

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06384

研究課題名(和文) 神経伝達物質を増殖因子とする乳酸菌の宿主ストレス下における有効性とその挙動解明

研究課題名(英文) Efficacy and behavior of lactic acid bacteria using neurotransmitters as growth-promoting factors under host stress

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・遺伝資源研究センター・上級研究員

研究者番号：50547718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス性神経伝達物質により増殖促進する乳酸菌を活用し、ストレス応答による腸内細菌叢の悪化等を予防・改善する機能性飼料・食品の創成を目指すことを目的とした。本乳酸菌の新規培養法と飼料ペレット製造法の検討を実施した。本増殖促進作用を示した乳酸菌L00C82株の全ゲノム解読を完了した。L00C82株給与により、マウスにおけるストレス誘発性の行動失調の改善が認められた。L00C82株給与後の腸内細菌叢解析より、L00C82株自身やL00C82株投与によって連鎖的に影響を受ける細菌グループを含む腸内細菌叢の変化が誘導されることにより、L00C82株によるマウスの巣作り行動が促進されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウィズコロナやポストコロナの時代に突入し、「世界的なストレス社会」の到来が大きな課題となりつつある。この課題に対して、独自に発見したストレス性神経伝達物質により増殖促進する有益な乳酸菌が、解決の一助になると考え研究を実施した。すなわち、ストレス時に腸管神経系から神経伝達物質が放出された際に、それに応じて増殖できる有益乳酸菌を食生活を通じて摂取することで、腸内細菌叢バランスの悪化を防ぐコンセプトである。本研究の成果は、ストレス関連の社会課題の解決に向けて基礎的な知見となるだけでなく、腸内細菌叢の変化がストレス誘発性の行動失調の改善に繋がる点を明らかにした点に学術的価値を見いだせる。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to establish a new concept of functional feeds and foods that prevent and improve the deterioration of intestinal microflora due to stress response by using beneficial lactic acid bacteria whose growth is promoted by neurotransmitters. We developed a new culture method of lactic acid bacteria and a feed pelleting process. The whole genome sequence of the strain L00C82 was successfully obtained, leading the knowledge that the stress-induced behavioral ataxia can be expected to be improved by the strain. The analysis of the intestinal microflora after feeding the strain L00C82 suggested that changes in the intestinal microflora, including L00C82 itself and some bacterial groups that are affected by L00C82 administration, may promote nest building behavior by the strain L00C82.

研究分野：畜産草地学、微生物学

キーワード：乳酸菌 心理社会的ストレス 機能性飼料 機能性食品

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

権威ある学術雑誌である Nature 誌に「2050 年、多くの社会的ストレスが増大し、うつ病・不安神経症・統合失調症等の罹患者が激増する」との予測が報告された⁽¹⁾。同年、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ている。内閣府の世論調査(令和元年 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。まさに、「世界的なストレス社会」の到来が大きな課題となりつつある。

2. 研究の目的

ストレス性神経伝達物質により増殖促進する有益な乳酸菌を研究の柱として、第 2 の脳と呼ばれる腸管神経系とプロバイオティック乳酸菌の関係を追究し、ストレス応答による腸内細菌叢の悪化等を予防・改善する新発想の機能性飼料・食品の創成を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物体内において、ストレス性神経伝達物質として生理的作用を発揮しているカテコールアミンやその代謝産物であるグアイアコール化合物を乳酸菌の培養液中に添加した際に、顕著に増殖促進する乳酸菌を選抜した。当該乳酸菌を生産現場に応用するための新規培養法の開発と当該乳酸菌を含む新飼料を設計した。本技術の応用場面として、食品だけでなく家畜飼料も想定されるため、動物素材フリーの最適な培養液条件を検討した。すわなち、飼料への応用の場合、飼料自体やその製造過程における動物素材の利用が法令等で禁止されているケースへの対応を見据えた。

(2) 乳酸菌のゲノム解析のため、PacBio 社製 sequel シークエンサにより continuous long read モードによるロングリード配列を得た後、Tracycler⁽²⁾を用いてゲノムアセンブリを行った。Illumina 社製 novaseq6000 シークエンサにより得られたショートリード配列を用いて研磨し、完全長かつ品質の高いゲノム配列の構築を目指した。作成されたゲノム配列を Bakta⁽³⁾によりアノテーションし、詳細なゲノム情報の取得を目指した。本ゲノム配列を用いた細菌の系統解析は、fastANI 法⁽⁴⁾により実施した。

(3) ストレス曝露下のマウスに当該乳酸菌を含む固形飼料を摂取させた場合の飼料摂食量と体重への影響を調べた。飼料中に含まれる乳酸菌数を 1×10^8 CFU/g に設定した。供試動物として BALB/cAJcl (日本クレア)、オス、7 週齢(試験開始時)を用いた。試験群は①対照群 (AIN-93G 飼料のみ) 5 頭、②L00C82 株添加群 (AIN-93G 飼料+L00C82 株) 5 頭、③T01002 株添加群 (AIN-93G 飼料+T01002 株) 6 頭を個別飼育した。試験期間中、事前給与期間は 10 日間とし、行動試験期間も同様の飼料を給与した。行動試験(ストレス曝露)としては、社会行動試験⁽⁵⁾(11 日目)、オープンフィールド試験(12 日目)⁽⁵⁾、強制水泳試験⁽⁵⁾(13 日目)を行った。

(4) マウスに当該乳酸菌を含む固形飼料を摂取させた場合の行動への影響を調査した。飼料中に含まれる乳酸菌数を 1×10^8 CFU/g に設定した。供試動物として、C57BL/6JJcl (B6) マウス、オス、3 週齢(試験開始時)を用いた。試験群は①対照群 (AIN-93G 飼料のみ) 8 頭、②L00C82 株添加群 (AIN-93G 飼料+L00C82 株) 8 頭、③T01002 株添加群 (AIN-93G 飼料+T01002 株) 9 頭を個別飼育した。試験期間中、事前給与期間は 10 日間とし、行動試験期間も同様の飼料を給与した。行動試験として、巣作り行動試験⁽⁶⁾(10~11 日目)を実施した。巣材投入から 1~9 時間および 23 時間後における各区のネストスコアに対して、統計解析を実施した(一元配置分散分析、事後検定 Bonferroni 法)。L00C82 株添加群に水頭症が疑われる個体が一頭いたためその個体のデータは除外した。尚、すべての動物実験は、茨城大学動物実験委員会の指針に基づき、同委員会の承認(承認番号: 21070)を得て行った。

(5) L00C82 株給与後の盲腸内容物の 16S rRNA メタゲノム解析を実施した。盲腸内容物から DNA を抽出後、Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index V2 Kit (Illumina 社)によりライブラリ調製した。Miseq シークエンサ (Illumina 社)によるシークエンス解析を行い、paired-end リードを取得した。SILVA_v138_2019_12_16 (BLAST)をデータベースとした QIIME2 による多様性解析を実施した。相対量に有意差のある菌を検出するために Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) 解析を実施した。

4. 研究成果

(1) ストレス性神経伝達物質によって顕著に増殖促進する乳酸菌として、L00C82 株と T01002 株を本実験に供試した。一般的な市販の培養液中に用いられる動物由来窒素源等を使用しない条件において、生産効率とコストを維持したまま大量培養する技術を確立した。大量培養後にも、高い生菌レベルを維持したまま常温運搬が可能な菌体粉末として、ハンドリングに優れた資材

化にも成功した。通常、飼料ペレット化の際には、乳酸菌の生存率を著しく低下させる高温処理が施される場合がある。この問題を解決すべく、当該乳酸菌を生菌のまま飼料ペレットに組み込むためのペレット形成処理の最適条件を見出した。これらの知見は、本乳酸菌を食品や飼料に活用する上で重要である。

(2) 供試乳酸菌 2 株のうち、特に効果の高かった L00C82 株についてゲノム解読を実施した。本ゲノム配列を用いた average nucleotide identity (ANI) 法による系統解析により、L00C82 株ゲノムは *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* 基準株である DSM 5622^T 株ゲノムと ANI 値 98.41% を示した。以上のことから、L00C82 株は *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* であることが明らかとなった。L00C82 株のゲノムサイズは 3,025,747 bp であり、GC 含量は 46.3% であった。染色体ゲノムに加えて、2 つのプラスミド DNA を有することを明らかにした。合計 2,833 個の構造遺伝子が同定され、抗生剤耐性マーカー遺伝子は認められなかった。以上のことから、本増殖促進作用を解明する上で有用なゲノム情報基盤の構築に成功した。

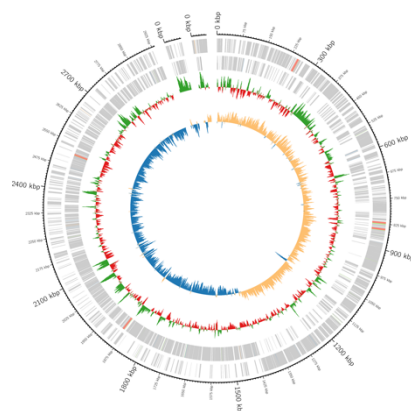


図1 L00C82 株の環状ゲノムマップ概要

(3) 行動試験期間（ストレス負荷期間：11 日目～13 日目）において、L00C82 株添加群および T01002 株添加群のいずれにおいても、対照群と比べて、摂食量が有意に増加していた。試験 14 日間の各群の増体重を比較したところ、有意差は見られなかったものの、L00C82 株および T01002 株添加群のいずれにおいても、対照群と比べて、最終増体重に増加傾向がみられた（図非掲載）。以上のことから、L00C82 株および T01002 株は、行動試験中のストレスにより生じた増体重の低下を抑制する可能性が示唆された。

(4) 巣作り行動試験において、巣材をケージに投入してから 1 時間後については、3 群間で統計的な有意差は認められなかったが、乳酸菌添加群は 2 群ともネストスコアの若干の上昇傾向が示唆された。巣材をケージに投入してから 6 時間後、L00C82 株添加群は対照群と比較し、ネストスコアが有意に高かった ($p=0.0068$)。対照群と T01002 株添加群間で、統計的な有意差は認められなかった ($p=0.6936$)。巣材をケージに投入してから 23 時間後には、3 群間で統計的な有意差は認められなかった。巣作り行動の低下は、易疲労性または気力の減退の指標であり⁽⁷⁾、統合失調症モデルマウスにおいて本行動の障害が認められている⁽⁸⁾。また、マウスに社会的敗北ストレスを暴露すると巣作り行動が遅延し、巣作りの遅れと社会的忌避行動の間には弱い正の相関があることが知られている⁽⁹⁾。さらに、巣作り行動は目標指向行動や内発的動機の指標となることが報告されている⁽¹⁰⁻¹²⁾。以上のことから、L00C82 株給与により、ストレス誘発性の行動失調の改善が期待できる。今後はモデル動物を対象とした非臨床試験だけでなく、家畜などの大型動物やヒト介入試験などでエビデンスを得る必要がある。

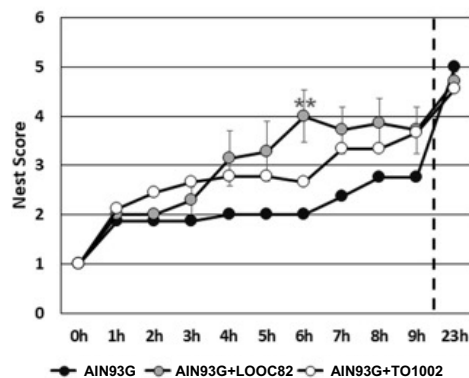


図2 L00C82 株給与によるマウスの巣作り行動への影響

(5) L00C82 株給与後の盲腸内容物の 16S rRNA メタゲノム解析の結果、対照群では、*Bacteroidaceae* 科、*Erysipelatoclostridiaceae* 科、*Bacteroides* 属、*Erysipelatoclostridium* 属で有意に存在量が多かった。一方、L00C82 株添加群では、幾つかの uncultured_bacterium の有意な増加に加えて、*Firmicutes* 門、*Lactobacillales* 目、*Streptococcaceae* 科、*Lactococcus* 属、*Dorea* 属、*Muribaculum* 属、*Lactococcus lactis* 種、*Lactobacillus casei* 種、*Muribaculum intestinale* 種などのグループで有意な存在量の増加を認めた。参照データベース (SILVA) に登録されている *Lactobacillus casei* と L00C82 株が属する *Lactocaseibacillus paracasei* (旧名 *Lactobacillus paracasei*) は、系統学的に近縁なカゼイグループとされており、L00C82 株が盲腸内に到達し検出可能なレベルになっていることが考えられた。L00C82 株投与によって、他の細菌グループの存在量が影響を受けることも明らかとなったことから、L00C82 株自身や L00C82 株投与によって連鎖的に影響を受ける細菌グループを含む腸内細菌叢の変化によって、L00C82 株による巣作り行動が促進されると考えられた。



図3 LOOC82 株給与後のマウス盲腸内容物の16S rRNA メタゲノム解析。(左) クラドグラム図 (右) LeFSe 解析。

<引用文献>

- (1) Abbot A., Stress and the city: Urban decay, *Nature*, 490(7419), 162-164, 2012.
- (2) Wick RR. et al., Trycycler: consensus long-read assemblies for bacterial genomes, *Genome Biol.*, 22(1), 266, 2021.
- (3) Schwengers O. et al., Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification, *Microb. Genom.*, 7(11), 000685, 2021.
- (4) Jain C. et al., High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries, *Nat. Commun.*, 9(1), 5114, 2018.
- (5) Goto T. et al., Subchronic and mild social defeat stress accelerates food intake and body weight gain with polydipsia-like features in mice, *Behav. Brain Res.*, 270, 339-348, 2014.
- (6) Otabi H. et al., Subchronic and mild social defeat stress alter mouse nest building behavior, *Behav. Processes*, 122, 21-25, 2016.
- (7) 辻ら、一般行動および抑うつ様行動の評価法、*日薬理誌*、130、97-104、2007.
- (8) Takao K. et al., Deficiency of Schnurri-2, an MHC Enhancer Binding Protein, Induces Mild Chronic Inflammation in the Brain and Confers Molecular, Neuronal, and Behavioral Phenotypes Related to Schizophrenia, *Neuropsychopharmacology*, 38, 1409-1425, 2013.
- (9) Otabi H. et al., Assessment of nest building and social interaction behavior in mice exposed to acute social defeat stress using a three-dimensional depth camera, *Anim. Sci. J.*, 91(1), e13447, 2020.
- (10) Yoshida K. et al., Chronic social defeat stress impairs goal-directed behavior through dysregulation of ventral hippocampal activity in male mice, *Neuropsychopharmacology*, 46, 1606-1616, 2021.
- (11) Yamada C. et al., Peptide YY Causes Apathy-Like Behavior via the Dopamine D2 Receptor in Repeated Water-Immersed Mice, *Mol. Neurobiol.*, 55(9), 7555-7566, 2018.
- (12) Oizumi H., et al., Ninjin' yoeito, a traditional Japanese Kampo medicine, suppresses the onset of anhedonia induced by dysfunction in the striatal dopamine receptor type 2-expressing medium spiny neurons, *NeuroReport*, 32(10), 869-874, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 経口用乳酸菌組成物	発明者 遠野雅徳、豊田淳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-13298	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	豊田 淳 (Toyoda Atsushi) (00292483)	茨城大学・農学部・教授 (12101)	

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
---------	---------