

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04480

研究課題名(和文)腸内細菌のクオラムセンシングの実態解明と疾病予防および健康増進に向けた制御

研究課題名(英文) Study on quorum sensing in gut microbial community for health promotion and disease prevention

研究代表者

中山 二郎 (Nakayama, Jiro)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：40217930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト腸内に多種多様に存在するクロストリジウム綱細菌群のクオラムセンシング(QS:菌密度依存的制御機構)の実態解明と、その人為的制御を目指した。まず、ウェルシュ菌に自身が発酵生産する短鎖脂肪酸により毒素発現誘導QSを抑制するクオラムクエンチング機構が存在していることを見出した。またウェルシュ菌のQS自己誘導ペプチドAIPcpの構造活性相関情報を基にそのアンタゴニストを創製し、QSを制御することに成功した。またプロバイオティクス酪酸菌のAIPcbの構造を解明し、それがウェルシュ菌のQSを干渉することを見出した。以上クロストリジウム綱細菌のQSを標的とする腸内フローラ制御の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to clarify and control the quorum sensing (QS), a cell density-dependent regulatory system, of order Clostridiales widespread in human gastro-intestinal tract. First of all, we found that QS-controlled toxin production is quenched by short chain fatty acids as fermentation products in *Clostridium perfringens*. Further, we designed an antagonist of autoinducing peptide (AIPcp) of *C. perfringens* based on the quantitative structure-activity relationship data. The designed peptide, Z-AIPcp-F4A/T5S, effectively inhibited the QS of *C. perfringens* at nanomolar order. Furthermore, we identified an autoinducing peptide, AIPcb, of a probiotic *Clostridium butyricum* and found a cross-inhibition of *C. perfringens* QS by AIPcb. Taken together, further studies are warranted to control Clostridiales community in GI-tract microbiota toward human health.

研究分野：微生物学・生物有機化学

キーワード：クオラムセンシング クオラムクエンチング Clostridiales ウェルシュ菌 アンタゴニスト 自己誘導ペプチド クロストリジウム 酪酸菌

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌研究の発展とともに、腸内細菌がヒトの健康に様々な方面から重要な機能を有していることが明らかになってきた。本研究対象のクロストリジウムは、ヒト腸内細菌の中核を占める超多様な細菌綱 (class Clostridia) で、常在菌から病原菌、善玉菌から悪玉菌と宿主における機能も様々である。我々が 2015 年に発表したアジアの子どもの腸内細菌叢の横断研究の調査結果でも、他の優占菌群であるバクテロイデス、プレボテラ、ビフィズス菌が個人間でその分布に大きな偏りがあるのに比べて、クロストリジウム綱細菌群は、すべての被験者にて安定して優占菌として存在していることが示されている(1)。このような常在菌として知られるクロストリジウム綱細菌は、腸内フローラにおいては代謝コアを形成しており、腸管粘膜細胞のエネルギー源である短鎖脂肪酸を盛んに生産している。特に酪酸が宿主免疫系を細胞レベルで制御していることが示されており(2)、食物繊維を利用してクロストリジウムに酪酸を積極的に生産させ、腸管の炎症を低減させる試みや、また、善玉菌であるクロストリジウム属細菌をプロバイオティクスとして投与し、腸管の炎症を低減させる試みが行われている(3)。一方、肥満者ではクロストリジウム過多の腸内フローラが特徴的に見られることが知られており、ある種のクロストリジウム細菌は、毒性の強い二次胆汁酸を腸管にて生産し、発癌にも関連する(4)。さらには、クロストリジウムには病原菌も多く、*Clostridium difficile* は抗生物質により誘発される感染症として今日の医療現場で驚異となっている。その他、*Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) や *Clostridium botulinum* なども毒素生産型の食中毒細菌として今日でも問題となっている。

一方、我々は、これまでの研究で、多くのグラム陽性細菌が環状ペプチドを自己誘導因子 (AIP) として細胞間のコミュニケーションを行っていることを示してきた [基盤研究 C(No.17580068), 基盤研究 B (No.19380053, No.21380061, No.24380050)](5, 6)。また、近年次々と明らかにされている細菌ゲノム情報から、クロストリジウムがこの環状ペプチドを用いた QS システムをどの程度有しているかを調査し、ゲノム情報が公開されている 113 種のクロストリジウムのうち 43 種から AIP のオルソログ遺伝子を確認した。さらに、アノテーションデータに AIP 遺伝子オルソログが見出されない場合でも、AIP 前駆体の保存アミノ酸配列を有するコード領域が見出されるケースも多く、クロストリジウム綱細菌の大部分が環状ペプチドによる細胞間コミュニケーションを行うポテンシャルを有していることが示唆されている。これらの環状 AIP は種間で完全に異なる配列を有し、多菌種が共存する自然界においても、種特異的な菌種間コミュニケーションを可能にしていると考えられる。

一方、応用微生物学の分野では、QS 阻害剤 (QSI) や AIP 分解酵素や抗体を用いて、人為的に QS に介入し (クオラムクエンチング)、病原菌の病原性発現を遮断する試みも行われている。申請者らも、腸球菌やブドウ球菌の QSI を天然物からのスクリーニングとドラッグデザインの両アプローチで創製している [基盤研究 B (No.19380053, No.21380061, No.24380050)]。特に、ペプチドデザインにより創製した AIP アンタゴニスト “ZBzl-YAA5911” を創製し、ウサギ眼内炎モデルにて、腸球菌の感染予防効果を実証している (7)。

参考文献

- (1) J. Nakayama et al., Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci. Rep.* 2015, 5: 8397.
- (2) Y. Furusawa et al., Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013, 504: 446-450.
- (3) A. Hayashi et al., A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe* 2013, 13: 711-722.
- (4) S. Yoshimoto et al., Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 2013, 499: 97-101.
- (5) 佐藤まみ, 中山二郎, グラム陽性細菌のクオラムセンシング研究の最前線. 日本乳酸菌学会誌. 2010, 21: 95-106.
- (6) 中山二郎, 細菌の世界における細胞間ケミカルコミュニケーションとその分子メカニズム. 2011, 25: 221-234.
- (7) J. Nakayama et al., Development of a peptide antagonist against *fsr* quorum sensing of *Enterococcus faecalis*. *ACS Chemical Biology*. 2013, 8: 804-811.

2. 研究の目的

1 で示した研究の背景から、複数種のクロストリジウム綱細菌が高密度にひしめく腸管内においては、環状ペプチドをシグナルとした同種あるいは異種間での cell-to-cell のコミュニケーションが積極的に行われていると考えた。一方、QS を人為的に制御するための様々な技術も開発され、特に当グループでは化学物質を用いて制御する技術を蓄積してきているので、腸内フローラでの QS もこれらの方法にて制御できるのではないかと考えた。よって本研究では、これまでの研究から得られた環状ペプチドを AIP とするグラム陽性細菌の QS に関する知見と技術を、腸内フローラ研究に展開し、腸内細菌叢で質・量ともに重要な位置を占めるクロストリジ

ア綱細菌群のコミュニケーションネットワークの一端を明らかにすることを第一目標とした。そしてさらには、QSIを用いたクロストリジア綱細菌群コミュニティへの人為的介入にチャレンジし、将来医療の一手法として期待されている腸内フローラ改善による疾病予防・健康増進法の一助としたいと考えた。

3. 研究の方法

3.1. AIP の合成

環状 AIP は、ペプチド固相合成法の一つである Fmoc 固相合成法により、直鎖ペプチドを合成した後、脱水環化させ、分子内チオエステルを形成させた。この時、直鎖ペプチドの末端アミノ基と反応しチオラクタムが生成するのを防ぐために、N 末端にはベンジロキシカルボニル基で保護しておき、環化後に除去するという工程で合成した。合成した AIP はすべて HPLC で単一ピークとなるように精製し、精製後 LC-MS で質量と保持時間を確認し、正しく合成されていることを確認した。

3.2. LC-MSMS による AIP の検出

一般的に AIP は微量にしか培養液中に存在しないので、感度の高い LC-MSMS を用いたとしても培養液から直接検出することは困難である。しかし、同じクロストリジア綱細菌であっても AIP の生産量やその物性は多様で、菌種ごとに AIP の LC-MSMS 検出には、異なるサンプルの前処理が必要であった。*C. perfringens* の AIP(AIP_{cp})については、酢酸エチル:メタノール (99:1) を用いて培養液(0.5 ml)を溶媒抽出し、濃縮乾固した後 LC-MSMS に供することで高感度で検出することができた。*Clostridium difficile* については、同様の方法で培養液 5 ml を用いて AIP_{cd} の検出に成功した。*C. butyricum* については、さらに検出が困難であったため、アセチル化によりペプチドの安定化と溶媒抽出の効率向上を図った後、LC-MSMS 検出することで、5 ml の培養液からの AIP_{cb} の検出に成功した。

3.3. pfoA の発現解析

pfoA の発現については、*C. perfringens* の細胞から total RNA を抽出後、逆転写定量 RNA 解析により定量した。

3.4 .RNA-seq 解析

C. perfringens を種々条件にて培養した後、3.3 と同様に total RNA を回収し、Novagen に RNA-seq を委託した。Novagen では調整した mRNA ライブラリーを Illumina HiSeq (PE150) にて 1 サンプルあたり 1.2 G base 相当を解読した。

4. 研究成果

4.1 種々クロストリジア綱細菌の AIP 検出系の構築と AIP の構造解析

クロストリジア綱細菌群の AIP を培養液から分子レベルで簡便に検出するシステムとして、LC-MSMS を用いるシステムを構築した。その結果、*C. perfringens* の AIP については、5 ml の培養液を用いて、対数増殖期前期から静止期にかけて、10 nM から 200 nM の範囲の AIP を定量的に検出した。また、偽膜性大腸炎起因菌である *Clostridium difficile* および酪酸菌 *Clostridium butyricum* についても培養液からの AIP (それぞれ AIP_{cd} および AIP_{cb}) の直接検出に成功した。

C. butyricum については AIP の構造が未知であったので、化学合成により培養液中に存在するものが、確かに 5 残基から成る環状チオラクトンペプチドであることを確かめた (図 1)。

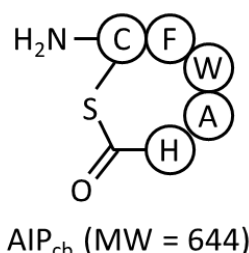


図 1. *Clostridium butyricum* の自己誘導ペプチド(AIP_{cb})の構造

4.2. クロストリジア綱細菌間の QS クロストークの解析

以前から *C. butyricum* が *C. perfringens* の毒素生産を抑制することは知られていた。今回、4.1.で決定された AIP_{cb} の構造は AIP_{cp} の構造に類似していることから、AIP_{cp} のアンタゴニストとして機能する可能性が考えられた。そこで、合成 AIP_{cb} を用いて実際に *C. perfringens* の θ 毒素遺伝子 pfoA の転写誘導を抑制するか否かを確認した。その結果、AIP_{cb} はサブマイクロモラーレベルで AIP_{cp} の pfoA の転写誘導を抑制し、 θ 毒素の生産を抑制することが明らかになった。本内容は国際特許 (WO2015119170A1)の一部として公開されている。

4.3. ウェルシュ菌 *C. perfringens* の QQ 機構の解明

ウェルシュ菌 *C. perfringens* は自ら VirSR の QS 系をシャットダウンする機構 (自己 QQ) を有していることに着目し、そのメカニズムを綿密に解析した。その現象は図 2A に示したように、対数増殖中後期の培地をウェルシュ菌の培養に加えると QS で誘導された θ 毒素遺伝子 pfoA の転写物が速やかに消滅することにより確かめられた。この現象を詳細に解析したところ、*C. perfringens* は細胞外の pH を感知し、AIP のシグナル伝達系を止めることにより、pfoA の転写誘導を遮断していることが明らかになった。*C. perfringens* は酢酸や酪酸を発酵生産する菌であることから、自身

の発酵産物により細胞外の pH が下がるのに同調して QS 系をシャットダウンしていると見受けられる。細胞外の pH については、無機酸である塩酸でも QQ を誘導することから (図 2B)、この QQ は化学シグナルの感知ではなく酸性 pH をシグナルとして感知していることが分かった。酸によりウェルシュ菌の毒素生産を遮断できることの発見は、例えば腸管においても健康な状態では種々有機酸発酵菌の活動により腸管環境が弱酸性になっていることが知られ、このような腸管環境がウェルシュ菌の毒素生産抑制にも働くと考えられ、間接的な腸管感染症予防のための一つの方策として着目される。一方、さらに積極的な感染症対策としても、pH の低下という手軽な手法として注目される。

我々は、さらに詳細にこの QQ の分子機構を明らかにするために、QQ 時の網羅的な転写変動を RNA-seq 解析を用いて行った。その結果、大変興味深いことに、VirSR の QS 系がもう一つの QS 系である AI-2 系とクロストークしている様子が見られた。実際には、AI-2 の生合成に関わる luxS 遺伝子の発現が VirSR 系により下方制御されていた。その他、下方制御される遺伝子にはアミノ酸の取り込みと代謝に関わる遺伝子が多く見られた。一方、上方制御されるものには、*pfoA* や *plc*(phospholipase C)や *colA*(collagenase)などすでに VirSR QS 系により制御されることが知られている毒素遺伝子の他、糖代謝に関わるいくつかの遺伝子が含まれていた。そして、これらの多くは、pH の酸性化にリンクする QQ により下方制御されていた。この事実は、QS 時はエネルギー代謝も活発化し毒素生産もサポートする一方、自らの発酵により細胞外 pH が低下すると毒素生産と同時に糖代謝を抑制し、一方、アミノ酸代謝など同化代謝を活発化しているとして取れる。

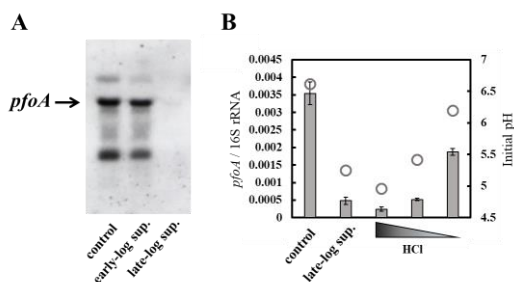


図 2. ウェルシュ菌のクオラムクエンチングの観察。A: 対数増殖期後期の培養ろ液を添加すると *pfoA* が速やかに消滅する。B: 同様に塩酸の添加でも *pfoA* の転写抑制が観察される。

4.4. ウェルシュ菌 *C. perfringens* の AIP antagonist の創製

AIPcp のアミノ酸置換体を複数合成し、得られたペプチドの QS および QQ 活性を測定した。次に、得られた定量的構造活性相関

(QSAR)情報を基に (図 3)、AIP アンタゴニスト (Z-AIP_{Cp}-F4A/T5S) をデザインした (図 4)。Z-AIP_{Cp}-F4A/T5S は IC₅₀ = 720 nM の QQ 活性を示した (図 4)。今後、この Z-AIP_{Cp}-F4A/T5S をリード化合物としてドラッグデザイン研究を進展させていくことで、さらに活性の強いアンタゴニストを得ることができると期待される。

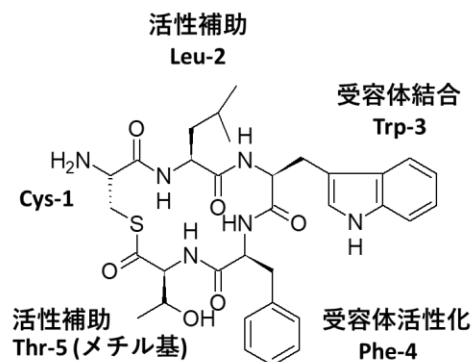


図 3. AIPcp の構造活性相関情報

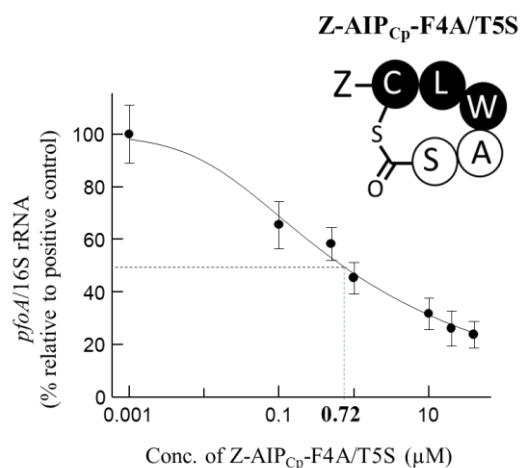


図 4. *C. perfringens* の AIP アンタゴニスト (Z-AIP_{Cp}-F4A/T5S) の構造と活性

4.5. 総括

腸内クロストリジア網細菌群の腸内におけるクロストークのモデル系として、腸内有益菌の *C. butyricum* (酪酸菌) と腸内病原菌の *C. perfringens* (ウェルシュ菌) の間で、クオラムセンシングの AIP を介した相互干渉の可能性が示された。今後、このモデル系をさらに拡張することで、ヒト腸内フローラのコアを形成するクロストリジア網細菌群が、腸管内にてどのように QS あるいは QS 干渉を行い、それぞれの細菌種の活性をコントロールしているかその全容に迫ることができると期待される。

一方、化学的なアプローチで AIP のアンタゴニストを分子創製し、人為的に *C.*

perfringens の毒素生産を阻止することにも成功した。併せて、酸性条件下で *C. perfringens* の QQ が誘導されることも見出した。これらの技術や情報を活用し、将来腸内フローラの中核をなすクロストリジウム綱細菌群の人的制御が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Adachi K, Ohtani K, Kawano M, Singh RP, Yousuf B, Sonomoto K, Shimizu T, Nakayama J. Metabolic dependent and independent pH-drop shuts down VirSR quorum sensing in *Clostridium perfringens*. J Biosci Bioeng. 2018;125(5):525-531. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.019.
2. Singh RP, Desouky SE, Nakayama J. Quorum quenching strategy targeting Gram-positive bacteria. Advances in Microbiology and Infectious Diseases and Public Health. 2016; 910; 109-130.
3. Desouky SE, Shojima A, Singh RP, Matsufuji T, Igarashi Y, Suzuki T, Yamagaki T, Okubo K, Sonomoto K, Nakayama J. Cyclodepsipeptides produced by actinomycetes inhibit cyclic-peptide-mediated quorum sensing in Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2015; 362; 1-9. 10.1093/femsle/fnv109.
4. Igarashi Y, Gohda F, Kadoshima T, Fukuda T, Hanafusa T, Shojima A, Nakayama J, Bills GF, Peterson S, Avellanin C, an inhibitor of quorum sensing signaling in *Staphylococcus aureus*, from *Hamiger ingelheimensis*. J. Antibiot. 2015; 68; 707-710. Doi: 10.1038/ja.2015.50
5. Igarashi Y, Yamamoto K, Fukuda T, Shojima A, Nakayama J, Carro L, Trujillo ME. Arthroamide, a cyclic depsipeptide with quorum sensing inhibitory activity from *Arthrobacter* sp. J Nat Prod. 2015; 78; 2827-2831. Doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b0040.
6. Singh RP, Okubo K, Ohtani K, Adachi K, Sonomoto K, Nakayama J. Rational design of quorum quenching peptides that target the VirSR system of *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol Lett. 2015; 361; 1-7. doi:10.1093/femsle/fnv188.

[学会発表] (計 11 件)

1. Keika Adachi, Jiro Nakayama. Metabolic-linked pH-drop quenches VirSR quorum sensing in *Clostridium perfringens*. 6th ASM Cell-Cell communication in Bacteria. 2017 年.

2. 安達桂香, Ravindra Pal Singh, 園元謙二, 中山二郎. *Clostridium perfringens* の毒素生産制御に関わる内在性クオラムクエンチングの解析. 第 69 回日本生物工学会年次大会. 2017 年.
3. 安達桂香, Ravindra Pal Singh, 大谷郁, 園元謙二, 中山二郎. *Clostridium perfringens* の代謝同調的な内在性クオラムクエンチング機構の実態解明. 環境微生物学合同大会. 2017 年.
4. 安達桂香, 神川美樹, Ravindra Pal Singh, 大谷郁, 園元謙二, 中山二郎. *Clostridium perfringens* の内在性クオラムクエンチング—代謝同調的 pH 低下によるクオラムセンシング機構の解明. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年 3 月 17 日~20 日. 京都女子大学.
5. 中山二郎, 神川美樹, 安達桂香, 大久保謙一, 大谷郁, 岡健太郎, 園元謙二. Clostridiales 目細菌ゲノムにコードされる agr 様クオラムセンシング系自己誘導ペプチドの LC-MS/MS 検出系の確立. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年 3 月 17 日~20 日. 京都女子大学.
6. 安達桂香, Ravindra Pal Singh, 大谷郁, 園元謙二, 中山二郎. *Clostridium perfringens* の毒素発現を制御する内在性クオラムクエンチングの実態解明. 第 68 回日本生物工学会大会. 2016 年 9 月 28 日~30 日. 富山国際会議場.
7. 神川美樹, 安達桂香, 大久保謙一, 大谷郁, 岡健太郎, 高橋志達, 園元謙二, 中山二郎. *Clostridium* 属細菌の agr 様クオラムセンシング系における自己誘導ペプチドの検出. 日本農芸化学会 2016 年度西日本支部大会. 2016 年 9 月 15 日~16 日. 長崎大学文教キャンパス.
8. 安達桂香, 大谷郁, 河野通生, ラビンドラパルシン, 園元謙二, 中山二郎. *Clostridium perfringens* の毒素生産を制御するクオラムクエンチング機構の解明. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年 3 月 27 日~30 日. 札幌コンベンションセンター.
9. 安達桂香, Ravindra Pal Singh, 大谷郁, 河野通生, 園元謙二, 中山二郎. *Clostridium perfringens* の毒素生産を制御するクオラムクエンチングに関する研究. 第 22 回日本生物工学会九州支部宮崎大会. 2015 年 12 月 5 日. 宮崎大学木花キャンパス.
10. 神川美樹, 庄島あかね, 大久保謙一, 松藤貴久, Ravindra Pal Singh, 大谷郁, 岡健太郎, 高橋志達, 園元謙二, 中山二郎. *Clostridium butyricum* MIYAIRI588 が産生するオートインデューサー様ペプチドの同定. 第 52 回化学関連支部合同九州大会. 2015 年 6 月 27 日. 北九州国際会議場.
11. R. P. Singh, K. Okubo, K. Sonomoto, J. Nakayama. Development of quorum quenching peptides targeting VirR/VirS

system of *Clostridium perfringens*. 6th
Congress of European Microbiologists. 2015
年 6 月 7 日～11 日. Maastricht, The
Netherlands.

〔図書〕（計 1 件）

1. Basit Yousuf, Keika Adachi, Jiro Nakayama.
Biotechnological Applications of Quorum
Sensing Inhibitors. Springer Nature, in press.
2018 年.

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：クロストリジウム属の菌の毒素産生抑制活性を有するペプチド (Peptide having activity of inhibiting production of toxin by bacterium belonging to genus clostridium)

発明者：清水徹、大谷郁、中山二郎、松藤貴久、ラビンドラパルシン、大久保謙一、神川美樹、高橋志達、岡健太郎

権利者：ミヤリサン製薬株式会社

種類：特許

番号：WO2015119170A1

取得年月日：2015 年 8 月 13 日

国内外の別：国際

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 二郎 (NAKAYAMA, Jiro)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40217930

(2)研究分担者（平成 27 年度）

大谷 郁 (OHTANI, Kaori)

金沢大学・大学院医薬保健学総合研究科・
講師

研究者番号：30377410

(3)研究協力者

高橋 志達 (TAKAHASHI, Motomichi)

ミヤリサン製薬・東京研究部

岡 健太郎 (OKA, Kentaro)

ミヤリサン製薬・東京研究部