2-2-9 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 製)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試料を乾燥させ、その後試料に 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マススペクトルを MALDI-TOF/TOF MS (UltrafleXtreme、Bruker Daltonics GmbH 製) 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行った。

2-2-11. ウェスタンブロッティングによる Gro-EL の検出

各種調製した試料について、2-2-9 項に従い SDS-10.0%PAGE によってタンパク質を分離後、PVDF メンブレン (WAKO 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 0.05% (w/v) Tween20 を含有した PBS (以下、PBS-T) へ浸し 5 分間振盪後、1 % (w/v) カゼインを含有した PBS へ浸し、1 時間 室温で振盪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 GroEL 抗体 (ADI-SPS-875、GroEL (*E. coli*) polyclonal antibody、Enzo Life Sciences 製)、を PBS で 1,000 倍に希釈し 20 時間、室温で振盪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 (Biotin

conjugated、sheep、polyclonal、NovusBiological 製) を 1% カゼイン-PBS で 1000 倍に希釈し 3 時間室温で振盪し反応させた。PBS-T で 5 分間洗浄後、HRP conjugated Streptoavidin (Proteintech 製) を 1%(w/v)カゼインを含有した PBS で 1000 倍に希釈し 1 時間室温で振盪しながらメンブレンに反応させた。PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回実施した後、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 (富士フイルム製) を用いて検出した。

2-2-12. 抗体を用いた GroEL のアフィニティー精製

アフィニティークロマトグラフィーの担体として、100 μ g の抗 GroEL 抗体を Profinity Epocide (BIORAD 製) に固定化した樹脂 約 10 ml に対し、2-2-8 項で調製した NaCl : 500mM 溶出画分を約 5ml 添加し、一晩インキュベートした。その後、カラムを洗浄し、3M KSCN で溶出した。回収された溶出画分は PBS 溶液中で 1 晩透析処理を行った。

2-2-13. 抗体添加による免疫調節作用の評価

2-2-4 項の上清画分を試料として、PBS で 100 倍、500 倍、2,000 倍にそれぞれ希釈した抗 GroEL 抗体を添加 (Anti GroEL +) または無添加 (Anti GroEL -) した試料を調製し、37°C で 1 時間攪拌しながらインキュベートした。2-2-6 項に従って培養上清中の IL-10 量を測定し、免疫調節作用への影響を評価した。

2-2-14. 統計解析

特に記述がない限りすべての定量的実験は 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。

2-3. 結果

2-3-1. 市販納豆から 23 種の *B. subtilis* natto 株の分離と同定

Table 2-2 に示すように、本研究で日本各地の計 22 種類の市販納豆（乾燥納豆を含む）から納豆菌の分離を試みた結果、計 23 種のコロニーを分離することができた。それぞれからコロニーPCRを実施したところ、23 種全ての分離菌株が *B. subtilis* NBRC 13719^T と 16S rRNA 領域において 95%以上の相同性を有していたことから、*B. subtilis* natto 菌株を 23 株取得することができた。ヨーグルトなどの乳発酵製品では複数のプロバイオティクス菌などが使用されている場合も多いが、今回 22 製品中 21 製品においては、単一の納豆菌株が分離されたことから、納豆においてはほとんどが単一の納豆菌によって発酵製造されていると考えられる。また、#6、#7 が分離された市販納豆「すごい S-903」には機能性納豆菌 S-903 株が含有されると製品に記載があったことから、納豆製造用のスターター菌と機能性付加用の納豆菌の 2 菌株が含有されていた可能性が考えられる。

Table 2-2. 市販納豆から分離された *B. subtilis* natto 菌株一覧

No	Identified bacterial strain	Products	Company	Region
1	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #1	Kinnotubu natto	Mizkan	Aichi
2	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #2	Okame natto	Takanofoods	Ibaraki
3	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #3	Kezurikobushi natto	Yamada Foods	Akita
4	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #4	Kiriboshi Natto	NUKAGA SYOJI	Ibaraki
5	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #5	Natto-jiman	Hoya-Natto	Tokyo
6	<i>Bacillus subtilis</i> (natto)(Rough) #6	Sugoi S-903	Takanofoods	Ibaraki
7	<i>Bacillus subtilis</i> (natto)(Smooth) #7			
8	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #8	Tezukuri natto	Shika-ya	Kagoshima
9	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #9	Hokkaido Kotubu natto	Kajinoya	Kanagawa
10	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #10	Yukihomare	Osato	Ibaraki
11	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #11	Kawaguchi Natto	Kawaguchi Natto	Miyagi
12	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #12	Hamanatto	Suzukishoji	Shizuoka
13	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #13	Tukuba-natto	Tukuba-natto	Ibaraki
14	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #14	Ohisama natto	Ibaraki	Ibaraki
15	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #15	Tengu natto	Ibaraki	Ibaraki
16	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #16	Ibaraki hoshi natto	Ibaraki	Ibaraki
17	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #17	Namahoshi natto	Ibaraki	Ibaraki
18	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #18	Korumame natto	Musouan	Kumamoto
19	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #19	Hikiwari natto	Kamakurayama-Noroshokuhinn	Kanagawa
20	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #20	Natto-moto	Takahashiyuzo-Kenkyusho	Yamagata
21	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #21	Miyagino natto	Miyagino	Miyagi
22	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #22	Funmatsu Natto-kin	Naruse Hakkokagaku Kenkyusho	Tokyo
23	<i>Bacillus subtilis</i> (natto) #23	Fukuokajiman	Yoshino Shoten	Fukuoka

2-3-2. *B. subtilis* natto 菌株の免疫調節活性評価

分離された 23 種の *B. subtilis* natto 菌株の菌体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 を樹状細胞様に分化させ (THP-1 DC)、各菌体画分を供し、抗炎症性サイトカインである IL-10 の誘導能を評価した。また、IL-10 誘導能の高いポジティブコントロールとして乳酸菌 *L. acidophilus* JCM1132 株も供試した (Fig. 2-2A)。その結果、全ての *B. subtilis* natto 菌株が IL-10 誘導活性の高いことで知られる *L. acidophilus* JCM1132 株よりも高い活性を示した。さらに、*B. subtilis* natto の菌株間でも活性に顕著な違いが確認された。

次に、各菌体の THP-1 DC に対し免疫賦活を担う炎症性サイトカインである IL-12 の誘導能を評価し、IL-12 誘導能と IL-10 誘導能を両軸にプロットした (Fig. 2-2B)。その結果、IL-10 と IL-12 の産生誘導能は正の相関関係にあり、IL-10 誘導能において高い活性を示した *B. subtilis* natto #1 は IL-12 誘導能も高い傾向にある一方で、*B. subtilis* natto #15 はいずれも顕著に低い活性を示した。

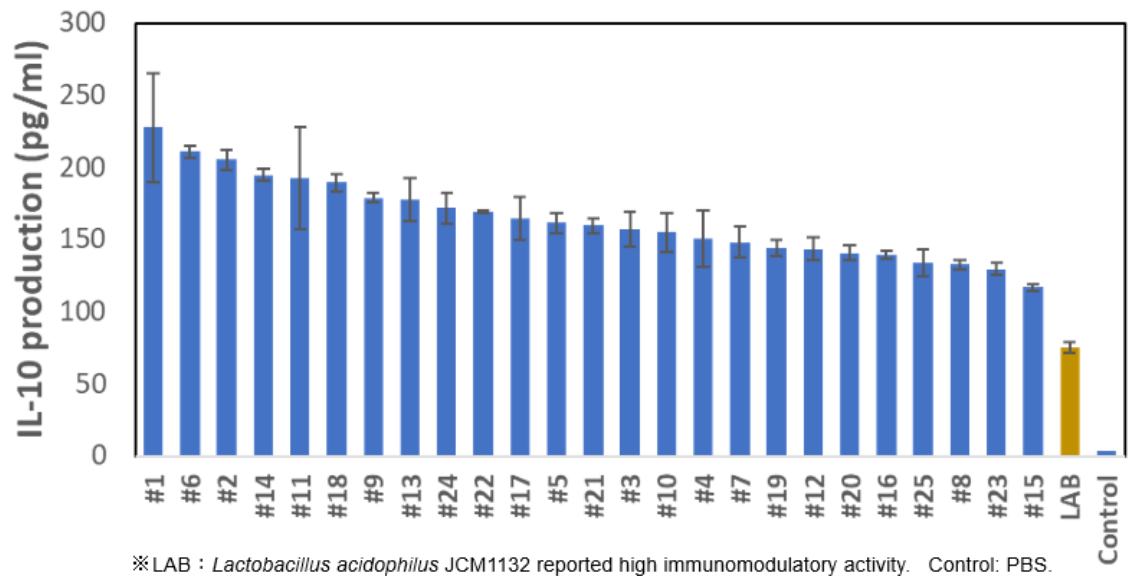
以上の結果から、*B. subtilis* natto #1 菌株は炎症性サイトカインである IL-12 と抗炎症性サイトカインである IL-10 の両方において樹状細胞に対して誘導活性が顕著に高く、また、#15 菌株は両方において顕著に低かった。このように多くの菌株において IL-10 と IL-12 両方の誘導比活性が同程度であったことから、納豆菌に含まれる同一の成分が IL-10 と IL-12 のどちらの産生誘導にも寄与している可能性が示唆された。

2-3-3. 表層タンパク質および LTA を含む各種画分の分析

B. subtilis natto の 23 株中で最も高い免疫調節活性が観察された *B. subtilis* natto #1 株に着目し、細胞内外のどの画分に免疫調節活性がみられるかを明らかにするため、培養液から菌体画分 (Cell body) と上清画分 (Supernatant) を回収し、さらに菌体画分については、表層タンパク質を抽出した画分 (SLPs) と表層タンパク質およびリポタイコ酸を抽出した画分 (SLPs + LTA) を作製した。それぞれの画分について、THP-1 DC に添加することで IL-10 誘導活性を比較評価した (Fig. 2-3A)。

その結果、菌体画分と比較して、培養上清に顕著な IL-10 誘導活性があることが分かった。また、菌体画分から SLPs と LTA を抽出して評価したところ、SLPs を抽出することで有意に IL-10 誘導活性が向上した一方で、LTA を抽出してもほとんど活性は変わらなかった。これらの結果から、*B. subtilis* natto の高い免疫調節作用のほとんどの活性が培養上清にみられ、菌体においては細胞表層のタンパク質に IL-10 誘導活性を示す可能性が示唆された。

A



B

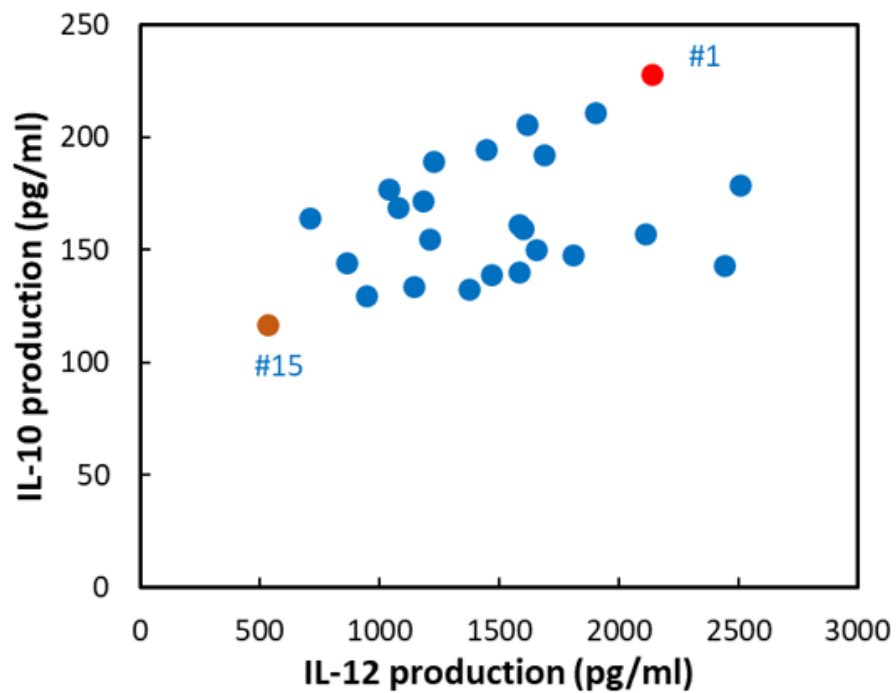


Fig. 2-1. 各種 *B. subtilis* natto 菌株の抗炎症性サイトカイン IL-10 誘導活性 (A)、IL-10 誘導活性と炎症性サイトカイン IL-12 誘導活性の関係 (B)

次に、高活性株である *B. subtilis* natto #1 株と低活性株である *B. subtilis* natto #15 株それぞれの培養上清における IL-10 誘導活性の比較分析を行った (Fig. 2-3B)。その結果、高活性株である *B. subtilis* natto #1 の培養上清では顕著な IL-10 誘導活性の再現性が確認された一方で、低活性株である *B. subtilis* natto #15 の培養上清では IL-10 誘導活性がほとんどみられなかった。これらの結果から、*B. subtilis* natto の活性の違いが細胞外上清中の免疫調節因子の構成に違いがある可能性が示唆された。

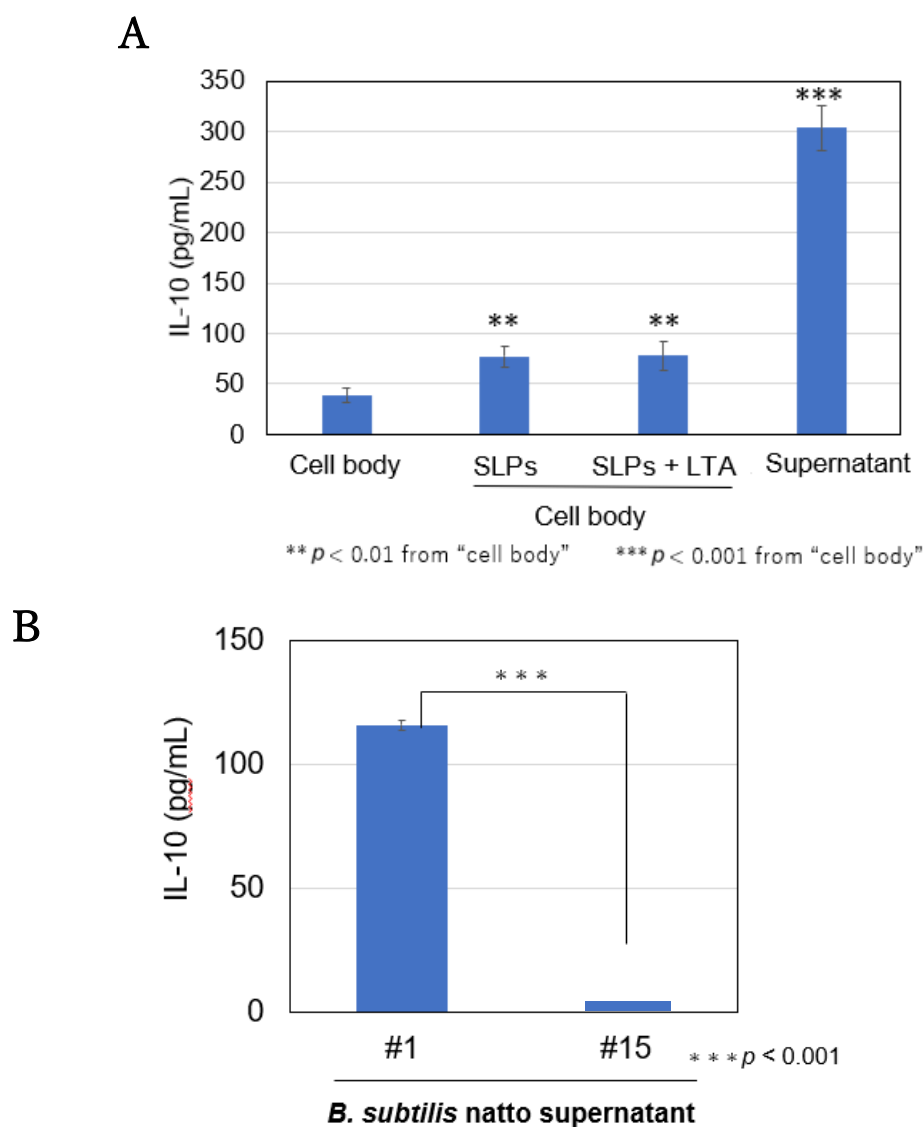


Fig. 2-2 *B. subtilis* natto#1 株由来の各画分での IL-10 誘導活性比較 (A)
高活性株 #1 株と低活性株 #15 株の培養上清での IL-10 誘導活性比較 (B)

2-3-4. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる *B. subtilis* natto 培養上清の分析

2-3-3 項において、高活性株である *B. subtilis* natto #1 株の培養上清に高い免疫調節作用があることが分かった。そこで、培養上清中に含まれる免疫調節活性因子を明らかにするため、*B. subtilis* natto #1 株の培養上清を陰イオン交換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細胞外タンパク質と IL-10 誘導活性の関係を調べた。細胞外タンパク質については SDS-10.0% PAGE に供し分析したところ、NaCl 濃度：100mM 溶出画分からバンドが検出され始め、特に NaCl：200mM、250mM、300mM 溶出画分において、25kDa~60kDa 付近に多くのバンドが検出された (Fig. 2-4A)。

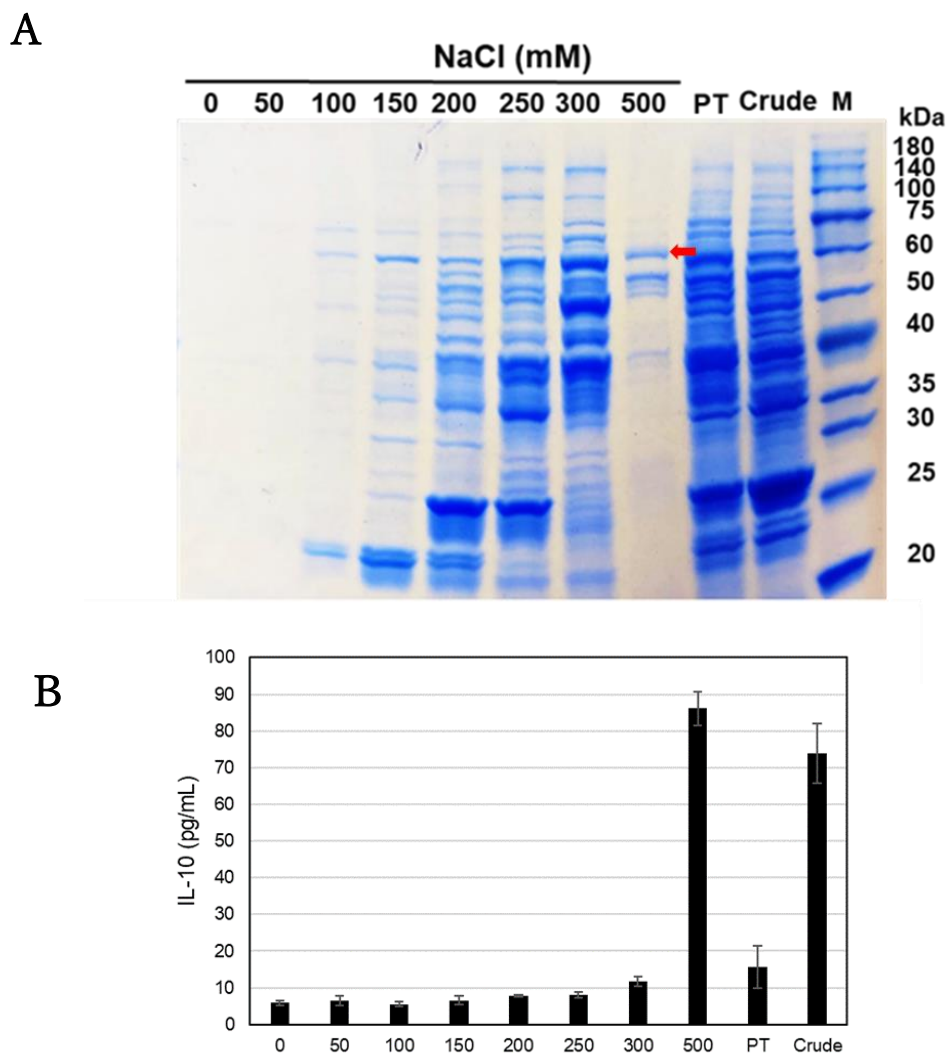


Fig. 2-3 陰イオン交換クロマトグラフィー各画分での SDS-PAGE (CBB 染色) (A)、各画分での IL-10 誘導活性比較 (B)

また、それぞれの溶出画分について IL-10 誘導活性を評価した結果、500mM 溶出画分において顕著な活性が確認され、その他の画分においてはほとんど活性がみられなかった (Fig. 2-4B)。

この結果から、NaCl : 500mM 溶出画分に免疫調節活性因子が含有される可能性が考えられ、SDS-PAGE の結果から、この画分にはほとんどタンパク質が含有されておらず約 60kDa 付近と約 52kDa 付近に 2 つのバンドが検出された。特に約 60kDa 付近のバンドは他の画分に検出されておらず、500mM 溶出画分に特異的なバンドであった。

2-3-5. プロテオーム解析による免疫調節因子の同定

B. subtilis natto #1 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約 60 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 (Fig. 2-4)。

Mascot 解析の結果、最も高いスコアを示したタンパク質は分子シャペロンの一つである GroEL (ヒトでは Heat shock protein 60 : HSP60) であった (Fig. 2-5)。

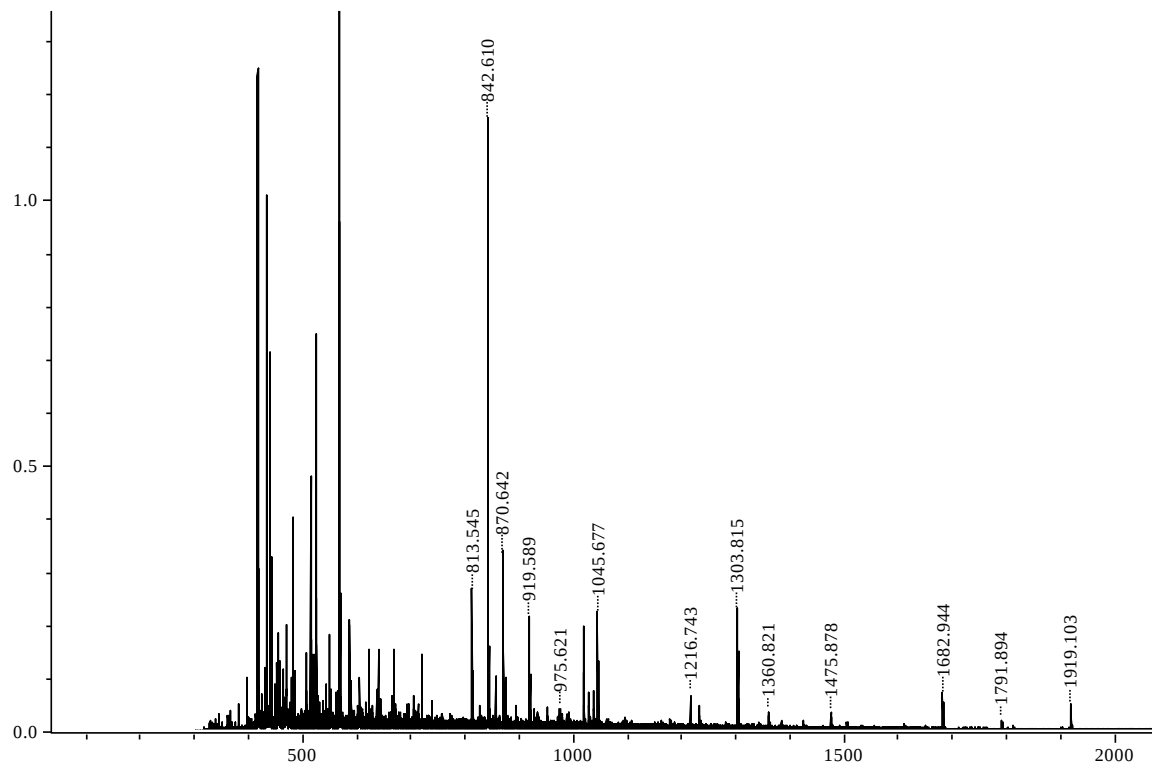


Fig. 2-4. 分子量 約 60 kDa タンパク質の TOF-MASS 解析チャート

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: CH60_BACSU

Chaperonin GroEL OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=groEL PE=1 SV=3

Database: SwissProt
Score: 45
Expect: 0.14
Monoisotopic mass (M_r): 57389
Calculated pI: 4.73
Taxonomy: [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of CH60_BACSU against nr](#).

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Mass values searched: 23
Mass values matched: 6

Protein sequence coverage: 9%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MAKEIKFSEE ARRAMLRGVD ALADAVKVTIL GPKGRNVVLE KKFSGSPLITN
51 DGVITIAKEIE LEDAFENMGA KLVAEVASKT NDVAGDGTIT ATVLAQAMIR
101 EGLKNVTAGA NPGVVRKGME QAVAVAIENL KEISKPIEGK ESIAQVA AIS
151 AADEEVGSLI AEAMERVGND GVITIEESKG FTTELEVVEG MQFDRGYASP
201 YMWTDSDKME AVLDNPFYILI TDKKITNIQE ILPVLEQVVQ QGKPLLLIAE
251 DVEGEALATL VVNKLRGIFN AVAVKAPGFG DRRKAMLEDI AVLTGGEVIT
301 EDLGLDLKST QIAQLGRASK VVVTKENTTI VEGAGETDKI SARVTQIRAO
351 VEETISEFDR EKLQERLAKL AGGVAVIKVG AATETELKER KLRIEDALNS
401 TRAAVEEGIV SGGGTALVNV YNKVAAVEAE GDAQTGINIV LRALEPIRQ
451 IAHNAGLEGS VIVERLKNEE IGVGFNAATG EWNMIEKGI VDPKTVTRSA
501 LQNAASVAAM FLITTEAVVAD KPEENGAGAG MPDMGGMGGM GGM

```

Unformatted sequence string: [544 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort by ☒ residue number ☐ increasing mass ☐ decreasing mass
Show ☒ matched peptides only ☐ predicted peptides also

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
7 - 13	894.5540	893.5467	893.4355	124	1	K.FSEEARR.A
167 - 179	1360.8210	1359.8137	1359.6882	92.3	0	R.VGNDGVITIEESK.G
276 - 283	875.5590	874.5517	874.4409	127	1	K.APGFGDRR.K
370 - 378	827.6210	826.6137	826.5276	104	0	K.LAGGVAVIK.V
379 - 388	1018.6330	1017.6257	1017.5342	89.9	0	K.VGAATETELK.E
379 - 390	1303.8150	1302.8077	1302.6779	99.6	1	K.VGAATETELKER.K

Top Score : 45 for CH60_BACSU, Chaperonin GroEL OS=Bacillus subtilis (strain 168)

[CH60_BACSU](#) Mass: 57389 Score: 45 Expect: 0.14 Matches: 6

Chaperonin GroEL OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=groEL PE=1 SV=3

[FOSB_BACSU](#) Mass: 17162 Score: 20 Expect: 45 Matches: 2

Metallothiol transferase FosB OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=fosB PE=1 SV=1

[YWOH_BACSU](#) Mass: 16414 Score: 20 Expect: 47 Matches: 2

Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YwoH OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=ywoH PE=4 SV=1

Fig. 2-5. プロテオーム解析における MASCOT 分析

2-3-6. ウェスタンブロッティングによる GroEL の検出

これまでの結果から、*B. subtilis* natto #1 株は培養上清に主要な免疫調節因子である分子量約 60 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 60 kDa のタンパク質が プロテオーム解析で推測された GroEL であることを確かめるために特異抗体を用いたウェスタンブロッティング（以下、WB）による検出を試みた。また、活性の違いと GroEL 発現量に相関があるかどうかを解析するため、低活性株である *B. subtilis* natto #15 株の培養上清についても評価を行った。

その結果、SDS-PAGE(CBB 染色)においては、#1 株と#15 株のどちらの培養上清でもいくつか共通のバンドが検出された。一方、抗 GroEL 抗体を用いた WB においては、高活性株である #1 株の培養上清では約 60kDa 付近にバンドが検出された一方で、低活性株である #15 株の培養上清では約 60kDa 付近にバンドは検出されなかった。この結果から、#1 株では培養上清中に多くの GroEL が分泌されている可能性が示唆された。GroEL より高分子の約 72 kDa のバンドは #1 と #15 両株に確認されたことから、一次抗体もしくは 2 次抗体による非特異的反応の可能性はある。

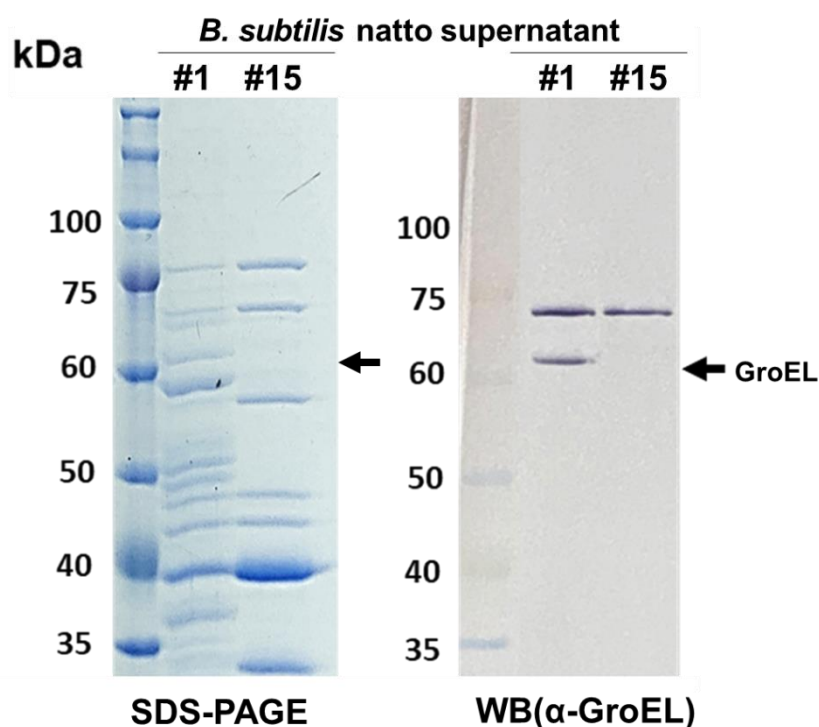


Fig. 2-6. #1 株と#15 株の培養上清中の細胞外タンパク質の SDS-PAGE（左）、同サンプルの抗 GroEL 抗体による WB 分析（右）

2-3-7. 精製 GroEL による免疫調節作用

2-3-6 項において、抗 GroEL 抗体が *B. subtilis* natto #1 株由来培養上清中の GroEL に反応することがわかったため、抗体を用いた GroEL のアフィニティー精製を行った。#1 株と抗 GroEL 抗体を一晩インキュベートし、溶出画分について抗体を用いた WB によって確認したところ、約 60kDa 付近に GroEL の精製が確認された (Fig. 2-7A)。

そこで、精製 GroEL に IL-10 誘導活性があるかどうかを評価した (Fig. 2-7B)。その結果、精製 GroEL に顕著な IL-10 誘導活性が確認された。このことから、#1 株の培養上清に分泌された GroEL 自体が高い IL-10 誘導活性を有している可能性が強く示唆された。

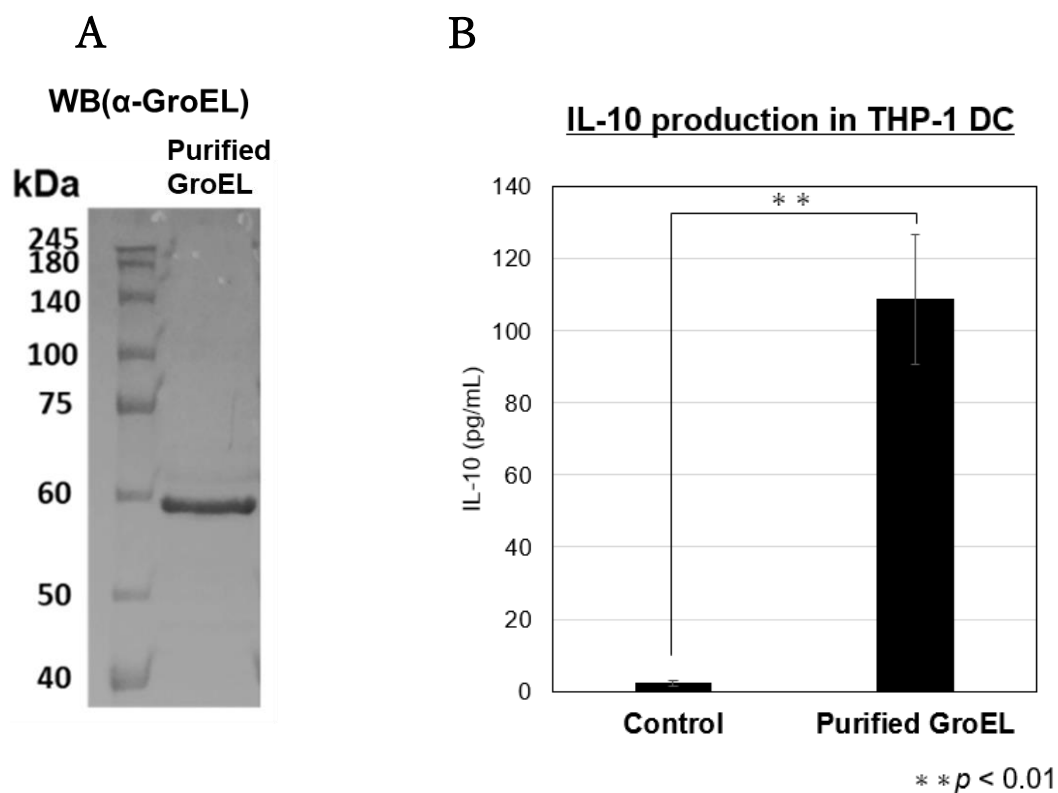


Fig. 2-7. 精製 GroEL 試料での WB (抗 GroEL 抗体) (A)、精製画分での IL-10 誘導活性

2-3-8. 免疫調節作用における抗 GroEL 抗体による活性阻害評価

B. subtilis natto #1 株由来培養上清には高い免疫調節活性が確認され、培養液中に分泌される GroEL が主要因子である可能性が強く示唆された。そこで #1 株由来の培養上清と抗 GroEL 抗体を反応させた時、IL-10 誘導活性に影響があるかどうか検証した。

その結果、抗 GroEL 抗体を添加した場合、抗体の濃度依存的に IL-10 誘導活性の有意な低下が確認され、抗 GroEL 抗体の 100 倍希釈液を用いた場合には、未添加群に比較して、半分以下まで IL-10 誘導活性が低減した (Fig. 2-8)。

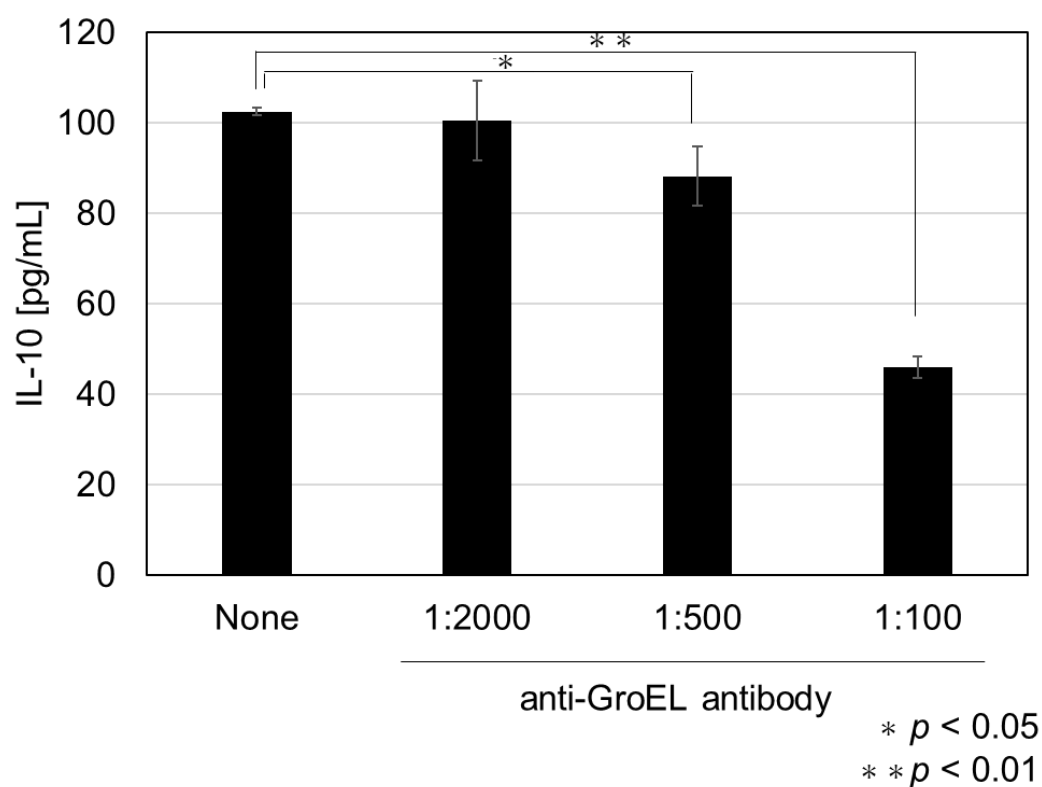


Fig. 2-8. 抗 GroEL 抗体が #1 株由来培養上清画分の IL-10 誘導活性に及ぼす影響

2-4. 参考文献

1. Wei, Q. et al. Natto Characteristics as Affected by Steaming Time, *Bacillus* Strain, and Fermentation Time. *Journal of Food Science*, **2006**, *66*, 167-173.
2. Rescigno, M. et al. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J. Exp. Med.*, **2006**, *203*, 2841–2852.
3. Fujiwara, D. 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*, **2004**, *153*, 205-215.
4. Kubo, Y. et al. A high-accuracy method for quantifying poly-gamma-glutamic acid content in natto. *Food Science and Technology Research*, **2021**, *27*, 463-471
5. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680.
6. Saad, N. et al. *Lactobacillus plantarum* 299v surface-bound GAPDH: a new insight into enzyme cell walls location. *Journal of microbiology and biotechnology*, **2009**, *19*, 1635-43.

第 3 章 *B. subtilis* natto 由来 GroEL の免疫調節作用

3-1. はじめに

第 2 章において、23 種の *B. subtilis* natto 菌株の免疫調節作用の比較から高活性株の培養上清に含まれる GroEL が主要な免疫誘導成分であることが示された。GroEL は、微生物ではしばしば細胞外への分泌が観察され、特に乳酸菌 *Limosilactobacillus reuteri* などを中心に研究されており¹、細胞質内だけでなく、細胞表層や細胞外分泌など局在を変えることで、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²。ビフィズス菌においては、菌体外 GroEL が腸管のムチンへ結合性を示すことが報告³されているものの免疫調節作用に関する報告は少なく、GroEL が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プロバイオティクスは、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。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³。特に微生物の細胞表層構成成分が TLRs に認識されることがよく知られており、例えば、グラム陽性菌のリポタイコ酸

(LTA) は TLR2 により認識され、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) により認識されることが報告⁴されている (Fig. 3-1)。

以上から *B. subtilis* natto が細胞外に分泌する GroEL の免疫調節作用を理解するために、腸管免疫細胞 (樹状細胞やマクロファージなど) への作用機序解析を行うこととした。そこで本章では *B. subtilis* natto #1 株由来 GroEL が樹状化した THP-1 細胞 (THP-1 DC) 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 GroEL を用いて (1) THP-1 DC 細胞上の GroEL 認識レセプターの推定、(2) GroEL 刺激後の THP-1 DC における遺伝子発現における影響を評価した (Fig. 3-2)。

3-2. 実験材料および実験方法

3-2-1. 樹状細胞における GroEL 認識レセプターの推測

先行研究において、GroEL の認識レセプターとしての寄与が報告¹⁾されている細胞外の TLR2 及び TLR4 について、THP-1 DC における IL-10 産生のレセプターとして寄与するか評価した。2-2-5 項の方法に従って THP-1 細胞を分化させ、100 ng/ml の IL-4 を含む RPMI1640 培地で刺激し、抗 TLR2 抗体 (Sino Biological 製) または抗 TLR4 抗体 (Sino Biological 製) を 100 倍、500 倍、または 2,000 倍にそれぞれ希釈した抗体希釈液を添加または無添加 (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、5.0 x 10⁴個/well となるように THP-1 DC を撒いた 96well プレートに、2-2-12 項の方法に従って精製した *B. subtilis* natto #1 株培養上清由来 GroEL を 10 µl 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-10 量を測定した。

3-2-2 q-PCR 法

THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 製) のプロトコールに従って、3-2-2 項の方法で作製した 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。得られたデータを比較 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。なお、q-PCR に用いたプライマーは以下の通り (Table 3-1)。

Table 3-1. qPCR で使用したプライマー

Primer name	sequence (5'→3')	nt length	product size
Human_actin beta_F	TGGCACCCAGCACAAATGAA	19	186
Human_actin beta_R	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	25	
Human_IL-10_F	CTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTC	24	121
Human_IL-10_R	GGATCATCTCAGACAAGGCTTGGC	24	

3-2-3. GroEL の免疫調節作用の経時的変化評価

2-2-12 項の方法に従って、*B. subtilis* natto #1 株の培養上清より GroEL を精製した。2-2-5 項に従って THP-1 DC を調製後、100ng/ml の IL-4 を含む RPMI1640 培地で刺激し、その後、2-2-12 項の方法に従って精製した *B. subtilis* natto #1 株培養上清由来 GroEL を 10 μ L 添加した。37°C、5% CO₂ 環境下で 1、5、24 時間インキュベートし、培養上清中の IL-10 量を測定した。また 3-2-2 項に従って RNA を回収し、3-2-3 項に従って qPCR を行い IL-10 の相対的な遺伝子発現比率を評価した。

3-2-4. RNA シークエンシングによる樹状細胞内の遺伝子発現解析

2-2-5 項に従って THP-1 DC を調整後、100 ng/ml の IL-4 を含む RPMI1640 培地で分化し、その後、5.0 x 10⁴個/well となるように THP-1 DC を撒いた 96 well プレートに、2-2-12 項の方法に従って精製した *B. subtilis* natto #1 株培養上清由来 GroEL を 10 μ L または PBS(-)を 10 μ L 添加し、37°C、5% CO₂ 環境下で 4 時間インキュベートした。GroEL 水準区および PBS 水準区それぞれ独立した 3 サンプルについてインキュベートした後、THP-1 DC を PBS(-)で洗浄後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 製)を用いてトータル RNA を抽出した。その後、NanoDrop 2000(Thermo Fisher Scientific 製)を用いて抽出したサンプル中の RNA 濃度を測定し、トータル RNA 量が 1 μ g を超えていることを確認した。抽出した RNA サンプルを ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO 製)を用いて速やかに cDNA 化し、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=3)。データ解析時、比較する両水準ともに発現値が 200 以上であり、PBS 区に比べて発現が 1.5 倍以上に増加したものを発現上昇、0.5 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。

3-2-5. 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。

3-3. 結果

3-3-1. GroEL 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 *B. subtilis* natto #1 株培養上清由来 GroEL は THP-1 DC において、主に IL-10 生産を誘導することが明らかとなった。一般的にプロバイオティクスによる免疫調節作用は、樹状細胞表層に発現する TLRs のような PRRs によって免疫調節因子が認識されることでシグナル伝達がおこり、サイトカイン産生が活性化される⁵。

そこで本研究においても、TLR2 および TLR4 を GroEL 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 GroEL の免疫調節作用はどのように変化するか検証した。

その結果、THP-1DC における IL-10 産生では、抗体未添加のコントロール (Positive control) と比較して、抗 TLR2 抗体添加時には抗体の希釈倍率が 2,000 倍、500 倍、100 倍と抗体濃度が高くなるにつれて IL-10 産生量が有意に減少していき、抗体 100 倍希釈液を添加した水準ではコントロールに比べて、約 30%まで顕著に減少した。一方、抗 TLR4 抗体に関しては、抗体濃度を 100 倍希釈まで高めても IL-10 の産生抑制は観察されなかった。

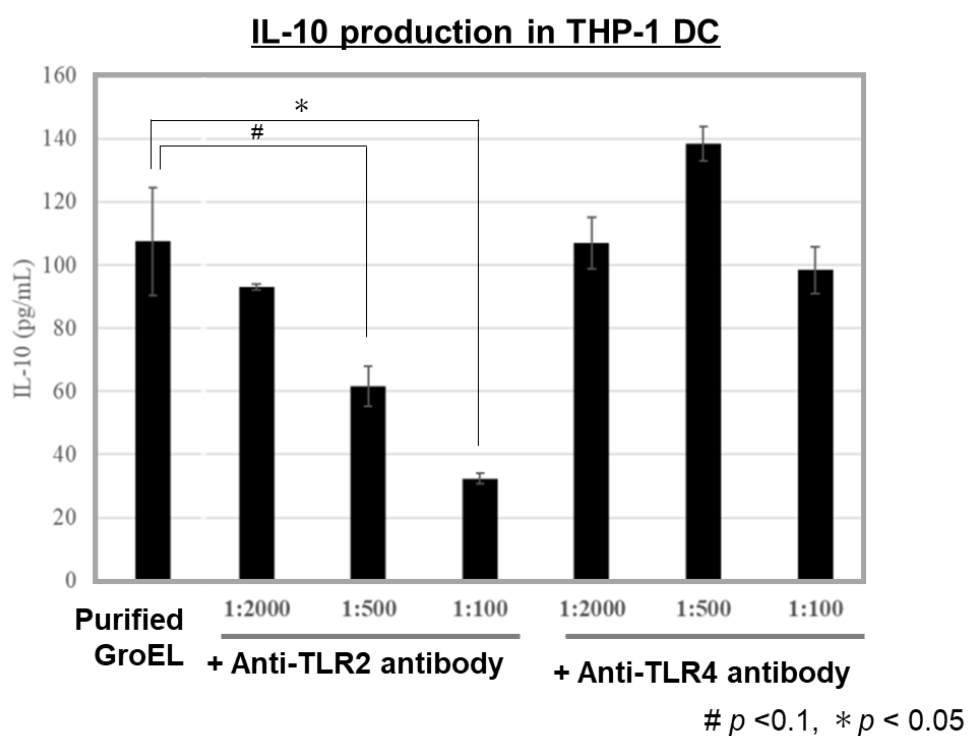


Fig. 3-3. 抗 TLR2 抗体または抗 TLR4 抗体による GroEL の免疫調節作用への影響

3-3-2. GroEL の免疫調節作用の経時変化

B. subtilis natto #1 株由来 GroEL 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、#1 株培養上清から精製した GroEL を THP-1DC に添加してから経時的に THP-1DC 培養上清をサンプリングし、その変化を観察した。

ELISA 法での分析の結果、培養上清中に分泌される IL-10 のタンパク量は 1 時間から 5 時間にかけて大きく増加し、5 時間から 24 時間にかけても増加傾向にあることが分かった (Fig. 3-4A)。さらに、THP-1DC 菌体からトータル RNA を抽出し、*IL-10* 遺伝子発現量の経時推移を調べてみると、*IL-10* 遺伝子発現量についても、0 時間から 5 時間にかけて著しく発現量が上昇し、その後 24 時間まで減少傾向を示した (Fig. 3-4B)。

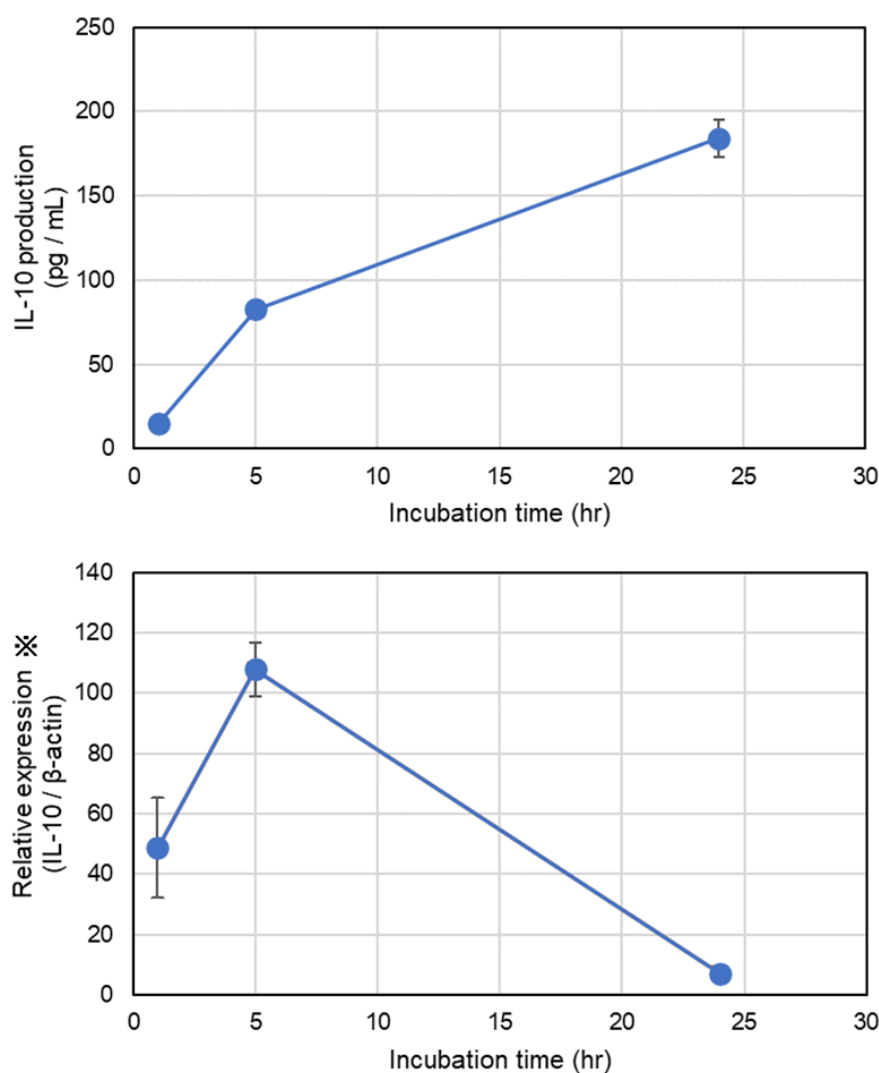


Fig. 3-4. *B. subtilis* natto #1 株由来 GroEL が誘導するサイトカイン量の経時変化
IL-10 (ELISA 法) (A)、*IL-10* 遺伝子発現量 (q-PCR 法) (B)

3-3-3. GroEL による樹状細胞内遺伝子発現の変化

3-3-2 項での検討の結果、*B. subtilis* natto #1 株由来 GroEL は THP-1 DC に供与してから 5 時間のインキュベートで IL-10 の RNA の発現量を増加させ、IL-10 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、GroEL によってどのような遺伝子が発現変動し、サイトカイン分泌に至っているのかその詳細メカニズムを調べるため RNA シークエンシングを試みた。

その結果、PBS に比べて GroEL によって 1.5 倍以上に発現上昇した遺伝子は 763 種類確認された (Supplementary Table 1)。そのうち、発現量が高かった順に並べると免疫調節に関わるケモカインの 1 種である *CXCL8* が顕著に増加しており、その他にも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 (Fig. 3-5A)。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、TLR2 シグナル経路に関わる因子である *TLR2*、*TNIP2*、*RIPK2* など、TNF シグナル経路に関わる因子である *IRF1*、*JUN*、*CREB1*、*MAPK*、*IRAK2*、*TRAF3*、*ATF4* など、NF κ B に関わる因子である *NFKB*、*CXCL8*、*CD40*、*BCL2L1* などが GroEL により発現亢進し、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. 3-5B)。

一方で、GroEL によって発現抑制された遺伝子は 1,375 種類確認された。上記と同様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、免疫応答に関連した遺伝子の抑制はほとんど認められず、細胞分裂や DNA の複製・修復に関与する遺伝子などの抑制がみられた (Fig. 3-6)

また、主要免疫調節サイトカインである *IL-10* および *IL-12* に関しては、PBS における発現値が 200 以下であったためネットワーク解析対象遺伝子群から除外されているが、精製 GroEL を添加することによって、炎症性サイトカイン *IL-12* に関しては 1.62 倍に発現上昇、抗炎症性サイトカイン *IL-10* に関しては 235 倍に発現上昇していた (Fig. 3-7)。この結果から、納豆菌から分泌された GroEL は THP-1 DC における IL-10 のタンパク産生量だけでなく、遺伝子発現も著しく増加させることが分かった。

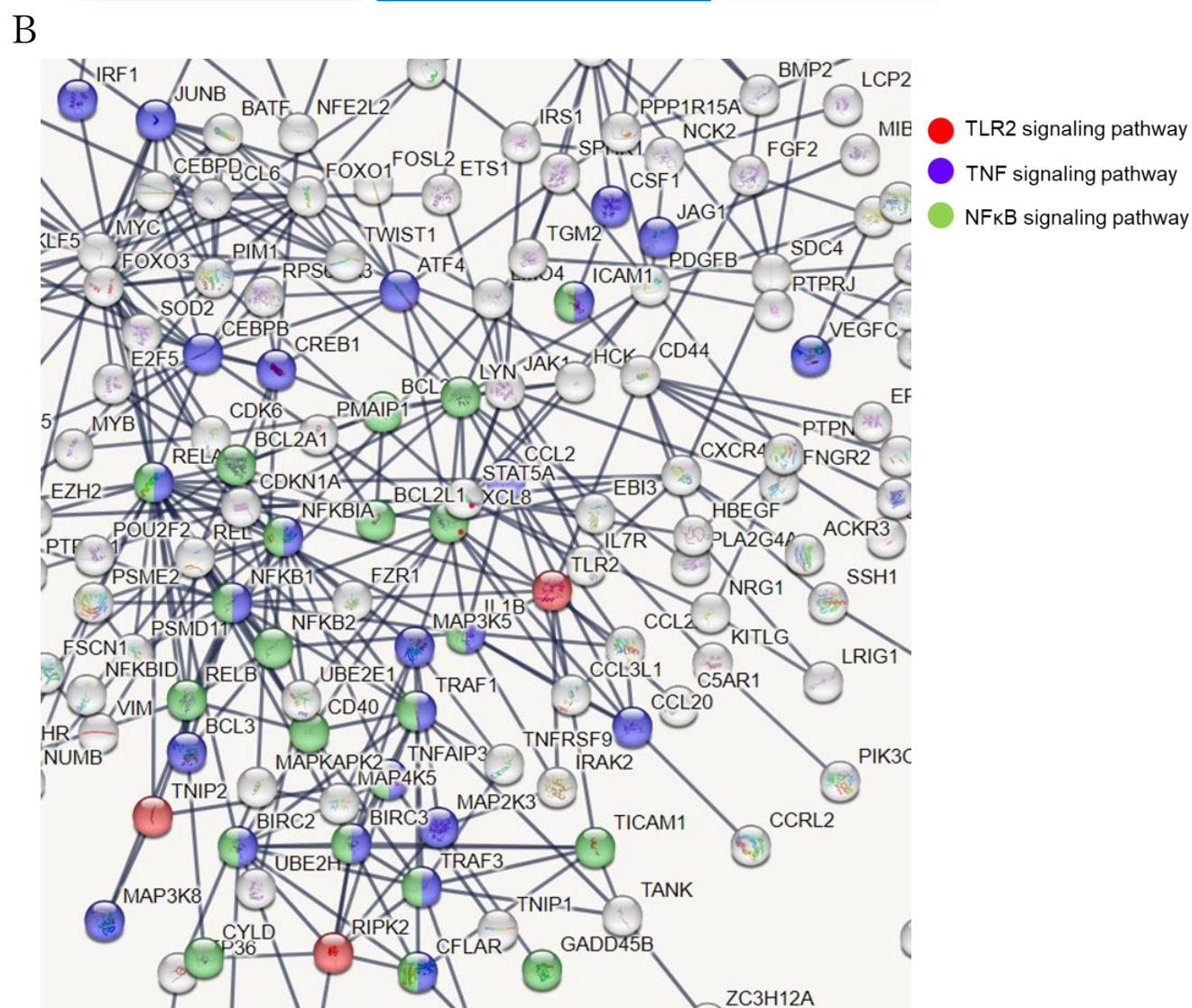
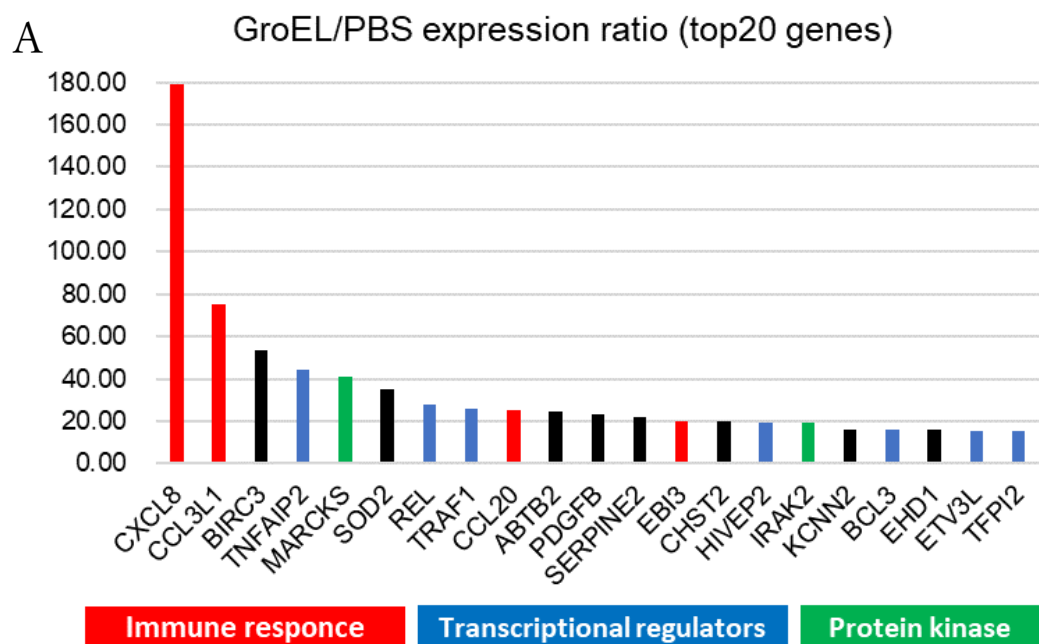


Fig. 3-5. *B. subtilis* natto #1 株由来 GroEL によって発現が上昇した THP-1 DC の上位 20 遺伝子 (A)、遺伝子ネットワーク解析 (B)

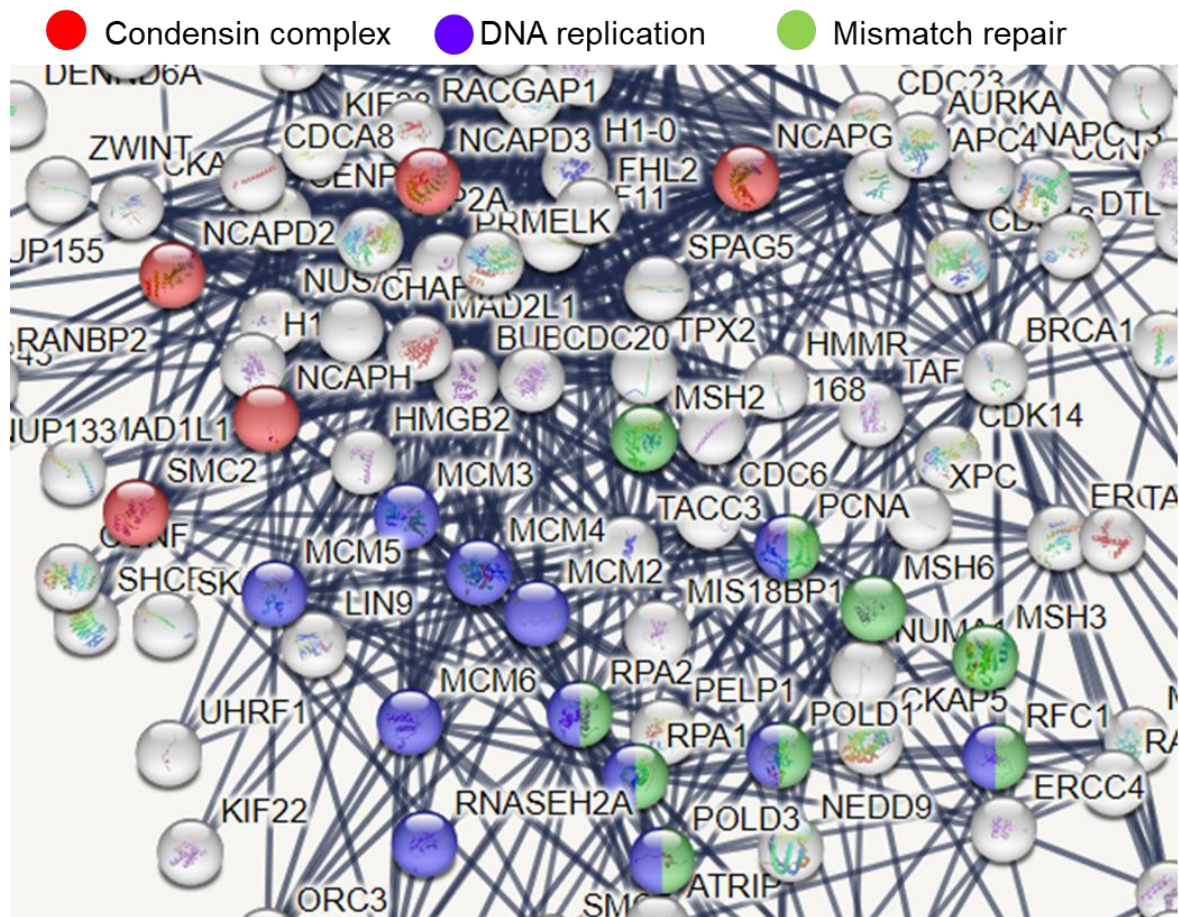


Fig. 3-6. *B. subtilis* natto #1 株由来 GroEL によって発現が抑制された THP-1 DC 遺伝子のネットワーク解析

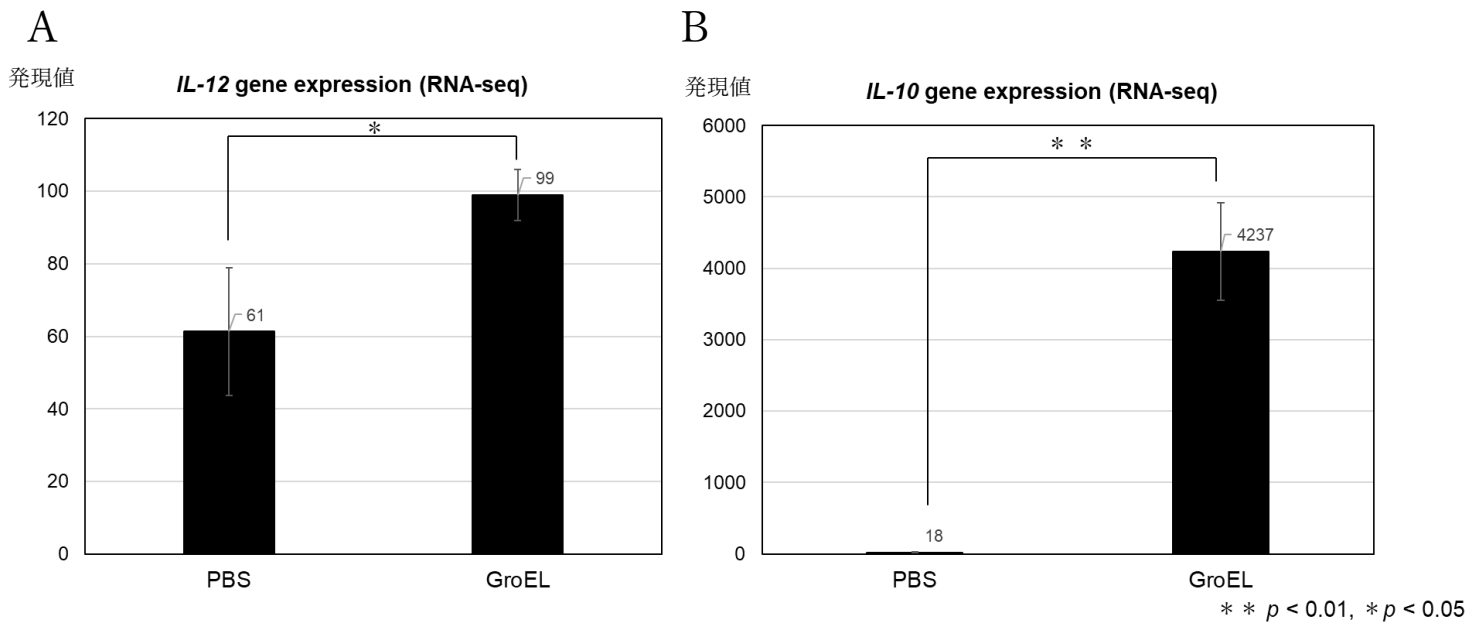


Fig. 3-7. *B. subtilis* natto #1 株由来 GroEL による主要免疫調節サイトカインの遺伝子発現量変化 *IL-12* (A)、*IL-10* (B)

3-4. 参考文献

1. Dias, M. et al. *Lactobacillus* stress protein GroEL prevents colonic inflammation. *J. Gastroenterol.*, **2021**, *56*, 442–455.
2. Henderson, B. et al. Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **2013**, *88*, 955-987.
3. Nishiyama, K. et al. Extracellular Vesicles Produced by *Bifidobacterium longum* Export Mucin- Binding Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2020**, *86*, 1464-1470.
4. Thomas, CM. et al. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbe.*, **2010**, *1*, 148–163.
5. Rescigno, M. et al. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J. Exp. Med.*, **2006**, *203*, 2841–2852.

第 4 章 *B. subtilis* natto の GroEL 分泌に関する解析

4-1. はじめに

これまで *B. subtilis* natto の中で最も免疫調節活性の高い #1 株の培養上清において、GroEL が主要な免疫調節因子であること、そして THP-1 DC における GroEL の免疫調節作用を明らかにしてきた。さらに 2-3-3 項にて *B. subtilis* natto #1 株の免疫調節活性は培養上清だけでなく、細胞表層タンパク (SLPs) にも高い活性があることがわかった。乳酸菌などにおいては GroEL が SLPs の一種として細胞表層に発現しているとの報告¹があることから細胞表層の活性に GroEL が関与している可能性も考えられる。また、2-3-6 項にて *B. subtilis* natto 培養上清に分泌された GroEL 量について比較解析した結果、高活性株である #1 株と比べて、低活性株である #15 株では細胞外に分泌された GroEL はほとんど検出されなかった。

筆者は *B. subtilis* natto #1 株の主要免疫調節活性因子である GroEL の菌体外分泌のメカニズムを解析するために、高活性株と低活性株での 1) 比較ゲノム解析、および 2) RNA シーケンスによる遺伝子発現解析、により関連遺伝子の推定を試みた (Fig. 4-1)。

さらに本章では、走査型電子顕微鏡による高活性株と低活性株での表層形状の比較や、抗体を用いた免疫染色により菌体表層の GroEL 発現量の違いについて比較を行い、菌体の形態的变化や、菌体表層での GroEL 発現にどのような特徴があるか解析を行った。最終的に市販品の納豆を用いた GroEL 発現量の解析を実施するとともに、上記検討から明らかとなった芽胞化による形質変化に伴う免疫調節作用の変化や、GroEL 分泌量の変化について比較解析を行った。

B. subtilis natto #1 with the highest anti-inflammatory activity

B. subtilis natto #15 with the lowest anti-inflammatory activity

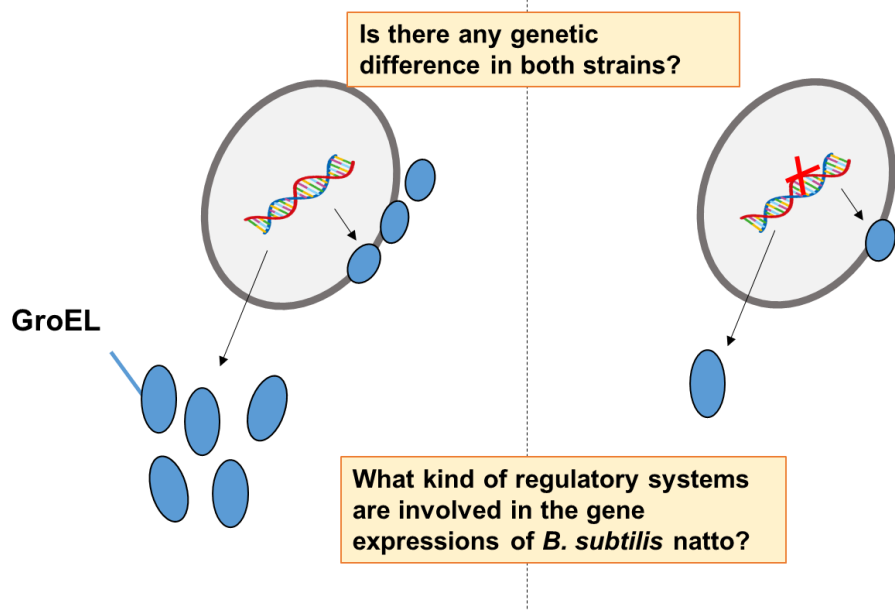


Fig. 4-1. 納豆菌高活性株と低活性株でのゲノム、遺伝子発現の比

4-2. 実験材料および実験方法

4-2-1. 使用菌株

本章では免疫調節活性の高い *B. subtilis* natto #1 株、および免疫調節活性の低い *B. subtilis* natto #15 株を用いて比較検討した。なお、市販納豆を用いた検討においては「金のつぶ とうろっ豆」(ミツカン製)を使用した。

また、*B. subtilis* natto #1 株の芽胞形成培養条件として、2-2-4 項で標準使用している TS 液体培地でなく、Difco sporulation medium (DSM 培地)²を用いて培養を実施した。

4-2-2. *B. subtilis* natto の全ゲノム解析

B. subtilis natto #1 株および#15 株それぞれについて、2-2-4 項に従って 10ml の TS 液体培地に植菌し、37°C、120 rpm で 18 時間振盪培養した。10,000×g、4°C で 10 分間遠心分離を行い、菌体ペレットを回収後、PBS で 2 回洗浄した洗浄菌体を調製した。DNA 抽出キット PureDireX (BioHelix 社製)を用いて、キットの手順に従い、それぞれの菌体からゲノム DNA を抽出した。抽出した *B. subtilis* natto ゲノム DNA の配列解読は、株式会社 生物技研に外部委託した。ゲノムの塩基配列は PacBio Revio(PacBio 製)を使用したロングリードシーケンスとして取得した。得られた配列には SPAdes³を使用し、de novo アセンブルを行った。また、作成されたそれぞれのコンティグについて、*B. subtilis* natto BEST195 株の全ゲノムをリファレンスとして、Medusa⁴を用いて scaffolding を行った。

4-2-3. RNA シークエンシングによる菌体内の遺伝子発現解析

4-2-2 項と同様に *B. subtilis* natto #1 株および#15 株の洗浄菌体を調整後、Rneasy Mini Kit (QIAGEN 製)を用いてトータル RNA を抽出した。その後、NanoDrop 2000(Thermo Fisher Scientific 製)を用いて抽出したサンプル中の RNA 濃度を測定し、トータル RNA 量が 1 µg を超えていることを確認した。RNA シークエンス用のサンプルは #1 株、#15 株それぞれ独立した 3 サンプルを均等に混合した。混合した RNA サンプルを ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO 製)を用いて速やかに cDNA 化し、株式会社 生物技研にて RNA シークエンシングを行った(各 n=1)。データ解析時、比較する両水準ともに発現値が 200 以上であり、PBS 区に比べて発現が 1.5 倍以上に増加したものを発

現上昇と定義した。発現の上昇した遺伝子は STRING ([https:// string-db.org/](https://string-db.org/))を用いて関係性をマップ化した。

4-2-4. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察

4-2-2 項と同様に *B. subtilis* natto #1 株および#15 株の洗浄菌体を調整後、2.5% グルタルアルデヒド溶液 (WAKO 製) に懸濁し、10 分間室温にてインキュベートすることで固定化した。その後、遠心分離 (10,000 x g, 1 分間) により菌体ペレットを回収し、PBS で 2 回洗浄した。その後、菌体を 10%エタノール溶液に懸濁し、10 分間室温にてインキュベートした後に遠心分離を行い、同様の操作を 50%エタノール溶液、99.5%エタノール溶液の順に繰り返すことで脱水処理を行った。その後、遠心分離によって回収した菌体を t-ブタノール (WAKO 製) に懸濁し、10 分間室温にてインキュベートした後、遠心分離によって菌体を回収した。同様の操作を再度繰り返すことで、t-ブタノールによる置換を行った。その後、t-ブタノールを溶媒とした菌体懸濁液を 18mm×18mm カバーガラス (松浪硝子工業製) 上に約 10 μ l 滴下し、ラボ用凍結乾燥機 FDU-1110 (東京理化学器械製) を用いて凍結乾燥を行うことで観察試料を作製した。SEM による菌体観察は、埼玉県産業技術総合センターに設置されている走査型電子顕微鏡 SU3500 (日立ハイテック製) を使用して、現場の専門技術者の指導のもと、電圧 15.0kV、高真空モードにて x10,000 倍で画像撮影を行った。

4-2-5. *B. subtilis* natto 菌体の蛍光免疫染色

4-2-2 項と同様に *B. subtilis* natto #1 株および#15 株の洗浄菌体を調整後、PBS で 1.0×10^7 個/ml となるように調製した。抗 GroEL 抗体 (ADI-SPS-875、GroEL (*E. coli*) polyclonal antibody、Enzo Life Sciences 製) 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。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。PBS で菌体を洗浄後、プレパラートを作製し、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。

4-2-6. 培養上清のメタボローム解析

B. subtilis natto #1 株および#15 株それぞれについて、2-2-4 項に従って 10ml の TS 液体培地に植菌し、37°C、120 rpm で 18 時間振盪培養した。10,000×*g*、4°C で 10 分間遠心分離を行い、培養上清を回収した。この培養上清 100 μl にクロロホルム:メタノール:超純水 (容量比 2: 5: 2) を 1mL 加え、サーモミキサーで抽出した (37°C, 1,000 rpm, 30 分間)。その後、遠心分離し (15,000×*g*, 3 分間, 4°C)、上層 (水-メタノール層) 800 μl と超純水 400 μl を混合した。さらに再度、遠心分離し、上層 (水-メタノール層) 200 μl を移した。これらサンプルを遠心エバポレーターにて濃縮・乾燥した (8 mmHg, 一晚, 40 °C)。乾固した試料を初期移動相 0.1% (v/v) ギ酸-蒸留水 (関東化学株) 200 μl に再溶解した後、フィルターろ過 (0.2 μm, PTFE) して LC-MS/MS 分析サンプルとした。培養上清中に含まれる成分を調べるため、アミノ酸、有機酸、塩基、ヌクレオチド、補酵素などの一次代謝物 99 成分を分析できる島津製作所の「一次代謝物メソッドパッケージ ver.2」を用いた。LC-MS/MS(LCMS-8040)を用いて、メソッドパッケージに指定された HPLC 条件と MRM transition の各パラメーターに設定し、測定・解析を行った。

4-2-7. LC-MS/MS による分析

装置及び器具

LC system : Nexera XR (Shimadzu)

MS system : LCMS-8040(Shimadzu)

HPLC Column : Discovery HS F5-3 (2.1 x 150 mm, 3 μm) (SUPELCO)

シリンジフィルター : MILLEX LG (0.2 μm, PTFE) (Merck Millipore)

HPLC 条件

分析カラム : Discovery HS F5-3 (2.1 x 150 mm, 3 μm) (SUPELCO 製)

移動相 A : 0.1% (v/v) ギ酸-蒸留水 (for LC/MS, 関東化学製)

移動相 B : 0.1% (v/v) ギ酸-アセトニトリル (for LC/MS, 関東化学製)

タイムプログラム : 0% B (0-2.0 min) → 25% B (5.0 min) → 35% B (11.0 min) → 95% B (15.0-20.0 min) → 0% B (20.1-25.0 min)

流速 : 0.25 mL/min

注入量 : 3 μ L

カラムオープン温度 : 40 °C

MS 条件

イオン化法 : ESI (Positive/Negative)

対象成分 99 成分のうち、78 成分が positive モード、21 成分が Negative モード

ネブライズガス流量 : 2.0 L/min

ドライイングガス流量 : 15.0 L/min

4-2-8. 芽胞形成率の測定

芽胞形成率の測定に関しては先行文献を参考に実施した。各種培養液を 10,000 × g、4°C で 10 分間遠心分離を行い、回収した菌体を滅菌水で再懸濁した。この再懸濁液について湯煎（SM-05N、タイテック製）による熱処理（65°C、30 分）を行った。熱処理前後の懸濁液をそれぞれ段階希釈し、TS 寒天培地を用いて生菌数を測定し、以下の計算式により芽胞形成率を算出した。

$$\text{芽胞形成率 (\%)} = \text{熱処理後の生菌数} / \text{熱処理前の生菌数} \times 100$$

4-3. 結果

4-3-1. *B. subtilis* natto の全ゲノム解析

高い免疫調節作用を示した *B. subtilis* natto #1 株と低活性株である#15 株それぞれの納豆菌において、その遺伝的特徴の違いを解析するため、比較ゲノム解析を行った。得られたゲノム DNA 配列を用いて相同性解析を実施した結果、#1 株（全長 3,965,530bp）と#15 株（全長 3,965,359bp）の間の相同性は 99.97%であり、全ゲノムのうち配列の異なる領域は約 0.03%しか存在しないことが明らかとなった（Fig. 4-2）。2-3-6 項において低活性株#15 株と比べて高活性株 #1 株において、培養上清中の GroEL 分泌量が顕著に高かったことから、高活性株 #1 株において *groEL* 遺伝子の発現量が亢進している可能性が考えられた。そこで、両者のゲノム DNA 中の *groEL* 遺伝子配列上流に存在するプロモーター領域である K-box、N-box、CIRCE⁴を比較したところ、両菌株において全く同じ配列であった（Fig. 4-3A）。また、高活性株#1 株と低活性株#15 株のそれぞれにおいて特異的に存在する遺伝子群についても整理した（Fig. 4-3B）。アンモニウムトランスポーターや DNA ヘリカーゼなど高活性株 #1 株に特異的に存在するいくつかの遺伝子が明らかとなったが、その他機能未知の遺伝子が多く、免疫調節作用や GroEL 発現量の違いにつながる知見を得ることはできなかった。

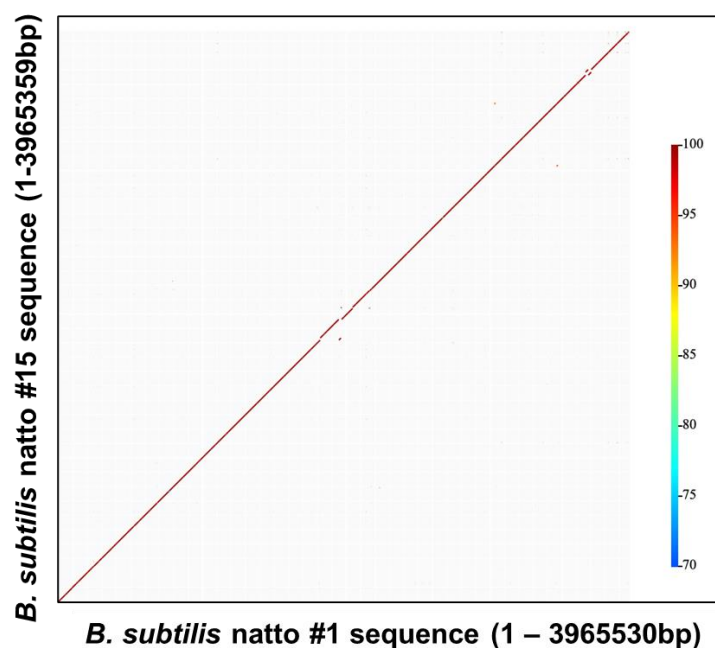
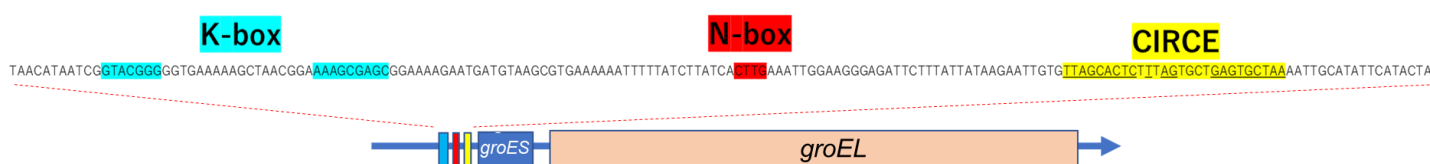


Fig. 4-2. 高活性株#1 株と低活性株#15 株でのゲノム DNA 相同性比較

A



B

#1 specific genes	#15 specific genes
Ammonium transporter	FIG01232843: hypothetical protein
KtrAB potassium uptake system, integral membrane component KtrB	FIG01240390: hypothetical protein
FIG01228047: hypothetical protein	FIG01236913: hypothetical protein
Uncharacterized protein YlbE	Uncharacterized cysteine-rich DUF326 protein bsYhjQ/STM1261
Phage-like element PBSX protein xkdQ	FIG01247248: hypothetical protein
FIG01231551: hypothetical protein	
DNA helicase II (EC 3.6.1.-)	
D-lyxose isomerase (EC 5.3.1.15)	
CysteinyI-tRNA synthetase (EC 6.1.1.16)	
LSU rRNA # 23S rRNA, large subunit ribosomal RNA - 3 prime missing fragment	

Fig. 4-3 高活性株 #1 株と低活性株 #15 株ゲノム DNA での *groEL* 遺伝子上流プロモーター領域の配列 (A)、特異的に存在する遺伝子群 (B)

4-3-2. 菌株間での菌体内遺伝子発現の比較

高い免疫調節作用を示した *B. subtilis* natto #1 株と低活性株である#15 株それぞれの納豆菌において、培養時の菌体中の遺伝子発現の違いを網羅的に解析するため、RNA シーケンスによる比較解析を行った。その結果、低活性株である#15 株と比較して、高活性株である#1 株の菌体内において発現が 1.5 倍以上上昇していた遺伝子群は計 274 種確認され、*groEL* 遺伝子発現量が 1.78 倍上昇していることがわかった (Supplementary Table 2)。また、分子シャペロンとしての GroEL のタンパク質フォールディング機能における複合体形成パートナーであり、ゲノム配列において *groEL* 上流に位置する *groES* は 1.35 倍と上昇傾向にあった。また、どのような機能ユニットが高活性株において発現上昇しているか解析するために、ネットワーク解析を行った結果、*groEL* を含むシャペロン遺伝子の多くが高活性株#1 株において発現上昇していることが明らかとなった (Fig. 4-4)。また、*spo* 遺伝子群など芽胞形成に関わる多くの遺伝子群も高活性株#1 株において発現上昇しており、なかでも芽胞形成の初期 Forespore 形成に関与すると考えられている *spo II Q* や *spo III AH* などの遺伝子が顕著に発現上昇していた。

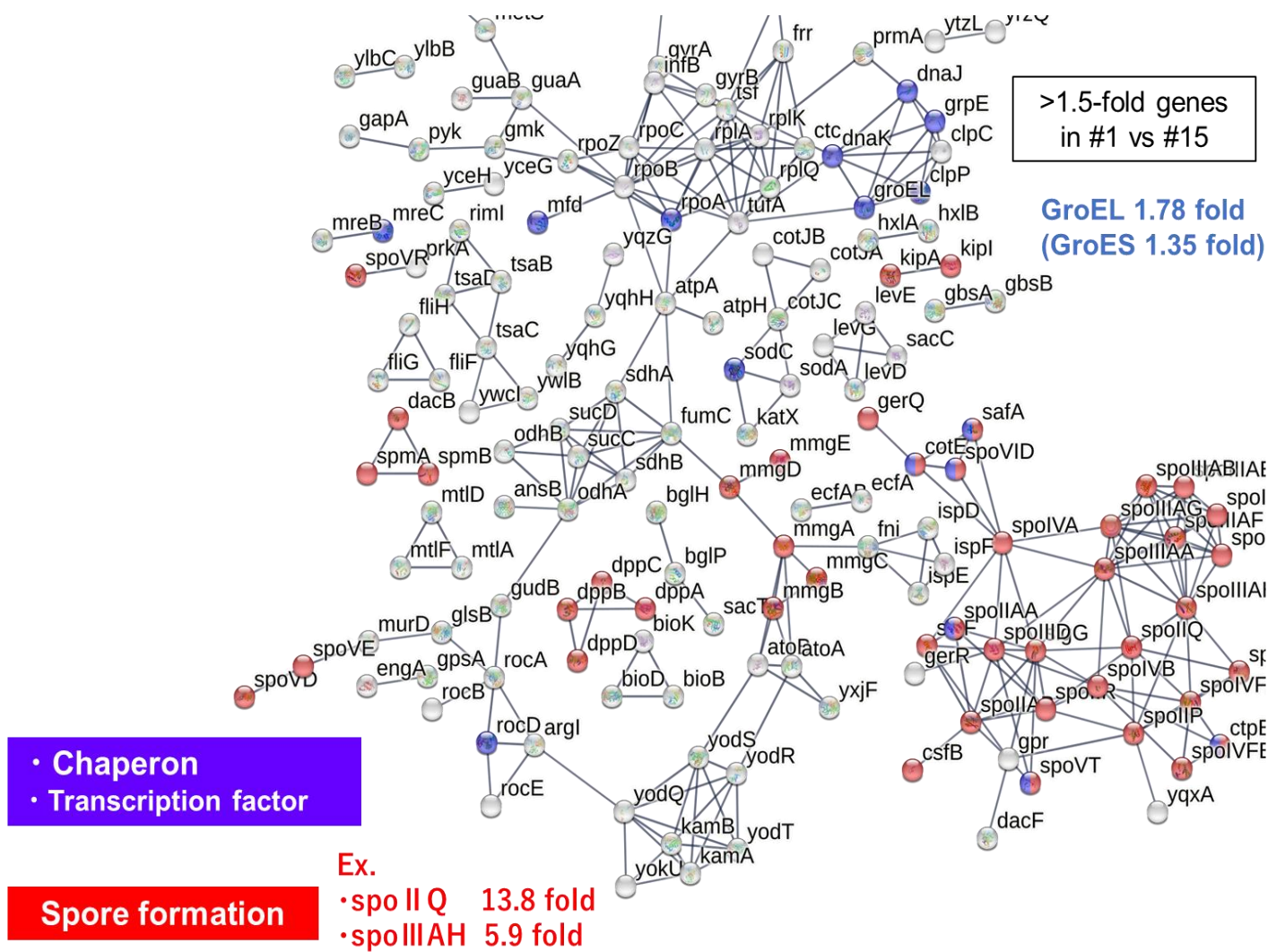


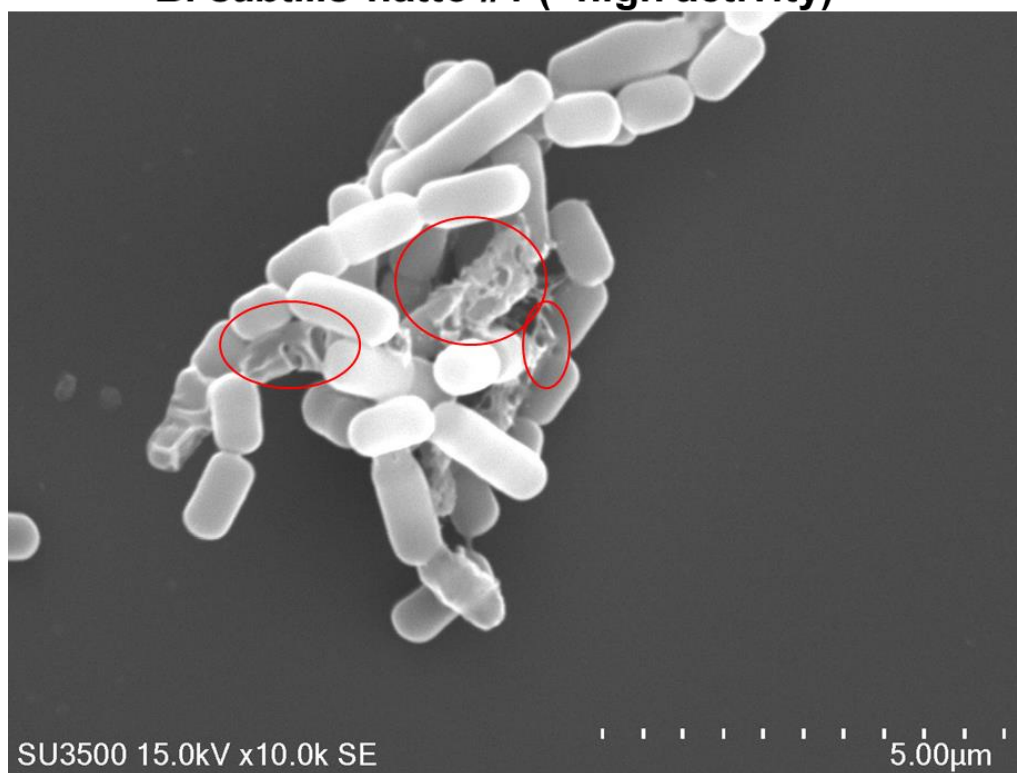
Fig. 4-4. *B. subtilis* natto #15 株と比較して、高活性株 #1 株において発現量が高かった (>1.5 fold) 遺伝子のネットワーク解析

4-3-3. 走査型電子顕微鏡による菌体形態の比較

培養 18 時間における *B. subtilis* natto 菌体の形態的特徴を解析するため、免疫調節作用の高活性株#1 株と低活性株#15 株それぞれについて、走査型電子顕微鏡を用いて菌体画像を取得し比較分析した。その結果、低活性株である#15 株と比較して、高活性株である#1 株の一部菌体周辺において繊維状物質が菌体表層に絡みついているような画像が得られた (Fig. 4-5A、B)。また、菌の形態については、#1 株と#15 株に大きな違いは認められなかったが、#1 株において長径がやや長い菌も一部認められ、同じ集団の中でも菌の長さが若干異なっている様子が確認できた。納豆の特徴である粘性成分 γ -PGA が周辺に覆われたような菌はほとんど存在しておらず、Naked Cell の状態のものがほとんどであった。

A

***B. subtilis* natto #1 (=high activity)**



B

***B. subtilis* natto #15 (=low activity)**

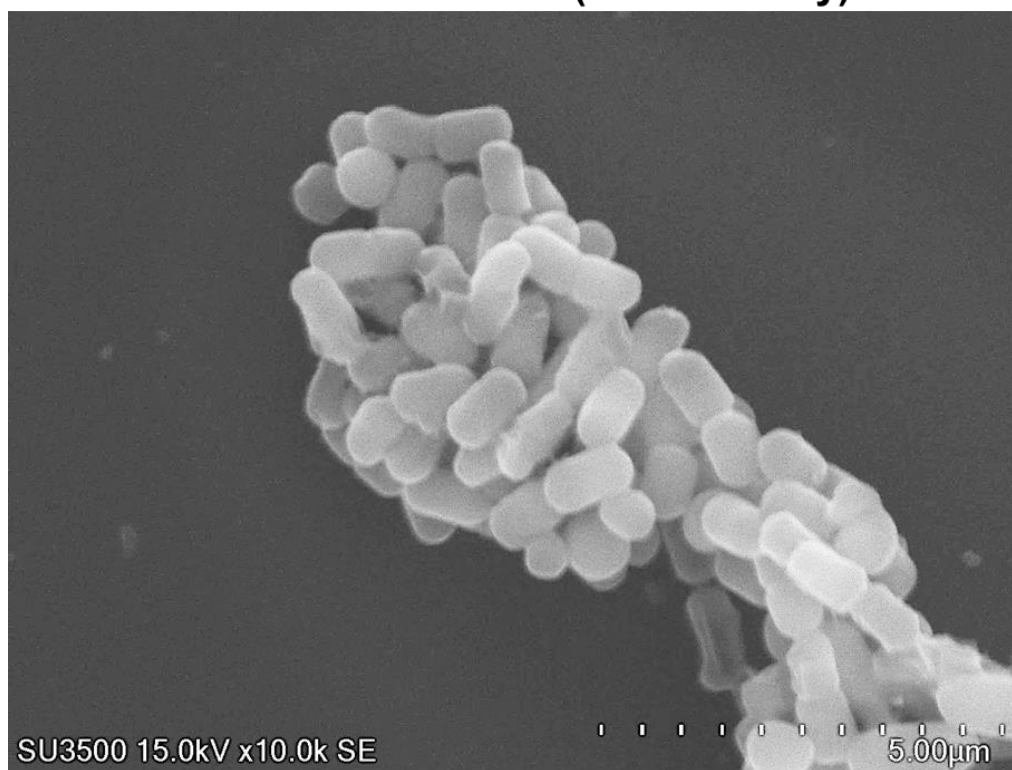


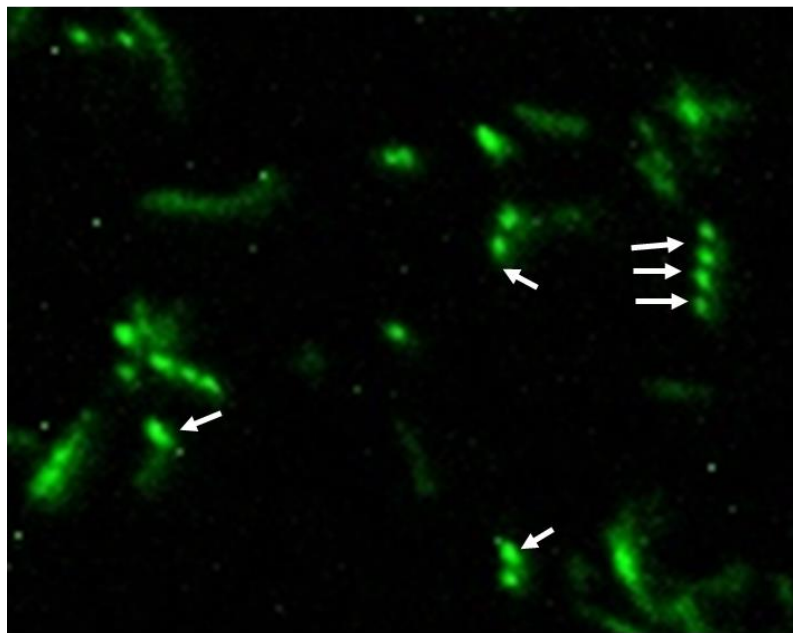
Fig. 4-5. 走査型電子顕微鏡による *B. subtilis* natto 菌体の形態観察
(x 10,000 倍)、#1 株 (A)、#15 株 (B)

4-3-4. 免疫蛍光染色による菌体表層での GroEL 発現比較

2-3-3 項の結果より、*B. subtilis* natto #1 株の免疫調節作用は細胞外分泌物に高活性がみられることに加えて、菌体処理物の比較においては細胞表層タンパク質 (SLPs) に高い活性がみられることが示唆された。ムーンライトタンパク質である GroEL は細胞表層に発現し、バイオフィルム形成¹やムチン⁶との結合などが他のグラム陽性細菌において報告されていることから、高活性株 #1 株と低活性株 #15 株における細胞表層での *groEL* 発現量について蛍光免疫染色によって比較を行った。その結果、#1 株および#15 株のどちらの納豆菌においても蛍光が検出されたことから GroEL は菌体表層に局在することが示唆された (Fig. 4-6A、B)。また、高活性株である#1 株においてより高い蛍光強度で検出されたことから、細胞表層においても GroEL が低活性株である#15 株と比べて高発現している可能性が強く示唆された。またこの GroEL の細胞表層での発現量の違いが菌体における免疫調節作用の違いに影響を及ぼしている可能性が考えられる。さらに、#1 株において白い矢印で示したように、菌体全体ではなく、局所的に強い蛍光が検出された菌体が多数確認された (Fig. 4-6A)。同様の免疫蛍光染色の結果は、同じ *B. subtilis* における芽胞形成初期において検出されることが報告⁷されている。4-3-2 項での遺伝子発現比較においても#1 株では芽胞形成因子に関わる遺伝子群が顕著に高発現していたことから、高活性株である#1 株では芽胞形成と免疫活性が密接に関連している可能性がある。

A

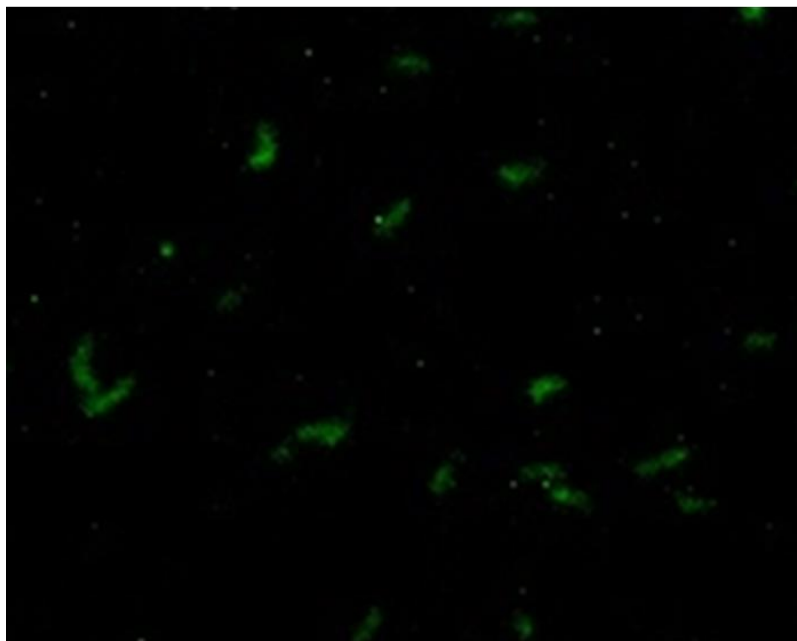
***B. subtilis* natto #1**



5 μm

B

***B. subtilis* natto #15**



5 μm

Fig. 4-6. 免疫蛍光染色による *B. subtilis* natto 菌体表層上の GroEL の検出
高活性株 #1 株 (A)、低活性株 #15 株 (B)

4-3-5. 培養上清中の代謝物と免疫調節作用の相関解析

B. subtilis natto の#1 株と#15 株の培養上清において、免疫調節作用因子として GroEL の発現量が大きく異なることが 2-3-3 項の結果から示唆されたが、さらに培養上清中の代謝物量に変化があるかどうか比較解析するためメタボローム解析を実施した。アミノ酸、有機酸、塩基、ヌクレオチド、補酵素などの一次代謝物 99 成分を分析できるメソッドパッケージを用いてターゲットメタボローム解析を実施した結果、高活性株である#1 株において培養上清中の含有量が多かった代謝物を左から順に計 18 成分比較した (Fig. 4-7)。イソロイシンやロイシンなど、アミノ酸成分が多く培養上清中に含有されることがわかった一方で、高活性株#1 株と低活性株#15 株を比較すると、特にリジンやグルタミンに顕著な違いがみられ、#1 株の培養上清中ではいずれも#15 株上清と比較して含有量が高かった。

培養上清中のグルタミンに関しては、糸状菌 *Trichoderma reesei* において、培養中の窒素飢餓状態においてグルタミン濃度上昇により孢子形成が促進されるなど、芽胞形成と関連している可能性が考えられる⁸。今回培地として使用している TS 液体培地では乳および大豆由来ペプトン含有率が計 2.0 % と高含有であるため、培養 18 時間において窒素飢餓状態になっている可能性は低い。一方で、高栄養培地においても低栄養培地と同様に培養 18 時間などの培養定常期において酸素移動速度が下がると、*Bacillus pumilus* 種において報告⁹されていることから他の要因によって、高活性株#1 株において培地中のグルタミン濃度が上昇し、芽胞形成が誘導されているかもしれない。また、リジンに関しては大腸菌などの細菌において塩ストレス下においてストレス応答としてリジン異化経路が活性化することが報告¹⁰されている。このようなストレス応答の違いによって、培地中の含有量が異なっているかもしれない。

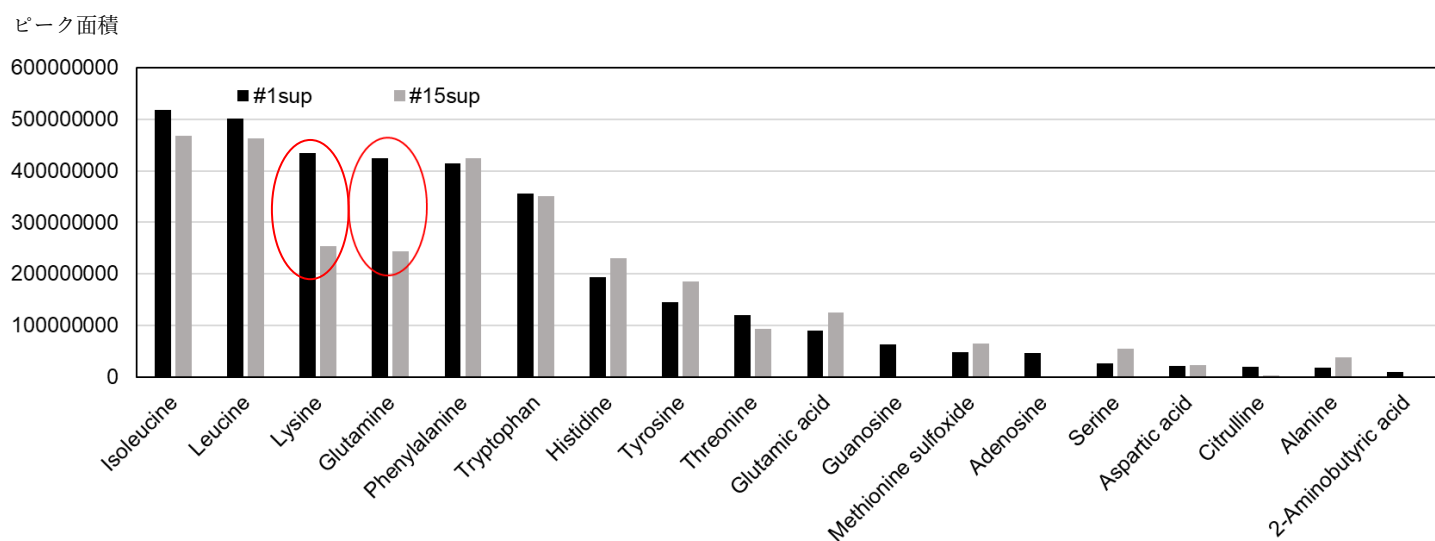


Fig. 4-7. メタボローム解析による *B. subtilis* natto #1 株および#15 株の培養上清における代謝物量の比較

4-3-6. 免疫調節作用に対する芽胞化の影響

4-3-2 項や 4-3-5 項の結果から、*B. subtilis* natto の高活性株 #1 株の免疫調節作用や細胞外への GroEL 分泌に関して芽胞化が関与している可能性が示唆された。そこで本項では #1 株と芽胞化の関係性について解析した。まず、#1 株の芽胞細胞を取得するため、通常の TS 液体培地ではなく芽胞形成培地である DSM 培地を用いて 37°C、18 時間振盪培養を実施した。その結果、TS 液体培地ではほとんどが栄養細胞の状態であり、芽胞形成率は約 3%であったのに対し、DSM 培地で培養した場合は芽胞形成率が約 92%とほとんどが芽胞の状態で存在することを確認した (Fig. 4-8)。DSM 培地を用いて培養することで #1 株を芽胞化されることが確認できたため、同条件で作製した芽胞と通常の TS 培地で培養した栄養細胞で、菌数 1.0×10^7 個あたりの培養上清における免疫調節作用を比較検討した。その結果、*B. subtilis* natto #1 株において、菌数あたりの IL-10 誘導活性は栄養細胞と比較して、芽胞では約 3.5 倍に増加した (Fig. 4-9A)。この結果から、芽胞化は #1 株の培養上清における免疫調節作用の向上に関係することが示唆された。

また、上記検討において、栄養細胞と芽胞での培養上清中への GroEL 分泌量を比較するため、WB による解析を行った。生細胞数 1.0×10^{10} cfu 相当の #1 株の培養上清に含まれる GroEL を検出した結果、栄養細胞 (TS) と比べて芽胞 (DSM) の方が約 60kDa 付近の GroEL のバンドが強く検出された (Fig. 4-9B)。このことから、芽胞では細胞外への GroEL 分泌が活性化されている可能性が示唆された。さらに、#1 株が分離された市販納豆「金のつぶ とうろっ豆」に含まれる #1 株においても GroEL が高発現しているかどうか検討した。製品から生細胞数 1.0×10^{10} cfu 相当の納豆菌懸濁液を作製し、遠心上清に含まれる GroEL 発現量を WB にて解析した結果、同程度の菌数が含まれる TS 液体培地や DSM 培地の培養上清と比べて、市販納豆の方がより強く GroEL のバンドが検出された (Fig. 4-9B)。このことから、貧栄養条件下でほとんどが芽胞として存在する市販納豆では、多くの GroEL が細胞外に分泌されていることがわかった。そのため、市販納豆では、さらに高い免疫調節作用を示す可能性が示唆された。

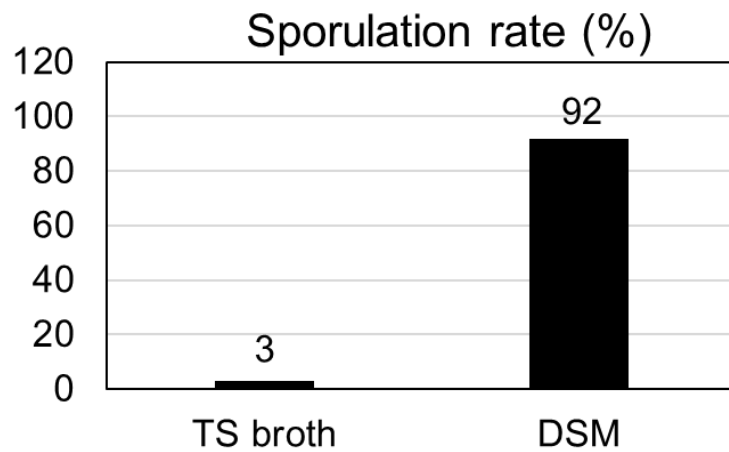


Fig. 4-8. *B. subtilis* natto #1 株の培地種類による芽胞形成率比較

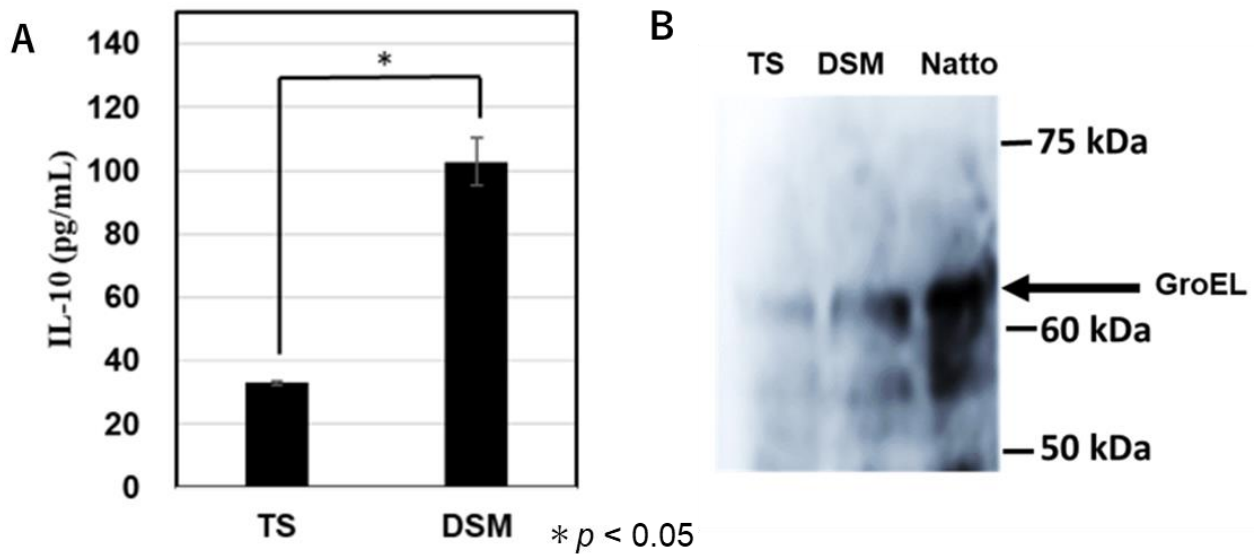


Fig. 4-9. *B. subtilis* natto #1 株の芽胞形成率と免疫調節作用の関係 (A)、栄養細胞、芽胞、市販納豆での GroEL 発現量に関する WB 比較 (B)

4-4. 参考文献

1. Rieu, A. et al. The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cellular Microbiology*, **2024**, *16*, 1836-1856.
2. Carnero, LC. et al. The heat shock protein 60 and Pap1 participate in the *Sporothrixschenckii*-Host Interaction. *J. Fungi.*, **2021**, *12*, 960.
3. Bankevich, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.*, **2012**, *19*, 455–477.
4. Bosi, E. et al. MEDUSA: a multi-draft based scaffold. *Bioinformatics*, **2015**, *31*, 2443–2451.
5. Irie, R. Preparation of a clean sample of bacterial spores. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **1964**, *3*, 10.
6. Nishiyama, K. et al. Extracellular Vesicles Produced by *Bifidobacterium longum* Export Mucin- Binding Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2020**, *86*, 1464-1470.
7. Elitza, I. et al. Peptidoglycan transformations during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol. Microbiol.*, **2013**, *88*, 673–686.
8. Pang, AP. et al. Glutamine involvement in nitrogen regulation of cellulase production in fungi. *Biotechnology for Biofuels*, **2021**, *14*, 199.
9. Müller, J. et al. Elucidation of auxotrophic deficiencies of *Bacillus pumilus* DSM 18097 to develop a defined minimal medium. *Microbial Cell Factories*, **2018**, *17*, 106.
10. Neshich, I. et al. Genome-wide analysis of lysine catabolism in bacteria reveals new connections with osmotic stress resistance. *The ISME Journal*, **2013**, *7*, 2400-2410.

第 5 章 総括

5-1. 本研究のまとめ

これまでの納豆の健康機能に関するエビデンスは納豆に含まれるナットウキナーゼやビタミン D、 γ -PGA¹⁻³ など特徴的な含有成分に対する研究が多かった^{24, 25}。一方で、納豆菌の健康機能に関する研究はほとんどなく、特に納豆菌の免疫機能について数報の報告^{4, 5}があるものの、どのような作用機序によって免疫担当細胞を活性化しているかなど、詳細なメカニズムは不明であった。また、近年は乳酸菌やビフィズス菌などに限定されず、芽胞形成能を有するグラム陽性細菌である *Bacillus* 属細菌に関しても、免疫賦活効果や抗炎症機能、腸管バリア向上⁶⁻⁸といったプロバイオティクス機能が多数報告されている。しなしながら、*Bacillus* 属細菌を用いたヒト臨床試験などの報告⁶は増加している一方で、菌体のどのような因子が免疫調節作用の主要因子であり、*Bacillus* 属細菌のどのような性質が免疫調節機能の特徴づけているかについては十分に研究されていない。

本研究では第 2 章において、23 種類の *B. subtilis* natto 株を用いて、樹状細胞からの各種免疫サイトカイン産生能の比較解析による納豆菌の免疫調節作用について評価し、菌体成分と免疫調節因子の比較評価を行うことで納豆菌による免疫調節の主要因子として GroEL を単離・同定することができた (Fig. 2-4)。また、GroEL 抗体により GroEL を精製し、精製 GroEL に高い免疫調節作用があることを実証した (Fig. 2-7)。さらに、GroEL 抗体とのプレインキュベーションによって高活性株 #1 株の培養上清の免疫調節効果が減衰したことから、GroEL 抗体が納豆菌上清の免疫調節作用を競合的に阻害することを明らかにした (Fig. 2-8)。

納豆菌を含む *B. subtilis* 種において免疫調節作用因子として GroEL が報告された事例はこれまで存在せず、本研究で初めて明らかとなった。また、プロテオーム解析による同定に加えて、精製した GroEL を用いた免疫調節作用の確認および抗体による濃度依存的な競合阻害効果を示すことができたことから、納豆菌培養上清中の GroEL が免疫調節作用の主要因子であることを裏付けるエビデンスを取得することができた。

今回は 23 種の納豆菌の中で、免疫調節作用に著しい活性の違いがみられた代表的な 2 株を用いて比較解析を行ったが、他の納豆菌株も含めて免疫調節作用と

GroEL の発現量についてさらに詳しく解析することで、納豆菌の免疫調節作用と GroEL の関係についてより詳細に理解できる可能性がある。また、Fig. 2-2 のように培養上清だけでなく菌体においても #1 株は高活性を示し、#15 株は低活性を示したことから、菌体表層の GroEL 発現や細胞内での GroEL 発現量との関係についても解析することで、菌体での免疫調節作用についても GroEL が関連するかどうか解析する必要があると考えられる。

第 3 章では、納豆菌から分泌された GroEL が樹状細胞においてどのように認識され、抗炎症サイトカイン IL-10 産生が誘導されるかその作用メカニズム解析を中心に評価した。納豆菌から分泌された GroEL の免疫調節活性は、DC 上に発現する TLR2 の抗体により顕著に阻害されたことから、TLR2 を介して GroEL は DC に認識され则认为られる (Fig. 3-3)。また、RNA シーケンスの結果から、TLR-2 の下流の *NFκB* シグナル伝達経路や *JUN* などの遺伝子群が発現上昇し、IL-10 の産生誘導につながっている可能性を示すことができた (Fig. 3-5)。

GroEL の樹状細胞における認識機構についての報告はほとんどなく、今回の解析から、納豆菌の GroEL については TLR2 によって認識されることを示すことができた。また、IL-10 産生には様々なシグナル伝達や転写因子が関わっているとされるがその中でも *NFκB* や *JUN* などが中心的な役割を担っている可能性が示唆された。

MAMPs の樹状細胞の認識に関しては、今回解析した TLR2/4 以外にも多くの受容体が報告されている。納豆菌由来 GroEL に関しても今回抗体による阻害活性が示された TLR2 受容体以外でも認識されている可能性があるため、追加での検証が必要であると考えられる。また、IL-10 産生以外にも抗炎症マーカーとして IL-1 β などの成分もよく報告されている。今回の納豆菌由来 GroEL に関しても IL-10 以外の抗炎症性サイトカイン誘導の検証や、さらには炎症モデルマウスなどを用いた *in vivo* での効果検証なども今後検証すべきと考える。

第 4 章では、納豆菌において GroEL がどのようなメカニズムで細胞外に分泌されているか解析した。納豆菌の高活性株と低活性株の間ではゲノム DNA に大きな違いはみられず、RNA シーケンスの結果から高活性株では芽胞形成に関わる遺伝子群が顕著に発現上昇していることが分かった (Fig. 4-4)。また、芽胞形成培地で培養した納豆菌では細胞外への GroEL の分泌量が増加し、菌数あたりの免疫

調節活性が向上することがわかった (Fig. 4-9)。

GroEL の細胞外分泌と芽胞化に関係があることを本研究で初めて明らかにすることができた。また、芽胞化を誘導することで GroEL 分泌量が増大し、免疫調節機能が向上する可能性が示されたため、芽胞化を促進するような納豆や納豆菌の製造法や培養法に製法改良することによって、さらに納豆菌の免疫調節作用を高める技術を構築できる可能性が考えられる。

RNA シーケンスの結果から、*spoIIQ* や *spoIIIAH* などの遺伝子発現が著しく上昇していたことから、これらの芽胞初期形成において GroEL 排出に関わる推定メカニズムを示したが、実際にこれらの因子が GroEL 分泌を高めているかどうか検証をする必要がある。また、高活性株において GroEL の発現量自体が上昇していたことから、GroEL の発現量が上昇することで高活性株では菌体外への分泌量が高いのか、細胞外への分泌能が全体的に高まっていることから菌体外への分泌量が高いのかについては、他成分との発現や分泌量の比較解析を行う必要がある。

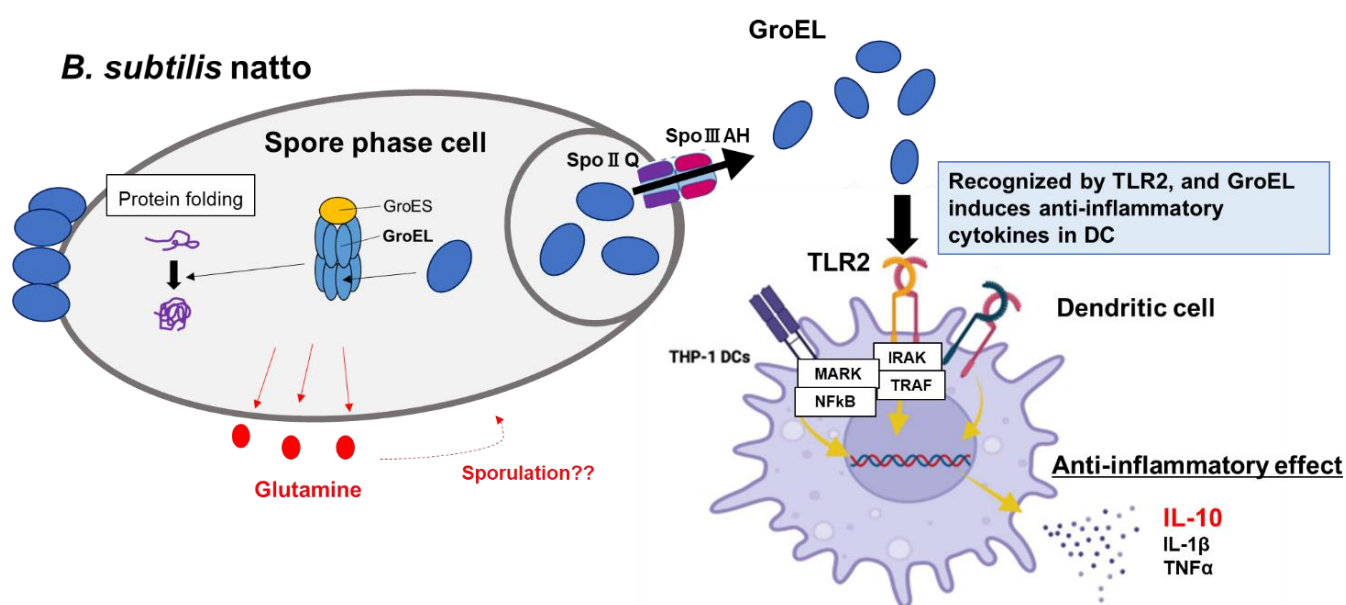


Fig. 5-1. 納豆菌による免疫調節作用のメカニズム

5-2. 考察

5-2-1. 腸管免疫系を介した *B. subtilis* natto 株の免疫調節作用

これまでの乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスの機能性研究において、LPS やリポタンパク質、ペプチドグリカン、多糖類、LTA、RNA、DNA、CpG モチーフなどの様々な MAMP 成分が、様々な宿主免疫系を調節することが報告されている⁹。しかしながら、多くの報告が菌種や菌株、投与量などに基づくものであり、プロバイオティクスの免疫調節作用の機能特異性については、主要な活性成分や関与する主な作用機序を理解するには十分ではないのが現状である。さらに、本研究において対象とした枯草菌の亜種である納豆菌についてはあまり学術研究が進んでおらず、その利点を説明する生物学的証拠は不十分である。

そこで本研究の第3章では、市販納豆から分離した *B. subtilis* natto 23 菌株とその培養上清の免疫作用の比較研究を通じて、*B. subtilis* natto の主要な免疫調節成分の同定を試みた。結果としてまず注目すべきは、多くの *B. subtilis* natto 菌株が、高いサイトカイン誘導活性が既に報告されている *L. acidophilus* JCM1132 株^{10, 11} よりも高い IL-10 および IL-12 の誘導活性を示したことである。今回選定された高活性株である#1 株の培養上清から精製された活性成分は、分子シャペロンタンパク質である GroEL であり、LPS やリポタンパク質、ペプチドグリカン、多糖類、LTA などのプロバイオティクスにおける一般的な免疫調節成分としては報告されていない成分であった¹²。*Bacillus* 属細菌で特徴的な免疫調節因子の報告例として、*B. amyloliquefaciens* amy-1 において、細胞外多糖 (EPS) の抗炎症作用と分子メカニズムが報告されている¹³。*B. amyloliquefaciens* amy-1 株由来 EPS は、LPS 刺激 THP-1 細胞における炎症性サイトカイン産生やマクロファージの貪食活性、酸化ストレスを顕著に減少させ、*in vivo* においてマウスの耳の炎症を改善したとの報告がある¹³。また、*B. anthracis* は、芽胞表層に放出した大量の RNA によってマウスやヒトの免疫細胞表層に発現する TLR7 や TLR13 などの受容体を活性化することで、宿主の免疫応答を誘導したとの報告もある¹⁴。一方で、本研究で精製した GroEL 画分は、これまで報告のある EPS や RNA などの成分を含有していないが、高い IL-10 誘導活性を示した。さらに、精製 GroEL による樹状細胞活性化における遺伝子発現解析では、抗炎症サイトカイン産生に関わる NF- κ B シグナル経路に関わる遺伝子群が多く発現上昇し、さらにこれまで枯草菌で活性化の報告がある JNK も発現誘導された (Fig. 5-2)。これらの作用メカニズムを含め、本研究によって *B. subtilis* natto における GroEL の免疫調節効果

を初めて示した。

また、精製した納豆菌培養上清由来 GroEL は高い IL-10 誘導活性を示した一方で、Fig. 2-1 のように納豆菌体は IL-12 についても高い誘導活性を示した。これらの結果から、納豆菌には炎症性サイトカイン IL-12 と抗炎症サイトカイン IL-10 のいずれも誘導する活性があり、例えば、病原菌などの異物侵入に対して、B 細胞活性化による抗体産生など防御機能を高めるために樹状細胞の IL-10 産生による未分化なヘルパー T 細胞の Th2 への分化誘導に活用できるとともに、過剰な Th2 分化誘導によるアレルギー反応 (IgE などの抗体過剰産生) を防ぐために樹状細胞の IL-12 産生による Th2 への分化誘導においても活用できると考えられる (Fig. 5-3)。

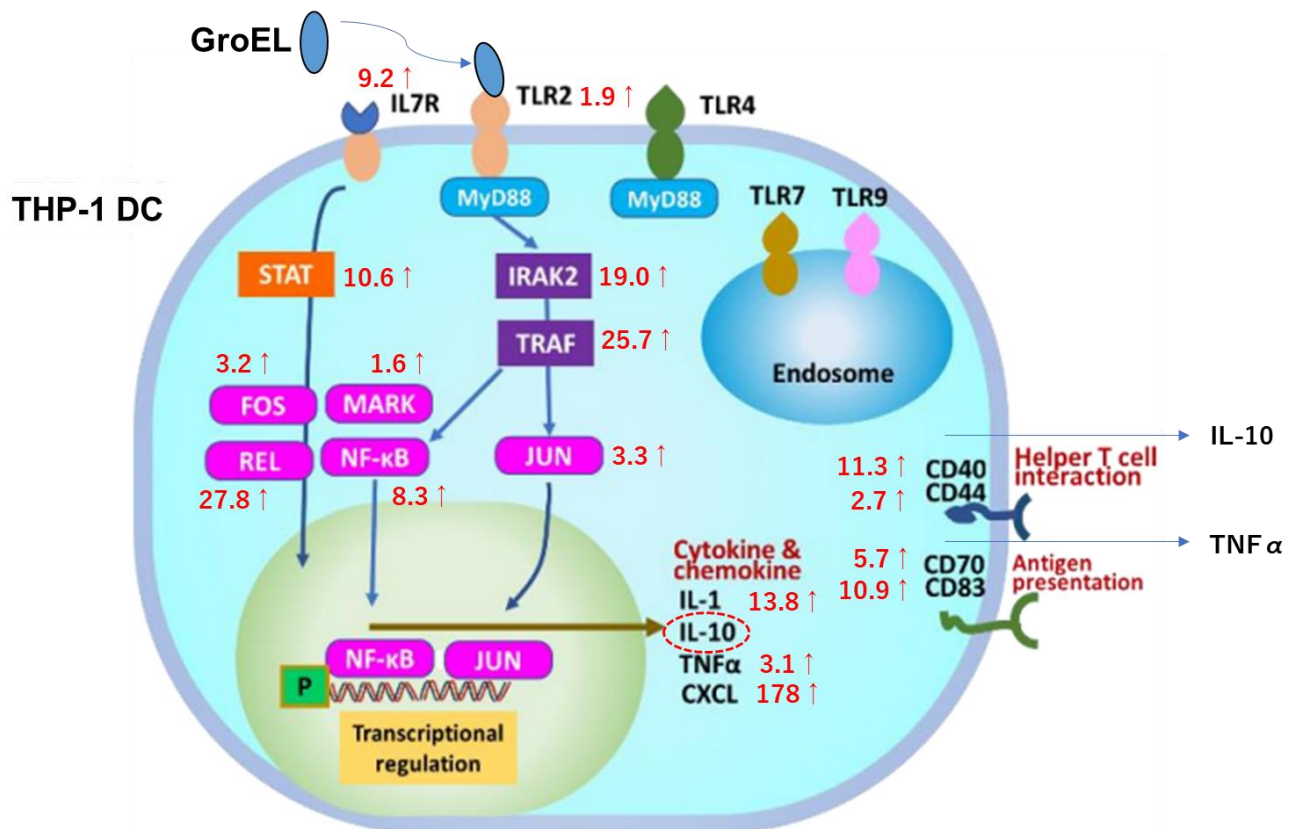


Fig. 5-2. 納豆菌由来 GroEL による THP-1 DC の免疫調節メカニズム

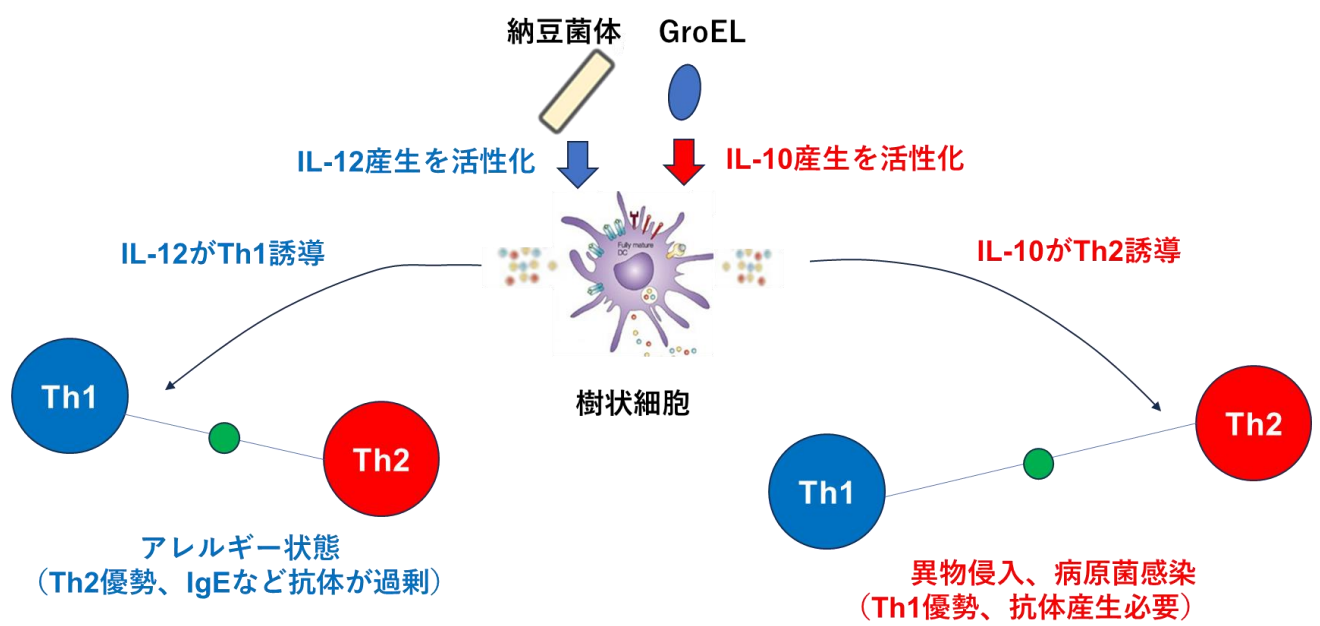


Fig. 5-3. 納豆菌によるヘルパーT細胞 Th1 および Th2 分化誘導による免疫調節

5-2-2. 分子シャペロン GroEL の抗炎症機能

Limosilactobacillus reuteri 由来の GroEL は、*in vitro* 評価系で TNF α 、IL-1 β 、IFN γ などの炎症性サイトカイン産生を抑制し、DSS モデルマウスで誘発された出血性大腸炎を抑制した¹⁵。また、マウスの腸内で抗炎症性サイトカインである IL-10 と IL-13 の産生を増加させ、IFN γ などの炎症性サイトカインを減少させた。さらに、大腸菌組換え体を用いて発現精製した *Streptococcus pneumoniae* 由来 GroEL を経鼻投与したマウスは、肺炎球菌に対して防御効果を示した¹⁶。これらの結果は、*B. subtilis* natto #1 株から免疫調節主要因子として同定された GroEL が THP-1 DC に対して免疫調節作用を示すだけでなく、動物モデルにおいても炎症を抑制する可能性があるという推察を支持するものである。また、本研究における *B. subtilis* natto #1 株由来 GroEL の IL-10 誘導活性は抗 TLR-2 抗体によって濃度依存的に阻害された一方で、抗 TLR-4 抗体ではほとんど阻害されなかった。これらの結果から、*B. subtilis* natto の GroEL は樹状細胞表層に発現する TLR2 を介して免疫調節を誘導していると考えられた。一方で、*Porphyromonas gingivalis* においては、GroEL によって活性化される NF- κ B シグナル経路が、抗 TLR2 抗体および抗 TLR4 抗体の両方によって阻害されることが報告されている¹⁸。さらに、赤痢菌ワクチン開発において GroEL がエピトープの免疫機能を高めるアジュバント機能を発揮し、TLR2 受容体に対して直接 GroEL が結合する可能性が高いことを *in silico* シミュレーションにより報告¹⁹している。全バクテリアの GroEL は相同性の高い共通配列を持つが一部の配列が異なっており、例えば大腸菌由来 GroEL は免疫調節作用を示さないことが報告されている。*B. subtilis* natto の GroEL の高次構造的特徴が TLR2 への特異的親和性をもたらしている可能性がある。

また、GroEL を含むヒートショックタンパク質は、タンパク質生合成において重要な生物学的機能を持つ高度に保存されたタンパク質であり、従来はタンパク質フォールディングが主要な役割であると認識されていたが、最近ではストレス応答や免疫調節作用に関与するムーンライトタンパク質として機能していることが明らかとなっている²¹。宿主における GroEL の配列の違いが免疫細胞における認識に関わっている可能性がある一方で、どのように GroEL が細胞内外での局在を決めているかを解析することが今後重要と考える。

5-2-3. 納豆菌の細胞外 GroEL 分泌メカニズム

Bacillus 属では、シグナル配列を持たない様々な細胞内タンパク質の分泌がいくつかの研究で報告されている²⁰。4種の *Bacillus* 属細菌を用いたセクレトーム解析においては、本来細胞内に局在していると考えられていた解糖系酵素であるエノラーゼや GroEL、フラジェリンタンパク質などが分泌されていることが明らかとなった²¹。またこれら複数の GroEL や DnaK、エノラーゼを含む多くの細胞質タンパクが定常期後期において大量に分泌されていたことから、枯草菌によるタンパク質の細胞外分泌は特定の菌株に特異的なものではないことが示唆された²¹。一方、本研究では、GroEL の細胞外分泌は高活性株である #1 株で特異的に多く、RNA シーケンス解析では、GroEL だけでなく DnaK など多くのシャペロン関連遺伝子の発現が上昇しており、さらに注目すべきことに、芽胞形成に関わる多くの遺伝子が #15 株と比べて、#1 株において顕著に発現上昇していた (Fig. 5-3)。孢子形成関連遺伝子のうち、*spoII* と *spoIIIAH* は #1 株で特に発現が上昇していた。最近、SpoIIQ と SpoIIIAH を含む新しい輸送系が、発達中の枯草菌内芽胞の 2 つの細胞膜を貫通して基質を移動させることが報告されている²²。枯草菌による内孢子の発生には、前孢子から内孢子と母細胞への分化が関与する。前孢子で産生された SpoIIQ と母細胞で産生された SpoIIIAH は、2 つの膜を介して相互作用し、前孢子と母細胞をつなぎ、母細胞が前孢子の発育を育むチャネルまたはトランスポーターの中心成分を形成する²²。GroEL と SpoIIQ や SpoIIIAH との相互作用に関する報告はないが、Fig. 5-4 に示すように、孢子形成期の GroEL にはこれらの分泌系が関与している可能性がある。

また分子シャペロンと孢子形成の関係についてはほとんど報告がないが、#1 株を芽胞形成用である DSM 培地で培養すると、#1 株の 90% 以上が孢子形成していることが確認され、培養上清中の GroEL 分泌量が顕著に多くなった。また興味深いことに、#1 株を分離した市販納豆から抽出した GroEL 量は、DSM 培地で調製したものよりも菌数あたりの GroEL の量が多かった (Fig. 4-9)。これらの結果は、GroEL 分泌が孢子形成に強く関与していることを示唆している。

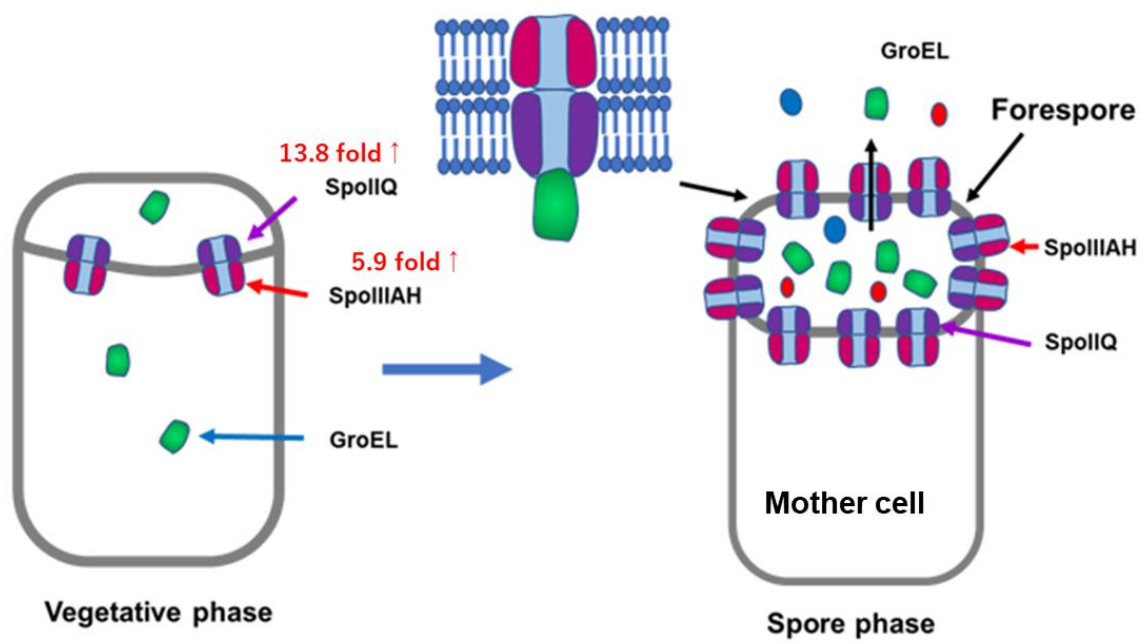


Fig. 5-4. 芽胞化と関連した納豆菌による GroEL 分泌の推定メカニズム

5-2-4. 納豆の免疫調節作用

日本や他のアジア諸国における乳がんリスクの低さは、納豆を含む大豆発酵製品や大豆の摂取量が多いことが一因であることが報告されている²³。さらに、大規模コホート研究において、女性では大豆発酵製品の摂取量と心血管疾患（CVD）リスクとの間に有意な逆相関が観察された。13,303 人の死亡を含む 14.8 年以上の追跡調査を行った日本での別の大規模コホート研究では、男女ともに納豆の摂取量が心血管疾患関連の死亡リスクと有意な逆相関であることが示された²⁴。

日本における納豆製品の年間消費量は約 30 万トンで、近年の納豆の健康増進効果のニュースなどもあり市場は拡大を続けており、2022 年の市場規模は約 2,500 億円まで成長している。本研究により高い免疫調節作用が確認された *B. subtilis* natto #1 株で生産された市販納豆には 3.5×10^{10} 個の芽胞が含まれている。#1 株の THP-1 DC に対する IL-10 誘導活性は、*L. acidophilus* JCM1132 株よりも高い活性を示した。現在までのところ、免疫機能を高める多くの乳酸菌が産業利用されている一方で、同様の健康効果を謳った納豆製品は市場に存在しない。市販納豆 1 g に含有される納豆菌の細胞数が、ヨーグルト製品 100 g に含有される乳酸菌などのプロバイオティクス菌の細胞数に相当することを考慮すると、納豆は今後、免疫調節作用などの機能性食品として応用される可能性が十分にある。

5-3. 結論

本研究では、市販納豆から分離された計 23 株の *B. subtilis* natto を用いて免疫調節作用に関する比較解析を行い、抗炎症サイトカインである IL-10、および炎症性サイトカイン IL-12 の誘導活性が顕著に高い *B. subtilis* natto #1 株を選定した。この *B. subtilis* natto #1 株の菌体内外の免疫調節作用を調べた結果、菌体外成分を多く含む培養上清に高い IL-10 誘導活性がみられ、その免疫調節作用の主要成分として分子シャペロン GroEL を同定した。

さらに納豆菌が分泌する GroEL の作用機序について解析した結果、GroEL は THP-1 DC の TLR2 受容体を介して *JUN* や *NFκB* シグナル経路などを活性化し、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を誘導している可能性が強く示唆された。

また、納豆菌体外への GroEL 分泌は孢子形成と関連していることがわかり、芽胞形成が促進された納豆菌は菌体外への GroEL 分泌量が増大し、高い免疫調節作用を示す可能性が示唆された。これらの結果から、GroEL を多く含有する市販納豆は、高い免疫調節効果を発揮する可能性が高いと考えられる。

5-4. 参考文献

1. Afzaal, M. et al. Nutritional Health Perspective of Natto: A Critical Review. *Biochemistry Research International*, **2022**, 9–18.
2. Ashiuchi, M. et al. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly-gamma-glutamate. *J. Biochem.*, **1998**, *123*, 1156–1163.
3. Ogawa, Y. et al. Efficient Production of γ -Polyglutamic Acid by *Bacillus subtilis* (natto) in Jar Fermenters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1997**, *61*, 1684–1687.
4. Samanya, M. et al. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **2002**, *133*, 95–104.
5. Xu, X. et al. Immunomodulatory effects of *Bacillus subtilis* (natto) B4 spores on murine macrophages. *Microbiol. Immunol.*, **2012**, *56*, 817–824.
6. Hong, H.A. et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2005**, *29*, 813–835.
7. Lei, S. et al. Capability of iturin from *Bacillus subtilis* to inhibit *Candida albicans* in vitro and in vivo. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2019**, *103*, 4377–4392.
8. Bueno, CP. et al. *Bacillus clausii* for Gastrointestinal Disorders: A Narrative Literature Review. *Adv. Ther.*, **2022**, *39*, 4854–4874.
9. Atarashi, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, **2011**, *331*, 337–341.
10. Yin, T. et al. Uptake of *Levilactobacillus brevis* JCM 1059 by THP-1 cells via interaction between SlpB and CAP-1 promotes cytokine production. *Microorganisms*, **2023**, *11*, 247-.
11. Park, JS. et al. *Lactobacillus acidophilus* improves intestinal inflammation in an acute colitis mouse model by regulation of Th17 and Treg cell balance and fibrosis development. *J. Med. Food*, **2018**, *21*, 215–224.
12. Tsai, YT. et al. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, *96*, 853–862.
13. Sung, W. et al. Exopolysaccharides of *Bacillus amyloliquefaciens* Amy-1 mitigate inflammation by inhibiting ERK1/2 and NF- κ B pathways and activating p38/Nrf2 pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*, 10237.

14. Bueno, CP. et al. *Bacillus clausii* for Gastrointestinal Disorders: A Narrative Literature Review. *Adv. Ther.*, **2022**, *39*, 4854-4874.
15. Dias, M. et al. *Lactobacillus* stress protein GroEL prevents colonic inflammation. *J. Gastroenterol.*, **2021**, *56*, 442–455.
16. Khan, MN. et al. Immunogenicity and protective efficacy of GroEL (hsp60) of *Streptococcus pneumoniae* against lethal infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **2009**, *56*, 56–62.
17. Zhu, Y. et al. Probiotic cocktail alleviates intestinal inflammation through improving gut microbiota and metabolites in colitis mice *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2022**, *12*.
18. Shiota, S. et al. Induction of *Porphyromonas gingivalis* GroEL signaling via binding to Toll-like receptors 2 and 4. *Oral Microbiol. Immunol.*, **2006**, *21*, 245–251.
19. León, Y. et al. *In silico* design of a vaccine candidate based on autotransporters and HSP against the causal agent of shigellosis, *Shigella flexneri*. *Molecular Immunology*, **2020**, *121*, 47-58.
20. Camp, AH. et al. A novel pathway of intercellular signalling in *Bacillus subtilis* involves a protein with similarity to a component of type III secretion channels. *Mol. Microbiol.*, **2008**, *69*, 402–417.
21. Doan, T. et al. Novel secretion apparatus maintains spore integrity and developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.*, **2009**, *5*, e1000566.
22. Meisnera, J. et al. Structure of the basal components of a bacterial transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 5446–5451.
23. Nozue, M. et al. Fermented soy products intake and risk of cardiovascular disease and total cancer incidence: The Japan Public Health Center-based Prospective study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **2021**, *75*, 954–968.
24. Katagiri, R. et al. Association of soy and fermented soy product intake with total and cause specific mortality: Prospective cohort study. *BMJ*, **2020**, *29*, m34.

付録

Supplementary Table 1. 納豆菌由来 GroEL により 1.5 倍以上発現上昇した
THP-1 DC の遺伝子群

Gene	PBS	GroEL	GroEL/PBS	p.value	Product
CXCL8	2717	486156	178.95	1.52E-14	C-X-C motif chemokine ligand 8
CCL3L1	296	22347	75.41	4.84E-15	C-C motif chemokine ligand 3 like 1
BIRC3	388	20757	53.54	3.45E-12	baculoviral IAP repeat containing 3
TNFAIP2	2101	93247	44.39	2.35E-18	TNF alpha induced protein 2
MARCKS	872	36017	41.32	6.41E-18	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
SOD2	5366	188924	35.21	4.61E-16	superoxide dismutase 2
REL	792	21978	27.75	1.35E-16	REL proto-oncogene, NF-kB subunit
TRAF1	2342	60149	25.68	2.54E-14	TNF receptor associated factor 1
CCL20	613	15618	25.46	1.84E-12	C-C motif chemokine ligand 20
ABTB2	661	16160	24.45	9.57E-17	ankyrin repeat and BTB domain containing 2
PDGFB	215	5029	23.43	3.61E-17	platelet derived growth factor subunit B
SERPINE2	2565	56321	21.96	2.36E-14	serpin family E member 2
EBI3	556	11154	20.05	2.86E-14	Epstein-Barr virus induced 3
CHST2	215	4268	19.88	3.08E-15	carbohydrate sulfotransferase 2
HIVEP2	338	6461	19.14	1.43E-13	HIVEP zinc finger 2
IRAK2	516	9837	19.08	6.96E-16	interleukin 1 receptor associated kinase 2
KCNN2	442	7246	16.41	4.60E-15	potassium calcium-activated channel subfamily N member 2
BCL3	292	4714	16.16	9.26E-14	BCL3 transcription coactivator
EHD1	2397	37883	15.80	3.50E-15	EH domain containing 1
ETV3L	227	3542	15.63	1.45E-16	ETS variant transcription factor 3 like
TFPI2	597	9302	15.59	6.94E-14	tissue factor pathway inhibitor 2
PIM1	1443	22435	15.55	1.00E-15	Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
SNN	1180	17652	14.96	1.78E-17	stannin
TNFAIP3	3075	45869	14.92	5.37E-15	TNF alpha induced protein 3
TNFRSF9	281	4175	14.84	7.43E-14	TNF receptor superfamily member 9
N4BP2L1	309	4349	14.09	4.58E-17	NEDD4 binding protein 2 like 1
MFSD2A	4446	62518	14.06	3.89E-15	major facilitator superfamily domain containing 2A
IL1B	8237	113919	13.83	3.54E-12	interleukin 1 beta
G0S2	979	12907	13.18	1.62E-12	G0/G1 switch 2
BCL2A1	661	8673	13.11	1.55E-15	BCL2 related protein A1
MCOLN2	349	4517	12.95	5.13E-17	mucolipin TRP cation channel 2
XIRP1	221	2818	12.73	2.03E-15	xin actin binding repeat containing 1
ZBTB10	292	3433	11.77	9.86E-13	zinc finger and BTB domain containing 10
GADD45B	270	3145	11.65	4.61E-14	growth arrest and DNA damage inducible beta
CFLAR	1644	19134	11.64	1.24E-15	CASP8 and FADD like apoptosis regulator
KLF5	308	3562	11.58	2.92E-13	Kruppel like factor 5
CNKSR3	608	7011	11.53	5.27E-16	CNKSR family member 3
RNA18SN5	271	3065	11.29	0.002288395	RNA, 18S ribosomal RNA N5
CD40	693	7793	11.24	6.22E-15	CD40 molecule
ZC3H12A	1375	15307	11.13	1.37E-14	zinc finger CCCH-type containing 12A
CD83	1810	19810	10.94	2.80E-15	CD83 molecule
STAT5A	2217	23529	10.61	2.76E-16	signal transducer and activator of transcription 5A
KDM6B	745	7843	10.53	8.53E-16	lysine demethylase 6B
NRG1	306	3210	10.50	2.21E-15	neuregulin 1, transcript variant HRG-beta1b
MYB	395	4133	10.45	1.67E-13	MYB proto-oncogene
DYRK3	325	3319	10.21	1.77E-15	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 3
ECE1	457	4427	9.69	4.58E-15	endothelin converting enzyme 1
TNIP1	2866	27541	9.61	2.67E-15	TNFAIP3 interacting protein 1
CCL22	808	7397	9.16	2.38E-13	C-C motif chemokine ligand 22

IL7R	207	1898	9.15	5.33E-13	interleukin 7 receptor
ICAM1	15875	144450	9.10	8.11E-15	intercellular adhesion molecule 1
RNA45SN5	357	3227	9.04	0.002383135	RNA, 45S pre-ribosomal N5
MAP3K8	360	3247	9.02	5.32E-13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
RGS16	7186	63066	8.78	1.01E-14	regulator of G protein signaling 16
BMP2	497	4210	8.47	2.43E-14	bone morphogenetic protein 2
TRIP10	1215	10217	8.41	1.26E-16	thyroid hormone receptor interactor 10
NFKBIA	5065	42197	8.33	1.37E-14	NFKB inhibitor alpha
PLK3	1258	10453	8.31	8.17E-14	polo like kinase 3
ZC3H12C	2694	22240	8.25	3.08E-15	zinc finger CCCH-type containing 12C
POU2F2	1740	14000	8.04	4.35E-16	POU class 2 homeobox 2
BCL9L	1131	9096	8.04	2.54E-15	BCL9 like
TNFAIP8	2176	17258	7.93	3.75E-13	TNF alpha induced protein 8
TNC	333	2585	7.76	8.01E-09	tenascin C
PDE4DIP	230	1744	7.58	6.26E-14	phosphodiesterase 4D interacting protein
USP12	4005	30315	7.57	2.56E-15	ubiquitin specific peptidase 12
AMPD3	2502	17959	7.18	4.04E-13	adenosine monophosphate deaminase 3
KYNU	1440	10330	7.17	1.11E-15	kynureninase,
PIM3	4911	35229	7.17	2.36E-13	Pim-3 proto-oncogene, serine/threonine kinase
DRAM1	245	1756	7.17	1.80E-14	DNA damage regulated autophagy modulator 1
RHOF	528	3690	6.99	2.01E-15	ras homolog family member F, filopodia associated
NFKB1	2556	17855	6.99	5.20E-15	nuclear factor kappa B subunit 1
ITGB8	900	6235	6.93	1.95E-14	integrin subunit beta 8
TWIST1	251	1734	6.90	8.59E-11	twist family bHLH transcription factor 1
SPECC1L-ADORA2A	801	5441	6.80	5.17E-15	SPECC1L-ADORA2A readthrough (NMD candidate)
NFKB2	2908	19613	6.74	2.59E-14	nuclear factor kappa B subunit 2
NBPF19	327	2173	6.64	1.74E-13	NBPF member 19
DDIT4	698	4494	6.44	5.32E-11	DNA damage inducible transcript 4
NEDD4L	394	2531	6.42	2.92E-15	NEDD4 like E3 ubiquitin protein ligase
UST-AS2	228	1464	6.41	1.14E-11	UST antisense RNA 2
PVR	2904	18290	6.30	9.53E-14	PVR cell adhesion molecule
GIMAP8	454	2815	6.20	6.70E-12	GTPase, IMAP family member 8
RNA45SN2	610	3762	6.16	0.000357793	RNA, 45S pre-ribosomal N2
CSF1	10472	62973	6.01	1.35E-09	colony stimulating factor 1
IGFBP3	5721	34249	5.99	5.82E-10	insulin like growth factor binding protein 3, transcript variant 2
STX11	305	1811	5.93	1.49E-11	syntaxin 11
COL5A3	356	2106	5.92	7.16E-09	collagen type V alpha 3 chain
FGF2	278	1640	5.89	8.48E-12	fibroblast growth factor 2
RNA18SN2	483	2819	5.83	0.000266731	RNA, 18S ribosomal RNA N2
CD70	594	3379	5.69	1.92E-15	CD70 molecule
RIPK2	1382	7683	5.56	3.72E-12	receptor interacting serine/threonine kinase 2
ATP2B1	2205	12152	5.51	2.12E-15	ATPase plasma membrane Ca2+ transporting 1
BTG2	9696	52225	5.39	2.17E-14	BTG anti-proliferation factor 2
PTGER4	1197	6404	5.35	7.39E-14	prostaglandin E receptor 4
JADE2	446	2385	5.35	8.37E-14	jade family PHD finger 2
NINJ1	2458	13085	5.32	2.16E-13	ninjurin 1
SOX13	219	1157	5.28	2.10E-13	SRY-box transcription factor 13
RASGEF1B	944	4969	5.26	7.67E-13	RasGEF domain family member 1B
NR4A3	500	2626	5.25	2.18E-13	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3
B4GALT5	3521	18362	5.22	4.23E-15	beta-1,4-galactosyltransferase 5
EGLN3	225	1164	5.17	4.95E-13	egl-9 family hypoxia inducible factor 3
RASSF4	905	4651	5.14	1.53E-13	Ras association domain family member 4
ARL5B	989	5080	5.14	1.14E-14	ADP ribosylation factor like GTPase 5B
OGFRL1	7108	36288	5.11	1.06E-14	opioid growth factor receptor like 1
DENND4A	1411	7138	5.06	3.69E-12	DENN domain containing 4A

KCNQ4	248	1254	5.05	1.38E-11	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 4
NOCT	290	1456	5.01	1.88E-11	nocturnin
RASSF5	4551	22591	4.96	6.43E-15	Ras association domain family member 5
WTAP	2453	12119	4.94	3.35E-14	WT1 associated protein,
PRKD3	1075	5296	4.93	6.22E-14	protein kinase D3
ETV3	5818	27888	4.79	1.37E-13	ETS variant transcription factor 3
SLC7A11	2210	10514	4.76	6.90E-13	solute carrier family 7 member 11
CHST7	728	3432	4.71	1.80E-13	carbohydrate sulfotransferase 7
DKK2	292	1322	4.52	1.54E-12	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2
CCL2	957	4299	4.49	8.89E-08	C-C motif chemokine ligand 2
SAT1	1455	6517	4.48	1.05E-13	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
FSD1L	237	1056	4.46	4.67E-11	fibronectin type III and SPRY domain containing 1 like
RNF19B	1802	8036	4.46	1.68E-13	ring finger protein 19B
SDC4	2760	12226	4.43	2.43E-13	syndecan 4
CD274	356	1567	4.40	6.02E-12	CD274 molecule
NUB1	1939	8464	4.37	1.44E-14	negative regulator of ubiquitin like proteins 1
CYLD	1291	5600	4.34	1.99E-14	CYLD lysine 63 deubiquitinase
BCL2	1292	5603	4.34	1.07E-13	BCL2 apoptosis regulator
WT1	522	2257	4.32	3.26E-14	WT1 transcription factor
CAV1	292	1257	4.31	3.61E-09	caveolin 1
MGLL	1518	6535	4.30	1.31E-14	monoglyceride lipase
NFAT5	1343	5711	4.25	9.00E-13	nuclear factor of activated T cells 5
JAG1	2209	9264	4.19	1.11E-11	jagged canonical Notch ligand 1
MSC	6149	25735	4.19	1.91E-13	musculin
MAFF	2492	10420	4.18	1.48E-11	MAF bZIP transcription factor F
SLC39A14	2472	10323	4.18	4.02E-11	solute carrier family 39 member 14
INHBA	633	2640	4.17	4.24E-11	inhibin subunit beta A
PNRC1	2098	8654	4.13	4.55E-10	proline rich nuclear receptor coactivator 1
ITGA6	2961	12187	4.12	2.90E-12	integrin subunit alpha 6
BAALC	226	924	4.09	9.83E-11	BAALC binder of MAP3K1 and KLF4
MIR155HG	652	2653	4.07	3.96E-12	MIR155 host gene
SMIM3	573	2314	4.04	2.59E-12	small integral membrane protein 3
NRP2	991	3984	4.02	1.36E-13	neuropilin 2
KANK1	1796	7204	4.01	1.81E-12	KN motif and ankyrin repeat domains 1
FLVCR2	397	1584	3.99	9.56E-13	FLVCR heme transporter 2
LHX2	302	1196	3.96	1.03E-11	LIM homeobox 2
TIFA	294	1163	3.95	2.68E-11	TRAF interacting protein with forkhead associated domain
TNIP2	1069	4170	3.90	4.27E-14	TNFAIP3 interacting protein 2
LRIG1	258	1003	3.88	1.33E-12	leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1
TMEM123	14381	55560	3.86	5.74E-14	transmembrane protein 123
IRF8	4040	15483	3.83	5.15E-14	interferon regulatory factor 8
DUSP4	2791	10594	3.80	2.14E-13	dual specificity phosphatase 4
IRF1	1593	6038	3.79	1.82E-14	interferon regulatory factor 1
HUWE1	7187	27104	3.77	2.27E-11	HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
PLAGL2	705	2637	3.74	4.90E-14	PLAG1 like zinc finger 2
F3	824	3017	3.66	3.90E-12	coagulation factor III, tissue factor
IER5	1716	6282	3.66	3.65E-12	immediate early response 5
NAMPT	2055	7512	3.66	1.97E-14	nicotinamide phosphoribosyltransferase
F8A1	388	1412	3.64	1.09E-11	coagulation factor VIII associated 1
RBM17	1895	6849	3.61	4.30E-14	RNA binding motif protein 17
DCBLD2	921	3321	3.61	2.32E-12	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2
PIK3C2B	505	1820	3.60	2.24E-09	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta
SLC7A2	325	1159	3.56	1.24E-07	solute carrier family 7 member 2
BASP1	2143	7613	3.55	1.24E-13	brain abundant membrane attached signal protein 1

HS3ST3B1	695	2455	3.53	6.66E-13	heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 3B1
MEIS2	601	2092	3.48	1.08E-12	Meis homeobox 2
DENND3	2136	7349	3.44	1.41E-13	DENN domain containing 3
GEM	1111	3796	3.42	1.50E-09	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
KLF3	478	1632	3.41	1.64E-10	Kruppel like factor 3
ATP1B1	7719	26162	3.39	3.12E-13	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 1
LIMS2	208	705	3.39	1.98E-10	LIM zinc finger domain containing 2
POLR1F	1260	4261	3.38	6.33E-13	RNA polymerase I subunit F
NFE2L2	5137	17343	3.38	6.86E-13	NFE2 like bZIP transcription factor 2
PPP1R15B	3288	11074	3.37	2.52E-11	protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B
RELB	1508	5070	3.36	4.83E-11	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit
ICAM5	454	1524	3.36	5.07E-10	intercellular adhesion molecule 5
CEBPB	3943	13195	3.35	3.08E-10	CCAAT enhancer binding protein beta
CYP27B1	264	882	3.35	4.08E-11	cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1
SEMA4C	520	1739	3.34	3.94E-10	semaphorin 4C
FOSL2	4558	15218	3.34	2.88E-13	FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit
DENND5A	1299	4327	3.33	5.63E-14	DENN domain containing 5A
JUNB	5286	17591	3.33	3.92E-12	JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
TNFRSF10B	1038	3453	3.33	1.71E-11	TNF receptor superfamily member 10b
PPTC7	1907	6306	3.31	2.28E-13	protein phosphatase targeting COQ7
KLF7	888	2922	3.29	6.01E-13	Kruppel like factor 7
ARRDC3	1328	4351	3.28	3.48E-13	arrestin domain containing 3
PERP	2063	6746	3.27	5.86E-11	p53 apoptosis effector related to PMP22
CD82	4068	13098	3.22	9.32E-12	CD82 molecule
CACNA1E	1114	3578	3.21	2.09E-11	calcium voltage-gated channel subunit alpha1 E
TP53BP2	3393	10879	3.21	3.91E-12	tumor protein p53 binding protein 2
CYP1B1	13444	43086	3.20	4.26E-13	cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1
ANKLE2	2907	9309	3.20	1.62E-13	ankyrin repeat and LEM domain containing 2
EEF1AKMT3	366	1164	3.18	5.84E-11	EEF1A lysine methyltransferase 3
SVIL	937	2981	3.18	2.43E-13	supervillin
CYRIA	449	1420	3.16	1.04E-09	CYFIP related Rac1 interactor A
GPR132	861	2724	3.16	2.90E-13	G protein-coupled receptor 132
PDSS1	530	1666	3.14	1.55E-11	decaprenyl diphosphate synthase subunit 1
HIVEP3	4102	12851	3.13	2.80E-11	HIVEP zinc finger 3
ADAMTS1	1440	4497	3.12	3.03E-08	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1
NOL4L	264	822	3.11	8.86E-10	nucleolar protein 4 like
EYA3	321	995	3.10	7.80E-11	EYA transcriptional coactivator and phosphatase 3
TRIM36	390	1207	3.10	2.24E-11	tripartite motif containing 36
SPAG9	9569	29592	3.09	3.27E-12	sperm associated antigen 9
CKB	761	2323	3.05	6.55E-11	creatine kinase B
LITAF	5993	18284	3.05	1.02E-13	lipopolysaccharide induced TNF factor
BCL2L1	2166	6598	3.05	3.32E-13	BCL2 like 1
MOB3C	1034	3146	3.04	1.75E-12	MOB kinase activator 3C
SEMA3C	325	987	3.03	4.46E-09	semaphorin 3C
SPHK1	3224	9774	3.03	3.77E-13	sphingosine kinase 1
FKBP5	2291	6915	3.02	1.57E-13	FKBP prolyl isomerase 5
TCF7L2	312	938	3.01	3.65E-11	transcription factor 7 like 2
SLC5A3	10864	32645	3.01	1.82E-12	solute carrier family 5 member 3
IKZF1	3343	10006	2.99	6.95E-13	IKAROS family zinc finger 1
BHLHE41	1312	3924	2.99	6.90E-08	basic helix-loop-helix family member e41
STK26	1427	4267	2.99	5.73E-13	serine/threonine kinase 26
RHOG	3226	9612	2.98	1.01E-12	ras homolog family member G
FOSL1	1362	3993	2.93	6.67E-13	FOS like 1, AP-1 transcription factor subunit
MYEOV	616	1803	2.93	9.77E-10	myeloma overexpressed
RASA4B	209	610	2.92	0.000235482	RAS p21 protein activator 4B
MYO10	1773	5166	2.91	3.92E-12	myosin X

OLR1	3058	8846	2.89	6.22E-14	oxidized low density lipoprotein receptor 1
SERPINE1	1670	4823	2.89	4.52E-09	serpin family E member 1
SMAD7	3498	10101	2.89	3.60E-13	SMAD family member 7
MAP2K3	1639	4697	2.87	5.78E-12	mitogen-activated protein kinase kinase 3
LOC100507403	2034	5796	2.85	1.33E-12	uncharacterized LOC100507403
TRIB1	6465	18426	2.85	6.03E-13	tribbles pseudokinase 1
ACSL1	4475	12736	2.85	4.42E-13	acyl-CoA synthetase long chain family member 1
KITLG	1539	4348	2.82	1.36E-12	KIT ligand
TAF4B	365	1026	2.81	4.06E-10	TATA-box binding protein associated factor 4b
PSD3	444	1247	2.81	1.32E-11	pleckstrin and Sec7 domain containing 3
UBTD2	1450	4072	2.81	3.26E-13	ubiquitin domain containing 2
FCHSD2	1057	2951	2.79	1.17E-11	FCH and double SH3 domains 2
LOC124904743	472	1318	2.79	1.06E-11	uncharacterized LOC124904743
IRS1	284	790	2.78	2.78E-08	insulin receptor substrate 1
TICAM1	911	2514	2.76	1.04E-11	toll like receptor adaptor molecule 1
TJP2	2125	5840	2.75	3.82E-11	tight junction protein 2
NFKBID	354	966	2.73	1.04E-09	NFKB inhibitor delta
RN7SL1	880	2399	2.73	0.008560432	RNA component of signal recognition particle 7SL1
MED14	1884	5130	2.72	7.59E-13	mediator complex subunit 14
LRCH1	1618	4398	2.72	2.64E-12	leucine rich repeats and calponin homology domain containing 1
RFFL	500	1359	2.72	6.27E-11	ring finger and FYVE like domain containing E3 ubiquitin protein ligase
ATXN1	234	629	2.69	6.63E-09	ataxin 1
MREG	254	682	2.69	1.98E-08	melanoregulin
CD44	33333	89014	2.67	1.53E-11	CD44 molecule (Indian blood group)
BTBD19	215	573	2.66	3.64E-10	BTB domain containing 19
CEBPD	691	1837	2.66	4.02E-08	CCAAT enhancer binding protein delta
PRDM15	409	1085	2.65	3.67E-11	PR/SET domain 15
MAP3K5	1368	3620	2.65	1.60E-12	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
CDKN1A	4545	12024	2.65	1.52E-12	cyclin dependent kinase inhibitor 1A
LOC374443	306	810	2.65	5.06E-10	C-type lectin domain family 2 member D pseudogene
SRGN	8455	22363	2.64	1.15E-10	serglycin
OTUD4	3537	9340	2.64	2.07E-12	OTU deubiquitinase 4
PRDM1	2060	5431	2.64	2.01E-12	PR/SET domain 1
CDYL	1148	3024	2.63	3.34E-11	chromodomain Y like
AHDC1	718	1884	2.62	6.25E-12	AT-hook DNA binding motif containing 1
DNAJB6	4966	13007	2.62	4.86E-13	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B6
CDK6	6237	16180	2.59	1.19E-11	cyclin dependent kinase 6
BAZ1A-AS1	267	690	2.59	1.17E-08	BAZ1A antisense RNA 1
TGIF2	945	2442	2.58	1.95E-12	TGFB induced factor homeobox 2
ACVR2A	1881	4853	2.58	7.08E-12	activin A receptor type 2A
DDX21	11269	29071	2.58	2.44E-12	DExD-box helicase 21
BAZ1A	4456	11427	2.56	3.28E-12	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A
RAP2C	2358	6010	2.55	6.28E-13	RAP2C, member of RAS oncogene family
RDX	1432	3638	2.54	5.47E-11	radixin
APOO	293	745	2.54	3.91E-09	apolipoprotein O
TIPARP	2371	6004	2.53	5.65E-11	TCDD inducible poly(ADP-ribose) polymerase
PTBP2	309	780	2.53	2.74E-10	polypyrimidine tract binding protein 2
SNHG15	487	1224	2.51	4.01E-10	small nucleolar RNA host gene 15
SLC1A3	1735	4349	2.51	6.51E-12	solute carrier family 1 member 3
CCSER2	1215	3035	2.50	2.91E-11	coiled-coil serine rich protein 2
B4GALT6	696	1735	2.49	9.97E-10	beta-1,4-galactosyltransferase 6
PARM1	1579	3934	2.49	1.12E-10	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
MAPKAPK2	6183	15372	2.49	5.53E-13	MAPK activated protein kinase 2
MSANTD3	1797	4447	2.47	1.27E-11	Myb/SANT DNA binding domain containing 3
CLDN1	333	821	2.47	6.68E-10	claudin 1

BHLHE40	3751	9245	2.46	4.92E-13	basic helix-loop-helix family member e40
SIK3	1225	3018	2.46	1.76E-12	SIK family kinase 3
POLR3D	2337	5730	2.45	1.00E-10	RNA polymerase III subunit D
MAMLD1	511	1252	2.45	7.43E-12	mastermind like domain containing 1
INSIG1	14363	35142	2.45	6.49E-13	insulin induced gene 1
RAD51L3-RFFL	477	1163	2.44	1.31E-10	RAD51L3-RFFL readthrough
HS3ST3A1	317	772	2.43	3.71E-10	heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 3A1
BTG3	798	1936	2.43	1.50E-10	BTG anti-proliferation factor 3
ETS1	8443	20461	2.42	4.70E-12	ETS proto-oncogene 1
LOC124903027	855	2069	2.42	1.24E-11	uncharacterized LOC124903027
AP1S3	477	1153	2.42	5.36E-11	adaptor related protein complex 1 subunit sigma 3
PIK3R5	4059	9770	2.41	1.61E-12	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5
DTX4	1571	3778	2.41	3.57E-11	deltex E3 ubiquitin ligase 4
RASSF8	652	1567	2.40	7.26E-11	Ras association domain family member 8
JAK1	2855	6843	2.40	1.85E-11	Janus kinase 1
PANX2	245	587	2.40	2.84E-08	pannexin 2
GTF3C4	1784	4265	2.39	1.47E-12	general transcription factor IIIC subunit 4
SRGAP1	558	1330	2.39	2.70E-11	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1
GPR137B	1563	3721	2.38	2.58E-12	G protein-coupled receptor 137B
AHR	1215	2884	2.37	2.91E-09	aryl hydrocarbon receptor
ARL4A	442	1049	2.37	3.39E-11	ADP ribosylation factor like GTPase 4A
TPRA1	2275	5387	2.37	2.24E-12	transmembrane protein adipocyte associated 1
UBE2H	2251	5329	2.37	1.35E-11	ubiquitin conjugating enzyme E2 H
LUCAT1	269	636	2.36	8.73E-10	lung cancer associated transcript 1
PMAIP1	847	1999	2.36	3.14E-11	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
MRPL20-DT	236	551	2.34	3.81E-09	MRPL20 divergent transcript
ARFGAP3	1800	4199	2.33	7.28E-13	ADP ribosylation factor GTPase activating protein 3
EPB41L3	871	2029	2.33	1.19E-11	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 3
P3H2	779	1812	2.33	7.15E-11	prolyl 3-hydroxylase 2
ELL2	4053	9385	2.32	1.21E-12	elongation factor for RNA polymerase II 2
LUC7L	466	1078	2.31	1.14E-10	LUC7 like
PLEK	17652	40833	2.31	7.37E-10	pleckstrin
LRP12	9323	21556	2.31	1.63E-12	LDL receptor related protein 12
SLC11A2	1226	2826	2.31	5.05E-12	solute carrier family 11 member 2
IRGQ	3303	7583	2.30	1.91E-12	immunity related GTPase Q
TBX3	223	511	2.29	1.86E-08	T-box transcription factor 3
E2F5	203	464	2.29	1.24E-08	E2F transcription factor 5
UXS1	3226	7330	2.27	2.65E-11	UDP-glucuronate decarboxylase 1
PLXNC1	381	863	2.27	2.94E-09	plexin C1
PRMT1	4191	9462	2.26	4.68E-12	protein arginine methyltransferase 1
GRAMD1A	1466	3309	2.26	9.60E-12	GRAM domain containing 1A
ASAP2	1400	3135	2.24	1.43E-10	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2
TRAF4	613	1369	2.23	7.07E-11	TNF receptor associated factor 4
PLD6	669	1494	2.23	5.57E-09	phospholipase D family member 6
CDC42EP3	4521	10046	2.22	5.41E-12	CDC42 effector protein 3
SLCO3A1	465	1032	2.22	2.32E-10	solute carrier organic anion transporter family member 3A1
FAM241A	662	1469	2.22	5.67E-11	family with sequence similarity 241 member A
RDH10	1365	3026	2.22	1.38E-11	retinol dehydrogenase 10
ASAP1	15086	33423	2.22	7.83E-12	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1
ZEB2	577	1273	2.21	4.48E-11	zinc finger E-box binding homeobox 2
VCPKMT	231	509	2.20	1.35E-08	valosin containing protein lysine methyltransferase
PPIF	14315	31517	2.20	8.29E-12	peptidylprolyl isomerase F
GCLM	2779	6101	2.20	5.73E-11	glutamate-cysteine ligase modifier subunit
ATAD3B	438	961	2.19	1.35E-09	ATPase family AAA domain containing 3B
MAML2	1723	3777	2.19	1.02E-10	mastermind like transcriptional coactivator 2

PANX1	1610	3528	2.19	2.12E-12	pannexin 1
SPRY4	586	1277	2.18	4.32E-11	sprouty RTK signaling antagonist 4
SMS	3280	7138	2.18	4.06E-12	spermine synthase
GPR35	2446	5322	2.18	3.25E-12	G protein-coupled receptor 35
COL8A2	211	460	2.18	3.70E-08	collagen type VIII alpha 2 chain
NLGN4Y	472	1026	2.17	1.43E-08	neuroligin 4 Y-linked
NOP16	1814	3937	2.17	7.11E-11	NOP16 nucleolar protein
MSANTD3-TMEFF1	1248	2706	2.17	9.41E-11	MSANTD3-TMEFF1 readthrough
MED13L	4192	9081	2.17	2.82E-10	mediator complex subunit 13L
LINC02458	238	515	2.16	3.73E-06	long intergenic non-protein coding RNA 2458
NAA30	1828	3950	2.16	1.68E-12	N-alpha-acetyltransferase 30, NatC catalytic subunit
ADGRE5	3856	8333	2.16	1.07E-12	adhesion G protein-coupled receptor E5
DOT1L	11348	24477	2.16	5.82E-11	DOT1 like histone lysine methyltransferase
ZBTB38	1266	2727	2.15	4.97E-11	zinc finger and BTB domain containing 38
BIRC2	2157	4639	2.15	6.92E-12	baculoviral IAP repeat containing 2
C3orf80	2189	4669	2.13	7.58E-09	chromosome 3 open reading frame 80
CITED4	6718	14285	2.13	1.87E-09	Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 4
SNHG16	3532	7477	2.12	4.10E-11	small nucleolar RNA host gene 16
FAIM	508	1076	2.12	1.69E-08	Fas apoptotic inhibitory molecule
EZH2	749	1582	2.11	5.46E-10	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
CPNE8	1076	2270	2.11	2.56E-11	copine 8
RN7SL2	695	1463	2.10	0.036841335	RNA component of signal recognition particle 7SL2
LOC730101	301	632	2.10	1.39E-09	uncharacterized LOC730101
NOLC1	3938	8266	2.10	3.41E-11	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1
BCOR	3137	6574	2.10	9.26E-09	BCL6 corepressor
ZNFX1	4066	8515	2.09	1.59E-11	zinc finger NFX1-type containing 1
TRMT61A	970	2028	2.09	4.73E-11	tRNA methyltransferase 61A
C17orf58	264	552	2.09	1.60E-06	chromosome 17 open reading frame 58
MMP10	222	463	2.08	4.93E-07	matrix metalloproteinase 10
MFHAS1	391	813	2.08	9.76E-09	multifunctional Roco family signaling regulator 1
NAB1	1129	2350	2.08	2.44E-09	NGFI-A binding protein 1
BCL6	4911	10212	2.08	5.30E-11	BCL6 transcription repressor
RCN1	7686	15941	2.07	5.85E-12	reticulocalbin 1
PPP3CC	743	1540	2.07	1.57E-10	protein phosphatase 3 catalytic subunit gamma
JDP2	200	413	2.06	1.50E-06	Jun dimerization protein 2
AGO2	6380	13156	2.06	1.85E-10	argonaute RISC catalytic component 2
ELOA	4235	8720	2.06	4.35E-12	elongin A
LOC105378179	718	1476	2.06	0.037195676	uncharacterized LOC105378179
PPP1R15A	5390	11034	2.05	2.94E-11	protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A
CDK17	1598	3268	2.04	5.21E-12	cyclin dependent kinase 17
LOC107984475	436	891	2.04	7.42E-09	uncharacterized LOC107984475
MED13	4626	9433	2.04	6.97E-11	mediator complex subunit 13
PHLPP2	425	866	2.04	8.63E-10	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2
PLAGL1	625	1271	2.03	2.34E-10	PLAG1 like zinc finger 1
SLC41A2	2412	4901	2.03	9.84E-12	solute carrier family 41 member 2
RXFP1	732	1485	2.03	1.31E-10	relaxin family peptide receptor 1
SLC35F2	586	1190	2.03	1.59E-09	solute carrier family 35 member F2
HCK	1776	3599	2.03	5.30E-11	HCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
RFTN1	7533	15234	2.02	5.01E-12	raftlin, lipid raft linker 1
TEAD1	1361	2750	2.02	6.82E-11	TEA domain transcription factor 1
UNC5B	2920	5874	2.01	3.38E-10	unc-5 netrin receptor B
WDR4	376	756	2.01	2.40E-08	WD repeat domain 4
KCNG1	270	542	2.00	1.30E-06	potassium voltage-gated channel modifier subfamily G member 1
SPATA5L1	856	1713	2.00	8.09E-10	spermatogenesis associated 5 like 1

YRDC	1684	3362	2.00	8.42E-11	yrnC N6-threonylcarbamoyltransferase domain containing
ARNTL2	3436	6850	1.99	5.02E-11	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like 2
SLCO4A1	1183	2349	1.99	2.02E-10	solute carrier organic anion transporter family member 4A1
ALCAM	21822	43287	1.98	1.56E-09	activated leukocyte cell adhesion molecule
MICALL1	3502	6929	1.98	4.62E-11	MICAL like 1
SERTAD2	4568	9026	1.98	6.77E-11	SERTA domain containing 2
PAXIP1	546	1079	1.98	1.21E-10	PAX interacting protein 1
SAMD4A	1171	2310	1.97	3.80E-11	sterile alpha motif domain containing 4A
CSRNP1	1971	3884	1.97	2.94E-10	cysteine and serine rich nuclear protein 1
RHOBTB3	588	1157	1.97	1.14E-08	Rho related BTB domain containing 3
SNAPC4	974	1915	1.97	5.40E-11	small nuclear RNA activating complex polypeptide 4
SMCO2	638	1246	1.95	2.38E-10	single-pass membrane protein with coiled-coil domains 2
SSH1	2108	4117	1.95	2.06E-10	slingshot protein phosphatase 1
ZC3H7B	1122	2191	1.95	2.09E-08	zinc finger CCCH-type containing 7B
E2F7	1021	1992	1.95	2.17E-10	E2F transcription factor 7
GAL	2974	5802	1.95	1.07E-07	galanin and GMAP prepropeptide
TMEM64	680	1325	1.95	7.29E-11	transmembrane protein 64
RIF1	1628	3169	1.95	3.37E-10	replication timing regulatory factor 1
LOC105375566	235	457	1.95	9.34E-06	uncharacterized LOC105375566
CPEB4	1503	2924	1.95	1.60E-10	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4
BATF	967	1882	1.95	1.31E-08	basic leucine zipper ATF-like transcription factor
TANK	2241	4355	1.94	5.15E-11	TRAF family member associated NFKB activator
IFNGR2	2325	4499	1.94	1.12E-09	interferon gamma receptor 2
FMNL3	4699	9088	1.93	1.27E-11	formin like 3
ROBO1	1839	3550	1.93	5.76E-10	roundabout guidance receptor 1
TMEM131L	567	1090	1.92	9.98E-10	transmembrane 131 like
WDR43	3390	6503	1.92	1.43E-11	WD repeat domain 43
GIMAP5	246	472	1.91	1.29E-07	GTPase, IMAP family member 5
FRY	1600	3054	1.91	1.15E-09	FRY microtubule binding protein
TWNK	947	1808	1.91	5.27E-10	twinkle mtDNA helicase
ETS2	1512	2882	1.91	7.92E-10	ETS proto-oncogene 2
EHD2	1851	3519	1.90	2.51E-10	EH domain containing 2
AGAP6	216	410	1.90	8.77E-08	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 6
ING2	410	779	1.90	2.43E-08	inhibitor of growth family member 2
EIF5	19483	36913	1.89	1.66E-11	eukaryotic translation initiation factor 5
NUP153	1683	3185	1.89	8.85E-11	nucleoporin 153
FAM107B	4819	9120	1.89	7.24E-11	family with sequence similarity 107 member B
UBQLN4	610	1148	1.88	3.68E-09	ubiquilin 4
ZFP36	2020	3800	1.88	1.24E-05	ZFP36 ring finger protein
DKC1	2888	5429	1.88	1.67E-10	dyskerin pseudouridine synthase 1
RNF145	2772	5198	1.87	1.50E-10	ring finger protein 145
UNKL	218	408	1.87	6.30E-07	unk like zinc finger
CPEB2	8782	16402	1.87	1.03E-10	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2
EPB41L4A-AS1	480	893	1.86	1.28E-08	EPB41L4A antisense RNA 1
TLR2	3122	5805	1.86	2.05E-11	toll like receptor 2
CREB1	1554	2889	1.86	1.58E-10	cAMP responsive element binding protein 1
PIK3R5-DT	232	430	1.86	9.44E-08	PIK3R5 divergent transcript
KCNQ3	328	608	1.86	1.27E-06	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 3
MTHFD2	6526	12107	1.86	1.19E-09	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
SAMD8	1262	2332	1.85	2.81E-10	sterile alpha motif domain containing 8
PLXNA1	4105	7568	1.84	3.12E-10	plexin A1
HBEGF	3885	7155	1.84	1.50E-10	heparin binding EGF like growth factor
POLR1C	1673	3081	1.84	4.18E-11	RNA polymerase I and III subunit C
DUSP1	1625	2990	1.84	1.23E-10	dual specificity phosphatase 1
RALGAP2	373	684	1.83	3.10E-08	Ral GTPase activating protein catalytic subunit alpha 2

ZBTB17	833	1528	1.83	3.14E-10	zinc finger and BTB domain containing 17
LYN	5222	9568	1.83	3.50E-11	LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
GPBP1	2502	4584	1.83	2.39E-10	GC-rich promoter binding protein 1
SNHG3	1235	2258	1.83	1.96E-09	small nucleolar RNA host gene 3
ITGB3	4418	8074	1.83	1.44E-09	integrin subunit beta 3
ERRFI1	298	544	1.83	2.77E-08	ERBB receptor feedback inhibitor 1
DUSP5	4564	8318	1.82	9.52E-10	dual specificity phosphatase 5
CYB561	388	706	1.82	8.27E-09	cytochrome b561
DUSP10	957	1739	1.82	8.50E-11	dual specificity phosphatase 10
RRP12	2542	4618	1.82	2.62E-09	ribosomal RNA processing 12 homolog
SNHG1	1178	2139	1.82	3.99E-09	small nucleolar RNA host gene 1
HR	456	828	1.82	5.91E-08	HR lysine demethylase and nuclear receptor corepressor
SLC43A3	11526	20878	1.81	1.05E-10	solute carrier family 43 member 3
TXNRD1	12446	22493	1.81	3.76E-11	thioredoxin reductase 1
ZNF189	754	1360	1.80	3.05E-09	zinc finger protein 189
ARL8B	7617	13727	1.80	4.74E-11	ADP ribosylation factor like GTPase 8B
NMT2	260	466	1.79	2.11E-07	N-myristoyltransferase 2
SMAP2	55891	100058	1.79	1.04E-10	small ArfGAP2
SLC23A2	3566	6375	1.79	4.54E-11	solute carrier family 23 member 2
TRAF3	3457	6178	1.79	1.32E-09	TNF receptor associated factor 3
EPB41	788	1408	1.79	2.94E-09	erythrocyte membrane protein band 4.1
BMP1	4059	7248	1.79	1.35E-10	bone morphogenetic protein 1
GRAMD2B	217	388	1.78	3.78E-06	GRAM domain containing 2B
NBPF14	435	775	1.78	6.46E-08	NBPF member 14
GIMAP1- GIMAP5	263	469	1.78	1.79E-07	GIMAP1-GIMAP5 readthrough
PELI1	361	641	1.78	1.60E-08	pellino E3 ubiquitin protein ligase 1
ARHGAP21	1016	1805	1.78	4.58E-09	Rho GTPase activating protein 21
UTP4	971	1723	1.77	4.03E-10	UTP4 small subunit processome component
FLT1	341	606	1.77	2.39E-07	fms related receptor tyrosine kinase 1
LOC101928487	214	379	1.77	2.69E-07	uncharacterized LOC101928487
CHD1	854	1513	1.77	1.29E-09	chromodomain helicase DNA binding protein 1
USP9X	5116	9063	1.77	1.62E-09	ubiquitin specific peptidase 9 X-linked
MPZL1	720	1274	1.77	1.51E-09	myelin protein zero like 1
PFKFB3	3949	6980	1.77	2.83E-11	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
DGKH	249	440	1.77	7.34E-07	diacylglycerol kinase eta
PITPNB	4367	7710	1.77	1.62E-11	phosphatidylinositol transfer protein beta
RCC1	1816	3204	1.76	1.49E-10	regulator of chromosome condensation 1
LOC124900605	347	612	1.76	1.24E-07	uncharacterized LOC124900605
ATXN1-AS1	238	416	1.75	1.51E-06	ATXN1 antisense RNA 1
VEGFC	219	383	1.75	2.64E-07	vascular endothelial growth factor C
BYSL	1434	2510	1.75	1.53E-10	bystin like
MYC	5680	9935	1.75	2.17E-09	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
ASXL1	2105	3682	1.75	3.95E-11	ASXL transcriptional regulator 1
PPRC1	2372	4141	1.75	1.56E-10	PPARG related coactivator 1
UBE2E1	6299	10975	1.74	1.58E-10	ubiquitin conjugating enzyme E2 E1
CD58	1580	2752	1.74	1.46E-08	CD58 molecule, transcript variant 3
ARMC9	1504	2618	1.74	2.98E-10	armadillo repeat containing 9
RAB21	4098	7096	1.73	7.40E-11	RAB21, member RAS oncogene family
EIF5AL1	226	390	1.73	2.93E-07	eukaryotic translation initiation factor 5A like 1
TMEFF1	436	752	1.73	5.67E-08	transmembrane protein with EGF like and two follistatin like domains 1
AMMECR1L	1492	2573	1.72	7.75E-11	AMMECR1 like
ARHGAP31	7005	12080	1.72	3.80E-10	Rho GTPase activating protein 31
RBBP6	1985	3408	1.72	1.11E-08	RB binding protein 6, ubiquitin ligase
ACKR3	250	429	1.71	1.47E-06	atypical chemokine receptor 3

AHCTF1P1	548	937	1.71	9.76E-09	AT-hook containing transcription factor 1 pseudogene 1
MRPS6	4746	8114	1.71	1.60E-10	mitochondrial ribosomal protein S6
DDX3Y	4129	7053	1.71	4.34E-11	DEAD-box helicase 3 Y-linked
QPCT	797	1360	1.71	2.12E-08	glutaminy-peptide cyclotransferase
IL4I1	9319	15882	1.70	2.21E-10	interleukin 4 induced 1
GABPB1	1182	2013	1.70	3.70E-10	GA binding protein transcription factor subunit beta 1
SLC6A8	1661	2829	1.70	4.92E-10	solute carrier family 6 member 8
VOPP1	817	1391	1.70	2.30E-09	VOPP1 WW domain binding protein
P2RX4	3222	5484	1.70	5.27E-11	purinergic receptor P2X 4
LOC122526782	256	436	1.70	4.91E-07	uncharacterized LOC122526782
GSAP	500	849	1.70	9.09E-09	gamma-secretase activating protein
MCTP1	622	1055	1.70	2.04E-08	multiple C2 and transmembrane domain containing 1
KBTBD8	443	752	1.70	9.87E-09	kelch repeat and BTB domain containing 8
PALS1	624	1059	1.70	4.58E-09	protein associated with LIN7 1, MAGUK p55 family member
ZNF778	542	918	1.70	2.93E-09	zinc finger protein 778
STXBP5	1550	2625	1.69	2.21E-08	syntaxin binding protein 5
RHOQ	4524	7646	1.69	1.84E-10	ras homolog family member Q
GTPBP4	3975	6709	1.69	1.65E-10	GTP binding protein 4
LCP2	3315	5595	1.69	3.59E-10	lymphocyte cytosolic protein 2
APBA3	824	1387	1.68	7.40E-09	amyloid beta precursor protein binding family A member 3
FOXP1	1186	1994	1.68	6.01E-10	forkhead box P1
RELA	2979	5001	1.68	2.74E-11	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit
EED	669	1123	1.68	1.50E-09	embryonic ectoderm development
CDV3	14241	23909	1.68	6.60E-11	CDV3 homolog
NME1	2543	4266	1.68	1.48E-09	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1
SLC25A37	407	681	1.67	1.04E-08	solute carrier family 25 member 37
ABCA1	2678	4481	1.67	1.54E-08	ATP binding cassette subfamily A member 1
SLC6A12	214	358	1.67	1.65E-05	solute carrier family 6 member 12
ZNF121	1333	2229	1.67	1.45E-10	zinc finger protein 121
NIFK	2241	3739	1.67	1.62E-10	nucleolar protein interacting with the FHA domain of MKI67
TRMT10C	1610	2686	1.67	1.25E-10	tRNA methyltransferase 10C, mitochondrial RNase P subunit
MIR4751	1017	1696	1.67	1.34E-09	microRNA 4751
SNHG12	275	458	1.66	6.20E-07	small nucleolar RNA host gene 12
CXCR4	409	681	1.66	7.87E-07	C-X-C motif chemokine receptor 4
BAZ2A	3358	5588	1.66	5.91E-10	bromodomain adjacent to zinc finger domain 2A
URB1	1590	2643	1.66	7.54E-09	URB1 ribosome biogenesis homolog
TENT4A	905	1502	1.66	2.43E-09	terminal nucleotidyltransferase 4A
UTP25	1475	2442	1.66	1.63E-09	UTP25 small subunit processome component
PPARGC1B	654	1082	1.66	1.61E-08	PPARG coactivator 1 beta
PTBP1	10325	17048	1.65	6.27E-11	polypyrimidine tract binding protein 1
CDH2	701	1157	1.65	5.15E-08	cadherin 2
DYRK2	3625	5981	1.65	1.94E-09	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 2
BCORL1	253	416	1.65	4.84E-07	BCL6 corepressor like 1
DNTTIP2	4552	7488	1.65	1.76E-10	deoxynucleotidyltransferase terminal interacting protein 2
CDC37L1	943	1549	1.64	2.54E-09	cell division cycle 37 like 1
NAF1	596	977	1.64	9.46E-08	nuclear assembly factor 1 ribonucleoprotein
CCRL2	271	445	1.64	1.06E-06	C-C motif chemokine receptor like 2
NRP1	15148	24802	1.64	4.43E-10	neuropilin 1
TRIM47	851	1392	1.64	1.95E-08	tripartite motif containing 47
SIN3A	1423	2329	1.64	5.85E-09	SIN3 transcription regulator family member A
RBM19	712	1163	1.63	1.10E-09	RNA binding motif protein 19
TSR1	1532	2500	1.63	9.53E-10	TSR1 ribosome maturation factor
BAHCC1	297	484	1.63	3.10E-07	BAH domain and coiled-coil containing 1
PDHX	1391	2263	1.63	1.15E-10	pyruvate dehydrogenase complex component X
AHCTF1	4913	7989	1.63	5.51E-10	AT-hook containing transcription factor 1
ATF5	12503	20280	1.62	3.72E-10	activating transcription factor 5

RAP1B	8929	14478	1.62	1.35E-10	RAP1B, member of RAS oncogene family
OSGIN2	4018	6514	1.62	6.42E-09	oxidative stress induced growth inhibitor family member 2
FZR1	1550	2513	1.62	2.34E-10	fizzy and cell division cycle 20 related 1
RASSF3	2021	3274	1.62	1.86E-10	Ras association domain family member 3
TNPO2	2473	4004	1.62	2.63E-10	transportin 2
ZNF267	2123	3430	1.62	1.74E-10	zinc finger protein 267
PHLDB1	2724	4400	1.62	1.56E-09	pleckstrin homology like domain family B member 1
SCAF4	2024	3269	1.61	1.64E-10	SR-related CTD associated factor 4
SETD5	2387	3853	1.61	1.38E-09	SET domain containing 5
NIBAN1	4617	7436	1.61	2.82E-10	niban apoptosis regulator 1
ZNF335	737	1186	1.61	2.81E-09	zinc finger protein 335
MYO1G	276	444	1.61	5.78E-06	myosin IG
MACF1	4628	7446	1.61	3.14E-07	microtubule actin crosslinking factor 1
RPL22L1	443	712	1.61	3.77E-07	ribosomal protein L22 like 1
CCNL1	875	1405	1.61	3.49E-09	cyclin L1, transcript variant 2
METTL1	829	1328	1.60	2.46E-07	methyltransferase 1, tRNA methylguanosine
SLC25A32	2364	3784	1.60	2.49E-09	solute carrier family 25 member 32
MTSS1	1812	2894	1.60	8.67E-08	MTSS I-BAR domain containing 1
PUM3	2394	3823	1.60	5.59E-10	pumilio RNA binding family member 3
ABCC4	561	896	1.60	3.98E-08	ATP binding cassette subfamily C member 4
FSCN1	27464	43806	1.60	4.65E-10	fascin actin-bundling protein 1
RC3H1	2454	3909	1.59	1.16E-09	ring finger and CCCH-type domains 1
GMEB1	1133	1802	1.59	3.41E-10	glucocorticoid modulatory element binding protein 1
SYNM	513	816	1.59	2.23E-06	synemin
PTGER2	229	364	1.59	2.52E-06	prostaglandin E receptor 2
RND3	3897	6166	1.58	1.07E-08	Rho family GTPase 3
ARID5A	865	1368	1.58	1.09E-08	AT-rich interaction domain 5A
MARK3	2415	3819	1.58	9.11E-11	microtubule affinity regulating kinase 3
SHE	272	430	1.58	3.92E-06	Src homology 2 domain containing E
HK2	2104	3326	1.58	6.64E-07	hexokinase 2
C11orf91	271	427	1.58	8.81E-07	chromosome 11 open reading frame 91
MAFK	1629	2572	1.58	2.39E-09	MAF bZIP transcription factor K
GABARAPL1	2418	3816	1.58	2.99E-08	GABA type A receptor associated protein like 1
ATF4	8314	13098	1.58	1.44E-08	activating transcription factor 4
TMEM39A	1063	1673	1.57	1.05E-08	transmembrane protein 39A
RO60	3381	5319	1.57	3.39E-09	Ro60, Y RNA binding protein
RGMB	229	360	1.57	5.57E-06	repulsive guidance molecule BMP co-receptor b
DCP1A	1813	2851	1.57	1.33E-09	decapping mRNA 1A
HSD11B1	255	400	1.57	1.36E-06	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1
SMG7	3733	5867	1.57	2.32E-10	SMG7 nonsense mediated mRNA decay factor
SHB	3761	5909	1.57	1.14E-09	SH2 domain containing adaptor protein B
UBR4	4350	6833	1.57	7.83E-07	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4
PNO1	1596	2506	1.57	2.34E-09	partner of NOB1 homolog
ZFP36L2	7243	11369	1.57	1.08E-10	ZFP36 ring finger protein like 2
SLC9A8	786	1232	1.57	1.97E-09	solute carrier family 9 member A8
WDR3	2873	4499	1.57	2.76E-08	WD repeat domain 3
FOXO3	4080	6380	1.56	7.48E-10	forkhead box O3
GRWD1	2513	3930	1.56	1.11E-08	glutamate rich WD repeat containing 1
TFEB	1661	2594	1.56	4.34E-09	transcription factor EB
ZBTB5	303	473	1.56	4.35E-07	zinc finger and BTB domain containing 5
RRP1	1847	2879	1.56	3.46E-09	ribosomal RNA processing 1
LOC101928143	645	1005	1.56	7.92E-08	uncharacterized LOC101928143
NOP56	2483	3866	1.56	4.12E-10	NOP56 ribonucleoprotein
SMURF2	573	892	1.56	2.33E-07	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
RPLP0P2	1419	2207	1.56	5.20E-06	ribosomal protein lateral stalk subunit P0 pseudogene 2
UPP1	4605	7152	1.55	1.84E-09	uridine phosphorylase 1

USP42	588	912	1.55	2.03E-08	ubiquitin specific peptidase 42
YY1AP1	2434	3771	1.55	1.56E-09	YY1 associated protein 1
NCOA4	8535	13205	1.55	3.34E-10	nuclear receptor coactivator 4
NOB1	2181	3367	1.54	3.75E-10	NIN1 (RPN12) binding protein 1 homolog
SDCBP	16532	25504	1.54	1.67E-09	syndecan binding protein
PELO	568	876	1.54	2.49E-08	pelota mRNA surveillance and ribosome rescue factor
SNX9	7510	11557	1.54	4.12E-10	sorting nexin 9
MT2A	541	831	1.54	8.01E-05	metallothionein 2A
BCAT1	13521	20748	1.53	6.64E-09	branched chain amino acid transaminase 1
CLIC4	16502	25313	1.53	7.94E-10	chloride intracellular channel 4
PDE8A	576	883	1.53	2.87E-08	phosphodiesterase 8A
LYRM4	212	325	1.53	6.73E-06	LYR motif containing 4
YBX3	5455	8361	1.53	3.03E-10	Y-box binding protein 3
NUDCD1	939	1435	1.53	1.45E-08	NudC domain containing 1
AMIGO2	391	598	1.53	8.07E-06	adhesion molecule with Ig like domain 2
ADCY8	2818	4307	1.53	1.87E-10	adenylate cyclase 8
NCL	25018	38219	1.53	1.26E-09	nucleolin
URB2	1614	2465	1.53	1.61E-09	URB2 ribosome biogenesis homolog
WDR74	1224	1869	1.53	7.47E-09	WD repeat domain 74
CCNL2	1747	2666	1.53	6.62E-09	cyclin L2
SLC30A7	556	848	1.53	8.97E-07	solute carrier family 30 member 7
PUS7	707	1079	1.52	5.57E-09	pseudouridine synthase 7
DDX47	1019	1552	1.52	8.22E-10	DEAD-box helicase 47
GLUL	6170	9394	1.52	2.71E-09	glutamate-ammonia ligase
HIPK3	4957	7546	1.52	1.29E-07	homeodomain interacting protein kinase 3
ANXA5	19008	28918	1.52	8.81E-10	annexin A5
SBNO2	506	769	1.52	0.003560538	strawberry notch homolog 2
LRG1	400	608	1.52	4.22E-07	leucine rich alpha-2-glycoprotein 1
BZW2	2514	3820	1.52	3.19E-09	basic leucine zipper and W2 domains 2
NIP7	2604	3954	1.52	1.78E-09	nucleolar pre-rRNA processing protein NIP7
RIT1	4173	6335	1.52	3.84E-10	Ras like without CAAX 1
CHMP4B	5297	8037	1.52	6.94E-10	charged multivesicular body protein 4B
NCOA3	4723	7160	1.52	2.32E-08	nuclear receptor coactivator 3
ATL2	928	1407	1.52	2.20E-09	atlastin GTPase 2
CEBPZ	2268	3435	1.51	2.00E-10	CCAAT enhancer binding protein zeta
CXCR5	207	313	1.51	1.67E-05	C-X-C motif chemokine receptor 5
ACSL5	1797	2713	1.51	2.27E-09	acyl-CoA synthetase long chain family member 5
TIMM23B-AGAP6	401	606	1.51	1.76E-07	TIMM23B-AGAP6 readthrough (NMD candidate)
WWC2	1653	2488	1.51	3.14E-09	WW and C2 domain containing 2
DDX10	924	1388	1.50	6.01E-08	DEAD-box helicase 10
RBM15	712	1068	1.50	6.79E-08	RNA binding motif protein 15
TCERG1	2326	3487	1.50	1.04E-09	transcription elongation regulator 1
PAK4	723	1084	1.50	5.79E-09	p21 (RAC1) activated kinase 4
HIP1	340	509	1.50	1.13E-05	huntingtin interacting protein 1
TAF1D	966	1446	1.50	6.11E-09	TATA-box binding protein associated factor, RNA polymerase I subunit D
NOP14	2433	3639	1.50	3.98E-10	NOP14 nucleolar protein

Supplementary Table 2. *B. subtilis* natto #1 株の菌体内において、#15 株と比べて
1.5 倍以上発現上昇した遺伝子群

Gene	#1	#15	#1 / #15	p.value	Product
spolIQ	37210	2696	13.80	1.64E-02	forespore protein required for alternative engulfment
spolVA	20638	1698	12.15	1.75E-01	morphogenetic stage IV sporulation protein
psrF	21035	2396	8.78	2.35E-02	prespore-specific transcription regulatory gene
ywlB	11310	1675	6.75	1.95E-01	hypothetical protein
yabS	12448	1891	6.58	1.97E-01	hypothetical protein
lonB	12251	1903	6.44	1.99E-01	spore-specific ATP-dependent protease LonB
sprC	6778	1079	6.28	2.02E-01	spore-specific protease
safA	9564	1572	6.08	2.05E-01	morphogenetic protein associated with SpoVID
spolIIAH	3920	668	5.87	2.08E-01	stage III sporulation ratchet engulfment protein
yjbA	7370	1281	5.75	2.10E-01	putative sporulation nucleic acid binding protein
sspN	3185	612	5.20	2.20E-01	small acid-soluble spore protein
spolIR	14141	2759	5.13	3.72E-02	regulator signal of pro-sigma(E) spolIGA endopeptidase (stage II sporulation)
spoVID	10446	2063	5.06	3.20E-02	morphogenetic spore protein (stage VI sporulation)
cotJB	2421	510	4.75	2.29E-01	component of the inner spore coat
swrB	4025	856	4.70	2.30E-01	coupling factor for flagellin transcription and translation
spolIP	6312	1366	4.62	2.31E-01	spore autolysin (stage II sporulation)
spolIAB	6795	1471	4.62	2.31E-01	anti-sigma factor (antagonist of sigma(F)) and serine kinase
sigF	7329	1590	4.61	2.32E-01	RNA polymerase sporulation-specific sigma factor (sigma-F)
spolIAA	5291	1155	4.58	2.32E-01	anti-anti-sigma factor (antagonist of SpolIAB)
spolIAG	3669	816	4.50	2.34E-01	stage III sporulation engulfment assembly protein
dacF	6590	1468	4.49	2.34E-01	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin binding protein)
cotJC	3504	791	4.43	2.35E-01	enzyme component of the inner spore coat
spolIIAA	4325	987	4.38	2.36E-01	ATP-binding stage III sporulation protein
sspT	2838	700	4.05	2.43E-01	small acid-soluble spore protein (thioredoxin-like protein)
gerW	2811	759	3.70	2.52E-01	germination-associated protein
ynzL	1473	399	3.69	2.52E-01	hypothetical protein
prkA	6773	1857	3.65	3.81E-02	serine protein kinase (involved in sporulation)
prkT	6226	1709	3.64	3.68E-02	serine/threonine-protein kinase
argI	5764	1624	3.55	3.70E-02	arginase
yocN	2012	567	3.55	2.55E-01	conserved protein of unknown function (sporulation-related)
codY	7239	2042	3.55	4.10E-02	transcriptional regulator, GTP and BCAA-dependent
Idel	6184	1757	3.52	3.85E-02	acetoacetyl-CoA synthetase
IdeG	4067	1159	3.51	2.56E-01	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase (leucine degradation)
gpr	4221	1232	3.43	2.58E-01	spore germination protease
yrzR	1983	580	3.42	2.58E-01	hypothetical protein
sigG	4623	1366	3.38	2.59E-01	RNA polymerase sporulation-specific sigma factor (sigma-G)
yoZN	2232	660	3.38	2.59E-01	conserved protein of unknown function (mother cell in sporulation)
sacT	4934	1472	3.35	0.2600902	transcriptional antiterminator of sacAP expression
spsC	3723	1113	3.35	2.60E-01	stationary phase survival protein
ykuS	2184	654	3.34	2.60E-01	hypothetical protein
yopG	171	52	3.29	5.64E-02	hypothetical protein%3B phage SPbeta
IgeHB	1526	465	3.28	2.62E-01	methylcrotonyl-CoA carboxylase%3B biotinylated subunit (leucine degradation)
dnaK	21225	6541	3.24	7.26E-02	molecular chaperone, ATP-dependent
IdeHA	4810	1516	3.17	4.03E-02	biotin carboxylase for subunit LdeHB of methylcrotonyl-CoA carboxylase
spoIVB	4809	1521	3.16	4.05E-02	regulatory membrane-associated serine protease
gerM	4205	1339	3.14	2.65E-01	germination (cortex hydrolysis) and sporulation (stage II, multiple polar septa) lytic enzyme

ydcC	6466	2079	3.11	4.67E-02	putative lipoprotein
pbpG	7724	2501	3.09	5.17E-02	sporulation specific penicillin-binding protein 2D
ldeF	2742	890	3.08	2.67E-01	methylglutaconyl-CoA hydratase (leucine degradation)
sleL	6464	2101	3.08	4.75E-02	spore peptidoglycan N-acetylglucosaminidase
csfB	2550	831	3.07	2.67E-01	forespore-specific anti-sigma factor
cotN	4107	1343	3.06	0.0396298	spore coat protein
rocD	5188	1719	3.02	4.48E-02	ornithine aminotransferase
yqhH	5280	1801	2.93	4.71E-02	putative RNA polymerase-associated helicase protein
ldeE	4900	1676	2.92	4.59E-02	methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit (leucine degradation)
gbsB	5231	1790	2.92	4.71E-02	choline dehydrogenase
yvaG	4714	1625	2.90	4.57E-02	putative oxidoreductase
spolIAB	1762	610	2.89	2.72E-01	stage III sporulation protein (feeding tube apparatus)
cotJA	1635	568	2.88	2.72E-01	component of the inner spore coat
ymfJ	2043	714	2.86	2.73E-01	putative enzyme
yrzQ	1385	489	2.83	2.73E-01	hypothetical protein
rpoB	47679	17304	2.76	1.00E-01	RNA polymerase (beta subunit)
guaB	6528	2377	2.75	5.66E-02	inosine-monophosphate dehydrogenase
ldeJ	3665	1360	2.69	4.58E-02	isovaleryl-CoA dehydrogenase (leucine degradation)
cotO	2612	974	2.68	2.77E-01	spore outer coat protein
scoB	2013	756	2.66	2.78E-01	acetoacetyl CoA-transferase (subunit B)
spolIIAF	2362	888	2.66	2.78E-01	stage III sporulation protein (feeding tube apparatus)
yqxA	1559	595	2.62	2.79E-01	hypothetical protein
pbpI	7141	2745	2.60	6.45E-02	penicillin-binding protein PBP4B
rocE	5703	2231	2.56	5.98E-02	arginine/ornithine/gamma-aminobutyrate permease
yhfM	1942	762	2.55	2.81E-01	hypothetical protein
spolID	3717	1460	2.55	5.06E-02	lytic transglycosylase%3B autolysin required for complete dissolution of the asymmetric septum (stage II sporulation)
sodC	2183	869	2.51	2.82E-01	superoxide dismutase (exported lipoprotein)
yqzG	1585	634	2.50	2.82E-01	hypothetical protein
gbsA	4325	1749	2.47	5.67E-02	glycine betaine aldehyde dehydrogenase, NAD+-dependent
ylbC	4875	1991	2.45	6.06E-02	hypothetical protein
rplQ	6980	2868	2.43	7.11E-02	ribosomal protein L17 (BL15)
ytfI	2703	1114	2.43	4.49E-02	conserved sporulation-related protein
ylbB	2517	1048	2.40	2.85E-01	putative enzyme
scoA	1783	744	2.40	2.85E-01	acetoacetyl CoA-transferase (subunit A)
clpP	11387	4762	2.39	9.48E-02	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit%3B Maxwell's demon
ywcl	1763	738	2.39	0.2852925	hypothetical protein
mmgB	1819	763	2.38	2.85E-01	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase
tcaB	5956	2555	2.33	7.10E-02	P-type calcium transport ATPase (sporulation)
spoVT	2298	987	2.33	2.87E-01	transcriptional regulator of sporulation / germination
grpE	7395	3192	2.32	7.98E-02	nucleotide exchange factor for DnaK activity
spoVE	3221	1402	2.30	5.64E-02	factor for spore cortex peptidoglycan synthesis (stage V sporulation)
gerQ	2713	1189	2.28	0.0506787	inner spore coat protein
ylaK	3408	1499	2.27	5.92E-02	putative phosphate starvation inducible protein
yceH	6560	2887	2.27	7.76E-02	putative reactive oxygen species resistance protein
skiZ	6251	2752	2.27	7.59E-02	permease subunit exporting Sporulation-Delaying Protein
sppO	2650	1188	2.23	5.19E-02	spore protein cse15
youB	11	5	2.20	5.42E-01	conserved phage protein of unknown function%3B phage SPbeta
yodQ	2970	1354	2.19	5.87E-02	putative deacetylase
pyrH	4379	1999	2.19	7.05E-02	uridylate kinase
mmgA	2446	1119	2.19	5.01E-02	degradative acetoacetyl-CoA thiolase
cotE	1535	704	2.18	2.91E-01	morphogenic spore protein
clpC	44487	20487	2.17	1.41E-01	class III stress response-related ATPase, AAA+ superfamily
hxlB	2565	1201	2.14	5.50E-02	6-phospho-3-hexuloisomerase (PHI)
chrA	3250	1525	2.13	6.52E-02	chromate transporter subunit C
hxlA	2740	1293	2.12	5.93E-02	3-hexulose-6-phosphate synthase (HPS)

rpoA	14354	6782	2.12	1.25E-01	RNA polymerase (alpha subunit)
comER	2556	1214	2.11	5.65E-02	putative pyrroline-5'-carboxylate reductase
yodS	1567	759	2.06	2.94E-01	putative oxoacid CoA-transferase
msmE	4314	2090	2.06	7.84E-02	multiple sugar-binding lipoprotein
spoIVFA	2149	1043	2.06	5.03E-02	regulator of SpoIVFB (stage IV sporulation)
yceG	12227	5967	2.05	1.27E-01	putative toxic compound adaptation protein (tellurite resistance)
msmR	3159	1543	2.05	6.96E-02	transcriptional regulator (LacI family)
kamB	1924	940	2.05	4.70E-02	epsilon-amino-beta-lysine acetyl transferase
mmgC	2226	1091	2.04	5.30E-02	propionyl-CoA dehydrogenase subunit
yfhE	813	399	2.04	4.68E-02	hypothetical protein
ydjI	2860	1405	2.04	6.65E-02	hypothetical protein
gerR	1691	832	2.03	2.95E-01	DNA-binding regulator
tsf	7145	3517	2.03	9.98E-02	elongation factor Ts
mfd	13529	6727	2.01	1.35E-01	transcription-repair coupling factor
yxjF	2492	1240	2.01	6.10E-02	putative hydroxyacid dehydrogenase
wapA	22164	11037	2.01	1.47E-01	cell wall-associated tRNA nuclease precursor%3B intercellular growth inhibitor
yhcM	988	500	1.98	4.63E-02	expressed protein of unknown function
ecfAB	2696	1365	1.98	6.79E-02	energizing coupling factor of ABC influx transporter (ATP-binding protein)
rpoC	38833	19795	1.96	1.63E-01	RNA polymerase (beta' subunit)
bioD	5414	2760	1.96	9.40E-02	dethiobiotin synthetase
skiY	4188	2135	1.96	8.56E-02	subunit of efflux permease exporting the starvation-induced killing protein (ATP-binding protein)
	972	496	1.96	4.72E-02	hypothetical protein
bioFC	12780	6524	1.96	1.39E-01	8-amino-7-oxononanoate synthase (pimeloyl-CoA-dependent)
psmB	2217	1137	1.95	5.84E-02	sodium-proton two component antiporter subunit
mtlF	1444	742	1.95	2.97E-01	phosphotransferase system (PTS) mannitol-specific enzyme IIA component
ecfA	2948	1515	1.95	7.45E-02	energizing coupling factor of ABC influx transporter (ATP-binding protein)
yodR	1212	628	1.93	4.65E-02	putative acyloate-acetoacetate CoA-transferase
fliG	2995	1557	1.92	7.70E-02	flagellar motor switching and energizing component
yesJ	1895	989	1.92	5.38E-02	putative acetyltransferase
bglP	3699	1935	1.91	8.57E-02	phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIBCA component
frr	2914	1527	1.91	7.71E-02	ribosome recycling factor
katX	5666	3016	1.88	1.04E-01	major catalase in spores
mreB	2916	1553	1.88	7.99E-02	cell-shape determining protein
yhxC	2198	1181	1.86	6.47E-02	putative oxidoreductase
maa	102	55	1.85	1.75E-01	maltose O-acetyltransferase
kamA	2894	1566	1.85	8.25E-02	lysine 2,3-aminomutase
rocA	3851	2085	1.85	9.37E-02	delta-1-pyrroline-5 carboxylate dehydrogenase
chrB	4118	2233	1.84	9.67E-02	chromate transporter subunit N
gpsA	4092	2237	1.83	9.82E-02	NADPH-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase
dnaJ	3187	1743	1.83	8.86E-02	co-factor of molecular chaperone
ydjP	17005	9316	1.83	1.69E-01	putative aminoacrylate hydrolase
spoVR	2973	1632	1.82	8.64E-02	involved in spore cortex synthesis (stage V sporulation, conserved in non sporulating bacteria)
yhzF	950	523	1.82	5.53E-02	membrane protein of unknown function
bioK	19728	10909	1.81	1.76E-01	L-lysine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase
dppB	4673	2586	1.81	1.06E-01	dipeptide ABC transporter (permease)
gudB	9183	5086	1.81	1.44E-01	cryptic glutamate dehydrogenase (active after removal of a 9 bp insert)
yccK	2221	1233	1.80	7.07E-02	putative ion channel associated aldo-keto reductase
levE	1703	950	1.79	5.89E-02	phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IIB component

rpoZ	2789	1563	1.78	8.75E-02	omega subunit of RNA polymerase
groEL	82917	46473	1.78	2.28E-01	chaperonin large subunit
nrdFB	157	88	1.78	1.39E-01	phage SPbeta ribonucleoside diphosphate reductase
dppA	4757	2676	1.78	1.10E-01	D-alanyl-aminopeptidase
yxjC	2574	1448	1.78	8.35E-02	putative acid metabolite permease
yumB	2793	1574	1.77	8.87E-02	putative NAD-disulfide oxidoreductase
yhcB	1391	785	1.77	5.58E-02	NADH:quinone oxidoreductase associated to benzoate stress
gyrB	28294	15970	1.77	1.90E-01	DNA gyrase (subunit B)
yfhD	1206	681	1.77	5.58E-02	hypothetical protein
yyaL	4224	2386	1.77	1.07E-01	hypothetical protein
spoVD	3513	1992	1.76	1.00E-01	transpeptidase penicillin-binding protein
dacB	1957	1110	1.76	6.70E-02	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5*) (required for spore cortex)
bioB	4464	2536	1.76	1.10E-01	biotin synthase
leuS	5669	3224	1.76	1.21E-01	leucyl-tRNA synthetase
fumC	4210	2406	1.75	1.10E-01	fumarate hydratase
mmgD	2346	1341	1.75	8.02E-02	bifunctional citrate synthase/2-methylcitrate synthase
atpH	7529	4312	1.75	1.41E-01	ATP synthase (subunit delta, component F1)
spolIIAE	2466	1418	1.74	8.51E-02	stage III sporulation protein (feeding tube apparatus)
msmF	2601	1496	1.74	8.89E-02	carbohydrate ABC transporter (permease)
atpA	14465	8332	1.74	1.81E-01	ATP synthase (subunit alpha, component F1)
mmgE	2859	1648	1.73	9.49E-02	2-methylcitrate dehydratase (promiscuous)
tufA	17794	10310	1.73	1.90E-01	elongation factor Tu
yetF	1874	1092	1.72	6.96E-02	hypothetical protein
dppD	2777	1622	1.71	9.64E-02	dipeptide ABC transporter (ATP-binding subunit)
ytoQ	1999	1168	1.71	7.35E-02	putative enzyme with sugar binding fold
rpoE	3190	1864	1.71	1.03E-01	RNA polymerase (delta subunit) and transcriptional repressor
gmk	6247	3652	1.71	1.34E-01	guanylate kinase
radA	12889	7553	1.71	1.83E-01	DNA repair protein%3B 6-O-methylguanine-DNA methyltransferase
guaA	3692	2172	1.70	1.11E-01	GMP synthetase
gatB	5151	3034	1.70	1.26E-01	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (subunit B)
levD	1388	818	1.70	6.19E-02	phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IIA component
spolIID	1010	599	1.69	6.43E-02	transcriptional regulator (stage III sporulation)
pdaB	2191	1301	1.68	8.32E-02	polysaccharide deacetylase involved in sporulation
yodT	2313	1375	1.68	8.77E-02	putative aminovalerate aminotransferase
sdhA	13363	7944	1.68	1.91E-01	succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)
gapA	9385	5583	1.68	1.70E-01	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD-dependent, glycolytic)
pxpC	4275	2546	1.68	1.21E-01	L-5-oxoprolinase (ATP-dependent) subunit C
bofC	1739	1039	1.67	7.09E-02	bypass of forespore C, intercompartmental signaling factor
odhA	16698	9977	1.67	2.01E-01	2-oxoglutarate dehydrogenase (E1 subunit)
yopF	224	134	1.67	1.30E-01	conserved protein of unknown function%3B phage SPbeta
sspE	4604	2756	1.67	1.26E-01	small acid-soluble spore protein (gamma-type SASP)
fliH	1825	1093	1.67	7.35E-02	flagellar export apparatus subunit of cytoplasmic ATPase
fin	2064	1237	1.67	8.08E-02	protein required for the switch from F to G during sporulation (anti sigma F)
spmA	1381	829	1.67	6.48E-02	spore maturation protein
infB	16026	9624	1.67	2.01E-01	initiation factor IF-2
yrrD	1587	958	1.66	6.92E-02	hypothetical protein
ytjJ	3293	1993	1.65	1.14E-01	putative N-substituted formamide deformylase, dihydropyrimidinase or isoaspartyl peptidase
miaA	1987	1209	1.64	8.16E-02	tRNA isopentenylpyrophosphate transferase
spolIIAD	1104	675	1.64	6.81E-02	stage III sporulation protein (feeding tube apparatus)
sodA	12923	7988	1.62	2.06E-01	superoxide dismutase (Mn[2+]-dependent)
yojN	2416	1495	1.62	1.02E-01	putative nitric-oxide reductase associated protein

msmX	24956	15461	1.61	2.27E-01	multiple sugar (maltodextrins) transporter ATP-binding protein
rbsA	4632	2874	1.61	1.38E-01	ribose ABC transporter (ATP-binding protein)
levG	1653	1026	1.61	7.64E-02	phosphotransferase system (PTS) fructose-specific enzyme IID component
sucC	9751	6072	1.61	1.93E-01	succinyl-CoA synthetase (beta subunit)
yxjH	7595	4735	1.60	1.72E-01	putative methyl-tetrahydrofolate methyltransferase (biofilm formation)
yphA	1201	749	1.60	7.10E-02	conserved membrane protein of unknown function
rimI	1217	759	1.60	7.10E-02	ribosomal protein S18 alanine N-acetyltransferase
glgD	2003	1250	1.60	8.82E-02	glucose-1-phosphate adenyltransferase (ADP-glucose pyrophosphorylase) beta subunit
dppC	2745	1715	1.60	1.14E-01	dipeptide ABC transporter (permease)
glnQ	1695	1059	1.60	7.90E-02	glutamine ABC transporter (ATP-binding protein)
ytzC	668	418	1.60	8.43E-02	hypothetical protein
murD	2670	1675	1.59	1.13E-01	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate ligase
sdhB	7288	4574	1.59	0.1718432	succinate dehydrogenase (iron-sulfur protein)
mreC	2520	1582	1.59	1.09E-01	cell-shape determining protein
ytrI	1283	806	1.59	7.23E-02	protein involved in sporulation
bgIH	3108	1957	1.59	1.23E-01	aryl-phospho-beta-d-glucosidase
tsaC	2817	1778	1.58	1.19E-01	tRNA(NUU) t(6)A37 threonylcarbamoyladenine modification%3B threonine-dependent ADP-forming ATPase
citH	2749	1737	1.58	1.18E-01	secondary transporter of divalent metal ions/citrate complexes
pyk	10184	6441	1.58	2.03E-01	pyruvate kinase
malA	5770	3651	1.58	1.57E-01	6-phospho-alpha-glucosidase
aspS	2768	1752	1.58	1.19E-01	aspartyl-tRNA synthetase, promiscuous (also recognizes tRNAasn)
fliF	5561	3521	1.58	1.55E-01	flagellar basal-body M-ring protein
metS	4656	2954	1.58	1.46E-01	methionyl-tRNA synthetase
iolX	3198	2034	1.57	1.28E-01	scyllo-inositol 2-dehydrogenase (NAD(+))
csH	14075	8953	1.57	2.24E-01	ATP-dependent RNA helicase%3B cold shock
spmB	1175	749	1.57	7.54E-02	spore maturation protein
glS	2134	1362	1.57	9.97E-02	L-glutamine amidohydrolase%3B glutaminase
sacC	3510	2241	1.57	1.34E-01	levanase
deoB	3678	2349	1.57	1.37E-01	1,5-phosphopentomutase
yokU	941	601	1.57	7.86E-02	hypothetical protein
spoIVFB	1955	1251	1.56	9.31E-02	membrane metalloprotease [proteolysis of pro-sigma(K)]
yphB	1693	1086	1.56	0.0851229	conserved membrane protein of unknown function
pupG	3304	2120	1.56	1.33E-01	purine nucleoside phosphorylase
ywlG	2614	1681	1.56	1.20E-01	hypothetical protein
yqhG	1699	1093	1.55	8.60E-02	hypothetical protein
cypD	4950	3190	1.55	1.55E-01	bifunctional P-450/NADPH-P450 reductase 1
ansB	5165	3329	1.55	1.57E-01	L-aspartase (aspartate ammonia lyase)
pnpA	7339	4734	1.55	1.85E-01	polynucleotide phosphorylase (PNPase)
lplJ	2366	1529	1.55	1.13E-01	lipoate-protein ligase
mlpA	2186	1413	1.55	1.06E-01	specific processing protease
bipA	7283	4709	1.55	1.85E-01	ribosome-associated GTPase
cotIC	984	637	1.54	8.06E-02	inner spore coat protein
ctpB	2694	1744	1.54	1.24E-01	PDZ-containing carboxyl-terminal protease processing protease [Zn(II)]
pxpB	4352	2818	1.54	1.51E-01	L-5-oxoprolinase (ATP-dependent) subunit B
odhB	8516	5516	1.54	2.00E-01	2-oxoglutarate dehydrogenase complex (dihydrolipoamide transsuccinylase, E2 subunit)
ytzL	781	506	1.54	8.65E-02	hypothetical protein
prmA	2779	1801	1.54	1.27E-01	ribosomal protein L11 methyltransferase
fni	3314	2150	1.54	1.37E-01	isopentenyl diphosphate isomerase (typeII)
gyrA	16575	10760	1.54	2.41E-01	DNA gyrase (subunit A)
csH	5161	3356	1.54	1.61E-01	ATP-dependent RNA helicase%3B cold shock
gatA	4010	2609	1.54	1.48E-01	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (subunit A)

acpS	1668	1086	1.54	8.82E-02	holo-acyl carrier protein synthase (phosphopantetheinyl transferase)
glmM	4352	2835	1.54	1.53E-01	phosphoglucosamine mutase
rocB	3313	2164	1.53	1.40E-01	putative N-deacetylase involved in arginine and ornithine utilization
sucD	6868	4488	1.53	1.85E-01	succinyl-CoA synthetase (alpha subunit)
yhbB	2596	1697	1.53	1.25E-01	hypothetical protein
der	4612	3024	1.53	1.59E-01	GTPase essential for ribosome 50S subunit assembly (maturation of the 50S subunit central protoberance)
yloV	3524	2313	1.52	1.45E-01	putative enzyme structurally related to dihydroxyacetone/glyceraldehyde kinase
mtlA	2620	1720	1.52	1.28E-01	phosphotransferase system (PTS) mannitol-specific enzyme IICB component
tsaB	1708	1123	1.52	9.22E-02	tRNA(NUU) t(6)A37 threonylcarbamoyladenosine modification%3B protease involved in TsaD function
ytxC	2211	1455	1.52	1.13E-01	sporulation protein
mtlD	2417	1592	1.52	1.22E-01	mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
tsaD	1969	1298	1.52	1.03E-01	tRNA(NUU) t(6)A37 threonylcarbamoyladenosine modification%3B glycation binding protein
proS	4738	3124	1.52	1.62E-01	prolyl-tRNA synthetase
yebE	1742	1150	1.51	9.44E-02	hypothetical protein
spolIAC	702	464	1.51	9.51E-02	stage III sporulation protein (feeding tube apparatus)
ispD	4972	3297	1.51	1.68E-01	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, nonmevalonate isoprenoid pathway
fusA	12338	8203	1.50	2.42E-01	elongation factor G
yteJ	4227	2816	1.50	1.61E-01	putative integral inner membrane protein
yhbH	2146	1430	1.50	1.14E-01	factor involved in shape determination
ydcT	36	24	1.50	4.56E-01	ICEBs1 mobile element: conserved protein of unknown function
remA	3074	2052	1.50	1.44E-01	essential sporulation DNA binding protein%3B regulator of biofilm formation
yebG	1083	723	1.50	8.65E-02	hypothetical protein

本研究と関連した報告

原著論文発表

- Uesugi T, Mori S, Miyanaga K, Yamamoto N. GroEL Secreted from *Bacillus subtilis* Natto Exerted a Crucial Role for Anti-Inflammatory IL-10 Induction in THP-1 Cells. *Microorganisms* 2023, 11(5), 1281. Published 14 May 2023.
doi: 10.3390/microorganisms11051281

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なご指導と、技術的な側面だけでなく、社会人生と両立した上での学位取得に向けて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 博士には、深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、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 博士ならびにアステラス製薬株式会社 岩谷駿 博士に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、ご支援および激励を賜りました、株式会社 JFR の宮崎博 社長をはじめ、同従業員の皆様に心より感謝申し上げます。樹状細胞に対する納豆菌由来 GroEL の作用機序の解明に関して、RNA シーケンス解析の実施など多くのご支援およびご指導を賜りました順天堂大学 先任准教授 渡邊心 博士に深く感謝いたします。また、本研究を進めるにあたり、ご支援を賜りました、江崎グリコ株式会社の齋藤康雄グループ長をはじめ、同従業員の皆様に心より感謝申し上げます。

本研究において多大なるご協力を頂きました CJ ジャパン株式会社の毛利優氏には深く感謝申し上げます。

本研究に関して、様々な議論を行い、充実した研究生活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、研究に集中できるよう私生活を支えてくれた大切な家族に、深く感謝いたします。