

令和元年6月5日現在

機関番号：14602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16282

研究課題名(和文) プロバイオティクスに特異的に応答する新規パターン認識受容体と標的成分の解明

研究課題名(英文) Specific immunomodulatory factors of the probiotics in *C. elegans*

研究代表者

小村 智美 (Komura, Tomomi)

奈良女子大学・生活環境科学系・助教

研究者番号：10736515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：わが国は世界一の長寿大国となったが、免疫力の低下による高齢者の肺炎死亡率増加など老化に関する課題も多い。そこで老化に伴う免疫力の低下を食品成分により制御する可能性について、線虫(*Caenorhabditis elegans*)をモデル動物として研究を進めている。これまでにビフィズス菌が、線虫の老化を抑制し寿命を延長させることを発見した。本研究では、ビフィズス菌にトランスポゾン挿入することでランダム変異株の作製に成功した。さらにビフィズス菌摂取させた線虫体内で変化する生体防御関連の候補遺伝子を見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主に有益な保健効果をもたらすビフィズス菌の新たな機能性を見つけるため、ビフィズス菌の変異株作製に成功させた。またモデル生物の一種*C. elegans*を用いてビフィズス菌摂取で変動する生体防御関連の遺伝子を見つけた。今後、これらのツールを利用してさらに研究を進めることで、有効なビフィズス菌体成分の同定を目指したい。

研究成果の概要(英文)：More than 70% of human genes have an ortholog in *Caenorhabditis elegans* genome. This organism has been used as an experimental system to study aging because of its short lifespan and the discoveries of genes associated with the senescence. We previously showed that probiotics could prolong the lifespan of metazoan using the nematodes (Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 6404-9 and Biogerontology 2013; 14: 73-87). This study is to reveal the immunogenics, which is immunomodulatory factors of the probiotics, by a molecular biological approach using the nematodes. I had successfully established a method for random mutants in bifidobacteria. I could find some host defense genes in *C. elegans* by bifidobacteria. The reporter assay would be used to screen probiotic bacteria as immunoenhancer in the near future.

研究分野：免疫栄養学

キーワード：線虫 老化 ビフィズス菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界一の長寿大国となった我が国では、急速な高齢化社会の進行に伴い、免疫力の低下による高齢者の肺炎死亡率の増加や Quality of life (生活の質: QOL) の低下、老々介護などが社会問題となっている。そこで、老化に伴う免疫力や QOL の低下を食品成分により制御し、健康寿命(介護を必要とせず、自立して健康的に生活できる期間)を延ばし、高齢者が健康で長生きするサクセスフル・エイジングの実現を目指して、基礎的な研究を進めている。

栄養学や免疫学の研究では、実験動物としてマウスやラットを用いるのが一般的であるが、老化のモデル生物として哺乳類を用いる場合、長期の実験期間を要し、動物倫理の制約も厳しい。そこで、線虫(*Caenorhabditis elegans*; 図 1)に着目している。線虫は、腸管、神経、生殖器など生物としての基本的な構造を持ち、寿命が短く(約 3 週間)、倫理上の制約もない。そして、遺伝子レベルではヒトと 70%以上の相同性を有し、老化に関連する遺伝子が数多く同定され老化研究のモデル動物として世界中で利用されている。



図 1. 線虫の体構造

2. 研究の目的

近年、食品の生理調節機能が世界的に注目され、そのひとつとしてプロバイオティクス(宿主に有益な保健効果を示す微生物)が挙げられる。1907 年、ノーベル賞受賞者のメチニコフはヨーグルトに含まれる乳酸菌が長寿を導くとする「不老長寿説」を提唱し、小村が所属していた研究室では、線虫モデルを用いてその長寿効果を in vivo で初めて実証した(Ikeda et al., Appl. Environ. Microbiol., 2007; 73: 6404-9)。そして小村は、広義の乳酸菌に含まれプロバイオティクスとして利用されているビフィズス菌について線虫の寿命や老化指標に与える影響を検証し、体内の酸化物質の蓄積や運動機能の低下が抑制されることを見出した(Komura et al. Biogerontology 2013; 14: 73-87)。その過程で、ビフィズス菌を与えた線虫のマイクロアレイを実施したところ、遺伝子 X の顕著な発現上昇が認められた。さらにその遺伝子は病原菌では誘導されず、善玉菌のみ特異的に誘導することを見出した(未発表)。これは、線虫が未知の受容体で病原菌と善玉菌を識別していることを示唆している。現在のところ、線虫が細菌の構成成分を認識する Toll-like receptor などのパターン認識受容体(pattern-recognition receptors; PRRs)をもつことは報告されていない。しかしながら、線虫は寿命調節や病原菌感染における主要なシグナル伝達経路としてヒトとの相同性が高い MAP キナーゼカスケード(p38MAPK 経路)を保有する。

そこで本研究の目的は、ビフィズス菌を与えた線虫の遺伝子 X を手掛かりにして、プロバイオティクスに応答する標的菌体成分の解明を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) 各ビフィズス菌体成分の分画

ビフィズス菌体側の有効成分に関しては、抽出したい成分によって分画方法が異なり煩雑なこと、精製が難しいことなどもあいまって、菌体のどの部分が長寿効果に関与するのかすら未だ明らかにできていない。そこで菌体を DNase や Protease などで酵素処理することで、DNA やタンパクを変性させた菌体を作製した。またキットを用いてビフィズス菌の DNA-タンパク複合体の分画を作製した。

(2) GFP 挿入トランスジェニック線虫を用いた GFP の発現観察

これまでにマイクロアレイ法を用いて遺伝子 X が、通常のエサ(大腸菌)を与えた時に比べてビフィズス菌を与えた時に顕著に発現量が増加することを見出した。そこで、ビフィズス菌摂取時に発現増加する遺伝子のプロモーターに GFP を繋いだベクターをインジェクションして作製したトランスジェニック線虫(図 2)を用いて、(1)の DNA-タ

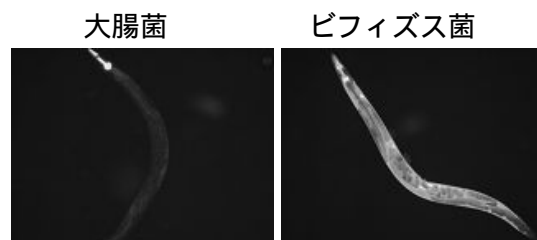


図 2. トランスジェニック線虫

ンパク複合体や、DNase や Protease で酵素処理したビフィズス菌を与えて、GFP の発現変化を観察した。

(3) ビフィズス菌のランダム変異株作製方法の確立

EZ-Tn5™ pMOD™-2<MCS> Transposon Construction Vector(Epicentre)を用いて、ビフィズス

菌のランダム変異株の作製を試みた。

(4) ビフィズス菌を摂取した線虫の遺伝子変化

マイクロアレイ法と RT-PCR 法を用いて、ビフィズス菌摂取において線虫体内で変化する遺伝子(遺伝子 X 以外)の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 各ビフィズス菌体成分の分画

グラム陽性菌であるビフィズス菌は、大腸菌(グラム陰性菌)と比べて細胞壁が厚く、タンパク質や DNA, RNA を抽出することが難しいとされる。そこで、各成分を抽出するのではなく、酵素法を用いて DNA や RNA、タンパクを酵素分解処理した菌体を作製した。また DNA とタンパクの複合体の作製も行うことができ、これらを(2)の実験に用いることとした。

(2) GFP 挿入トランスジェニック線虫を用いた GFP の発現観察

ビフィズス菌摂取時に発現増加する遺伝子 X に GFP, 咽頭部の myo-3 遺伝子に DsRed を繋いだトランスジェニック線虫を用いて、(1)で作製した菌体や複合体を与えた際の GFP の変化を調べた。

ビフィズス菌の加熱死菌でも GFP の発現誘導は観察されたが、加熱死菌を DNase や Protease で処理した菌をトランスジェニック線虫に与えると、GFP 発現が消失した。しかしながら、RNase 処理した菌体を与えた場合は顕著な GFP 発現が確認できた。これは、本遺伝子を発現させるビフィズス菌の成分が DNA やタンパク質であることを示唆していると推察された。そこで DNA-タンパク複合体を作製し、線虫に与えてみたものの、顕著な GFP の発現は認められなかった。キットで精製できる複合体の量が少なく、線虫への投与量が十分ではなかった、あるいは、精製時に用いるバッファーが GFP の発現を阻害させた可能性が考えられる。菌体から目的の物質を精製し、線虫へ投与するのは困難だと判断し、ビフィズス菌体にランダムにトランスポゾン挿入させることで、変異株を作製する方針(2)に切り替えることとした。

(3) ビフィズス菌のランダム変異株作製方法の確立

ビフィズス菌などグラム陽性菌は細胞壁成分のペプチドグリカン層が厚く、変異株の作製報告はグラム陰性の大腸菌などと比べて少ない。しかしながら Ito らは、EZ-TN5 トランスポソームを用いた *Lactobacillus casei* (乳酸菌の一種)の挿入変異をエレクトロポレーション法を用いて作製できることを報告した(Ito M, Kim YG, Tsuji H, Kiwaki M, Nomoto K, Tanaka R, Okada N, Danbara., "A practical random mutagenesis system for probiotic *Lactobacillus casei* using Tn5 transposition complexes., Appl. Microbiol., 109(2): 657-666, 2010)。そこで Ito らの方法を参考に、一部改良しながら、ビフィズス菌の中でも最も寿命延長効果が顕著であった *B. infantis* のトランスポゾン導入を試みた。*B. infantis* はテトラサイクリンに対して感受性があるため、EZ-Tn5 pMOD-2<MCS>Transposon Construction Vector のマルチクローニングサイトにテトラサイクリン耐性遺伝子を組み込み(pMOD-2<Tetr>)、コンピテントセルの大腸菌を形質転換させた。大腸菌からプラスミド pMOD-2<Tetr>を抽出し、トランスポソーム(トランスポゾンと転位酵素の複合体)を作製した。その後、エレクトロポレーション法を用いて *B. infantis* を形質転換させることを試みた。回復培地やエレクトロポレーション法の条件検討を繰り返し、形質転換効率の良いランダム変異株の作製に成功した。

(4) ビフィズス菌を摂取した線虫の遺伝子変化

上記(3)のランダム変異株をトランスジェニック線虫に与え、遺伝子 X の誘導に関わる変異株を探索することを計画していたが、その実験過程で遺伝子 X は善玉菌の成分に反応する特異的な反応ではないことが判明した。そこでマイクロアレイ法と RT-PCR 法を用いて、ビフィズス菌に反応する他の遺伝子を探索し、候補遺伝子 12 種類を見つけ出した。今後は、本遺伝子に GFP を融合させたトランスジェニック線虫を作製し、発現に寄与する菌体成分の同定を目指す計画をしている。

今後も本研究で作製したランダム変異株を用いて長寿効果に関与するビフィズス菌体成分の探索を進め、ビフィズス菌による寿命延長の機構解明に向けて継続的に研究を進めていきたい。また既に、線虫のレポーターアッセイを作製する技術を習得しているため、ランダム変異株とレポーターアッセイを組み合わせることで、将来的には、乳酸菌をはじめプロバイオティクスのアンチエイジング効果の探求にも応用できる新たなシステムとなり、食品の新規機能性(アンチエイジング効果)研究における基礎実験系への応用やサプリメントへの応用も期待できると考えている。

以上、ビフィズス菌の長寿効果に寄与する菌体成分をスクリーニングするために有用となる変異株を作製でき、長寿効果に寄与する可能性のある新たな遺伝子を見つけ出すことができた。今後、ビフィズス菌の有効成分が明らかにできれば、その機構解明からヒトへの応用などを通じて、超高齢社会に突入した我が国で課題となっている健康寿命の延伸などに貢献できることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

「*C. elegans* (線虫)におけるプロバイオティクスの長寿効果と特異的な遺伝子発現」, 小村智美, 中臺枝里子, 西川禎一, 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 2017.3

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。