

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15438

研究課題名（和文）なぜビフィズス菌は腸内に定着できるのか？ - 腸内細菌との共生から紐解く生存戦略

研究課題名（英文）The bifidobacterial gut colonization strategies based on communication between complex symbiotic intestinal microbes

研究代表者

西山 啓太（Nishiyama, Keita）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：40756029

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌は芳香族アミノ酸を様々な物質に変換し、宿主の生理状態に多くの影響を及ぼすことが知られている。本研究では、BacteroidesとLactobacillusの協調的代謝から産生される芳香族アミノ酸の代謝産物AAAがBifidobacteriumの線毛の発現を誘導し腸内定着を促進することを見出した。本知見は、腸内細菌が産生する特定の代謝産物がBifidobacteriumの腸管定着を制御するシグナル分子として作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bifidobacteriumはヒト消化管に生息する共生細菌であり宿主の腸内環境の恒常性維持に密接に関わる。しかし、どのようにしてビフィズス菌はヒト腸内に定着できるのかという疑問に対して不明な点が多い。本研究では、ビフィズス菌の腸管定着因子である線毛発現を誘導する代謝産物AAAを産生する腸内細菌を同定し、ビフィズス菌とこれらの細菌との共生により腸内定着が促進されること、さらにAAAは病原性細菌の生育を抑制する、興味深い共生関係を見出した。これらは、ビフィズス菌の新たな腸内定着機構を明らかにしたと共に、ヒト腸内細菌叢の形成と維持の理解に向けた知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The gut microbiome converts aromatic amino acids to several metabolites that potentially regulate biological processes. Here, we show that metabolite 'AAA', produced by intestinal bacteria, upregulates the gene expression of fimbriae of Bifidobacterium, thereby dynamically inducing fimbriae elongation. AAA promoted the intestinal colonization of commensal bacteria, and inhibited the growth of gram-negative pathogenic bacteria through cell membrane disruption. Furthermore, we found that AAA was produced by metabolic exchange between two bacterial species, Bacteroides and Lactobacillus. This study revealed that AAA can act as a signaling molecule that significantly modulates bacterial colonization in the intestine. These findings demonstrate the existence of AAA-mediated trans-species dialogue between microorganisms and provide new insights into understanding the formation and maintenance of human gut microbiota.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 ビフィズス菌 共生 代謝産物 定着

1. 研究開始当初の背景

Bifidobacterium 属細菌 (ビフィズス菌) は、乳児から成人の大腸に生息する共生細菌であり、宿主腸内環境の恒常性維持に密接に関わる。しかし、どのようにしてビフィズス菌はヒトの腸内に定着し、棲み続けることができるのか、という疑問に対して明確な答えは得られていない。我々は、腸内細菌の産生する代謝産物を介した共生機構に着目し、ヒト便培養液からビフィズス菌の腸内定着因子である線毛の形成を誘導する芳香族アミノ酸 AAA を同定した。さらに AAA は、腸内細菌科に属する病原細菌の増殖を抑制した。すなわち AAA は、ビフィズス菌の線毛を介した定着を促進し、病原菌の生育を抑制するという、ビフィズス菌が AAA 産生菌との共生により獲得した新たな定着機構の存在が推察された。

2. 研究の目的

本研究では、AAA 産生菌とビフィズス菌の共生関係に着目し、*Bifidobacterium longum* の腸内定着における分子機構理解のため、以下に示す2つの課題を達成することを目的とした。

課題1 : AAA 産生菌を同定し、AAA 産生菌による *B. longum* の線毛誘導現象を *in vitro* で証明する。

課題2 : 無菌マウスを用いて AAA 産生菌が *B. longum* の腸内定着に及ぼす影響を評価する。さらに、*Salmonella* Typhimurium 感染に対する AAA 産生菌の感染抑制効果を確認する。

3. 研究の方法

課題1 : AAA 産生菌として一部の *Clostridium* 属細菌が報告されているが、我々が AAA の分離・同定に用いた便培養液からこれらの細菌は検出できなかった。したがって、新たな AAA 産生菌が存在すると仮定した。そこで、腸内細菌 50 菌株を単独または混合培養した培養菌液を LC-MS に供し、AAA を産生する菌株またはその組み合わせについて検討した。さらに、AAA 産生菌の代謝産物情報を手がかりに、物質の代謝変換に関わる酵素の同定と遺伝子破壊株の作出を試みた。

課題2 : AAA 産生菌と *B. longum* を無菌マウスに投与することで、AAA 産生菌が *B. longum* の線毛発現に及ぼす影響を電子顕微鏡及びウエスタンブロットングにより確認した。さらに、*B. longum* のマウス消化管における定着性を qPCR 及び FISH 法により検討した。

AAA は酢酸などの短鎖脂肪酸と組み合わせることで、グラム陰性病原細菌に対して抗菌作用を発揮することが分かっている。そこで、AAA 産生菌と *B. longum* を投与したマウスに *S. Typhimurium* を感染させ、これらの細菌による *S. Typhimurium* 感染の予防効果についても評価した。

4. 研究成果

課題1 : 腸内細菌 50 菌株を単独培養したところ、4 菌株で AAA 産生が確認できたが、いずれも既知の AAA 代謝経路を有するものであった。一方、これらの菌を除いた 46 菌株を混合培養すると AAA 産生が確認できたことから (図 1A)、複数菌種の代謝交換により AAA が産生されると考えた。そこで、*Bacteroides* をベースに各菌種を組み合わせ、AAA 産生を評価した結果、*Bacteroides* と Firmicutes (主に *Lactobacillus* [Lac]) の共培養により AAA 産生が確認できた (図 1B)。また、LC-MS による代謝産物解析から、phenylalanine を基質としてこれら 2 菌種の連続代謝により AAA が作られること、さらに *Bacteroides* [Bac] の有する Phenylalanine の変換に関わる酵素 PA の遺伝子破壊株を作製した。Bacwt/Lac と *B. longum* を共培養すると、線毛の伸長が確認され、一方で Bac ΔPA 株では確認されなかった。以上より、新たな AAA 産生菌を同定することができた。

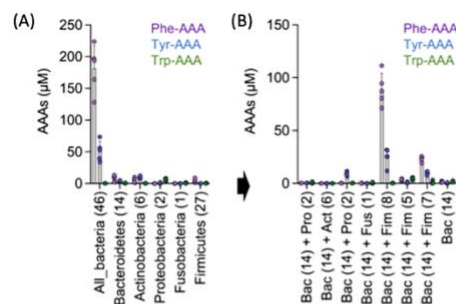


図1. 腸内細菌の培養液におけるAAA産生評価

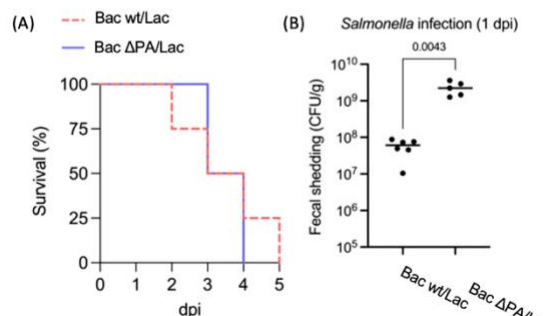


図2. *Salmonella* Typhimurium のマウス感染試験

課題2: Bac/Lac を無菌マウスに投与したところ、Bacwt/Lac 群では糞便中から AAA が検出されたが、Bac Δ PA/Lac 群では検出されなかった。続いて、これらのマウスに *B. longum* を投与し、一週間後に線毛発現を確認すると、Bac/Lac 群では強い線毛シグナルが検出された。さらに Bac Δ PA/Lac 群と比較し Bacwt/Lac 群では大腸粘液に多くの *B. longum* が接着する様子が確認できた。

次に、Bac/Lac 投与マウスに *S. Typhimurium* を感染させたところ、マウスの生存率に関しては、両群で顕著な差は見られなかったが (図 2A)、感染後1日目の糞便中の *S. Typhimurium* 菌数は、Bac Δ PA/Lac 群と比較し Bac/Lac 群において有意に低い菌数であることが確認できた (図 2B)。

以上より、AAA 産生菌を同定できたとともに、*B. longum* の AAA 産生菌との共生を介した定着機構を明らかにし、立案した目的(課題1及び2)を概ね達成できたと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishiyama K, Takaki T, Sugiyama M, Fukuda I, Aiso M, Mukai T, Odamaki T, Xiao JZ, Osawa R, Okada N.	4. 巻 17;86
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Produced by Bifidobacterium longum Export Mucin-Binding Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Appl Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e0146420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.01464-20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama K, Yokoi T, Sugiyama M, Osawa R, Mukai T, Okada N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Roles of the Cell Surface Architecture of Bacteroides and Bifidobacterium in the Gut Colonization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 754819
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.754819.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yokoi T, Nishiyama K, Kushida Y, Uribayashi K, Kunihara T, Fujimoto R, Yamamoto Y, Ito M, Miki T, Haneda T, Mukai T, Okada N.	4. 巻 35581157
2. 論文標題 O-acetyltransferase activity of Bifidobacterium bifidum sialidase facilitates the liberation of sialic acid and encourages the proliferation of sialic acid scavenging Bifidobacterium breve	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environ Microbiol Rep.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1758-2229.13083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 糖鎖を介した腸内細菌と宿主のクロストーク
3. 学会等名 第22回比較グライコーム研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 細菌の共生から紐解く腸内細菌の消化管定着
3. 学会等名 第32回日本薬学会生物系薬学部会 微生物シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 腸内細菌が産生する代謝産物から紐解く細菌の共生機構
3. 学会等名 日本生物工学会東日本支部 賀詞交換会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 腸内細菌の相互作用を司る代謝産物から紐解くビフィズス菌の消化管定着
3. 学会等名 ビフィズス菌研究会設立記念第1回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keita Nishiyama
2. 発表標題 Bacterial-surface architecture and host colonization
3. 学会等名 The 11th Asian Conference for Lactic Acid Bacteria (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 Bifidobacteriumの消化管定着に寄与する細胞表層構造物の役割
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山啓太
2. 発表標題 Bacterial-surface protein and gut colonization
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関