

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20780105  
研究課題名（和文）  
宿主－微生物間相互作用情報に基づくプロバイオティクス評価系の構築  
研究課題名（英文）  
Development of an assessment system of probiotics based on host-microbial crosstalk information  
研究代表者  
福田 真嗣 (Fukuda Shinji)  
独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究チーム・基礎科学特別研究員  
研究者番号：80435677

## 研究成果の概要（和文）：

腸管出血性大腸菌 O157:H7 によるマウス感染死を予防できるビフィズス菌と予防できないビフィズス菌の違いについて、複合オミクス解析手法を用いて詳細な比較解析を行った。その結果、プロバイオティックビフィズス菌を定着させたマウスの腸管内では短鎖脂肪酸産生量が有意に多く、そのことが O157 感染による腸管上皮細胞の細胞死を抑制していることを見出した。従って、プロバイオティックビフィズス菌の効果の一因として、腸管内での高い糖代謝能が必要であることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

To elucidate the prevention mechanisms by probiotic bifidobacteria against *E. coli* O157:H7 lethal infection, we took advantage of multi-omics-based approach. Detailed research revealed that the fecal concentration of short chain fatty acid (SCFA) in probiotic bifidobacteria-associated mice was significantly higher than that in non-probiotic bifidobacteria-associated mice. SCFA could inhibit colonic epithelial cells from cell death provoked by O157 infection, suggesting that the abilities of sugar metabolism and SCFA production in probiotic bifidobacteria play a critical role in the prevention of O157 lethal infection.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学 ・食品科学

キーワード：プロバイオティクス、腸内細菌、メタボローム、トランスクリプトーム、ゲノム、オミクス、相互作用、ビフィズス菌

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含め動物の腸内には数百種類以上で100兆個にもおよぶ細菌が生息しており、これら一群を総称して腸内細菌叢(腸内フローラ)と呼ぶ。腸内フローラはヒトの健康維持に有用であると同時に有害な面があることも明らかになってきている。いわゆる悪玉菌の増加は癌・糖尿病・高血圧・心臓病などの生活習慣病、アレルギー・炎症性腸疾患などの免疫疾患や各種感染症を誘発し、老化との関連も示唆されている。炎症性腸疾患モデル動物や大腸発癌モデル動物を無菌化することで発症しなくなるという事実からも(Karin, et al., *Cell*, 124, 2006)、単に宿主の遺伝子異常ばかりでなく、宿主-腸内フローラ間 cross-talk が病態形成の重要な要因であることは明らかである。逆に、ビフィズス菌や乳酸菌に代表される善玉菌による疾患の改善や予防効果も明らかになると共に、これら善玉菌そのもののプロバイオティクスとしての投与の有用性が、健康維持、予防医学の面からも着目されている。肥満と腸内細菌の関係が報告されたことから(Turnbaugh, et al., *Nature*, 444, 2006)、腸内細菌とエネルギー代謝の関連性も注目されつつある。しかしながら、これら腸内フローラがどのような作用機序で宿主の健康維持や疾患の改善と関わっているのか、すなわち宿主-腸内フローラ間 cross-talk の科学的根拠は乏しいのが現状であった。

## 2. 研究の目的

近年、メタゲノム解析の手法による難培養性菌を含めたヒト腸内フローラの一斉解析が進められている。この試みは、以前暗黙知であったヒトの遺伝情報解読がゲノムプロジェクトで有限な形式知となったように、実験室で単離されなかった難培養性の未同定菌までもを含めた“腸内宇宙”とも呼ぶべき腸内フローラの総体を形式知の世界

に移行させる事になる。例えば、健常 vs 生活習慣病のヒト腸内フローラ構成のゲノムレベルでの相違が、メタゲノム解析により明確になることが期待される。しかし、ゲノム解析以降の課題として常に、時間軸を伴った生体分子の機能解析への展開が挙げられる。宿主の一塩基多型(SNPs)に基づくゲノム創薬研究においてさえ遺伝的背景だけでは限界があり、食物や薬剤の消化・吸収あるいは腸内フローラの構成など種々の環境要因を考慮する必要があるとされている(Clayton, et al., *Nature*, 440, 2006)。腸内フローラの解析においては、微生物間、さらには宿主との crosstalk がヒト個体全体の恒常性を保つ大きな鍵を握っている。しかし、数百種類にも及びかつ未同定菌を多数含む複雑な腸内フローラ全体と宿主の crosstalk を体系的に解析・理解するのは現時点では事実上不可能であった。そこで申請者らは、無菌マウスに限られた菌のみを投与したモデル実験系を用いて宿主-腸内フローラ間 crosstalk を明らかにし、宿主-腸内フローラ間 crosstalk 情報に基づくプロバイオティクスの評価系を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

申請者らが共同研究者らとともに確立した腸管出血性大腸菌 O157:H7 によるマウス感染死モデル動物実験系を用いて、宿主-腸内フローラ間 crosstalk 情報に基づくプロバイオティクスの評価系を構築することを目的とした。これまでの研究成果から、無菌マウスに O157 を投与すると7日以内に全例が死に至るが、O157 と共に典型的なプロバイオティクスである *Bifidobacterium longum* を投与すると感染死は完全に予防されることを見出した。一方、成人の腸管内に常在するビフィズス菌である *Bifidobacterium adolescentis* を投与しても感染死が予防できないことも明らかにした。*B. longum* 前投与により O157 のマウス腸管内における生菌数、シガ毒素産生量、シガ毒素活性、腸管内 pH には *B. longum* 前投与の有無によらず違いは認め

られなかったが、O157 単独投与時にみられた血清中のシガ毒素濃度の増加および大腸上皮の軽い炎症は認められなかった。従って、*B. longum* による宿主腸管上皮バリアー機能や免疫能の増強が感染死予防に寄与する可能性が示唆された。これは、*B. longum* の代謝産物が腸管上皮に作用することによると考えられた。そこで、宿主と腸内細菌とが共通に利用可能であるため、*crosstalk* 情報を大量に含むと考えられる「代謝物」に注目し、宿主動物の尿や糞便中の代謝物の NMR 解析による網羅的プロファイリングを行った。同時に宿主側の応答として腸内フローラと直接相互作用する腸管上皮細胞の「遺伝子発現変動」にも注目し、マイクロアレイ解析により網羅的にプロファイリングを行った。加えて、腸管内で実際に発現している腸内フローラの遺伝子群を網羅的に解析するメタトランスクリプトーム解析も行った。得られた代謝物と宿主および腸内フローラの遺伝子発現の関連情報を分子基盤とし、既存の代謝経路マップを用いてそれらを統合することにより、プロバイオティクスを評価するポストメタゲノムの新規な体系的な研究手法の構築を試みた。

#### 4. 研究成果

感染死を予防できるプロバイオティックビフィズス菌2株と予防できないビフィズス菌2株を用い、代謝物や発現遺伝子群の網羅的解析、すなわち複合オミックス解析により詳細な比較を行った。その結果、感染死を予防できるビフィズス菌を定着させたマウスでは、予防できないものよりもマウス糞便中の糖質の含量が有意に少なく、短鎖脂肪酸の一つである酢酸が有意に多いことを見出した。ヒト大腸上皮株化細胞であるCaco-2細胞を用いてO157感染に対する酢酸の効果を調べたところ、酢酸を培地に加えるとO157が産生する病原因子の発現量に違いはないにもかかわらず、Caco-2細胞の細胞死が有意に抑制された。トランスクリプトーム解析結果から、酢酸によるマウス腸管上皮層での抗炎症応答が促進していること

が明らかになった。ビフィズス菌の比較ゲノム解析結果から、感染死を予防できるビフィズス菌は主にフルクトースを取り込むABC型の糖質のトランスポーター(ABCトランスポーター)をコードする遺伝子を有し、マウス腸管内で発現していることを明らかにした。以上の結果から、プロバイオティクスの効果の一因として、腸管内での高い糖代謝能が必要であることが示唆された。このプロバイオティック効果はプロバイオティックビフィズス菌が有するABCトランスポーター遺伝子に起因したことから、この遺伝子を対象にした評価系を構築することで、科学的根拠の明らかな新たなプロバイオティクス評価系が構築できるものと考えられた。

#### 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7件)

1. Date, Y., Nakanishi, Y., Fukuda, S., Kato, T., Tsuneda, S., Ohno, H., and Kikuchi, J.: “Development of a monitoring approach for metabolic dynamics in microbial ecosystems by stable isotope labeling technologies” *J. Biosci. Bioeng.* in press. 査読有
2. Shima, H.\*, Takatsu, H.\*, Fukuda, S., Ohmae, M., Hase, K., Kubagawa, H., Wang, J.Y., and Ohno, H.: “Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM” *Int. Immunol.* 22: 149-156 (2010) 査読有  
\*These authors contributed equally to this work.
3. Fukuda, S., Nakanishi, Y., Chikayama, E., Ohno, H., Hino, T., Kikuchi, J.: “Evaluation and characterization of bacterial metabolic dynamics with a novel profiling technique, real-time metabolotyping” *PLoS ONE* 4: e4893 (2009) 査読有
4. Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S. I., Lowe, A. W., Waguri, S., Itoh, K., Kiyono,

- H., Ohno, H.: "Uptake via Glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response" *Nature* 462: 226-230 (2009) 査読有
5. Nakato, G, Fukuda, S., Hase, K., Goitsuka, R., Cooper, DM, and Ohno, H.: "New approach for M-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis" *DNA Res.* 16: 227-235 (2009) 査読有
  6. 福田真嗣、大野博司 "腸管出血性大腸菌 O157 感染症に対するプロバイオティクスの防御効果"、腸内細菌学会誌 23:271-278 (2009) 総説 査読無
  7. Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D. J., McKay, L. L., Ohno, H., Kikuchi J., Masaoka, T., and Hattori, M.: "Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production" *DNA Res.* 15: 151-161 (2008) 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. 福田真嗣・中西裕美子・吉村和敏・伊藤喜久治・菊地淳・大野博司 "腸管出血性大腸菌 O157:H7 投与マウスモデルを用いた宿主-腸内フローラ間相互作用の解析" 第 12 回腸内細菌学会、東京、6 月 (2008)
2. Fukuda, S., Nakanishi, Y., Toh, H., Yoshimura, K., Oshima, K., Morita, H., Tobe, T., Itoh, K., Kikuchi, J., Hattori, M., and Ohno, H. "Multi-omics analysis identifies microbial metabolites to protect host from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 lethal infection" *Keystone Symposia: Innate, Adaptive and Regulatory Immune Response to Intestinal Microbiota*, Taos, Jan (2009)
3. 福田真嗣・伊達康博・加藤完・中西裕美子・近山英輔・坪井裕理・常田聡・守屋繁春・菊地淳・大野博司"複合オミックス解析による腸内環境評価系の構築" 第 13 回腸内細菌学会、東京、6 月 (2009)
4. Fukuda, S., Nakanishi, Y., Toh, H., Yoshimura, K., Oshima, K., Tobe, T., Morita, H., Itoh, K., Kikuchi, J., Hattori, M., and Ohno, H. "Multiple Omics Identified Microbial Metabolites to Protect Host from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Lethal Infection" The 8th International Workshop on Advanced Genomics, Tokyo, June (2009)
5. Fukuda, S., Nakanishi, Y., Toh, H., Yoshimura, K., Oshima, K., Tobe, T., Morita, H., Itoh, K., Kikuchi, J., Hattori, M., and Ohno, H. "Multiple Omics Identified Microbial Metabolites to Protect Host from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Lethal Infection" 14th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, July (2009)
6. Fukuda, S., Hase, K., Itoh, K., Morita, H., Ohno, H. "Multiple Omics Identified Microbial Metabolites to Protect Host from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Lethal Infection" 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、12 月(2009)
7. 福田真嗣・伊達康博・加藤完・中西裕美子・近山英輔・坪井裕理・常田聡・守屋繁春・菊地淳・大野博司"複合オミックス解析による腸内環境評価系の構築" 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 (2009)
8. Fukuda, S., Date, Y., Kato, T., Nakanishi, Y., Chikayama, E., Tsuboi, Y., Tsuneda, S., Moriya, S., Kikuchi, J., and Ohno, H. : "Gut environment assessment system based on

multiple omics approach” National Institute of Health Human Microbiome Project Research Network Meeting, Houston, January (2010)

9. 福田真嗣、大野博司 “網羅的解析手法による宿主－腸内フローラ間相互作用の解明” 第 60 回日本生物工学会、仙台 8 月 (2008) 招待講演
10. Fukuda, S. and Ohno, H. “Multi-omic analysis identifies microbial metabolites to protect host from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 lethal infection” ○A Global COE International Symposium「Systems Biology for the Young Scientists」Nagoya, Dec (2008) 招待講演
11. 福田真嗣、大野博司 “リンパ濾胞上皮層における宿主－微生物間相互作用の解析” 第 14 回Hindgut Club Japanシンポジウム、東京、12 月(2008) 招待講演
12. 福田真嗣、大野博司 “腸管出血性大腸菌O157:H7 投与マウスモデルを用いた宿主－腸内フローラ間相互作用の解析” 第 12 回日本臨床腸内微生物学会総会、岐阜 9 月(2009) 招待講演
13. 福田真嗣、大野博司 “複合オミックス解析による腸内環境評価系の構築” 第 19 回日本数理生物学会年会、東京、9 月(2009) 招待講演
14. 福田真嗣、大野博司 “腸管出血性大腸菌O157:H7 感染マウスモデルに対するプロバイオティクスの防御効果の解析” 第 83 回日本細菌学会総会、横浜、3 月(2010) 招待講演

[図書](計 1 件)

1. 福田真嗣(共著): 難培養微生物研究の最新技術Ⅱ ～ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望～ 監修 工藤俊章/大熊盛也、シーエムシー出版 (2010)

[産業財産権]  
○出願状況(計 3 件)

名称:腸管バリア機能改善剤  
発明者:福田真嗣、藤英博、服部正平、大野博司  
権利者:独立行政法人理化学研究所  
種類:特許  
番号:特願 2009-204157  
出願年月日:平成 21 年 9 月 3 日  
国内外の別:国内

名称:IgA 腎症の予測方法および IgA 腎症患者の選択方法  
発明者:長澤康行、飯尾健一郎、猪阪善隆、福田真嗣、大野博司  
権利者:国立大学法人大阪大学・独立行政法人理化学研究所  
種類:特許  
番号:特願 2009-029227  
出願年月日:平成 21 年 2 月 12 日  
国内外の別:国内

名称:原核生物、特に真正細菌の cDNA の簡易な調製方法  
発明者:守屋繁春、福田真嗣、加藤完、大野博司、菊地淳  
権利者:独立行政法人理化学研究所  
種類:特許  
番号:特願 2008-052503  
出願年月日:平成 20 年 3 月 3 日  
国内外の別:国内

[その他]

福田真嗣、大野博司 “腸内フローラと腸管免疫”  
ネスレ栄養科学会議 栄養科学トピックス  
[http://www.nestle.co.jp/science/topics/topics0912\\_2.asp](http://www.nestle.co.jp/science/topics/topics0912_2.asp)

6. 研究組織

- (1)研究代表者  
福田 真嗣(Fukuda Shinji)  
独立行政法人理化学研究所・免疫系構築研究チーム・基礎科学特別研究員  
研究者番号:80435677
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
なし