

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 6 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25712032

研究課題名(和文)神経伝達物質により増殖促進する乳酸菌の機構解明と新概念ニューロバイオティクス提唱

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of growth stimulation of lactic acid bacteria by neurotransmitter and proposal for the novel concept of neurobiotics

研究代表者

遠野 雅徳 (Tohno, Masanori)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・飼養管理技術研究領域・主任研究員

研究者番号：50547718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経伝達物質により増殖促進する乳酸菌の増殖促進機構の解明を目指した。ゲノム解読に成功した*Lactobacillus hokkaidonensis*、*L. plantarum*及び*L. buchneri*等の供試株のゲノムには、本機構への関与が考えられるTwo-component systems関連の遺伝子が複数個見られた。選抜乳酸菌株で発酵させた発酵飼料を牛個体に給与した結果、乳酸菌添加区においてのみルーメン内に*Lactobacillus*属が検出され、16S rRNA遺伝子コピー数の有意な上昇を認めた。今後、本乳酸菌の活用により、消化管内細菌叢悪化を予防・改善する機能性食品・飼料の創成が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanisms of growth stimulation of lactic acid bacteria by neurotransmitter, namely neurobiotics. The genome DNA of neurobiotics belonging to the genus *Lactobacillus* species, such as *Lactobacillus hokkaidonensis*, *L. plantarum* and *L. buchneri* contains several genes associated with the bacterial two-component systems. After feeding with a diet including certain neurobiotics for cows, rumen samples were collected and applied to the metagenomic analysis based on bacterial 16S rRNA genes. Metagenomic data from rumen samples clearly showed that the genus *Lactobacillus* was detected only in the rumen samples from cows with a neurobiotic diet, and that the copy numbers of 16S rRNA genes were significantly increased in the samples. This could contribute to the production of new functional foods and feeds with useful abilities such as maintenance of intestinal microflora.

研究分野：農学

キーワード：微生物 畜産学 乳酸菌 ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

プロバイオティクスは、乳酸菌に代表される有益微生物として発展と進化を続けている。プロバイオティクスとも馴染みの深いヨーグルト市場規模は、3,000 億円以上 (2011 年、日本) であり、ヨーロッパではその3倍以上にもなる。免疫バイオティクス (immune + probiotics) とは、プロバイオティクスの有益作用の中でも、免疫系との相互作用に着目して提唱された概念であり、増加するアレルギーや自己免疫疾患の解決策として期待されている (Clancy, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003)。

2011 年 6 月、Kennedy らにより、「現在、都会に住む人の割合は 50% であるが、2050 年には 70% に達することで多くの社会的ストレスが増大し、鬱・不安神経症・統合失調症等の罹患者が激増する」との世界的な研究予測が *Nature* 誌に報告された。

内閣府の国民生活に関する世論調査 (H21 年 8 月) によると、7 割弱の人が「日常生活での悩みや不安を感じる」と回答している。

また、2011 年 7 月、厚労省は医療計画基本方針内の既存の四大疾病に、精神疾患を加えて「五大疾病」とする方針を決定した。

さらに近年、過敏性腸症候群 (通称 IBS) などの機能性消化管障害の罹患者率は、日本を含む先進国で成人の 11~20% に激増しており、消化器診療中、最大頻度となっている (Matsue, *J. Intest. Microbiol.*, 2010)。本疾病の原因として、ストレスによる脳腸相関を介した機能異常や腸内細菌叢の悪化が指摘されており、ストレスを抱える現代において、これらの諸問題に対する解決策の提示が必要不可欠であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、乳酸菌と腸管神経との相互作用という新たな切り口により、「ニューロバイオティクス (neuro + probiotics)」提唱とその応用に向けた先駆け研究を展開する。

これまでの研究において、生体のストレス応答時に腸管内の神経末端より放出されるカテコールアミン系の神経伝達物質 (アドレナリン等) やその代謝産物を認識し増殖促進する乳酸菌株を発見している。本発見は、ヒトを含む高等生物の“神経伝達物質”が、「微生物と宿主生物」という異なる生物界間を繋ぐ“情報交換物質”として、乳酸菌などの原核生物に対して作用している事を示唆しているが、その詳細メカニズムは未解明である。

一方、大腸菌 O157 等においても、本神経伝達物質による増殖促進作用が認められ (Freestone *et al.*, *BMC Microbiol.*, 2007)、ストレス応答による腸内細菌叢の悪化原因の一端とされ始めており、研究の必要性とともに、本着眼点の研究競争が激化

している。

本研究は、世界に先駆けて、乳酸菌と神経系との相互作用機構の解明を目指す。応用例として、腸管神経におけるストレス応答時に、有害細菌に対して競合阻害的に優先増殖することにより、腸内細菌叢改善に寄与する乳酸菌素材の開発も見据えている。

また、カテコールアミン系化合物は、植物体内にも存在しており、各種ホルモン様作用を有する。以上のことから、これらの植物由来カテコールアミン系化合物の利用をも狙った家畜向け発酵飼料添加剤としての活用も目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳酸菌の分離

新規ニューロバイオティクスとしての活用を見据えて、ヒトや家畜に対して有効なプロバイオティクスや飼料添加剤向けの各種乳酸菌を分離し、生理・生化学的性状解析及び 16S rRNA 遺伝子塩基配列解析により、分離菌株の同定を行った。

### (2) 神経伝達物質及び関連物質添加による増殖活性試験

生体腸管内環境をより反映する培地 (Serum-SAPI 培地) (Freestone *et al.*, *BMC Microbiology*, 1999) を乳酸菌用に改変し供試した。乳酸菌の増殖をコロニー計数、濁度および培養液 pH 測定により解析した。すべての実験を 3 連で実施し、独立した実験として 3-9 回繰り返した。GraphPad PRISM (Prism software) により、得られたすべてのデータを統計解析した。

### (3) ゲノム解析

各種供試菌株よりゲノム DNA を調製後、PacBio RS (Tomy Digital Biology) 及び Miseq (Illumina) によりシーケンシングを行った。PacBio RS により得られたリードは、HGAP 法 (Chin *et al.*, *Nature Method*, 2013) によりアセンブリした。

### (4) 乳酸菌 IWT192 株添加稲ホールクロップサイレージ (WCS) の乳牛への給与試験

ルーメンフィステル装着ホルスタイン種乾乳牛 (n=3) に、たちすずか稲 WCS (無添加、対照 SP 株添加及び IWT192 株添加、冬期を含む 6 ヶ月間ロールベール貯蔵)、稲わら及び大豆粕より構成される餌を 11 日間給与した。継続給与後、最終日の朝給餌前 (8:30) 及び朝給餌 2 時間半後 (11:30) に採血とルーメン液のサンプリングを定法に従って実施した。血液成分解析は定法に従って実施した。ルーメン液より微生物由来 DNA を物理的破碎法と酵素法の組み合わせ

せにより調製し、得られた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンを Roche 454 (Roche) による次世代シーケンサにより菌叢解析した。ルーメン細菌由来 16S rRNA 遺伝子を指標としてルーメン細菌量をリアルタイム PCR 法により定量解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 乳酸菌の分離

*Lactobacillus* 属及び *Aerococcus* 属新種乳酸菌を発見し、それぞれ *Lactobacillus silagei*, *L. backii*, *L. iwatensis*, *L. mixtipabuli* 及び *Aerococcus vaginalis* と命名した。今後、これらの新種分離株のニューロバイオティクスとしての活用が期待された。

##### (2) 神経伝達物質及び関連物質添加による増殖活性試験

カテコールアミン系神経伝達物質であるノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパ及びドーパミン添加により、*L. plantarum* T01002 株の増殖が促進されることが確認された (図 1)。これらの神経伝達物質の前駆体アミノ酸であるチロシンには増殖促進効果は認められなかった (図 1)。一方、同種異株である T01009 株、T01015 株及び T01033 株には同促進作用が認められず、菌株間における多様性が認められた。また、*L. hokkaidonensis* 及び *L. buchneri* 供試株においても同促進作用が認められた (図未掲載)。以上のことから、ニューロバイオティクスとしての乳酸菌株の選抜とその機能機構解明が極めて重要であることが考えられた。

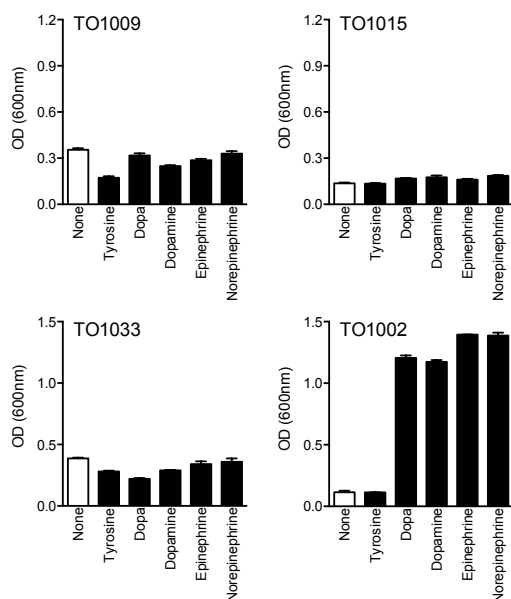


図 1. Norepinephrine, Epinephrine, L-dopa, dopamine および L-tyrosine の各種 *L. plantarum* 供試株に対する増殖促進活性。

供試株を 100 $\mu$ M の各種物質を含む培地中で 36 時間、37 $^{\circ}$ C、嫌気条件下で培養し、培養後の培養液の濁度を測定した。

##### (3) ゲノム解析

Miseq によるゲノム解読後の *de novo* assembly により、ニューロバイオティクスである *L. plantarum* T01000, T01001 及び T01003 株のドラフトゲノムの構築に成功した (図未掲載)。また、菌種間パンゲノム解析への活用が有効と考えられた *L. hokkaidonensis* LOOC260<sup>T</sup> 株由来ゲノムの PacBio RS によるゲノム解読により、本菌株は、1 本の完全環状ゲノム染色体 (2,277,985 bp) 及び 2 本のプラスミド (81,630 bp 及び 40,971 bp) を有することが明らかとなった (図 2)。同様の PacBio RS によるゲノム解読により、T01002 株が 1 本の完全環状ゲノム染色体と 2 本のプラスミドを有することが明らかとなった (図未掲載)。

この他、*L. oryzae*, *W. oryzae* 及び *L. buchneri* 各種供試株のドラフトゲノム解読にも成功した (図未掲載)。これらのデータにより、本反応性の異なる菌株間のゲノム比較解析が可能となった。

ゲノム解読に成功した *L. hokkaidonensis*, *L. plantarum* 及び *L. buchneri* 等の供試株のゲノムには、本機構への関与が考えられる Two-component systems 関連の遺伝子が複数個見られた。

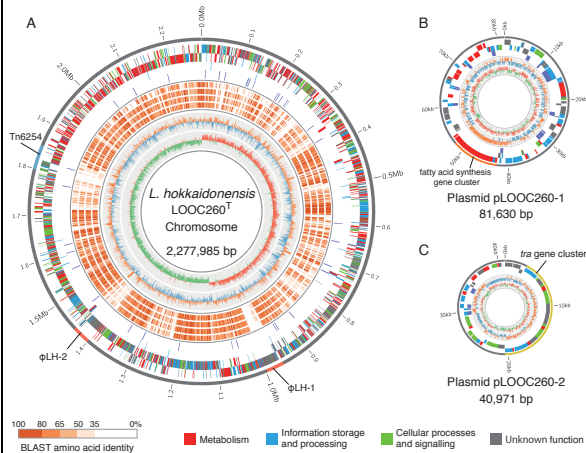


図 2. 菌種間パンゲノム解析のための *L. hokkaidonensis* LOOC260<sup>T</sup> 株の完全染色体ゲノムとプラスミドアトラス。(A) 完全環状染色体、(B) プラスミド pLOOC260-1 及び (C) プラスミド pLOOC260-2。

##### (4) 乳酸菌 IWT192 株添加飼料 WCS の乳牛への給与試験

実験区間のルーメン内 pH (8:30:約 7.0, 11:30:約 6.0) 各種有機酸含量並びに各種血液学的・生化学的検査結果に統計学的に

有意な違いは認められなかった(図未掲載)。

Phylum レベルのルーメン細菌叢解析により、各実験区で顕著な相違は認められなかったが(図 3)、全リードをベースとした OTU 主成分解析により、各処理区間でのプロット結果に若干の違いが見られた(図 4)。

さらに genus レベルでの検討の結果、主要な *Prevotella* 属等に違いは認められなかったが、IWT192 株添加稲 WCS 給与区においてのみ *Lactobacillus* 属が検出された(図 5)。最終日朝給与前の IWT192 株添加稲 WCS 給与区において、16S rRNA 遺伝子コピー数が有意に上昇していた(図 6)。

以上のことから、IWT192 株添加稲 WCS 給与により、ルーメン内細菌叢に劇的な変化は誘導されず、生理学的に安定なルーメン環境が担保される一方で、*Lactobacillus* 属が特徴的に検出されることから、ニューロバイオティクスである本株給与後の生育・生存動態に興味を持たれた。

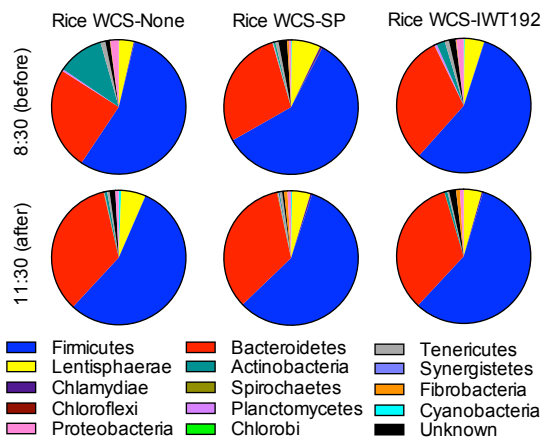


図 3. 調製処理の異なる稲 WCS 給与後の phylum レベルでのルーメン細菌叢解析. None(無添加区)、SP(SP 株添加区)、IWT192(IWT192 株添加区)。

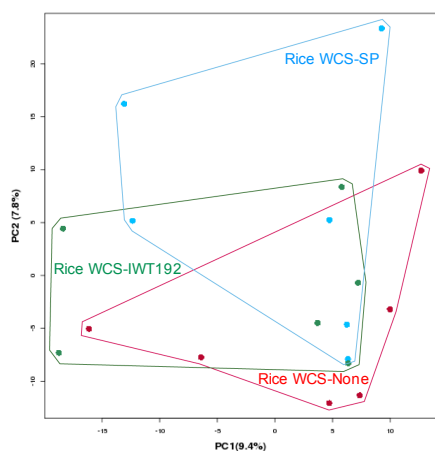


図 4. 調製処理の異なる稲 WCS 給与後のルーメン細菌叢 OTU 主成分解析。実験区は図 1 を参照。

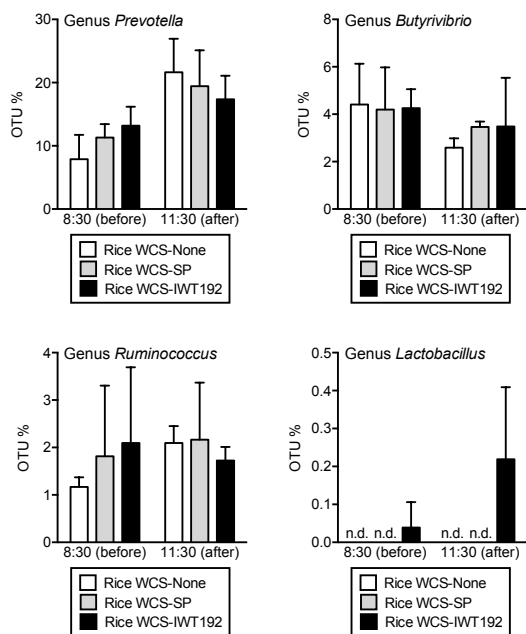


図 5. 調製処理の異なる稲 WCS 給与後の genus レベルでのルーメン細菌叢解析。実験区は図 1 を参照。

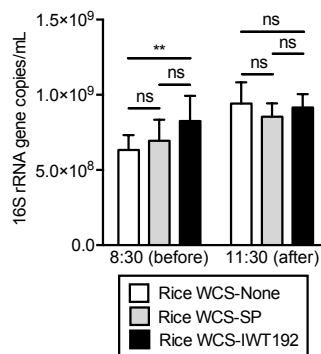


図 6. 調製処理の異なる稲 WCS 給与後のルーメン細菌叢由来 16S rRNA 遺伝子定量解析。

## 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 Y. Tanizawa, M. Tohno, E. Kaminuma, Y. Nakamura, M. Arita, Complete genome sequence and analysis of *Lactobacillus hokkaidonensis* L00C260(T), a psychrotrophic lactic acid bacterium isolated from silage, *BMC Genomics*, 16, 240, 2015, 査読有。
- ② M. Tohno, M. Kitahara, T. Irisawa, H. Ohmori, T. Masuda, M. Ohkuma, K. Tajima, *Lactobacillus mixtipabuli* sp. nov. isolated from total mixed ration silage, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1981-1985, 2015, 査読有。
- ③ Y. Tanizawa, T. Fujisawa, T. Mochizuki,

E. Kaminuma, Y. Nakamura, M. Tohno, Draft Genome Sequence of *Lactobacillus oryzae* Strain SG293T, *Genome Announcements*, 2, e00861-14, 2014, 査読有.

④ Y. Tanizawa, T. Fujisawa, T. Mochizuki, E. Kaminuma, Y. Suzuki, Y. Nakamura, M. Tohno, Draft Genome Sequence of *Weissella oryzae* SG25T, Isolated from Fermented Rice Grains, *Genome Announcements*, 2, e00667-14, 2014, 査読有.

⑤ M. Tohno, M. Kitahara, S. Matsuyama, K. Kimura, M. Ohkuma, K. Tajima, *Aerococcus vaginalis* sp. nov., isolated from the vaginal mucosa of a beef cow, and emended descriptions of *Aerococcus suis*, *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinaeequi*, *Aerococcus urinaehominis*, *Aerococcus urinae*, *Aerococcus christensenii* and *Aerococcus sanguinicola*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1229-1236, 2014, 査読有.

⑥ M. Tohno, M. Kitahara, T. Irisawa, T. Masuda, R. Uegaki, M. Ohkuma, K. Tajima, *Lactobacillus silagei* sp. nov., isolated from orchardgrass silage, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4613-4618, 2013, 査読有.

⑦ M. Tohno, M. Kitahara, T. Irisawa, T. Masuda, R. Uegaki, M. Ohkuma, K. Tajima, Description of *Lactobacillus iwatensis* sp. nov., isolated from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) silage, and *Lactobacillus backii* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3854-3860, 2013, 査読有.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：新規飼料添加用乳酸菌  
発明者：遠野雅徳、河野幸雄、福馬敬紘、北村亨、本間満  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許願 2015-256307 号  
出願年月日：平成 27 年 1 月 28 日  
国内外の別：国内

名称：新規飼料添加用乳酸菌  
発明者：遠野雅徳、河野幸雄、福馬敬紘、北村亨、本間満  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許願 2016-226916 号

出願年月日：平成 28 年 1 月 22 日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://nilgs.naro.affrc.go.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠野 雅徳 (TOHNO MASANORI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門・飼養管理技術研究領域・主任研究員

研究者番号：50547718