

*Helicobacter pylori* 感染に与えるガレクチン-2 の影響

佐々木 啓晴

# 目次

略語	5
緒言	7
<b>第1章 ガレクチン-2が <i>Helicobacter pylori</i> に与える影響</b>	
第1節 緒言	14
第2節 実験結果	
2.1. ガレクチン-2の <i>Helicobacter pylori</i> 凝集作用	16
2.2. ガレクチン-2の <i>Helicobacter pylori</i> 凝集作用の β-ガラクトシド構造依存性	18
2.3. <i>Helicobacter pylori</i> 凝集体におけるガレクチン-2の存在部位	20
2.4. ガレクチン-2の <i>Helicobacter pylori</i> 増殖抑制作用	22
2.5. ガレクチン-2の <i>Helicobacter pylori</i> 殺菌作用	23
2.6. 胃粘液中におけるガレクチン-2の存在	25
第3節 考察	26
第4節 小括	31

## 第II章 弱酸性条件におけるガレクチン-2 と *Helicobacter pylori* の相互作用

第1節 緒言	.....	33
第2節 実験結果		
2.1. 弱酸性条件におけるガレクチン-2 の <i>Helicobacter pylori</i> 凝集作用	.....	36
2.2. 弱酸性条件におけるガレクチン-2 の構造変化	.....	38
2.3. ガレクチン-2 の <i>Helicobacter pylori</i> LPS リガンドの探索	.....	40
第3節 考察	.....	43
第4節 小括	.....	47

## 第III章 *Helicobacter pylori* に与える作用のガレクチン-2, 3 の比較

第1節 緒言	.....	48
第2節 実験結果		
2.1. 弱酸性条件におけるガレクチン-3 の構造変化	.....	50
2.2. ガレクチン-3 の <i>Helicobacter pylori</i> LPS リガンドの探索	.....	52
2.3. ガレクチン-3 の <i>Helicobacter pylori</i> 増殖抑制作用	.....	54
第3節 考察	.....	55
第4節 小括	.....	59

総括	.....60
----	---------

## 実験操作

### 第I章 ガレクチン-2が *Helicobacter pylori* に与える影響

1. 使用菌株及び培養条件	..... 64
2. 懸濁液の調製	..... 64
3. リコンビナントガレクチンの発現と精製	..... 65
4. 菌体凝集実験	..... 66
5. 菌増殖抑制実験	..... 67
6. 殺菌実験	..... 67
7. 組織切片の作製	..... 68
8. PAS 染色	..... 69
9. 免疫組織染色	..... 70
10. 統計処理	..... 71

## 第 II 章 弱酸性条件におけるガレクチン-2 と *Helicobacter pylori* の相互作用

1. 弱酸性条件における菌体凝集実験	..... 71
2. CD スペクトル解析	..... 72
3. LPS の抽出	..... 73
4. アフィニティークロマトグラフィー	..... 74
5. Western blotting	.....75
6. 統計処理	..... 76

## 第 III 章 *Helicobacter pylori* に与える作用のガレクチン-2, 3 の比較

1. CD スペクトル解析	..... 76
2. アフィニティークロマトグラフィー	..... 77
3. Western blotting	..... 77
4. 菌増殖抑制実験	..... 77
5. 統計処理	.....77

謝辞	..... 78
----	----------

参考文献	..... 80
------	----------

## 略語

略称	正式名称
BHI	Brain heart infusion
CFDA	5(6)-Carboxyfluorescein diacetate
CFU	Colony forming unit
CRD	Carbohydrate recognition domain
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
Gal	Galectin
GFP	Green fluorescence protein
HBSS	Hanks' balanced salt solution
hGal-2	Human galectin-2
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
LPS	Lipopolysaccharide
mGal-2	Mouse galectin-2
OD	Optical density
PAS	Periodic acid-shieff
PBS	Phosphate buffered saline

PI	Propidium iodide
rGal-2	Rat galectin-2
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate

## 緒言

*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) は、一極に複数の鞭毛を持つグラム陰性のらせん状桿菌で、1983年にオーストラリアの病理医である B. J. Marshall と J. R. Warren により胃炎患者の病巣部から発見された[1]。胃内は酸性環境であり、無菌の臓器であると考えられてきたが、ピロリ菌の発見によりこの通説は覆された。現在、全世界におけるピロリ菌の保菌者は約 45%と推定されている [2]。また、日本における保菌者は約 40%と推定され、年齢層が高くなると共に保菌率は上昇している [2, 3]。ピロリ菌が胃炎や消化性潰瘍、粘膜関連リンパ腫、胃癌を含む様々な疾患の発症と関係していることが報告され [4-9]、1994年には、国際がん研究機関の疫学的研究によってヒトに対して発がん性を示すとされるグループ I に分類された [10]。本菌と胃炎や消化性潰瘍との関連性が示されて以来、これらの疾患の治療法は制酸薬から抗菌薬の使用へと大きく変わることとなった。日本では 2000 年からピロリ菌陽性患者に対してクラリスロマイシン、アモキシシリン、プロトンポンプ阻害薬を用いた 3 剤併用療法 (1 次除菌) が保険適応となり、ピロリ菌が原因で引き起こされる胃炎や胃癌の罹患率は大きく減少した [11, 12]。しかし、クラリスロマイシン耐性菌の出現により、ピロリ菌除菌療法の成功率は低下し、現在約 70%に留まっている [13]。1 次除菌が失敗した場合、クラリスロマイシンをメトロニダゾールに変更した 2 次



除菌がなされるが、その除菌成功率も 80%程度と完璧な治療法ではない [14]。クラリスロマイシンやメトロニダゾールに対する薬剤耐性菌は年々増加していることから、今後ピロリ菌の除菌成功率はさらに低下すると予測される [15]。また、ペニシリン系抗生物質にアレルギーのある患者に対してはアモキシシリンが使用できない。このため、ペニシリンアレルギーを持つ患者に対しても使用可能な新たな除菌療法の確立が必要とされる。

胃は胃酸や粘液の分泌、抗菌ペプチドの分泌によって病原体の感染から身を守っている。しかし、ピロリ菌は尿素をアンモニアと二酸化炭素に加水分解するウレアーゼを有することにより胃酸を中和し、胃内の酸性環境下でも生存し得る [16]。一極に持つ複数の鞭毛により高い運動性を示し、胃粘膜細胞への到達や免疫応答の回避を容易にしている [17]。また、ピロリ菌の持つ O 抗原構造はヒトの上皮細胞や粘液中にみられる Lewis 抗原と類似しており、ピロリ菌はヒト宿主の免疫反応を回避していることも知られている [18, 19]。さらに、貪食細胞に対する抵抗性や T 細胞の増殖の阻害を含む様々な戦略を用いることで胃での持続感染を可能にしている [20]。一方、胃には糖鎖やレクチンが関与する他の感染防御機構が存在することが明らかにされつつある。その一つとして、粘液の主成分であるムチンが挙げられる。ムチンは糖タンパク質の一種であり、ヒトの消化管では約 13 種類のムチンサブタイプが発現し、胃粘液には MUC5AC や

MUC6 が存在している [21]。胃粘液は表層粘液細胞から分泌される表層粘液及び副細胞から分泌される腺粘液からなるが、腺粘液の主要な成分は MUC6 である [22]。MUC6 はその糖鎖末端に $\alpha$ 1,4 結合した N-アセチルグルコサミン残基を持ち、この糖残基がピロリ菌の細胞壁成分であるコレステリル- $\alpha$ -D-グルコピラノシドの生合成を阻害することでピロリ菌感染を抑制することが報告されている [23]。また、自然免疫に関わるレクチンの一つであるサーファクタントプロテイン D は、ピロリ菌感染によって発現が上昇することやピロリ菌を凝集させることが報告されている [24, 25]。胃粘液に侵入してきたピロリ菌を凝集させることで運動性を低下させ、継続的な粘液分泌によりピロリ菌を胃粘膜細胞から遠ざけるといった複数の感染防御機構が共同して働くと考えられる。

ガレクチンは $\beta$ -ガラクトシド構造に親和性を持つ動物レクチンの一種であり、細胞接着や白血球の遊走、分化、アポトーシスを含む様々な生命現象に関与する [26]。海綿や線虫、両生類、鳥類などの幅広い動物種に発現しており、現在、哺乳類において、臓器や組織によって発現量が異なる 15 種類のサブタイプが発見されている [27, 28]。また、哺乳類間での臓器や組織におけるガレクチンの発現や機能についての種差はある程度同等であると考えられている。ガレクチンはその構造から、プロトタイプ、キメラタイプ、タンデムリピートタイプの 3 種類に分類され、プロトタイプ及びキメラタイプは 1 分子内に 1 か所の糖認識部位

(CRD) を持ち、タンデムリピートタイプは 1 分子内に 2 か所の CRD を持つ [29]。プロトタイプのガレクチンは濃度や周囲の環境に依存して、非共有結合により 2 量体形成が可能であり、キメラタイプやタンデムリピートタイプにおいても 2 量体や多量体の形成が可能である。このため、ガレクチンは複合糖質に含まれる $\beta$ -ガラクトシド構造の認識を介して、複数の複合糖質を架橋することが出来る (Figure 1)。

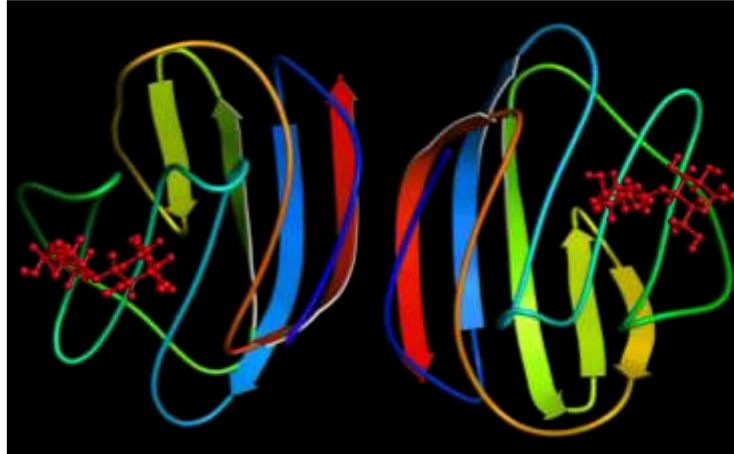
ピロリ菌は他のグラム陰性菌と同様に細胞壁外膜にリポ多糖 (LPS) を有するが、その LPS はフコシル化された O 抗原を持つという他の細菌にはあまり見られない特徴を持ち [30]、この O 抗原はガレクチンによって架橋される可能性がある。実際、ガレクチン-3 (Gal-3) やガレクチン-4 (Gal-4)、ガレクチン-9 (Gal-9) を含む数種類のガレクチンは消化管に発現し、病原体を認識すると共に殺菌作用を示す [31]。とりわけ、Gal-3 はピロリ菌の O 抗原を認識することや $\beta$ -ガラクトシド構造依存的にピロリ菌に凝集及び殺菌作用を示すことが報告されている [32, 33]。

ガレクチン-2 (Gal-2) はプロトタイプのガレクチンの一つであり、マウスにおいては胃腸の上皮細胞に局在し、特に胃においては表層粘液細胞と粘液頸細胞における発現が確認されている [34]。また、マウス Gal-2 (mGal-2) の過剰発現が急性及び慢性大腸炎を寛解させることや、マウスの胃がんモデルにおい

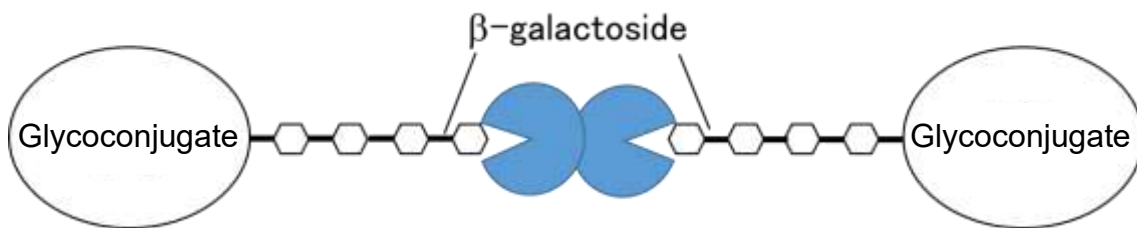
て Gal-2 の遺伝子発現が低下することが報告されている [35, 36]。試験管内の実験において、ラット Gal-2 (rGal-2) は胃粘液の成分であるムチンを架橋して胃粘液のバリア機能を増強させる可能性が示唆されている [37]。ヒトにおいては、リンパ節転移のある胃がんでは Gal-2 の発現が低下する [38]。疾患の発症や寛解への関与や胃粘液のバリア機能への関与の可能性から、Gal-2 は胃の保護作用に関与すると予測される。また、Gal-3 と同様にピロリ菌 LPS 内の O-抗原を認識し、ピロリ菌感染に対する生体防御に関与する可能性が考えられるが、このことを証明する研究はこれまでになされていない。

本研究では、ピロリ菌感染に対する生体防御機構に Gal-2 が関与するのかを調査した。第 I 章では、Gal-2 とピロリ菌の混合液を顕微鏡観察することで Gal-2 のピロリ菌凝集作用を観察した。また、異なる動物種の Gal-2 の使用や競合糖の存在する条件での検討も行った。次に、Gal-2 とピロリ菌の混合液の培養や蛍光染色により、Gal-2 がピロリ菌の増殖や生存に与える影響を調査した。更に、胃粘膜細胞と胃粘液を同時固定したマウス胃における Gal-2 の免疫組織染色により、胃粘液中の Gal-2 の存在を検討した。第 II 章では、弱酸性条件における Gal-2 のピロリ菌凝集作用を観察した。また、弱酸性条件における Gal-2 の構造変化を CD スペクトル測定した。Gal-2 固定化カラムによるピロリ菌 LPS のアフィニティークロマトグラフィー及び Western Blotting により、Gal-2 が認識す

るピロリ菌の LPS リガンドを探索した。第 III 章では、弱酸性条件における Gal-3 の構造変化を CD スペクトル測定した。また、Gal-3 とピロリ菌の混合液を培養し、ピロリ菌の増殖抑制作用を評価した。Gal-3 固定化カラムによるピロリ菌 LPS のアフィニティークロマトグラフィー及び Western Blotting により、Gal-3 が認識するピロリ菌の LPS リガンドを探索した。Gal-3 の弱酸性条件における構造の安定性やピロリ菌増殖抑制作用、認識するピロリ菌 LPS を Gal-2 と比較し、相違点を検討した。



(Lobsanov. Y. D. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1993)



**Figure 1 Crosslinking by galectin-2 dimer**

Ribbon diagram of galectin-2 dimer, in which red carbohydrate chains exhibit lactose (upper), and schematic model for crosslinking by galectin-2 dimer in a  $\beta$ -galactoside-dependent manner (lower).

## 第I章 Gal-2がピロリ菌に与える影響

### 第I節 緒言

ガレクチンは、リンパ器官や呼吸器、泌尿器等、様々な器官で発現が確認されており、マウスの消化器官においてはガレクチン-2, 3, 4/6, 7, 9が発現している [28]。マウスとラットでは胃における Gal-2 の発現が確認されており [28, 39]、ヒトにおいては Gal-2 の mRNA の発現が確認されている [40]。消化器に発現する数種類のガレクチンサブタイプは病原体を認識するだけでなく、殺菌作用を示すことが報告されている [31]。例として、ヒトの Gal-4 や Gal-8 は $\alpha$ ガラクトースを有する *Klebsiella pneumoniae* 及び *Providencia alcalifaciens* や血液型 B 抗原を有する *Escherichia coli* を殺菌し [31, 41]、Gal-9 は HIV の感染により血漿中の濃度が上昇する [42]。ヒトの Gal-3 は $\beta$ -ガラクトシド構造依存的にピロリ菌に凝集・殺菌作用を示すことやピロリ菌感染によりその発現量が上昇することが知られており、ピロリ菌感染に対する生体防御に関与している [33, 43]。このように、様々な病原体と多く接触する器官である消化管に発現するガレクチンは、感染防御に関わる重要な因子の一つであると考えられる。

Gal-2 に関して、大腸炎の寛解や胃がんの発症やリンパ節転移といった消化管疾患との関連性は報告されているが [35–38]、病原体の感染に対する感染防御機構については未だ報告がない。Gal-2 は胃の上皮細胞に多く存在していること

から、胃を感染部位とする病原体の感染防御に関与すると予測される。また、キメラタイプではあるが、同じガレクチンファミリーに属する Gal-3 が $\beta$ -ガラクトシド構造依存的にピロリ菌を凝集・殺菌することから、プロトタイプの Gal-2 も同様の作用を示す可能性がある。

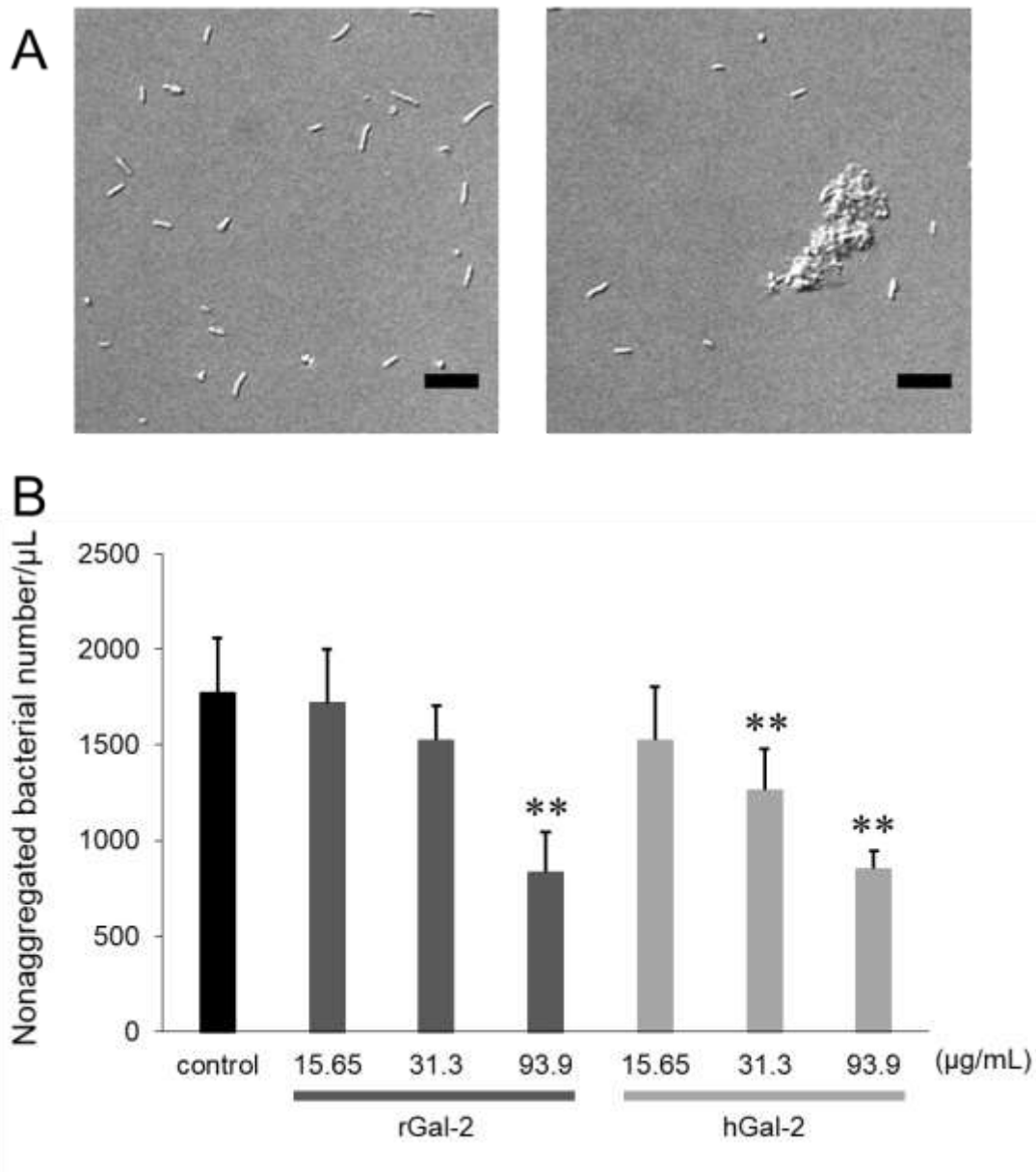
そこで、本章では胃を感染部位とするピロリ菌に対して Gal-2 どのような作用を示すのかを検討した。まず、Gal-2 がピロリ菌を凝集させるか確認し、その作用が $\beta$ -ガラクトシド構造に依存するかを調べた。また、Gal-2 がピロリ菌の増殖や生存に与える影響についても検討した。更に、Gal-2 とピロリ菌が相互作用すると考えられる胃粘液中での Gal-2 の存在を証明した。これらのことを明らかにすることで Gal-2 が生体内で生体防御に関わるのかを予測した。



## 第 II 節 実験結果

### 2. 1. Gal-2 のピロリ菌凝集作用

ピロリ菌懸濁液に rGal-2 溶液を添加後、ピロリ菌の様子を顕微鏡観察した。PBS を添加し、タイムラプス撮影したところ、ピロリ菌は活発な運動性を示したが、その運動性に経時的な変化は認められなかった (Figure 2A, left)。一方、Gal-2 溶液を添加してタイムラプス撮影したところ、ピロリ菌は凝集し、凝集体の数や大きさは経時的に増大した。(Figure 2A, right)。次に、この凝集作用が Gal-2 の濃度と相関するのかを調べた。なお、Gal-2 の添加によって生じたピロリ菌の凝集体のサイズや形にはばらつきがあり、凝集作用を直接比較することは困難であったため、非凝集菌体数を算出することで Gal-2 のピロリ菌凝集作用を評価した (Figure 2B)。Gal-2 の濃度が上昇するにつれてピロリ菌の非凝集菌体数は減少した。また、ピロリ菌凝集作用は rGal-2 とヒト Gal-2 (hGal-2) でほぼ同程度であり、mGal-2 を添加した場合でも同様の凝集作用が確認された。Gal-2 のピロリ菌凝集作用にマウスとラット、ヒト間で大きな種差は認められなかった。

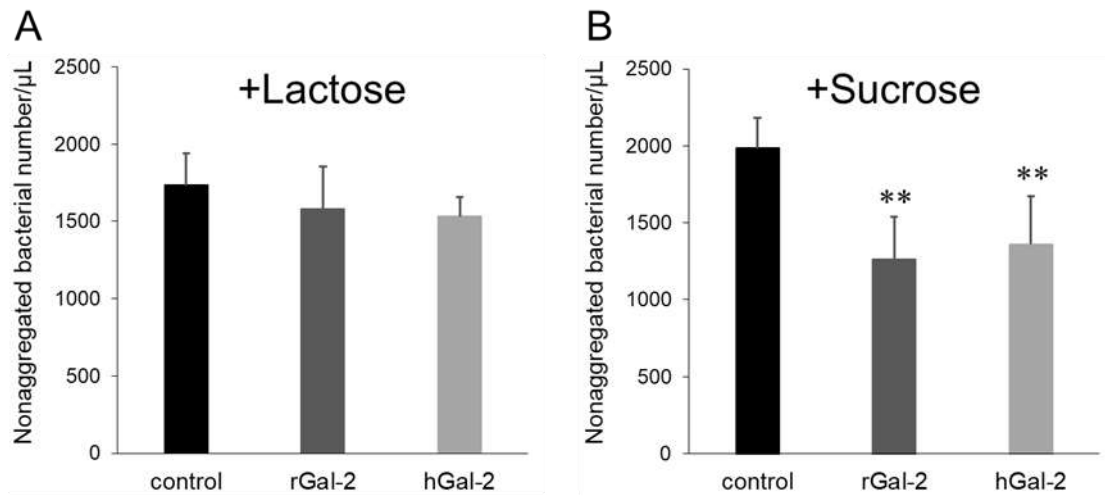


**Figure 2 Aggregation of *H. pylori* induced by Gal-2**

The bacterial suspension after mixing with phosphate buffered saline (A, left). *H. pylori* suspension observed under an optical microscope 1 h after mixing with rat Gal-2 (rGal-2) solution (A, right). Relationship between bacterial aggregation and concentration of Gal-2 (B). The Black, dark gray and light gray bars represent control (without Gal-2), rGal-2 and hGal-2, respectively. Scale bar represents 10 μm. Each bar represents mean ± standard deviation (SD) from five image samples. \*\*,  $P < 0.01$  by Dunnet's test (vs control).

## 2. 2. Gal-2 のピロリ菌凝集作用の $\beta$ -ガラクトシド構造依存性

Gal-2 によるピロリ菌凝集作用が、ピロリ菌表面に存在する複合糖質内の $\beta$ -ガラクトシド構造の架橋によって引き起こされるのかを競合糖を用いて評価した (Figure 3)。 $\beta$ -ガラクトシド構造を持つラクトース共存条件では、rGal-2 及び hGal-2 のピロリ菌凝集作用は阻害され、ピロリ菌の非凝集菌体数は Gal-2 の添加により変化しなかった (Figure 3A)。一方、 $\beta$ -ガラクトシド構造を持たないスクロース共存条件では、rGal-2h 及び Gal-2 のピロリ菌凝集作用が確認され (Figure 3B)、スクロース非共存下と同等の非凝集菌体数の減少が認められた (Figure 2)。また、この $\beta$ -ガラクトシド構造依存的な Gal-2 のピロリ菌凝集作用において、ラットとヒトで大きな種差は認められなかった。

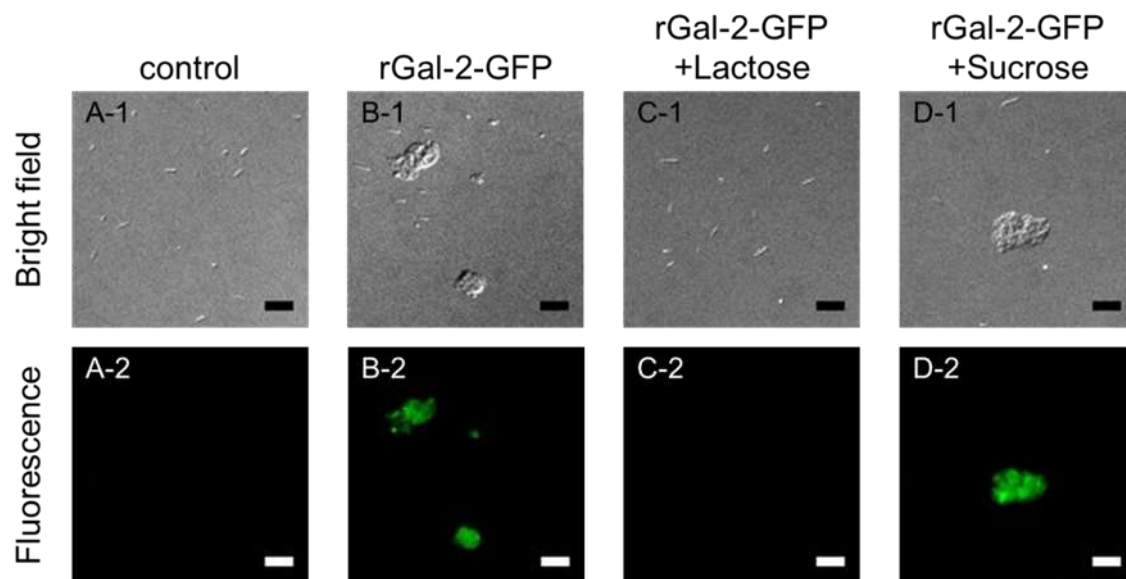


**Figure 3 Inhibition of Gal-2 induced *H. pylori* aggregation by competitive sugar, lactose.**

Number of nonaggregated bacteria under lactose coexistence condition (A). Number of nonaggregated bacteria under sucrose coexistence condition (B). Concentration of Gal-2 was 93.9 μg/mL, lactose and sucrose were 0.1 M. Black, dark gray and light gray bars represent control (without Gal-2), rGal-2 and hGal-2, respectively. Each bar represents mean ± SD from five image samples. \*\*,  $P < 0.01$  by Dunnet's test (vs control).

### 2.3. ピロリ菌凝集体における Gal-2 の存在部位

Gal-2 がピロリ菌表面に存在する $\beta$ -ガラクトシド構造に結合することで凝集が生じるのかを明らかにするため、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を付加した rGal-2 (rGal-2-GFP) を Gal-2 の代わりに用いて調べた (Figure 4)。ピロリ菌のみのコントロールでは凝集体は観察されず、蛍光も検出されなかった (Figure 4A-1, -2)。しかし、ピロリ菌に rGal-2-GFP を添加するとピロリ菌の凝集体が観察され、凝集体表面からは rGal-2-GFP 由来の蛍光が検出された (Figure 4B-1, -2)。また、rGal-2-GFP によるピロリ菌凝集作用はラクトースの共存によって阻害された (Figure 4C-1, -2)。一方、スクロース共存下では rGal-2-GFP のピロリ菌凝集作用は維持され、生じた凝集体からは蛍光が検出された (Figure 4D-1, -2)。これらの結果から、Gal-2 はピロリ菌表面に存在する $\beta$ -ガラクトシド構造を架橋することで凝集を引き起こすことが明らかとなった。

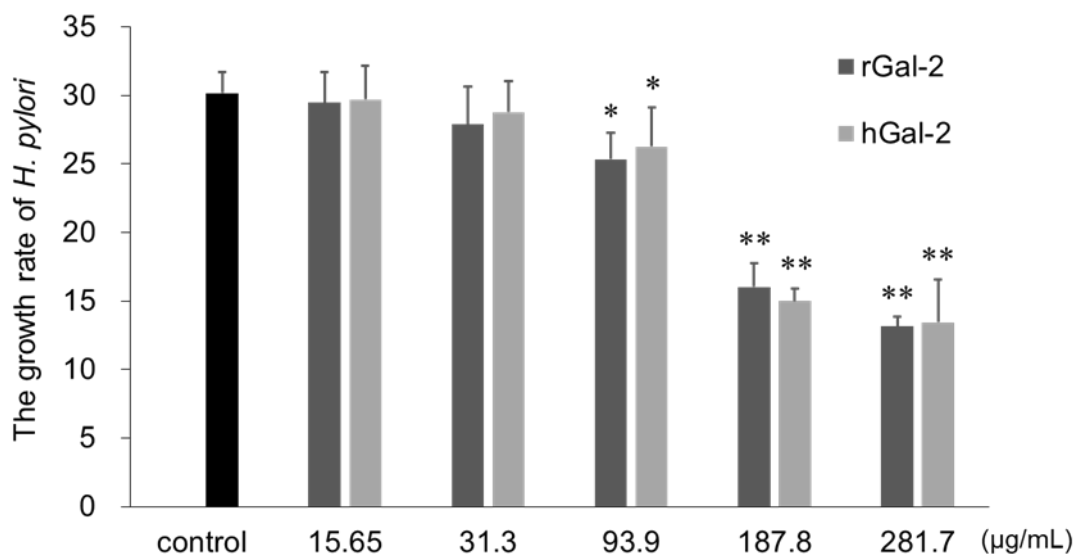


**Figure 4 Observation of rGal-2-GFP-*H. pylori* interaction**

Control (without Gal-2 and sugars) (A). rGal-2-GFP alone (B). rGal-2-GFP with lactose (C). rGal-2-GFP with sucrose (D). Upper (1) and lower (2) images were transmission and fluorescence images, respectively. Concentration of rGal-2-GFP was 93.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lactose and sucrose were 0.1 M. Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

## 2. 4. Gal-2 のピロリ菌増殖抑制作用

Gal-2 にピロリ菌凝集作用があることが確認されたため、次に菌増殖に及ぼす影響を評価した。ピロリ菌懸濁液を種々の濃度の rGal-2 及び hGal-2 と共に培養し、培養前後の濁度の比から増殖比を算出した(Figure 5)。その結果、Gal-2 の濃度が高いほどピロリ菌増殖抑制作用が認められた。また、rGal-2 と hGal-2 は共に 93.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で有意にピロリ菌増殖を抑制し、その作用に大きな種差は認められなかった。



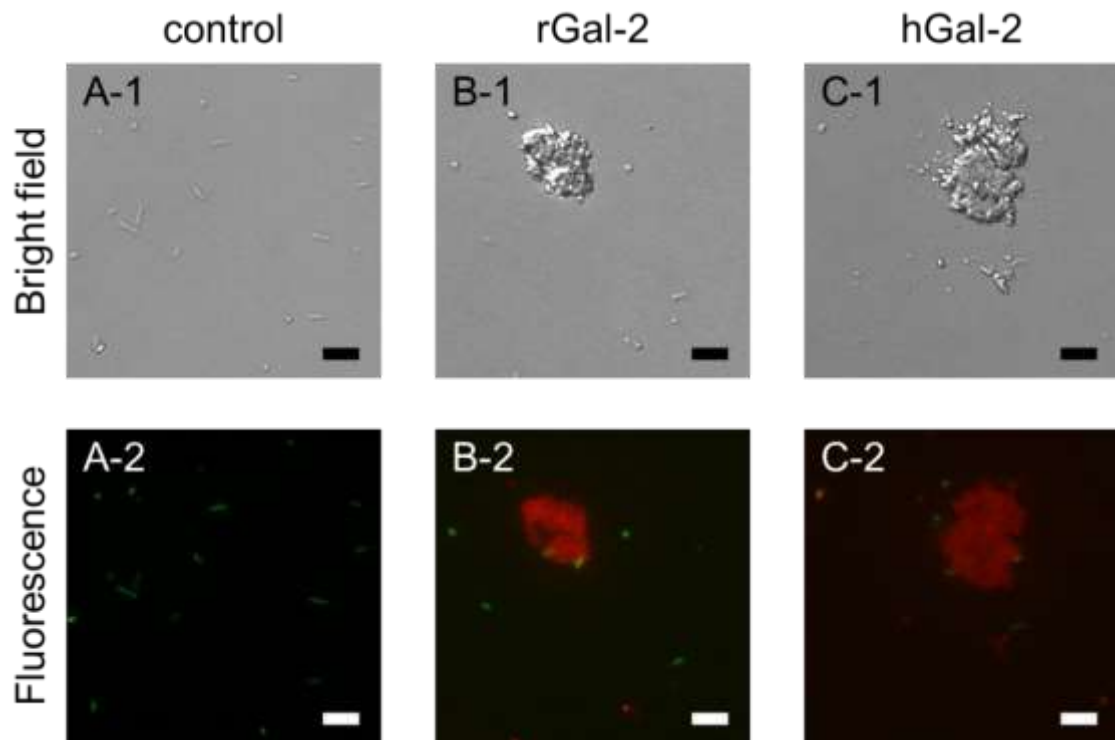
**Figure 5 Inhibitory effect of Gal-2 for *H. pylori* growth**

The growth rate of *H. pylori* was represented as the optical density ratio at 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) before and after incubation for 3 days. The black, dark gray and light gray bars represent control (without Gal-2), rGal-2 and hGal-2, respectively. Mean  $\pm$  SD of the results obtained from four samples. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  by Dunnet's test (vs control).

## 2.5. Gal-2 のピロリ菌殺菌作用

Gal-2 のピロリ菌増殖抑制作用が殺菌作用に起因するか調べるため、ピロリ菌懸濁液を rGal-2 及び hGal-2 溶液と共に 1 時間インキュベート後、生細菌と死細菌をそれぞれ Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) と Propidium Iodide (PI) により染色した (Figure 6)。Gal-2 の代わりに PBS を添加したコントロールを蛍光顕微鏡で観察した結果、観察される大部分のピロリ菌からは CFDA による緑色の蛍光が検出され、ほとんどのピロリ菌は生存していることが確認された (Figure 6A-1, -2)。一方、ピロリ菌懸濁液を rGal-2 及び hGal-2 と共にインキュベートした場合、生じた凝集体の周囲の一部や凝集していないピロリ菌からは CFDA による緑色の蛍光が検出されたが、凝集体からは PI による赤色の蛍光が検出され、死細菌であることが確認された (Figure 6B-1, -2, C-1, -2)。これらの結果から、rGal-2 と hGal-2 はピロリ菌に対して殺菌作用を示すことが明らかとなった。



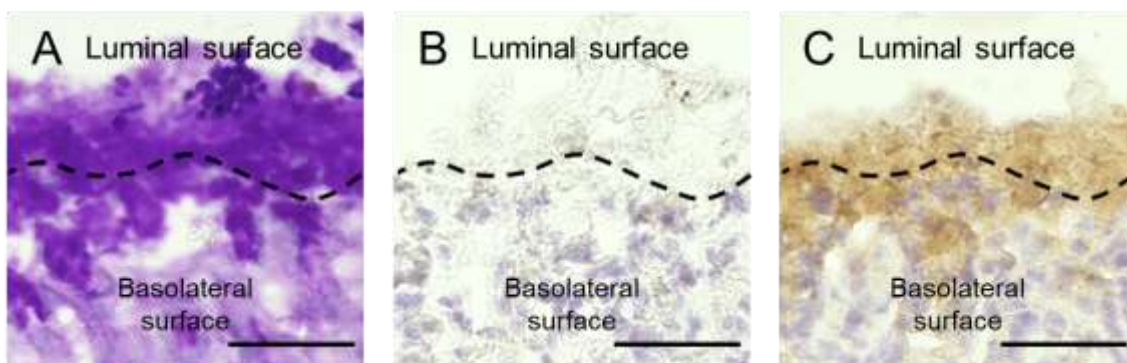


**Figure 6 Bactericidal effect of Gal-2 against *H. pylori***

Control (without Gal-2) (A). rGal-2 (B). hGal-2 (C). Upper (1) and lower (2) images were transmission and fluorescence images, respectively. Live and dead *H. pylori* cells were stained with carboxyfluorescein diacetate (CFDA; green) and propidium iodide (PI; red) for 10 min. Concentration of Gal-2 was 93.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

## 2. 6. 胃粘液中における Gal-2 の存在

生体内では Gal-2 がピロリ菌凝集体を形成する場所は胃粘液中と考えられるが、Gal-2 が胃粘液細胞中のみならず粘液中にも存在するのかは明らかにされていない。そこで、C57BL/6J マウスにおける胃粘膜細胞及び胃粘液をカルノア液で同時固定し、Gal-2 の分布を PAS 染色及び Gal-2 の免疫組織染色により調べた。胃粘液は粘液中の糖鎖を染色する PAS 染色により、胃粘膜細胞直上に固定されていることが確認された (Figure 7A)。Gal-2 の免疫組織染色の結果、アイソタイプコントロールで検出されないシグナルが胃粘膜細胞及び胃粘液中に検出された (Figure 7B, C)。これらの結果から、Gal-2 は胃粘液中に存在すると共に胃粘液中でピロリ菌に対して凝集及び殺菌作用を示し得ると考えられる。



**Figure 7 Distribution of Gal-2 in mouse gastric mucus.**

PAS staining (A). Isotype control (B). Anti-mouse Gal-2 antibody (C). Upper and lower parts of these images are the luminal side and basolateral surface, respectively. The black dotted lines indicate gastric mucosal surface. Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$ .

### 第 III 節 考察

病原体に対する免疫反応はガレクチンの持つ重要な生理機能の一つである。ガレクチン-1 (Gal-1) や Gal-3、Gal-8 に関する病原体の認識や殺菌作用については広く研究がなされている一方で、Gal-2 についてはほとんど報告がされていない [31]。本章では Gal-2 がピロリ菌感染に対する生体防御に関与する可能性を初めて示した。すなわち、Gal-2 はピロリ菌表面の $\beta$ -ガラクトシド構造を架橋することで凝集を引き起こした結果、ピロリ菌に増殖抑制及び殺菌作用を示すことを明らかにした。

rGal-2 及び hGal-2 は濃度依存的にピロリ菌を凝集させた (Figure 2)。また、これらの Gal-2 のピロリ菌凝集作用は $\beta$ -ガラクトシド構造を持つ競合糖であるラクトース共存条件で阻害された (Figure 3)。更に、rGal-2-GFP をピロリ菌に添加すると生じた凝集体からは蛍光が検出された (Figure 4)。Gal-2 はホモ 2 量体を形成することにより 2 つの $\beta$ -ガラクトシド構造を架橋することが出来る (Figure 1) [44]。Gal-2 はピロリ菌表面に存在する $\beta$ -ガラクトシド構造を含む糖鎖を架橋することで凝集を引き起こすと考えられる。

rGal-2 及び Gal-2 によるピロリ菌凝集実験において、高い Gal-2 濃度であっても凝集しないピロリ菌が存在した (Figure 2)。また、rGal-2-GFP を用いたピロリ菌凝集実験では、凝集に関与しないピロリ菌からは蛍光が検出されなかつ

た (Figure 4)。この原因として2つの可能性が挙げられる。1つ目は、凝集に関与しないピロリ菌は rGal-2h 及び Gal-2 が結合する $\beta$ -ガラクトシド構造をほとんどもしくは全く発現していないということである。2つ目は、凝集していないピロリ菌表面には rGal-2-GFP が結合するものの、その量が少なく使用した蛍光顕微鏡の感度では検出が出来なかったということである。ピロリ菌は O 抗原を含む糖鎖を発現しているが、その発現は pH や宿主免疫への曝露といった周囲の環境や特定のライフサイクルによって変化する [24, 45, 46]。更に、phase variation により、同一コロニー内のピロリ菌であっても糖鎖の発現は異なる [18]。このため、一部のピロリ菌は Gal-2 が認識する $\beta$ -ガラクトシド構造を含む複合糖質をほとんどもしくは全く発現していないため、凝集に関与しなかった可能性がある。

Gal-2 は以下の順序でピロリ菌を凝集させると考えられる。まず、Gal-2 の2量体の片方の CRD がピロリ菌表面の $\beta$ -ガラクトシド構造を含む複合糖質に結合する。その後、ピロリ菌がほかの菌に接触した際に、Gal-2 の2量体のもう一方の CRD がピロリ菌同士を架橋し凝集が生じる。Gal-2 添加後、経時的に凝集体の数やサイズが増大したのは (Figure 2)、ピロリ菌の運動によりピロリ菌同士の接触機会が高まったためと考えられる。ピロリ菌凝集作用にラットとヒトで大きな種差は確認されなかった (Figure 2)。これは、ヒトの Gal-2 のアミノ

酸配列と他の動物の Gal-2 のアミノ酸配列との相同性が高く、糖認識部位には差がないことによるものと考えられる [47]。また、哺乳類間の Gal-2 において、糖鎖認識に重要な 8 つのアミノ酸が保存されていることから [47, 48]、ピロリ菌に対する Gal-2 の作用に大きな種差は認められない可能性が考えられる。

rGal-2 及び hGal-2 はピロリ菌に対して増殖抑制作用及び殺菌作用を示した (Figure 5, 6)。Gal-2 によって生じた凝集体の中央のピロリ菌は死に至り、凝集体の周りの一部の菌は生存していた。Gal-2 のピロリ菌殺菌作用のメカニズムは不明であるが、ヒトの Gal-3 はピロリ菌の ATP 代謝異常や細胞壁の形態変化を引き起こす [33]。また、ヒトの Gal-4 や Gal-8 は血液型 B 抗原を有する *Escherichia coli* の細胞壁を破壊することで殺菌する [41]。いずれの作用も、ガレクチンが病原体のガラクトシド構造に結合することで起こると考えられることから、Gal-2 がピロリ菌に代謝異常を引き起こすことや細胞壁構造を破壊する作用を示す可能性がある。Gal-2 がピロリ菌の $\beta$ -ガラクトシド構造に結合することで殺菌作用を示すと仮定すると、ピロリ菌に Gal-2 が結合すればするほど強い殺菌作用を示すと考えられる。Gal-2 が結合する量が多いピロリ菌ほどより早く凝集すると考えられることから、凝集体の中央部分はより殺菌作用が強く表れ死細菌が多くなると予測される。もう一つの殺菌機序は、Gal-2 のピロリ菌凝集作用そのものが殺菌作用に関わるというものである。ピロリ菌の培養は Brain

heart infusion (BHI) を用い、高栄養要求株の細菌であることや培養時に好気性条件を必要とする [49]。凝集体中央部分はピロリ菌の生存に適さない環境であり、そのことが殺菌をもたらすと考えられる。いずれの機序にせよ、Gal-2 がピロリ菌を殺菌することにより増殖を抑制することが明らかとなった。今後、Gal-2 のピロリ菌殺菌作用の分子メカニズムについては更なる研究が必要とされる。

免疫組織染色と PAS 染色の結果、C57BL/6J マウスにおいて Gal-2 は胃粘膜細胞中のみならず胃粘液中にも存在することが明らかとなった (Figure 7)。したがって、Gal-2 のピロリ菌に対する凝集・増殖抑制・殺菌作用は胃粘液中で発現し、ピロリ菌に対する感染防御の一翼を担っていると考えられる。

ピロリ菌増殖は 93.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の rGal-2h 及び Gal-2 により抑制された (Figure 5)。胃粘膜細胞中の Gal-2 の濃度は不明だが、ヒトの血清中には約 15  $\text{ng}/\text{mL}$  存在することが報告されている [50]。動物の身体全体に発現する Gal-1 において、ウシの脾臓中では 35~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の発現が報告されており、これはヒトの血清中 Gal-1 濃度と比較してはるかに高い濃度である [50, 51]。哺乳類間での臓器や組織におけるガレクチン発現の種差はある程度同等であると考えられているため、ヒトの脾臓においても同程度の発現が予測される。また、ガレクチンの発現レベルは病原体の感染や疾患を含む様々な状態により劇的に変動す

ることが知られている [50, 52, 53]。例えば、乳がん患者においては血清中の Gal-2, -3, -4 量が上昇し、急性肝不全患者においては Gal-9 の血漿中濃度が上昇する。また、ヒトの胃の間質における Gal-3 の発現はピロリ菌の感染により上昇する [43]。以上のことから、ヒトの胃粘膜細胞中では、Gal-2 は血中よりもはるかに高い濃度で発現すると予測されるため、本研究で使用した Gal-2 の濃度はヒトの生理的濃度の範囲内であると予測される。

結論として、Gal-2 はピロリ菌に対して凝集・増殖抑制・殺菌作用を示し、胃粘液中における存在が確認された。これらの結果はピロリ菌感染に対する生体防御に Gal-2 が関与することを示唆している。これらの知見は将来的に新たな抗菌薬の開発やピロリ菌感染患者の治療戦略の開発に貢献できると考えられる。しかしながら、Gal-2 は虚血性冠動脈疾患患者の増悪に関与するため [54, 55]、製剤化の際にはタンパク工学技術を用いた Gal-2 構造の改変やドラッグデリバリーシステムの利用が必要とされる。

#### 第IV節 小括

本章では、Gal-2 がピロリ菌に与える影響を調査した。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. rGal-2 及び hGal-2 は濃度及び $\beta$ -ガラクトシド構造依存的にピロリ菌表面の糖鎖を架橋することで凝集を引き起こす。

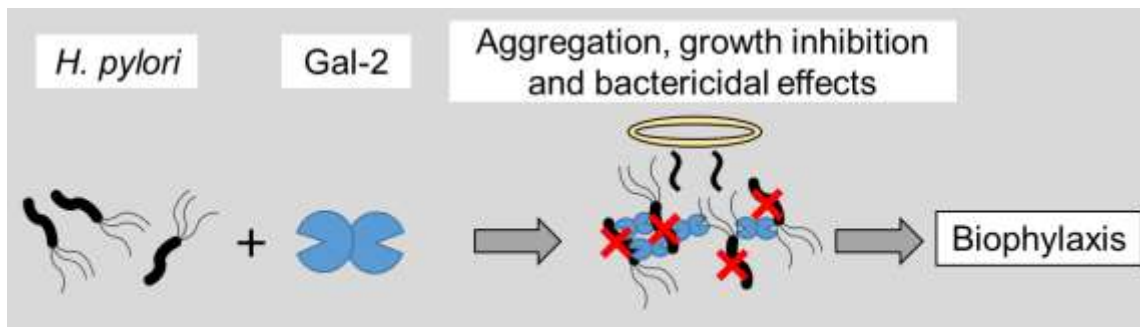
2. rGal-2 及び hGal-2 はピロリ菌を殺菌し、濃度依存的な増殖抑制効果を示す。

3. ピロリ菌の凝集・増殖抑制・殺菌作用にラットとヒトの Gal-2 で大きな差は認められない。

4. C57BL/6J マウスにおいて、Gal-2 は胃粘膜細胞のみならず胃粘液中に存在する。

以上の結果より、Gal-2 は胃粘液中でピロリ菌を凝集させると共に殺菌することで感染防御に関わる可能性が示唆された (Figure 8)。





**Figure 8** Biophylactic mechanism of Gal-2 against *H. pylori* infection.

## 第 II 章 弱酸性条件における Gal-2 とピロリ菌の相互作用

### 第 I 節 緒言

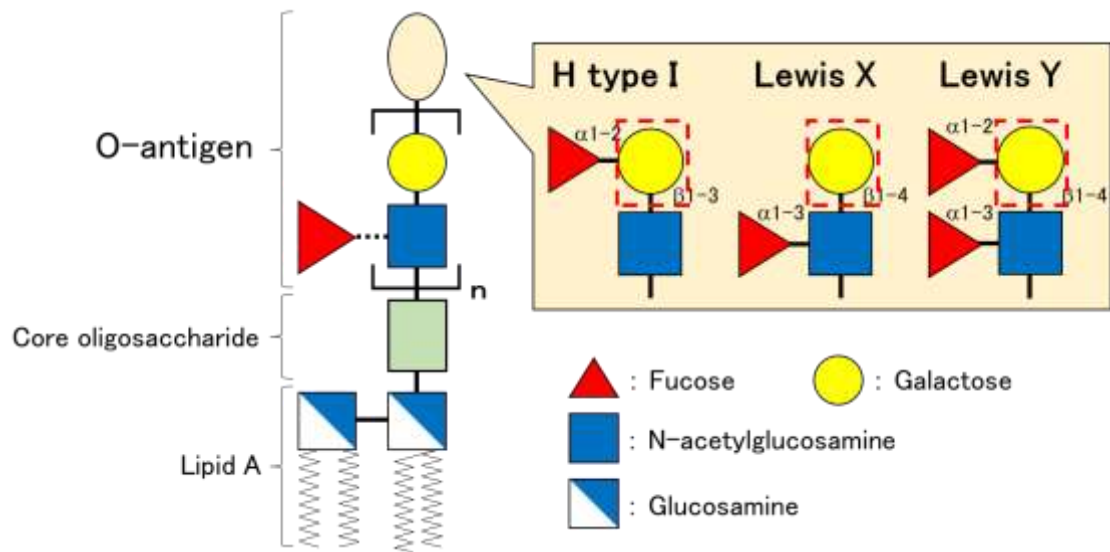
第 I 章では、Gal-2 がピロリ菌表面の $\beta$ -ガラクトシド構造に結合することやピロリ菌に対して増殖抑制・殺菌作用を示すことを示した。また、胃粘液中における Gal-2 の存在が明らかとなったことから、Gal-2 は胃粘液中でピロリ菌と相互作用して感染防御に関与する可能性が見出された。

胃は壁細胞から胃酸を分泌する一方で、表層粘液細胞から粘液や重炭酸イオンを分泌することで自身を胃酸から守っている。重炭酸イオンの分泌により、胃粘液中における pH は胃の管腔側に近づくにつれて低くなり、表層粘液細胞に近づくにつれて中性に近づく [56, 57]。ヒトの Gal-1 において、糖鎖への結合能力が pH によって変化することが報告されている [58]。Gal-1 と Gal-2 のアミノ酸配列の相同性は約 43% と高いため、Gal-2 の糖鎖への結合能力も pH によって変化する可能性がある。第 I 章の結果は、pH7.4 の中性条件で得られたため、より酸性の高い条件でも同様の結果が得られるか確認する必要がある。

ピロリ菌は一般的なグラム陰性菌と同様に LPS を持つ。LPS は細胞壁外膜に存在する糖脂質であり、菌体が破壊されることで放出されて宿主の免疫反応を賦活化させる [59]。LPS はリポド A、コアオリゴ糖、O 抗原から構成されるが、

ピロリ菌は他のグラム陰性菌にはあまり認められないフコシル化された O 抗原を持つ [30]。この O 抗原構造は Lewis 抗原と呼ばれ、ヒトの上皮細胞や粘液中にも同じ Lewis 抗原が存在している。ピロリ菌は LPS に Lewis 抗原を発現することでヒト宿主の免疫応答を回避していると考えられる [18, 19]。本研究で使っているピロリ菌株 (ATCC43504) は H type I、Lewis X、Lewis Y 抗原の発現が報告されている [30]。これら 3 種類の Lewis 抗原は全て  $\beta$ -ガラクトシド構造を持つことから (Figure 9)、Gal-2 はピロリ菌の Lewis 抗原に結合することで凝集作用や増殖抑制、殺菌作用を示すと予測されるが、LPS の発現も pH に依存して変化する可能性がある。

そこで、第 II 章では、生体内でも Gal-2 がピロリ菌と相互作用できるかを検討するため、より生理条件に近い弱酸性条件下における Gal-2 のピロリ菌凝集作用を調べた。また、Gal-2 がピロリ菌のどのような  $\beta$ -ガラクトシド構造を認識して凝集や増殖抑制、殺菌作用を示すのかを Gal-2 固定化カラムによるピロリ菌 LPS のアフィニティークロマトグラフィーを用いて検討した。



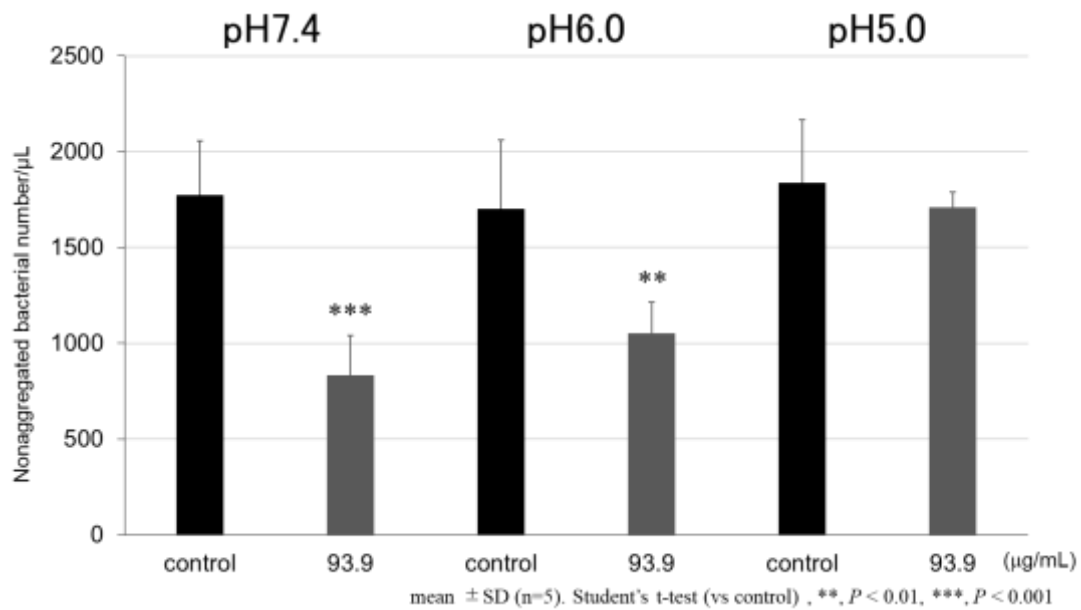
**Figure 9 Schematic model of LPS expressing on *H. pylori***

The regions surrounded with red dotted lines indicate galactose containing  $\beta$ -galactoside bond.

## 第 II 節 実験結果

### 2.1. 弱酸性条件における Gal-2 のピロリ菌凝集作用

ピロリ菌懸濁液及び rGal-2 溶液の pH を 6.0 または 5.0 に変更してピロリ菌凝集実験操作を行った。rGal-2 のピロリ菌凝集作用は pH6.0 条件下でも確認され、pH7.4 と同等の凝集作用が確認された (Figure 10)。しかし、pH5.0 では rGal-2 のピロリ菌凝集作用は大幅に低下し、コントロールとの差も消失した。これらのことから、rGal-2 のピロリ菌凝集作用は pH の低下とともに減弱するが、pH6.0 までは維持されることが明らかとなった。

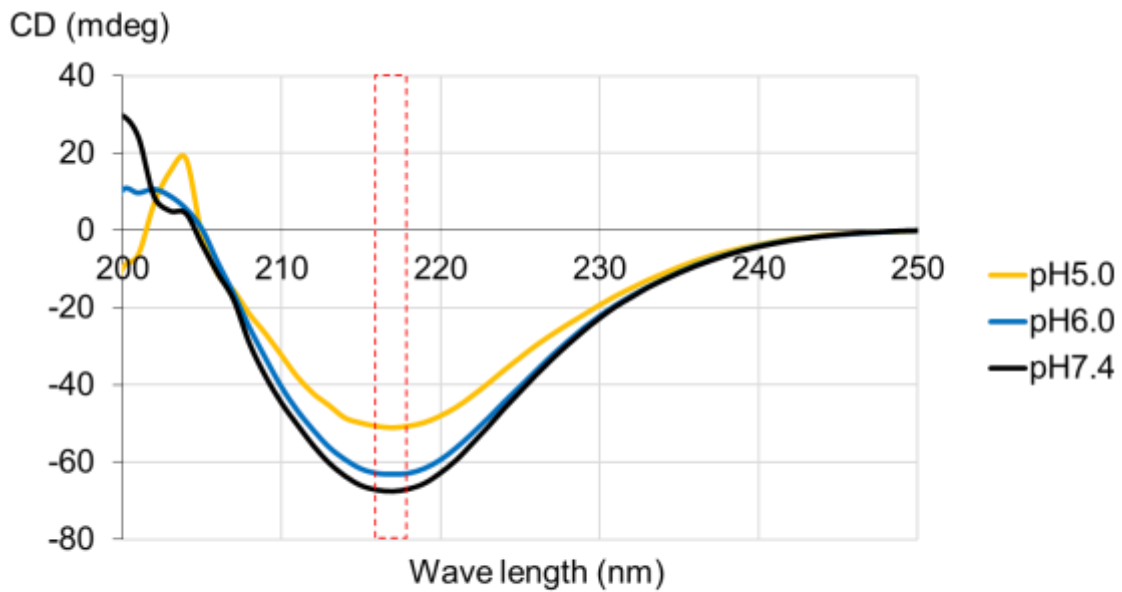


**Figure 10** Aggregation of *H. pylori* induced by rGal-2 under various pH conditions

The black and dark gray bars represent control (without rGal-2) and rGal-2, The left, middle and right bars indicate under pH7.4, pH6.0 and pH5.0 conditions, respectively. Each bar represents mean ± standard deviation (SD) from five image samples. \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$  by Student's test (vs control).

## 2.2. 弱酸性条件における Gal-2 の構造変化

rGal-2 のピロリ菌凝集作用が pH の低下と共に減弱したことから、酸性条件による rGal-2 の変性の可能性が示唆された。そこで次に、rGal-2 の構造安定性に及ぼす pH の影響を評価した。Gal-2 の構造内には多数の $\beta$ -シート構造が存在することから[60]、種々の pH における rGal-2 の $\beta$ -シート構造の変化を CD スペクトルにより測定した。rGal-2 の CD スペクトルには、217 nm 付近に $\beta$ -シート構造由来のピークが確認された (Figure 11)。pH6.0 における rGal-2 の $\beta$ -シート構造のピークの大きさは pH7.4 と比べて大差はなかったが、pH5.0 ではピークが小さくなった。このことから、rGal-2 は pH の低下に伴って変性するが、pH6.0 以上の弱酸性条件まではほぼ維持されることが明らかとなった。



Gal-2: 0.5 mg/mL

pH6.0; 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl

pH5.0; 0.1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 150 mM NaCl

pH7.4; 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{PO}_4^{2-}$

### Figure 11 CD spectrum of rGal-2 under various pH conditions

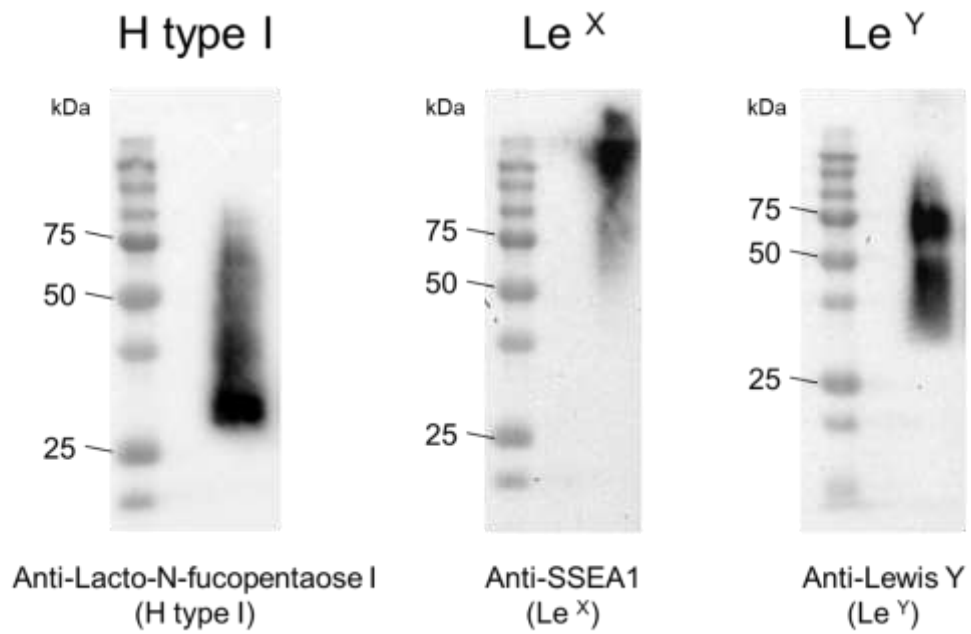
The concentration of rGal-2 was 0.5 mg/mL. The peaks surrounded with a red dotted line correspond to  $\beta$ -sheet structure. The yellow, blue and black lines indicate pH 5.0, 6.0 and 7.4, respectively.



### 2.3. Gal-2 のピロリ菌 LPS リガンドの探索

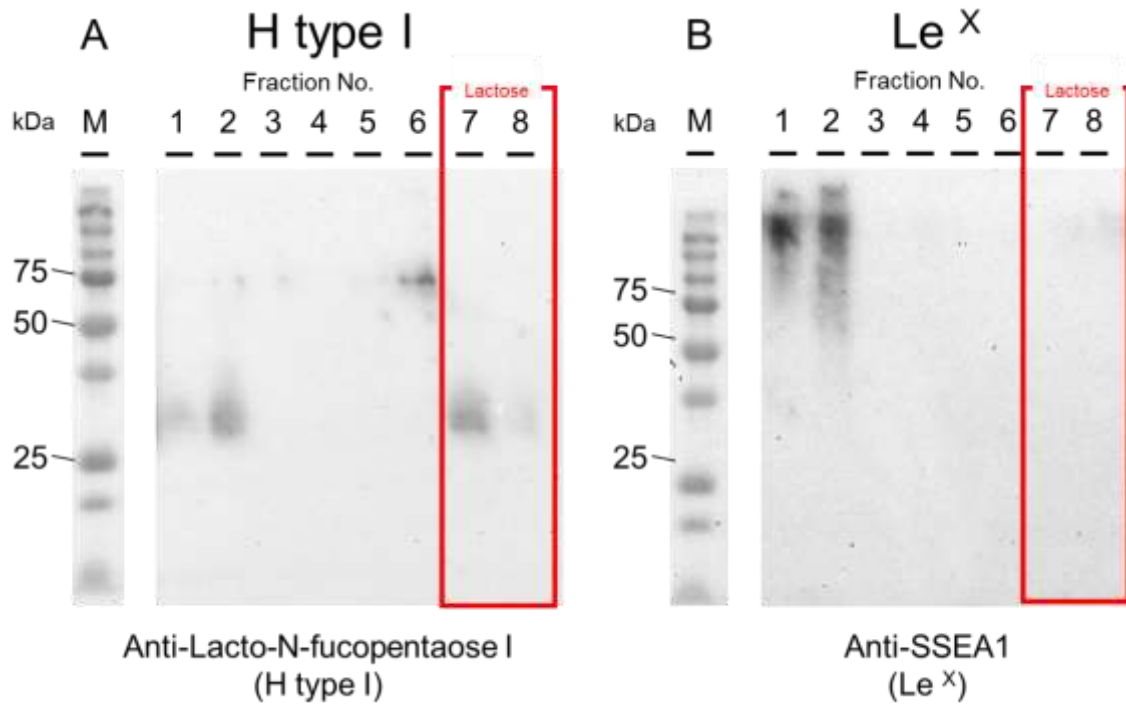
rGal-2 のピロリ菌凝集作用は pH6.0 以上の弱酸性条件では維持されるが、ピロリ菌のどのようなリガンドに結合しているのかは不明である。そこで、ピロリ菌表面に存在する LPS に着目し、まずはピロリ菌がどのような Lewis 抗原を発現しているか確認した。pH6.0 で培養したピロリ菌から LPS 成分を抽出し、報告のある H type I、Lewis X、Lewis Y 抗体を用いて Western Blotting を行った (Figure 12)。その結果、ピロリ菌 (ATCC43504) は pH6.0 で培養しても H type I、Lewis X、Lewis Y を発現すること確認された。

次に、hGal-2 がピロリ菌の LPS 上の Lewis 抗原に結合するのかを検討した。ピロリ菌 LPS を hGal-2 固定化カラムに添加してカラムに吸着させた後 E-PBS (PBS containing 1 mM EDTA) で洗浄し、その後大量のラクトースを添加することによりカラムに吸着した hGal-2 リガンドを溶出した。溶出液の各フラクションに回収された hGal-2 リガンドは、Lewis 抗体を用いた Western Blotting により検出した (Figure 13)。H type I 抗体を用いた場合、洗浄液中にもバンドが確認されたが、ラクトース添加後の溶出画分にもバンドが検出され (Figure 13A)、hGal-2 はピロリ菌 LPS 中の H type I と結合することが明らかとなった。一方、Lewis X 抗体を用いた場合は、ラクトース溶出画分にはバンドは検出されず (Figure 13B)、Lewis X は hGal-2 リガンドではないと考えられる。



**Figure 12 Lewis antigens expressing in *H. pylori* 43504 strain at pH 6.0.**

The bacteria were lysed and subjected to Western blotting with anti-H type I (left), and anti-Lewis X (middle), and anti-Lewis Y antibodies, respectively.



**Figure 13** *H. pylori*'s Lewis antigen recognized by hGal-2

LPS extracted from *H. pylori* were subjected to affinity column fixed with hGal-2. hGal-2 ligands were eluted by excess lactose and then each fraction was subjected Western blotting with anti-H type I (A) and anti-Lewis X (B) antibodies. Lanes 1 to 6 correspond to washed fractions with E-PBS, and lanes 7 and 8 are eluted fraction by lactose.

### 第 III 節 考察

本章では、Gal-2 がピロリ菌と相互作用する胃粘液中は弱酸性であることから、まず、Gal-2 が弱酸性条件でもピロリ菌と相互作用することが出来るのかを検討した。

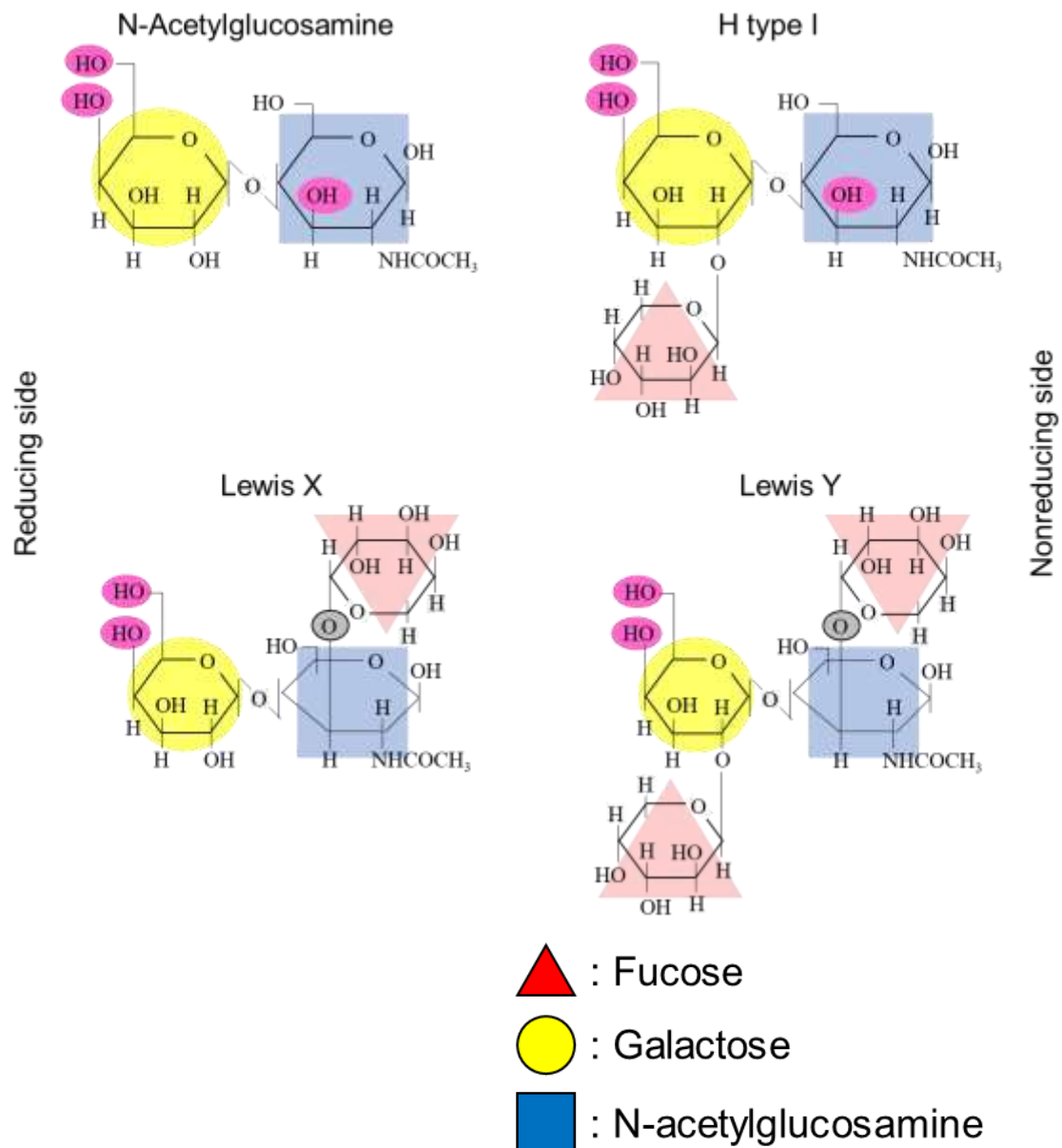
rGal-2 のピロリ菌凝集作用は pH5.0 では大きく低下したが、pH6.0 まで保たれた (Figure 10)。更に、弱酸条件における rGal-2 の構造変化を CD スペクトル上の $\beta$ -シート構造由来ピークから調べた。その結果、rGal-2 の $\beta$ -シート構造は pH6.0 では pH7.4 と比較して大きな変化が見られなかったが、pH5.0 では $\beta$ -シート構造の崩壊が認められた (Figure 11)。ヒトの Gal-1 において、 $\beta$ -ガラクトシド構造への結合活性が pH によって変化することが報告されている [58]。Gal-1 の持つ 53 番目のヒスチジンは pH6.3 以下でプロトン化され、アミノ酸の 2 次構造にわずかな変化が生じると共に、糖鎖への結合活性もわずかに低下する。また、Gal-1 の 45 番目のヒスチジン (His45) は pH5.7 以下でプロトン化され、ガレクチン分子内の 68 番目のトリプトファンとのカチオン- $\pi$ 相互作用が出来なくなることで $\beta$ -ガラクトシド構造との結合ポケットが緩み、糖鎖への結合活性が大きく減少する。His45 は Gal-2 の $\beta$ -シート構造中にも存在し、糖鎖の認識に重要なアミノ酸の一つである [48]。このことから、Gal-2 の糖鎖への結合力の低下は His45 のプロトン化による $\beta$ -シート構造の変性が主要な原因である可

能性が高い。rGal-2 は pH5.0 において、His45 のプロトン化により糖結合部位の構造が崩れることで糖結合活性が大幅に減少し、ピロリ菌凝集作用を示さなくなると考えられる。また、His45 のプロトン化は pH5.7 以下で起こることから、Gal-2 のピロリ菌凝集作用は pH5.7 付近まで維持されると予測される。これらのことから、Gal-2 は胃粘液中の胃粘膜細胞直上もしくは細胞付近でピロリ菌に凝集作用を示すと考えられる。

次に、pH6.0 において Gal-2 がどのようなピロリ菌リガンドに結合するのかを検討した。hGal-2 が認識するピロリ菌リガンドの探索を行った結果、hGal-2 がピロリ菌の H type I に結合することが初めて明らかとなった (Figure 13)。一方、hGal-2 はピロリ菌の Lewis X には結合しなかった。糖鎖構造単体を用いた研究により、ガレクチンが糖鎖に結合するために必須条件とされる構造が明らかにされている [61]。その条件とは、非還元末端側糖の 4 位と 6 位に水酸基を持つこと、そして還元末端糖の 3 位に水酸基を持つことである (Figure 14)。ガレクチンが共通して認識する N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と H type I、Lewis X、Lewis Y 抗原を例にすると、GlcNAc と H type I は非還元末端のガラクトースの 4 位及び 6 位に水酸基を持ち、還元末端側の N-アセチルグルコサミンの 3 位に水酸基を持つ。一方、Lewis X 及び Lewis Y においては非還元末端のガラクトースの 4 位及び 6 位には水酸基を持つものの還元末端側の 3 位にはフ

コースが付加している。このため、hGal-2 は H type I に結合し、Lewis X には結合しなかったと考えられる。

LPS 以外の Gal-2 リガンドの可能性として、ピロリ菌の細胞壁に存在する糖タンパク質が挙げられる。hGal-2 固定化カラムを用いてピロリ菌細胞壁成分のアフィニティークロマトグラフィーを予備的に行ったところ、わずかではあるがラクトース溶出画分にタンパク質リガンドが溶出された (data not shown)。ピロリ菌において、多様な糖タンパク質が発見されており、その中には細胞壁外膜に発現する糖タンパク質が複数存在する [62]。今後、Gal-2 のピロリ菌糖タンパク質リガンドの探索を行うことが検討課題である。



**Figure14 Carbohydrate chain structures recognized by galectins**

The upper left structure represents N-acetylglucosamine. The other are terminal structures of Lewis antigens expressing on *H. pylori*, namely H type I (upper right), Lewis X (lower left) and Lewis Y (lower right). The hydroxy groups which is essential to recognition by galectins were highlighted by magenta circles. The hydroxyl groups which disappeared by glycoside bonds are colored by gray.

#### 第IV節 小括

本章では弱酸性条件における rGal-2 のピロリ菌凝集作用及び構造変化を評価するとともに、hGal-2 のピロリ菌 LPS リガンドの探索を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. rGal-2 のピロリ菌凝集作用ならびに構造は pH6.0 以上の弱酸性条件まで維持される。
2. hGal-2 はピロリ菌 LPS の H type I に結合する。

以上の結果を第I章と併せると、Gal-2 は胃粘膜細胞直上もしくは細胞付近の胃粘液中でピロリ菌の H type I を含む LPS を架橋することで凝集や殺菌作用を示すと考えられる。



### 第 III 章 ピロリ菌に与える Gal-2 と Gal-3 の作用の比較

#### 第 I 節 緒言

胃は胃酸の分泌以外にもさまざまな方法で病原体から身を守っている。例として、胃の副細胞から分泌される腺粘液の主成分である MUC6 が挙げられる。MUC6 中に含まれる $\alpha$ 1, 4 結合した N-アセチルグルコサミン残基はピロリ菌の細胞壁の生合成を阻害することで感染防御に関与することが報告されている [23]。また、自然免疫に関わるサーファクタントプロテイン D はピロリ菌感染によって発現が上昇することやピロリ菌を凝集させることが報告されている [24, 25]。これらの感染防御機構は単独で機能するのではなく、共同して働くと考えられるが、そのすべてが明らかになっているわけではない。

Gal-3 は分子量約 35 kDa の Gal-2 とは異なるキメラタイプのガレクチンで、タンパク質の一次構造の N 末端に非 CRD ドメインを持ち、二量体のみならず多量体を形成することが出来る [63]。全身に広く存在し、胃の上皮細胞にも発現している [34]。ヒトの Gal-3 がピロリ菌を $\beta$ -ガラクトシド構造依存的に凝集・殺菌することや、これらの作用によりピロリ菌感染に対する生体防御に関わることが報告されている [32]。しかし、Gal-3 がピロリ菌のどのようなリガンドを認識するのかということや、周囲の pH 環境における構造安定性については不明である。また、本研究の第 I 及び II 章で、Gal-2 が胃粘液中でピロリ菌を凝

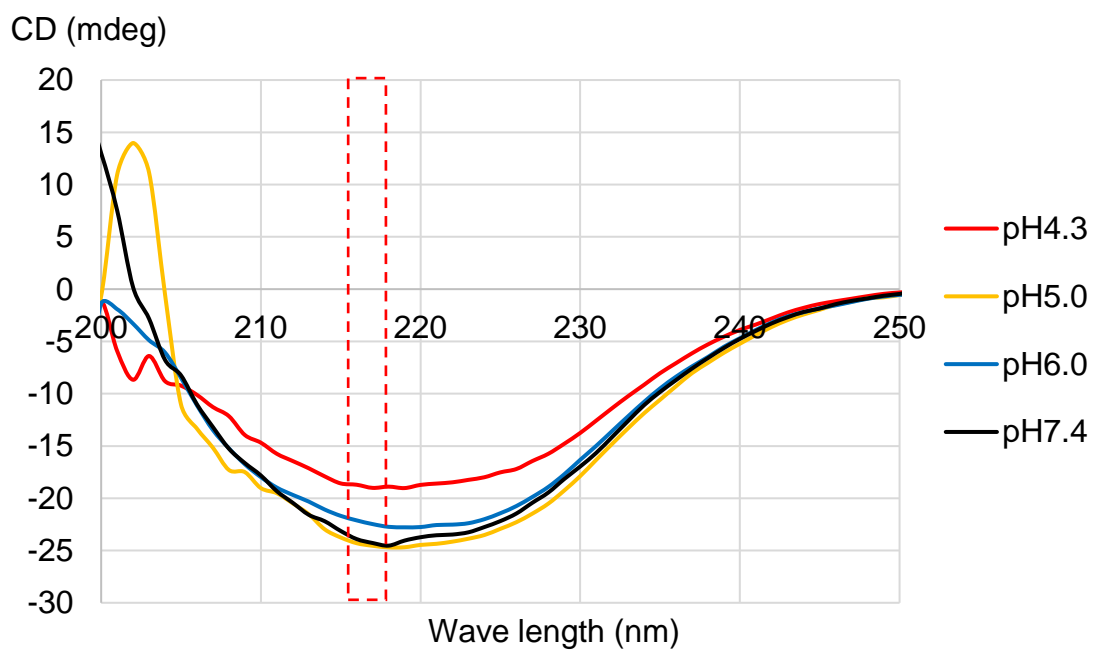
集・殺菌することによる生体防御への関与が示唆されたが、ピロリ菌に対する作用の Gal-2 と Gal-3 の相違点も明らかにされていない。糖鎖に対する親和性はガレクチンサブタイプごとに異なるため [64]、Gal-2 と Gal-3 で結合するピロリ菌の糖鎖が異なり、凝集・殺菌作用も異なる可能性がある。

そこで、ピロリ菌に対する Gal-2 と Gal-3 の作用を比較することで、ピロリ菌感染に対する生体防御機構に異なるガレクチンサブタイプが共同して働く可能性について検討した。本章では、Gal-3 の弱酸性条件における構造の安定性やピロリ菌の増殖抑制作用、認識するピロリ菌 LPS 中の Lewis 抗原を調査すると共に、Gal-2 との相違点について検討した。

## 第 II 節 実験結果

### 2. 1. 弱酸性条件における Gal-3 の構造変化

ヒト Gal-3 (hGal-3) の緩衝液の pH を 4.3、5.0、6.0 および 7.4 にした後、CD スペクトルを測定し、hGal-3 の $\beta$ -シート構造の変化を評価した (Figure 15)。pH7.4 のコントロールと比較して、pH6.0 と 5.0 の $\beta$ -シート構造のピークに大きな差は認められなかったが、pH4.3 では著しくピークが小さくなった。したがって、hGal-3 は酸性条件下で変性するものの、pH5.0 以上の弱酸性条件まではほぼ構造が維持されることが考えられる。また、rGal-2 と比較して hGal-3 の構造変化はより低い pH で起こることが明らかとなった。



Gal-3: 0.2 mg/mL

pH6.0: 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl

pH4.3: 0.1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 150 mM NaCl

pH7.4: 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{PO}_4^{2-}$

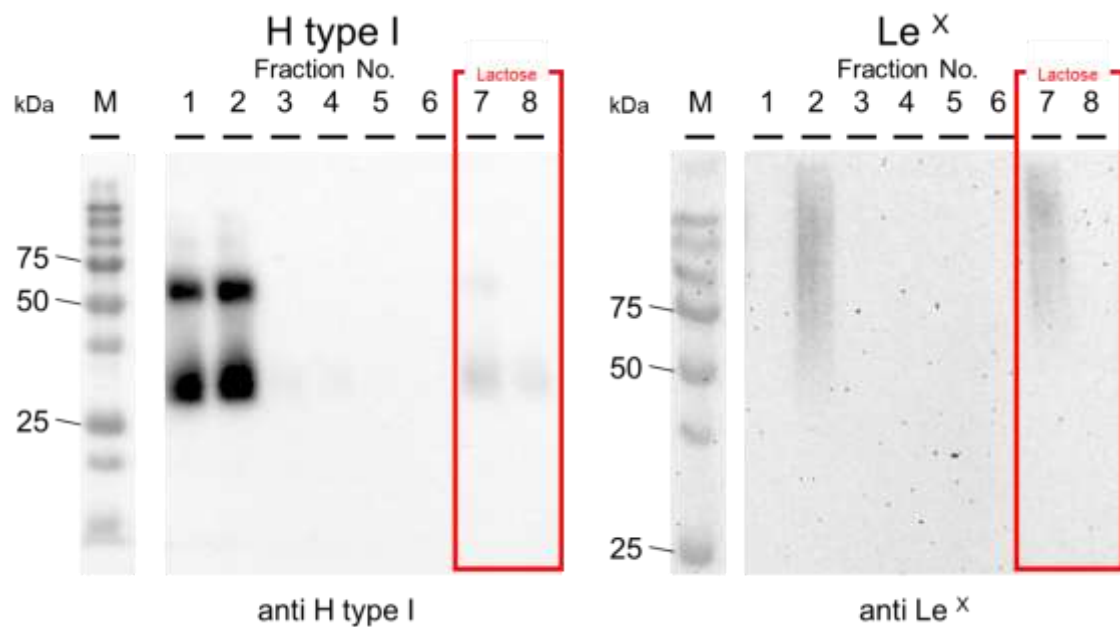
pH5.0: 0.1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 150 mM NaCl

### Figure 15 CD spectrum of hGal-3 under various pH conditions

The concentration of hGal-3 was 0.2 mg/mL. The peaks surrounded with a red dotted line correspond to  $\beta$ -sheet structure. The red, yellow, blue and black lines indicate pH 4.3, 5.0, 6.0, 7.4, respectively.

## 2.2. Gal-3 のピロリ菌 LPS リガンドの探索

hGal-2 のリガンド探索と同様に、hGal-3 固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー及び Western blotting により、hGal-3 リガンドの探索を行った (Figure 16)。hGal-2 とは異なり、ラクトースの添加によるリガンド溶出画分からは H type I のみならず、Lewis X のバンドも検出され、hGal-3 は H type I 及び Lewis X を発現するピロリ菌 LPS と結合することが明らかとなった。

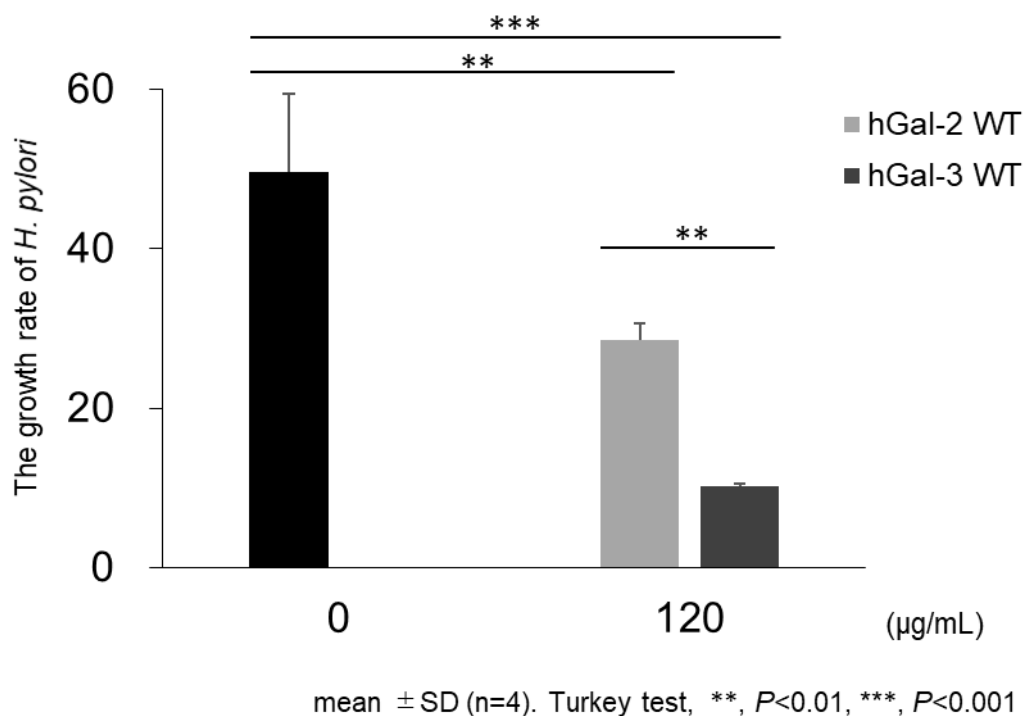


**Figure 16** *H. pylori*'s Lewis antigen recognized by hGal-3

LPS extracted from *H. pylori* were subjected to affinity column fixed with hGal-3, hGal-3 ligands were eluted by excess lactose and then each fraction was subjected Western blotting with anti-H type I (A) and anti-Lewis X (B) antibodies. Lanes 1 to 6 correspond to washed fractions with E-PBS, and lanes 7 and 8 are eluted fraction by lactose

### 2.3. Gal-3 のピロリ菌増殖抑制作用

次に、hGal-3 のピロリ菌増殖抑制作用を、同濃度の hGal-2 と比較した (Figure 17)。hGal-3 は hGal-2 と同様にピロリ菌の増殖抑制作用を示したが、その作用は hGal-2 よりも有意に強かった。



**Figure 17 The growth inhibition of *H. pylori* by Galectins in pH 7.2.**

The growth rate of *H. pylori* was represented as the OD<sub>600</sub> before and after incubation for 3 days. The black, light gray and dark gray bars represent control (without Gal-2), hGal-2 and hGal-3, respectively. Mean ± SD of the results obtained from four samples. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  by Turkey test.

### 第 III 節 考察

本章では弱酸性条件における hGal-3 の構造変化や hGal-3 のピロリ菌増殖抑制作用、結合するピロリ菌 LPS について検討し、hGal-2 と比較をした。

弱酸性条件における hGal-3 の $\beta$ -シート構造を CD スペクトル測定した結果、hGal-3 の $\beta$ -シート構造は pH5.0 以上の弱酸性条件ではコントロールと大きな差が生じなかったが、pH4.3 ではコントロールと比較して $\beta$ -シート構造のピークが小さくなった (Figure 15)。rGal-2 は pH6.0 以上の弱酸性条件まで構造が維持されると共にピロリ菌凝集作用を示した。また、中性条件では hGal-3 のピロリ菌凝集作用が確認できたことから、hGal-3 は pH5.0 以上の弱酸性条件まで構造を維持できると共にピロリ菌を凝集させることが出来ると考えられる。ガレクチンファミリー間において、CRD の構造の保存性は高い一方、CRD の糖鎖に結合するポケットの構造はサブタイプごとに異なることが明らかとなっている。Gal-3 は Gal-1 と比較して糖鎖が結合するポケットがやや拡張している [60, 65, 66]。Gal-1 と Gal-2 は同じプロトタイプのガレクチンであり、アミノ酸配列の相同性も高いことから、糖鎖に結合するポケットは Gal-2 よりも Gal-3 の方が拡張していると考えられる。また、mGal-2 において分子内の 57 番目のシステインが過酸化水素などの活性酸素による酸化失活を受けることで周囲の疎水性ポケットが不安定化することが報告されている [47]。これらのことから、Gal-

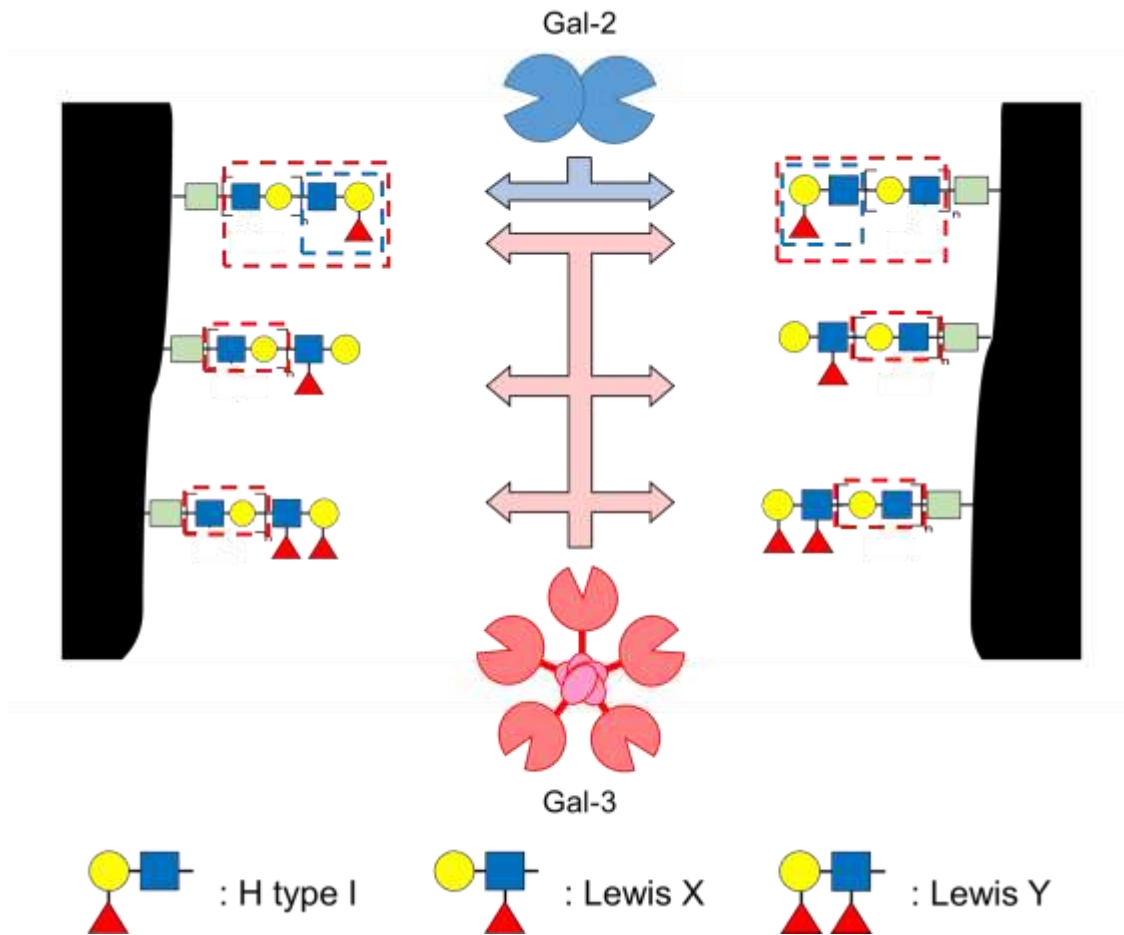


3と比較してGal-2は外的要因に対してより感受性が高いため、弱酸性条件における構造の安定性に差が出たと考えられる。胃粘液において、管腔側に近づくほどpHは低下することから[56,57]、Gal-3とGal-2はそれぞれ胃の管腔側と胃粘膜細胞付近といった異なる場所でピロリ菌を殺菌している可能性がある。

hGal-3が結合するピロリ菌のLPSを調べた結果、H type IとLewis Xを含むLPSに結合した(Figure 17)。蛍光標識糖鎖単体を用いた研究で、Gal-3はH type Iユニットを含む糖鎖には親和性を示すが、Lewis Xユニットには親和性を示さないことが報告されている[64]。また、ガレクチンが二糖の $\beta$ -ガラクトシド構造を認識する際には非還元末端側の糖の4位及び6位水酸基と還元末端側の糖の3位水酸基が必須であることも知られている[61]。これらのことから、hGal-3はhGal-2と同様にH type Iを含むLPSのみと結合すると予測していたが、これを覆す結果となった。この原因として、Gal-3の糖鎖への結合の仕方がGal-2とは異なることが考えられる。グリカンマイクロアレイを用いた研究では、Gal-2は糖鎖末端の $\beta$ -ガラクトシド構造に結合するのに対して、Gal-3は糖鎖の末端のみならず糖鎖内部にも結合できることが報告されている[67]。すなわち、ピロリ菌(ATCC43504)のO抗原はいくつかのラクトサミン構造の繰り返しとLewis抗原から成るため、hGal-3はO抗原内部のラクトサミン構造に結合したと考えられる(Figure 16)。また、Gal-3のH type Iとの結合力は1回のラク

トサミンの繰り返し構造との結合力とおおよそ同等であり、ラクトサミン構造が繰り返されることにより、結合力は増大する [64]。したがって、hGal-3 はピロリ菌 O 抗原の末端より内部のラクトサミン構造を優先的に認識しているのかもしれない。

ピロリ菌の増殖抑制実験の結果、hGal-2 よりも hGal-3 の方が高い抑制作用を示した。これは、hGal-2 と hGal-3 が認識するピロリ菌糖鎖の違いや糖鎖への結合力の差によるものと考えられる。同一の糖鎖単体に対する結合力はガレクチンサブタイプ毎に異なり、H type I に対する結合力は Gal-2 よりも Gal-3 の方が強い [64]。また、Gal-3 は Gal-2 より広い O 抗原の範囲に結合すると予測されるため [64, 67, 68]、Gal-3 はピロリ菌を強力に凝集させると共に増殖抑制作用を示したと考えられる。



**Figure 18** Schematic model of binding of Gal-2 and Gal-3 to LPS expressing on *H. pylori*

The sites of recognized by Gal-2 and Gal-3 in carbohydrate chains of LPS expressing on *H. pylori* were surrounded with blue or red dotted lines, respectively.

#### 第 IV 節 小括

本章ではピロリ菌へ与える hGal-2 及び hGal-3 の作用の比較を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. hGal-3 は pH5.0 以上の弱酸性条件まで構造が維持される。
2. hGal-3 はピロリ菌の H type I 及び Lewis X を含む LPS に結合する。
3. hGal-3 のピロリ菌増殖抑制作用は hGal-2 より強い。

以上の結果から、Gal-3 は胃粘液の管腔側でピロリ菌の感染を防ぎ、Gal-2 は胃粘膜細胞直上付近でピロリ菌の感染を防ぎ、両者は共同して生体防御機能を維持している可能性がある。

## 総括

ガレクチンは $\beta$ -ガラクトシド構造に結合することで細胞接着やアポトーシス、免疫応答の調節などの様々な生命現象に関与する。現在、15種類のガレクチンが発見されており、消化管にはガレクチン-2, 3, 4/6, 7, 9の発現が確認されている。また、このうちの数種類は病原体の感染に対する生体防御に関わる。Gal-1やGal-3、Gal-8においては病原体の認識や殺菌に関する研究が広くなされている一方、Gal-2についてはほとんど行われていない。外界の病原体と多く接触する消化管に発現するGal-2には、その生理機能の一つに胃からの病原菌の感染に対する生体防御機構への関与が考えられる。そこで、本研究では胃の上皮細胞に多く存在するGal-2がピロリ菌感染に与える影響を検討した。

第I章ではGal-2がピロリ菌にどのような影響を与えるのかを検討した。まず、rGal-2溶液とピロリ菌懸濁液を混合し、その様子を観察した。経時的なピロリ菌の観察の結果、rGal-2とhGal-2はピロリ菌に対して凝集作用を示すことが明らかとなった。続いて、凝集作用が濃度及び $\beta$ -ガラクトシド構造依存的に起こるのかを検討した。ピロリ菌と混合するrGal-2やhGal-2の濃度が上昇するほど凝集作用は強くなり、 $\beta$ -ガラクトシド構造を持つラクトースが共存する条件ではrGal-2とhGal-2のピロリ菌凝集作用が阻害された。また、GFP標識したrGal-2を用いてピロリ菌凝集実験を行ったところ、生じたピロリ菌の凝集体

の表面からは蛍光が検出された。これらの結果から、Gal-2 はピロリ菌表面に存在する $\beta$ -ガラクトシド構造に結合して凝集を引き起こすことが明らかとなった。続いて、Gal-2 の凝集作用がピロリ菌の生理機能にどのような影響を与えるのかを調べたところ、rGal-2 と hGal-2 は濃度依存的にピロリ菌の増殖を抑制することや凝集させたピロリ菌を殺菌することが明らかとなった。更に、生体内において Gal-2 は胃粘液中でピロリ菌と相互作用すると考えられるため、CB57/6J マウス胃粘液中の Gal-2 の存在を検討し、胃粘液と胃粘膜細胞の PAS 染色及び免疫組織染色の結果から、Gal-2 は胃粘液中に存在することが明らかとなった。以上より、第 I 章では Gal-2 は胃粘液中でピロリ菌表面の $\beta$ -ガラクトシド構造に結合して殺菌作用を示し、ピロリ菌感染に対する生体防御に関わる可能性が示唆された。

第 II 章では弱酸性条件における Gal-2 とピロリ菌の相互作用や Gal-2 が結合するピロリ菌リガンドの検討を行った。胃粘液は弱酸性であるため、Gal-2 とピロリ菌が相互作用する環境を再現して凝集実験を行った。rGal-2 は pH6.0 以上の弱酸性条件までピロリ菌凝集作用を示すと共に、pH が 6.0 より低くなると $\beta$ -シート構造が変化することで凝集作用が低下することが明らかとなった。hGal-2 のピロリ菌リガンドの探索を行った結果、hGal-2 はピロリ菌 LPS 中に発現する Lewis 抗原の一種である H type I に結合した。第 I 章と第 II 章の結果から、

Gal-2 は胃粘液中の胃粘膜上皮細胞直上及び細胞付近でピロリ菌の H type I に結合することで殺菌作用を示して生体防御に関わる可能性を示した。

第 III 章ではピロリ菌に対する Gal-2 及び Gal-3 の作用の比較を行った。hGal-3 の弱酸性条件における構造変化を CD スペクトル測定したところ、pH5.0 以上の弱酸性条件までは $\beta$ -シート構造が維持されたため、hGal-3 は pH5.0 以上の弱酸性条件までピロリ菌凝集作用や殺菌作用を示すことが出来ると考えられた。また、hGal-3 の構造変化は rGal-2 より低い pH で生じた。hGal-3 のピロリ菌リガンドの探索を行った結果、hGal-3 はピロリ菌の H type I 及び Lewis X を発現する LPS に結合することが明らかとなり、hGal-2 より多い種類の LPS と結合した。hGal-3 のピロリ菌増殖抑制作用を調べた結果、hGal-2 と同濃度でより強い増殖抑制作用が確認された。以上の結果より、Gal-3 は胃粘液に侵入した初期段階のピロリ菌と接触して殺菌作用を示すのに対して、Gal-2 は胃粘液深くまで侵入したピロリ菌を殺菌し、それぞれ協働して感染防御作用を示す可能性が考えられる。

胃酸の分泌や抗菌ペプチドの分泌以外に、胃に存在するサーファクタントプロテイン D や $\alpha$ 1, 4 結合した N-アセチルグルコサミン、Gal-3 がピロリ菌感染に対する生体防御機構に関与することが報告されている。本研究により、Gal-2 がピロリ菌感染に対する生体防御への関与が示唆されたことから、胃における

生体防御機構に新たな知見を広げることが出来た。

以上、本研究では Gal-2 がピロリ菌に与える影響、生体内におけるピロリ菌感染防御への関与、他のガレクチンサブタイプとの比較について検討した結果、Gal-2 は胃粘膜細胞直上もしくは胃粘膜細胞付近でピロリ菌表面の H type I に結合して凝集・殺菌作用を示し、生体防御機構への関与を示唆できた。また、Gal-2 の結合するピロリ菌リガンドは Gal-3 とは異なることを示した。ピロリ菌の LPS に結合することで Gal-2 が殺菌作用を示すことは、将来的に病原体の糖鎖をターゲットとした新たな抗菌薬開発に繋がることが期待される。



## 実験操作

### 第 I 章 Gal-2 がピロリ菌に与える影響

#### 1. 使用菌株及び培養条件

ピロリ菌 (ATCC43504) は American Type Culture Collection (ATCC, USA) より購入し、グリセロールストックとして  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。溶解させたグリセロールストックを適宜希釈してヘリコバクター寒天培地 (Nissui Pharmaceutical, Japan) に播種した後、角型ジャー (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo) を用いてアネロパック微好気 (Mitsubishi Gas Chemical) と湿らせたプロワイプ (Elleair, Japan) と共に微好気性条件にて  $37^{\circ}\text{C}$  で 4 日間培養した。培養により生じたコロニーは以下の実験及び継代培養に用いた。

#### 2. ピロリ菌懸濁液の調製

ピロリ菌のコロニーを Hank's balanced salt solution (HBSS, Invitrogen, USA) に回収し懸濁液とした。懸濁しなかったピロリ菌は卓上小型遠心機を用いた 15 秒の遠心により除去した。ピロリ菌懸濁液は 600 nm における光学密度 ( $\text{OD}_{600}$ ) を 1.0 に調整した後実験に用いた。なお、 $\text{OD}_{600}=0.5$  のとき、ピロリ菌  $10^8$  colony-forming unit (CFU) /mL に対応した。

### 3. リコンビナントガレクチンの発現と精製

先行研究に従い、リコンビナントガレクチン rGal-2, hGal-2, 及び rGal-2-GFP の発現と精製は pET21a システム (Novagen, Germany) により行った [69, 70]。 *Escherichia coli* (*E. coli*) を培養、IPTG (Wako, Japan) によりガレクチンを発現させた。*E. coli* を回収、超音波破碎後、遠心分離により細胞片を除いた。上清はアシアロフェツイン固定化カラムによりガレクチンを精製した。*E. coli* 由来の LPS を除くために、Detoxi-Gel (Thermo Fisher Scientific, USA) を精製ガレクチン溶液に加え、4°Cにて 30 分転倒混和した。Detoxi-Gel を遠心分離により除いた後、上清をポアサイズ 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターにより滅菌した。

なお、本研究は城西大学組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て実施した。

#### 4. 凝集実験

凝集実験は先行研究の実験操作に改変を加えて行った [71]。ピロリ菌懸濁液 100  $\mu\text{L}$  を等量の Gal-2 溶液を加えて混合した後、37°Cにて1時間インキュベートした。インキュベート後、2,500 rpm で25秒ボルテックスすることで沈殿したピロリ菌を再懸濁させ、混合液の一部 (2  $\mu\text{L}$ ) をスライドガラスに滴下、カバーガラス (1.8 mm x 1.8 mm) を被せた。デジタルカメラ (DP-26, Olympus, Japan) を搭載した顕微鏡 (BX-51, Olympus, 40x/numerical aperture; 0.95) で混合液を観察すると共にランダムに5か所を撮影した。非凝集菌体数は以下の計算式により算出した。

1  $\mu\text{L}$  あたりの非凝集菌体数

$$= \text{一定面積 (0.2 mm x 0.2 mm) あたりの非凝集菌体数} \times 40.5$$

なお、非凝集菌は先行研究に従い判定した [72]。すなわち、単独で存在する菌及び直線上に2つの菌が並んでいる場合は非凝集とした。Gal-2によるピロリ菌凝集作用は0.1 M ラクトース及びスクロース存在条件下でも行った。

## 5. Gal-2 によるピロリ菌増殖抑制作用

96-well plate に 0.1% glucose, 10% fetal bovine serum (GE Healthcare, USA) を含む BHI (Becton Dickinson, USA) 100  $\mu$ L と種々の濃度の Gal-2 溶液 50  $\mu$ L を加えた。更に、OD<sub>600</sub>=0.1 に調整したピロリ菌懸濁液 50  $\mu$ L を加え、微好気性条件にて 37°C で約 60 時間インキュベートした。インキュベート後、1,000 rpm にて 10 分ボルテックスしてピロリ菌を再懸濁後、OD<sub>600</sub> 測定した。ピロリ菌の増殖比は培養前後の OD<sub>600</sub> から算出した。

## 6. Gal-2 のピロリ菌殺菌作用

ピロリ菌懸濁液 100  $\mu$ L と等量の Gal-2 溶液を混合し、37°C にて 1 時間インキュベートした。インキュベート後、Carboxyfluorescein diacetate (CFDA, Dojindo, Japan) 及び Propidium Iodide (PI, Dojindo) をそれぞれ 0.15 mg/mL、1  $\mu$ g/mL となるように加えて 10 分インキュベートした。混合液から一部を取り、CCD カメラ (Hamamatsu, Japan) を搭載した顕微鏡 (BX-51, Olympus, Filter; NIBA and WIG) で観察した。

## 7. マウス胃組織切片の作製

C57BL/6J 雄マウスをクレアジャパン (Japan) より購入した。また、本研究における動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認を得て実施した。

マウスの頸椎を脱臼し、腹部を切開して胃を摘出した。切開した前胃部から胃内の残留物を押し出して除去し、粘液側に触れないように注意して大弯側から切り開いた。先行研究に従い、4°Cのカルノア液 (エタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1) に2時間浸漬し、胃粘膜と胃粘液を同時固定した [73]。10、15 および 20%のスクロース溶液にそれぞれ2時間浸漬した。クリオモルドにトリミングした組織と O.C.T.コンパウンド (Sakura Fine Technical, Japan) を載せ、ドライアイスとアセトンにて凍結組織ブロックを作製した。-80°Cで一晩保存後、クリオスタット (CM3050S, Leica, Germany) を用いて、厚さ 10  $\mu\text{m}$  の連続組織切片を作製し、MAS コートスライドガラス (Matsunami Glass, Japan) に接着させた。

## 8. PAS 染色

組織切片はカルノア液で再固定してから染色した。なお、以下の染色操作は PAS 染色キット (Mutoh Chemistry, Japan) を用いて行った。組織切片に 1% 過ヨウ素を滴下して 10 分間静置後、精製水に 10 分間浸漬した。シッフ試薬を滴下して 37°C で 5 分間静置した。亜硫酸水を滴下して 5 分間 3 回静置し、精製水に 10 分間浸漬した。20 倍希釈したヘマトキシリン液を滴下して 5 分間静置し、10 分間流水洗浄後、60°C の精製水に 5 分間浸漬した。マウントクイックアクエオス (Daido Industry, Japan) で封入し、光学顕微鏡 (BZ-X800, Keyence, Japan, 40x/numerical aperture; 0.95) で観察した。

## 9. 免疫組織染色

再固定した組織切片に、PBS で 5 分間 2 回浸漬洗浄し、0.3%過酸化水素/メタノールに 30 分間浸漬後、リキッドブロッカー (Daido Industry) で組織切片を囲んだ。PBS で滴下洗浄し、ヤギ正常血清 (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, CA) を滴下して 20 分間静置した。1 次抗体として抗マウス Gal-2 抗体 (Cloud-Clone Corp. USA) を希釈液 (0.1% BSA in PBS) で 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製した溶液を滴下し、4°Cで一晩静置した。なお、negative control には Isotype Control (Clone; EPR25A, Abcam, USA) を用いた。PBS で滴下洗浄し、5 分間 3 回浸漬洗浄した。2 次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) を滴下して 1 時間静置した。PBS で 5 分間 3 回浸漬洗浄し、ABC 試薬 (Vector Laboratories) を滴下して 30 分間静置した。PBS で 5 分間 3 回浸漬洗浄し、発色液 (0.02% 3, 3' diaminobenzidine, 0.005%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0.05 M Tris, pH7.4) を滴下した。滴下直後から光学顕微鏡下で観察を行い、組織の発色が十分となり、かつバックグラウンドが着色しないところで、PBS で滴下洗浄して反応を停止させた。20 倍希釈したヘマトキシリン液を滴下して 5 分間静置し、10 分間流水洗浄後、60°Cの精製水に 5 分間浸漬した。マウントクイックアクエオス (Daido Industry) で封入を行い、光学顕微鏡下で観察した。

## 10. データの統計処理

データは mean±S.D. で示した。また、有意差検定は一元配置分散分析後、Dunnett の多重比較検定により各群を比較した。なお、危険率 0.05 未満 ( $P<0.05$ ) 及び 0.01 未満 ( $P<0.01$ ) を統計学的に有意差ありとみなした。

## 第 II 章 弱酸性条件における Gal-2 とピロリ菌の相互作用

### 1. 弱酸性条件における Gal-2 のピロリ菌凝集作用

Amicon Ultra 0.5 (Millipore, USA) を用い、rGal-2 溶液 [in E-PBS (PBS containing 1 mM EDTA)] の溶媒を HCl で pH6.0 と 5.0 に調整した E-PBS にそれぞれ交換した。また、同様に HCl で pH6.0 と 5.0 に調整した HBSS を調製した。これらを用いて第 I 章 Gal-2 のピロリ菌凝集作用と同様の操作で凝集実験を行った。



## 2. 弱酸性条件における Gal-2 の構造変化

rGal-2 溶液を透析 (GE health care, USA) により、それぞれ pH6.0 (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl) 及び pH5.0 (0.1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 150 mM NaCl) の弱酸性緩衝液に置換した。円二色分散計 (J-720WI, JASCO, Japan) を用いて、弱酸性緩衝液に置換した rGal-2 溶液を CD スペクトル測定した。なお、rGal-2 は 0.5 mg/mL に調製してから CD スペクトル測定した。測定条件は、感度; standard、開始波長; 280 nm、終了波長; 195 nm、データ取込間隔; 1 nm、走査モード; continuous、走査速度; 100 nm/min、レスポンス; 2 sec、バンド幅; 1nm、積算; 5、温度制御装置; Jasco ペルチェ式、測定温度; 25 °C、セル長; 0.2cm とした。

### 3. ピロリ菌 LPS の抽出

ヘリコバクター寒天培地で培養したピロリ菌を生理食塩水に回収して懸濁液とした後、先行研究の方法に従い調製した液体培地 (Brain Heart Infusion containing 0.1%Glucose, 10%Fetal Bovine Serum, pH6.0) に播種し [74]、微好気性条件、37°C, 150 rpm で3日間培養した。先行研究を改変して、以下のようにピロリ菌から LPS を抽出した [75, 76]。培養したピロリ菌を遠心分離 (5,000 g, 25°C, 5 min) にて回収した後、菌洗浄液 (PBS containing 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) で2回洗浄した。洗浄後、ピロリ菌の沈殿を 10 mL の PBS に懸濁させ、超音波破碎した。菌破碎液に Proteinase K (QIAGEN, Germany) を終濃度 20 µg/mL になるように加え、65°C にて1時間インキュベートした。その後、DNase I (Nippon gene, Japan) と RNase A (Nippon gene) をそれぞれ 40 unit/mL, 10 µg/mL 加え、37°C, 150 rpm で一晩インキュベートした。インキュベート後、Hot phenol 法にて LPS を抽出した [77]。すなわち、ピロリ菌液と等量の 90% (v/v) phenol を混合し、70°C にて時々激しく降り混ぜながら 15 min インキュベートした。インキュベート後、水層は回収し、phenol 層には等量の H<sub>2</sub>O を加えて再抽出を行った。Hot phenol 法により回収した水層に終濃度 0.5 M となるように酢酸ナトリウムを加えて溶解させた後、水層の 10 倍量の 95% エタノールを加え、-20°C にて一晩静置した。遠心分離 (8,500 g, 4°C, 30 min) に

より回収した LPS 沈殿を H<sub>2</sub>O に懸濁させた後、透析 (GE health care, USA) により残渣 phenol を除いた。LPS 溶液は凍結乾燥により粉末サンプルとした。

#### 4. Gal-2 のピロリ菌 LPS リガンドのアフィニティークロマトグラフィー

凍結乾燥させたピロリ菌 LPS 粉末を E-PBS に約 5 mg/mL となるように溶解させた。hGal-2 固定化カラム (固定化量: 12.3 mg/mL) に LPS 溶液を 1 mL 添加した。その後、E-PBS を 5 mL 添加してカラムを洗浄した。更に、0.1 M ラクトースを含む E-PBS を 2 mL カラムに添加して hGal-2 が認識するピロリ菌 LPS リガンドを溶出させた。なお、カラムからの洗浄液及び溶出液は 1 mL ずつ回収した。

## 5. Western blotting による Gal-2 のピロリ菌リガンドの検出

アフィニティー精製によって得られたサンプルと 5 x SDS-PAGE サンプルバッファー (few amount of Bromo phenol blue, 50% Glycerol, 10% SDS, 250 mM Tris-HCl pH6.8) を混合し、10 min 煮沸した。SDS-PAGE, PVDF 膜 (0.2  $\mu$ m, BIO-RAD, USA) への転写後、iBind システム (invitrogen) により検出を行った。なお、H type I の検出には anti-Lacto N fucopentaose I antibody (1:2,000, Clone; R-17F, Funakoshi, Japan) 及び anti-mouse IgG antibody HRP conjugated (1:1,000, Merck, Germany), Lewis X の検出には anti-SSEA 1 antibody (1:250, clone; MC-480, Novus biologicals, USA) 及び anti-mouse IgM antibody HRP conjugated (1:5,000, Jackson Immuno Research, USA), Lewis Y の検出には anti-Lewis Y antibody (1:250, Clone; F3, abcam, UK) 及び anti-mouse IgM antibody HRP conjugated (1:5,000, Jackson Immuno Research) をそれぞれ 1 次、2 次抗体として使用した。バンドの検出には Immobilon<sup>®</sup> Crescendo Western HRP substrate (Millipore) 及び ChemiDoc<sup>™</sup> XRS Plus (BIO-RAD) (software; Image Lab 3.0.1 Beta2) を用いた。

## 6. データの統計処理

データは mean±S.D. で示した。また、有意差検定は Student の t 検定により 2 群を比較した。なお、危険率 0.01 未満 ( $P<0.01$ ) 及び 0.001 未満 ( $P<0.001$ ) を統計学的に有意差ありとみなした。

## 第 III 章 ピロリ菌に与える Gal-2 と Gal-3 の作用の比較

### 1. 弱酸性条件における Gal-3 の構造変化

hGal-3 溶液を透析 (GE health care) により、それぞれ pH6.0 (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl)、pH5.0 (0.1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 150 mM NaCl) 及び pH4.3 (0.1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 150 mM NaCl) の弱酸性緩衝液に置換した。円二色分散計 (J-720WI, JASCO) を用いて、弱酸性緩衝液に置換した hGal-3 溶液を CD スペクトル測定した。なお、hGal-3 は 0.2 mg/mL に調製してから CD スペクトル測定した。測定条件は第 II 章 弱酸性条件における Gal-2 の構造変化と同様である。

## 2. Gal-3 のピロリ菌 LPS リガンドのアフィニティークロマトグラフィー

hGal-3 固定化カラム (固定化量: 4.37 mg/mL) を用いてピロリ菌 LPS リガンドのアフィニティークロマトグラフィーを行った。なお、実験操作は第 II 章 Gal-2 のピロリ菌 LPS リガンドのアフィニティークロマトグラフィーと同様である。

## 3. Western blotting による Gal-3 のピロリ菌リガンドの検出

Gal-3 のピロリ菌 LPS リガンドのアフィニティークロマトグラフィーで得られたサンプルを用いた。なお、実験操作は第 II 章 Gal-2 のピロリ菌 LPS リガンドのアフィニティークロマトグラフィーと同様である。

## 4. Gal-3 のピロリ菌増殖抑制作用

120  $\mu$ g/mL の hGal-2 及び hGal-3、pH7.0 条件で実験を行った。なお、実験操作は第 I 章 Gal-2 によるピロリ菌増殖抑制作用と同様である。

## 5. データの統計処理

データは mean  $\pm$  S.D. で示した。また、有意差検定は一元配置分散分析後、Turkey 検定により各群を比較した。なお、危険率 0.01 未満 ( $p < 0.01$ ) 及び 0.001 未満 ( $P < 0.001$ ) を統計学的に有意差ありとみなした。

## 謝辞

本研究に際して、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科生化学講座教授 畑中 朋美 先生に深く感謝の意を表します。

本研究に際して、終始御指導ならびに多大なる御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬剤作用解析学講座教授 小林 大介 先生、城西大学大学院薬学研究科有機薬科学講座教授 山ノ井 孝 先生、城西大学大学院薬学研究科臨床栄養学講座教授 小林 順 先生に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御見守りいただき、御指導ならびに有益な御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科生物薬品科学講座教授 田中 享 先生、城西大学大学院薬学研究科生化学講座准教授 武内 智春 先生、城西大学大学院薬学研究科生化学講座助教 大山 翠 先生、城西大学大学院薬学研究科病原微生物学講座教授 一色 恭徳 先生、帝京大学薬学部薬学科衛生化学研究室教授 荒田 洋一郎 先生、帝京大学薬学部薬学科衛生化学研究室助教 田村 真由美 先生に深く感謝の意を表します。

本論文の作成、学位論文審査にあたり、御教示と御校閲をいただきました城西大学大学院薬学研究科薬品作用学講座教授 岡崎 真理 先生、城西大学大学院薬学研究科生体分析化学講座教授 古地 壯光 先生、城西大学大学院薬学研究科臨床病理学講座准教授 渡辺 知恵 先生に心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、御支援、御協力を頂きました城西大学薬学部生化学研究室諸氏ならびに城西大学薬学部生物薬品科学研究室諸氏に心より感謝いたします。

最後に、本研究のために尊い命をいただきました動物たちに深く感謝し、追悼の意を表します。



## 参考文献

1. Robin Warren, J.; Marshall, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1983**, *321* (8336), 1273–1275. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)92719-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92719-8).
2. Zamani, M.; Ebrahimitabar, F.; Zamani, V.; Miller, W. H.; Alizadeh-Navaei, R.; Shokri-Shirvani, J.; Derakhshan, M. H. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2018**, *47* (7), 868–876. <https://doi.org/10.1111/apt.14561>.
3. Inoue, M. Changing epidemiology of helicobacter pylori in japan. *Gastric Cancer* **2017**, *20* (1), 3–7. <https://doi.org/10.1007/s10120-016-0658-5>.
4. Price, A. B.; Levi, J.; Dolby, J. M.; Dunscombe, P. L.; Smith, A.; Clark, J.; Stephenson, M. L. Campylobacterpyloridis in peptic ulcer disease: microbiology, pathology, and scanning electron microscopy. *Gut* **1985**, *26* (11), 1183–1188. <https://doi.org/10.1136/gut.26.11.1183>.
5. Pereira, M. I.; Medeiros, J. A. Role of *helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (3), 684–698. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i3.684>.
6. Gasbarrini, A.; Franceschi, F.; Tartaglione, R.; Landolfi, R.; Pola, P.; Gasbarrini, G. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of helicobacter pylori. *Lancet* **1998**, *352* (9131), 878. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)60004-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)60004-9).
7. Mendall, M. A.; Goggin, P. M.; Molineaux, N.; Levy, J.; Toosy, T.; Strachan, D.; Camm, A. J.; Northfield, T. C. Relation of helicobacter pylori infection and coronary heart disease. *BR.HEART J.* **1994**, *71* (5), 437–439. <https://doi.org/10.1136/hrt.71.5.437>.
8. Husson, M. O.; Legrand, D.; Spik, G.; Leclerc, H. Iron acquisition by helicobacter pylori: importance of human lactoferrin. *Infect. Immun.* **1993**, *61* (6).
9. Shiotani, A.; Okada, K.; Yanaoka, K.; Itoh, H.; Nishioka, S.; Sakurane, M.; Matsunaka, M. Beneficial effect of helicobacter pylori eradication in dermatologic diseases. *Helicobacter* **2001**, *6* (1), 60–65. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5378.2001.00009.x>.
10. Cancer, I. A. for R. on. Infection with *helicobacter pylori*. in : iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Schisto-somiasis, Liver Flukes and Helicobacter pylori* **1994**, *61*, 177–241.
11. Asaka, M. A new approach for elimination of gastric cancer deaths in japan. *Int. J. Cancer* **2013**, *132* (6), 1272–1276. <https://doi.org/10.1002/ijc.27965>.

12. Asaka, M.; Kato, M.; Sakamoto, N. Roadmap to eliminate gastric cancer with helicobacter pylori eradication and consecutive surveillance in japan. *J. Gastroenterol.* **2014**, *49* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0897-8>.
13. Nishida, T.; Tsujii, M.; Tanimura, H.; Tsutsui, S.; Tsuji, S.; Takeda, A.; Inoue, A.; Fukui, H.; Yoshio, T.; Kishida, O.; et al. Comparative study of esomeprazole and lansoprazole in triple therapy for eradication of *helicobacter pylori* in japan. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (15), 4362–4369. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4362>.
14. Ohtaka, M.; Miura, M.; Hanawa, M.; Hirose, Y.; Kitahashi, A.; Imamura, N.; Watanabe, I.; Takaso, K.; Shimura, N.; Yoda, Y.; et al. Efficacy and tolerability of second-line metronidazole triple therapy using vonoprazan for *helicobacter pylori* eradication in japan—comparative study: vonoprazan vs. proton pump inhibitors. *Open J. Gastroenterol.* **2018**, *08* (01), 27–38. <https://doi.org/10.4236/ojgas.2018.81003>.
15. Thung, I.; Aramin, H.; Vavinskaya, V.; Gupta, S.; Park, J. Y.; Crowe, S. E.; Valasek, M. A. Review article: the global emergence of helicobacter pylori antibiotic resistance. **2016**, *43* (4), 514–533. <https://doi.org/10.1111/apt.13497>.
16. Bauerfeind, P.; Garner, R.; Dunn, B. E.; Mobley, H. L. T. Synthesis and activity of helicobacter pylori urease and catalase at low ph. *Gut* **1997**, *40* (1), 25–30. <https://doi.org/10.1136/gut.40.1.25>.
17. Ottemann, K. M.; Lowenthal, A. C. Helicobacter pylori uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect. Immun.* **2002**, *70* (4), 1984–1990. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1984-1990.2002>.
18. Appelmek, B. J.; Monteiro, M. A.; Martin, S. L.; Moran, A. P.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. Why helicobacter pylori has lewis antigens. *Trends Microbiol.* **2000**, *8* (12), 565–570. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01875-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01875-8).
19. Jin, C.; Kenny, D. T.; Skoog, E. C.; Padra, M.; Adamczyk, B.; Vitzeva, V.; Thorell, A.; Venkatakrisnan, V.; Lindén, S. K.; Karlsson, N. G. Structural diversity of human gastric mucin glycans. *Mol. Cell. Proteomics* **2017**, *16* (5), 743–758. <https://doi.org/10.1074/mcp.M117.067983>.
20. Talebi, A.; Abadi, B. Strategies used by helicobacter pylori to establish persistent infection. *World J Gastroenterol* **2017**, *23* (16), 2870–2882. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i16.2870>.
21. Ashida, H. Interaction between gut microbes and host through intestinal mucin. *Kagaku To Seibutsu* **2016**, *54* (12), 901–908. <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.54.901>.
22. Reis, C. A.; David, L.; Correa, P.; Carneiro, F.; Bolós, C. de; Garcia, E.; Mandel, U.; Clausen, H.; Sobrinho-Simões, M. Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (muc1, muc2, muc5ac, and muc6) expression. *Cancer Res.*

- 1999, 59(5).
23. Kawakubo, M.; Ito, Y.; Okimura, Y.; Kobayashi, M.; Sakura, K.; Kasama, S.; Fukuda, M. N.; Fukuda, M.; Katsuyama, T.; Nakayama, J. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against helicobacter pylori infection. *Science (80-. )*. **2004**, 305(5686), 1003–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1099250>.
  24. Khamri, W.; Moran, A. P.; Worku, M. L.; Karim, Q. N.; Walker, M. M.; Annuk, H.; Ferris, J. A.; Appelmelk, B. J.; Eggleton, P.; Reid, K. B. M.; et al. Variations in helicobacter pylori lipopolysaccharide to evade the innate immune component surfactant protein d. *Infect. Immun.* **2005**, 73(11), 7677–7686. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7677-7686.2005>.
  25. Murray, E.; Khamri, W.; Walker, M. M.; Eggleton, P.; Moran, A. P.; Ferris, J. A.; Knapp, S.; Karim, Q. N.; Worku, M.; Strong, P.; et al. Expression of surfactant protein d in the human gastric mucosa and during helicobacter pylori infection. *Infect. Immun.* **2002**, 70(3), 1481–1487. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1481-1487.2002>.
  26. Cummings, R. D.; Liu, F. Chapter 33 galectins. *Essentials Glycobiol. 2nd Ed.* **2009**, 1–12.
  27. Leffler, H. Introduction to galectins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1997**, 9(45), 9–19. <https://doi.org/10.4052/tigg.9.9>.
  28. Nio-Kobayashi, J. Histological mapping and subtype-specific functions of galectins in health and disease. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2018**, 30(172), SE89–SE96. <https://doi.org/10.4052/tigg.1737.1SE>.
  29. Kasai, K. I.; Hirabayashi, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycodes. *J. Biochem.* **1996**, 119(1), 1–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021192>.
  30. Wang, G.; Ge, Z.; Rasko, D. A.; Taylor, D. E. Lewis antigens in helicobacter pylori: biosynthesis and phase variation. *Mol. Microbiol.* **2000**, 36(6), 1187–1196. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01934.x>.
  31. Robinson, B. S.; Arthur, C. M.; Kamili, N. A.; Stowell, S. R. Galectin regulation of host microbial interactions. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2018**, 30(172), SE185–SE198. <https://doi.org/10.4052/tigg.1738.1se>.
  32. Fowler, M.; Thomas, R. J.; Atherton, J.; Roberts, I. S.; High, N. J. Galectin-3 binds to helicobacter pylori o-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to h. pylori adhesion. *Cell. Microbiol.* **2006**, 8(1), 44–54. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00599.x>.
  33. Park, A. M.; Hagiwara, S.; Hsu, D. K.; Liu, F. T.; Yoshie, O. Galectin-3 plays an important role in innate immunity to gastric infection by helicobacter pylori. *Infect. Immun.* **2016**, 84(4), 1184–1193. <https://doi.org/10.1128/IAI.01299-15>.
  34. Nio-Kobayashi, J.; Takahashi-Iwanaga, H.; Iwanaga, T. Immunohistochemical

- localization of six galectin subtypes in the mouse digestive tract. *J. Histochem. Cytochem.* **2009**, *57*(1), 41–50. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952317>.
35. Paclik, D.; Berndt, U.; Guzy, C.; Dankof, A.; Danese, S.; Holzloehner, P.; Rosewicz, S.; Wiedenmann, B.; Wittig, B. M.; Dignass, A. U.; et al. Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria t lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice. *J. Mol. Med.* **2008**, *86*(12), 1395–1406. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0290-2>.
36. Takaishi, S.; Wang, T. C. Gene expression profiling in a mouse model of helicobacter-induced gastric cancer. *Cancer Sci.* **2007**, *98*(3), 284–293. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00392.x>.
37. Tamura, M.; Sato, D.; Nakajima, M.; Saito, M.; Sasaki, T.; Tanaka, T.; Hatanaka, T.; Takeuchi, T.; Arata, Y. Identification of galectin-2–mucin interaction and possible formation of a high molecular weight lattice. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, *40*(10), 1789–1795. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00221>.
38. Jung, J. H.; Kim, H. J.; Yeom, J.; Yoo, C.; Shin, J.; Yoo, J.; Kang, C. S.; Lee, C. Lowered expression of galectin-2 is associated with lymph node metastasis in gastric cancer. *J. Gastroenterol.* **2012**, *47*(1), 37–48. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0463-1>.
39. Oka, T.; Murakami, S.; Arata, Y.; Hirabayashi, J.; Kasai, K. I.; Wada, Y.; Futai, M. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *361*(2), 195–201. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0968>.
40. Saal, I.; Lensch, M.; Lohr, M.; Manning, J. C.; Decaestecker, C.; André, S.; Kiss, R.; Salmon, I.; Gabius, H. J. Human galectin-2: expression profiling by rt-pcr/immunohistochemistry and its introduction as a histochemical tool for ligand localization. *Histol. Histopathol.* **2005**, *20*(4), 1191–1208.
41. Stowell, S. R.; Arthur, C. M.; Dias-Baruffi, M.; Rodrigues, L. C.; Gourdine, J. P.; Heimbürg-Molinari, J.; Ju, T.; Molinari, R. J.; Rivera-Marrero, C.; Xia, B.; et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nat. Med.* **2010**, *16*(3), 295–301. <https://doi.org/10.1038/nm.2103>.
42. Tandon, R.; Chew, G. M.; Byron, M. M.; Borrow, P.; Niki, T.; Hirashima, M.; Barbour, J. D.; Norris, P. J.; Lanteri, M. C.; Martin, J. N.; et al. Galectin-9 is rapidly released during acute hiv-1 infection and remains sustained at high levels despite viral suppression even in elite controllers. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2014**, *30*(7), 654–664. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0004>.
43. Estevam, R. B.; Wood da Silva, N. M. J.; Wood da Silva; Fonseca, F. M.; Oliveira, A. G. de; Nogueira; Pereira, S. A. de L.; Pereira, T. L.; Adad, S. J.; Rodrigues, V. J.; et al.

- Modulation of galectin-3 and galectin 9 in gastric mucosa of patients with chronic gastritis and positive helicobacter pylori infection. *Pathol. Res. Pract.* **2017**, *213* (10), 1276–1281. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.08.005>.
44. Gitt, M. A.; Massa, S. M.; Leffler, H.; Barondes, S. H. Isolation and expression of a gene encoding l-14-ii, a new human soluble lactose-binding lectin. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (15), 10601–10606. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50059-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50059-X).
  45. Moran, A. P.; Knirel, Y. A.; Senchenkova, S. F. Y. N.; Widmalm, G.; Hynes, S. O.; Jansson, P. E. Phenotypic variation in molecular mimicry between helicobacter pylori lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. acid-induced phase variation in lewisx and lewisy expression by h. pylori lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (8), 5785–5795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108574200>.
  46. Salaün, L.; Ayraud, S.; Saunders, N. J. Phase variation mediated niche adaptation during prolonged experimental murine infection with helicobacter pylori. *Microbiology* **2005**, *151* (3), 917–923. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27379-0>.
  47. Sakakura, M.; Tamura, M.; Fujii, N.; Takeuchi, T.; Hatanaka, T.; Kishimoto, S.; Arata, Y.; Takahashi, H. Structural mechanisms for the s-nitrosylation-derived protection of mouse galectin-2 from oxidation-induced inactivation revealed by nmr. *FEBS J.* **2018**, *285* (6), 1129–1145. <https://doi.org/10.1111/febs.14397>.
  48. Barondes, S. H.; Cooper, D. N. W.; Gitt, M. A.; Leffler, H. Galectins. structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (33), 20807–20810.
  49. Molnár, P.; Deli, J.; Tanaka, T.; Kann, Y.; Tani, S.; Gyémánt, N.; Molnár, J.; Kawase, M. Carotenoids with anti-helicobacter pylori activity from golden delicious apple. *Phyther. Res.* **2010**, *24* (5), 644–648. <https://doi.org/10.1002/ptr.2912>.
  50. Barrow, H.; Guo, X.; Wandall, H. H.; Pedersen, J. W.; Fu, B.; Zhao, Q.; Chen, C.; Rhodes, J. M.; Yu, L. G. Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17* (22), 7035–7046. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1462>.
  51. Ahmed, H.; Fink, N. E.; Pohl, J.; Vasta, G. R. Galectin-1 from bovine spleen: biochemical characterization, carbohydrate specificity and tissue-specific isoform profiles. *J. Biochem.* **1996**, *120* (5), 1007–1019. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021493>.
  52. Lukic, R.; Gajovic, N.; Jovanovic, I.; Jurisevic, M.; Mijailovic, Z.; Maric, V.; Popovska Jovicic, B.; Arsenijevic, N. Potential hepatoprotective role of galectin-3 during hcv infection in end-stage renal disease patients. *Dis. Markers* **2017**, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/6275987>.
  53. Niki, T.; Fujita, K.; Rosen, H.; Hirashima, M.; Masaki, T.; Hattori, T.; Hoshino, K.

- Plasma galectin-9 concentrations in normal and diseased condition. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *50* (5), 1856–1868. <https://doi.org/10.1159/000494866>.
54. van der Laan, A. M.; Schirmer, S. H.; de Vries, M. R.; Koning, J. J.; Volger, O. L.; Fledderus, J. O.; Bastiaansen, A. J. N. M.; Hollander, M. R.; Baggen, J. M.; Koch, K. T.; et al. Galectin-2 expression is dependent on the rs7291467 polymorphism and acts as an inhibitor of arteriogenesis. *Eur. Heart J.* **2012**, *33* (9), 1076–1084. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr220>.
  55. Yildirim, C.; Vogel, D. Y. S.; Hollander, M. R.; Baggen, J. M.; Fontijn, R. D.; Nieuwenhuis, S.; Haverkamp, A.; De Vries, M. R.; Quax, P. H. A.; Garcia-Vallejo, J. J.; et al. Galectin-2 induces a proinflammatory, anti-arteriogenic phenotype in monocytes, macrophages. *PLoS One* **2015**, *10* (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124347>.
  56. Allen, A.; Bell, A.; Mantle, M.; Pearson, J. P. The structure and physiology of gastrointestinal mucus. *Advances in experimental medicine and biology*. Springer, Boston, MA 1982, pp 115–133. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9254-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9254-9_15).
  57. Bahari, H. M. M.; Ross, I. N.; Turnberg, L. A. Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. *Gut* **1982**, *23* (6), 513–516. <https://doi.org/10.1136/gut.23.6.513>.
  58. Hiramatsu, H.; Takeuchi, K.; Takeuchi, H. Involvement of histidine residues in the pH-dependent  $\beta$ -galactoside binding activity of human galectin-1. *Biochemistry* **2013**, *52* (13), 2371–2380. <https://doi.org/10.1021/bi4001112>.
  59. Alexander, C.; Zähringer, U. Chemical structure of lipid a. the primary immunomodulatory center of bacterial lipopolysaccharides. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, *14* (76), 69–86. <https://doi.org/10.4052/tigg.14.69>.
  60. Lobsanov, Y. D.; Gitt, M. A.; Leffler, H.; Barondes, S. H.; Rini, J. M. X-ray crystal structure of the human dimeric s-lac lectin, l-14-ii, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (36), 27034–27038.
  61. Iwaki, J.; Hirabayashi, J. Carbohydrate-binding specificity of human galectins: an overview by frontal affinity chromatography. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2018**, *30* (172), SE137–SE153. <https://doi.org/10.4052/tigg.1728.1SE>.
  62. Champasa, K.; Longwell, S. A.; Eldridge, A. M.; Stemmler, E. A.; Dube, D. H. Targeted identification of glycosylated proteins in the gastric pathogen helicobacter pylori (hp)\* □ *s.* **2013**. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.029561>.
  63. Dumic, J.; Dabelic, S.; Flögel, M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier April 1, 2006, pp 616–635. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.12.020>.
  64. Hirabayashi, J.; Hashidate, T.; Arata, Y.; Nishi, N.; Nakamura, T.; Hirashima, M.;

- Urashima, T.; Oka, T.; Futai, M.; Muller, W. E. G.; et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2002**, *1572*, 232–254. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00311-2).
65. Seetharaman, J.; Kfanigsberg, A.; Slaaby, R.; Leffler, H.; Barondes, S. H.; Rini, J. M. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (21), 13047–13052. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.13047>.
66. Henrick, K.; Bawumia, S.; Barboni, E. A. M.; Mehul, B.; Hughes, R. C. Evidence for subsites in the galectins involved in sugar binding at the nonreducing end of the central galactose of oligosaccharide ligands: sequence analysis, homology modeling and mutagenesis studies of hamster galectin-3. *Glycobiology* **1998**, *8* (1), 45–57. <https://doi.org/10.1093/glycob/8.1.45>.
67. Stowell, S. R.; Arthur, C. M.; Mehta, P.; Slanina, K. A.; Blixt, O.; Leffler, H.; Smith, D. F.; Cummings, R. D. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (15), 10109–10123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709545200>.
68. Aspinall, G. O.; Monteiro, M. A.; Pang, H.; Walsh, E. J.; Moran, A. P. Lipopolysaccharide of the helicobacter pylori type strain nctc 11637 (atcc 43504): structure of the o antigen chain and core oligosaccharide regions. *Biochemistry* **1996**, *35* (7), 2489–2497. <https://doi.org/10.1021/bi951852s>.
69. Arata, Y.; Hirabayashi, J.; Kasai, K. I. Sugar binding properties of the two lectin domains of the tandem repeat-type galectin lec-1 (n32) of caenorhabditis elegans. detailed analysis by an improved frontal affinity chromatography method. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (5), 3068–3077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008602200>.
70. Tamura, M.; Sasai, A.; Ozawa, R.; Saito, M.; Yamamoto, K.; Takeuchi, T.; Ohtake, K.; Tateno, H.; Hirabayashi, J.; Kobayashi, J.; et al. Identification of the cysteine residue responsible for oxidative inactivation of mouse galectin-2. *J. Biochem.* **2016**, *160* (4), 233–241. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw029>.
71. Bergonzelli, G. E.; Granato, D.; Pridmore, R. D.; Marvin-Guy, L. F.; Donnicola, D.; Corthésy-Theulaz, I. E. GroEL of lactobacillus johnsonii la1 (ncc 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen helicobacter pylori. *Infect. Immun.* **2006**, *74* (1), 425–434. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.425-434.2006>.
72. Ensgraber, M.; Loos, M. A 66-kilodalton heat shock protein of salmonella typhimurium is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect. Immun.* **1992**, *60* (8), 3072–3078. <https://doi.org/10.1128/iai.60.8.3072-3078.1992>.

73. Ota, H.; Katsuyama, T. Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. *Histochem. J.* **1992**, *24* (2), 86–92.  
<https://doi.org/10.1007/BF01082444>.
74. Bukholm, G.; Tannæs, T.; Nedenskov, P.; Esbensen, Y.; Grav, H. J.; Hovig, T.; Ariansen, S.; Guldvog, I. Colony variation of helicobacter pylori: pathogenic potential is correlated to cell wall lipid composition. *Scand. J. Gastroenterol.* **1997**, *32* (5), 445–454.  
<https://doi.org/10.3109/00365529709025079>.
75. Li, H.; Yang, T.; Liao, T.; Debowski, A. W.; Nilsson, H.-O.; Fulurija, A.; Haslam, S. M.; Mulloy, B.; Dell, A.; Stubbs, K. A.; et al. The redefinition of helicobacter pylori lipopolysaccharide o-antigen and core-oligosaccharide domains. *PLOS Pathog.* **2017**, *13* (3), e1006280. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006280>.
76. Rezaei, S.; Amirmozaffari, N.; Tabarraei, B.; Jeddi-Tehrani, M.; Zarei, O.; Alizadeh, R.; Masjedani, F.; Zarnani, A. H. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from escherichia coli and salmonella typhi. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2011**, *3* (1), 3–9.
77. Westphal, O.; Jann, K. Bacterial lipopolysaccharides. extraction with phenol-water and further applications of the procedures. *Methods Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 83–91.