

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780132

研究課題名（和文） 複合オミックス解析によるプロバイオティクス因子の同定とその評価

研究課題名（英文） Identification and assessment of probiotic factor (s) via multiple omics approach.

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・研究員

研究者番号：80435677

研究成果の概要（和文）：

われわれがこれまでに同定したビフィズス菌のプロバイオティックトランスポーター遺伝子の効果を証明するため、プロバイオティックトランスポーター遺伝子欠損株や遺伝子導入株を遺伝子組み換え技術を駆使して作製し、腸管出血性大腸菌O157:H7感染マウスモデルを用いてその機能を評価した。その結果、プロバイオティックトランスポーター遺伝子はマウス大腸内での酢酸産生量の増加に寄与し、O157感染によって生じる腸管局所の炎症を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In order to demonstrate the effect of the bifidobacterial genes encoding 'probiotic transpoter', we generated the genes deficient or overexpressing bifidobacterial strains and assessed them using *Escherichia coli* O157:H7 lethal infection murine model. Our experiments clearly showed that the 'probiotic transpoter' largely contributes to the production of acetate by colonized bifidobacteria in the murine colon, and it could prevent the inflammation provoked by *Escherichia coli* O157:H7 infection.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

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：ビフィズス菌、酢酸、O157、マルチオミックス、プロバイオティクス、腸内細菌、相互作用、病原性大腸菌

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含め動物の腸内には 1000 種類以上で 100 兆個にもおよぶ細菌が生息しており、これらを総称して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知られている。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は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-腸内フローラ間相互作用が病態形成の重要な要因であることは明らかである。一方で、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が明らかになると共に、これら善玉菌のプロバイオティクスとしての有用性が、健康維持、予防医学の面からも着目されている。肥満と腸内細菌との関係性も示唆されていることから (Turnbaugh, *et al.*, *Nature*, 444, 2006、Turnbaugh, *et al.*, *Nature*, 457, 2009)、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、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に関わっているのか、すなわち宿主-腸内フローラ間相互作用が宿主の健康に与える影響の科学的根拠は乏しいのが現状であった。

2. 研究の目的

われわれはこれまでに、無菌マウスに腸管出血性大腸菌 O157 (O157) を投与すると 7 日以内に全例が死に至るが、O157 と共にビフィズス菌の一種である *Bifidobacterium longum* (BL) を投与すると、O157 によるマウス感染

死が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* (BA) 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。そこでこれらのビフィズス菌の詳細な比較解析を行うため、まずは宿主と腸内細菌とが共通に利用可能であるため、相互作用情報を多く含むと考えられる「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。その結果、感染死予防株ビフィズス菌は、ABC 型の糖質のトランスポーターを発現することで、単糖の一種である果糖を代謝し、酢酸を産生することを明らかにした。産生された酢酸が大腸上皮細胞のバリア機能を高めることで O157 感染によって生じる炎症を抑制した。このことから、本遺伝子を「プロバイオティックトランスポーター遺伝子」として同定した。本研究ではプロバイオティックトランスポーター遺伝子の効果を証明するため、O157 感染予防能を持たないビフィズス菌にプロバイオティックトランスポーター遺伝子を形質転換し、O157 感染マウスモデルを用いてその機能を評価した。また、感染死予防株ビフィズス菌のプロバイオティックトランスポーターをコードする遺伝子欠損株を作製し、同様に O157 感染マウスモデルを用いてその機能を評価した。

3. 研究の方法

O157 感染死予防株である BL のプロバイ

オティックトランスポーター遺伝子をクローニングし、大腸菌-ビフィズス菌シャトルベクターである pKKT427 プラスミドに導入した。この発現ベクターを O157 感染死非予防株である BA に形質転換し、プロバイオティックトランスポーター発現 BA 株 (BAtg) を作製した。本菌株または BA 野生株を無菌マウスに定着させ、2 週間後に O157 を感染させることで、O157 感染に対するプロバイオティックトランスポーターの効果を検討した。

次に O157 感染死予防株である BL のプロバイオティックトランスポーター遺伝子を、相同組換え法を用いて欠損させることで、プロバイオティックトランスポーター遺伝子欠損 BL (BLKO) を作製し、同様に O157 感染に対するプロバイオティックトランスポーターの効果を検討した。

4. 研究成果

O157 感染能を持たない BA 株にプロバイオティックトランスポーター遺伝子を発現させた BA_{tg} 株を無菌マウスに定着させたモノアソシエイトマウスでは、BA 野生株を定着させたモノアソシエイトマウスよりも大腸内での酢酸産生量が増加し、その結果、O157 感染によって生じる炎症が抑制された。一方、O157 感染予防能を有する BL 株のプロバイオティックトランスポーター遺伝子を欠損させた BLKO を定着させたモノアソシエイトマウスでは、BL 野生株定着モノアソシエイトマウスよりも大腸内での酢酸産生量が有意に低下し、O157 感染によって生じる炎症が抑制できなかつたため、O157 感染死を予防することができなくなっていた。以上のことから、プロバイオティックビフィズス菌による O157 感染死予防メカニズムの一つとして、プロバイオティックトランスポーター遺伝子が重要な役割を果たし、本遺伝子の有無が O157 感染死を予防可能か否かの指標になる

ことを明らかにした (Fukuda *et al.*, Nature 469, 2011)。

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 12 件)

- ① Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H., and Hattori, M. Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. Gut Microbes (2012) in press. 査読有
- ② Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., and Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Nature 469: 543-547 (2011). 査読有
- ③ Nakanishi, Y., Fukuda, S., Chikayama, E., Kimura, Y., Ohno, H., and Kikuchi, J. A dynamic omics approach identifies nutrition-mediated microbial interactions. J. Proteome Res. 10: 824-836 (2011). 査読有
- ④ Fukuda, S., Hase, K., and Ohno, H. Application of a mouse ligated Peyer's patch intestinal loop assay to evaluate bacterial uptake by M cells. J. Vis. Exp. 58: e3225 (2011). 査読有
- ⑤ Takahashi, D., Hase, K., Kimura, S., Nakatsu, F., Ohmae, M., Mandai, Y., Sato, T., Date, Y., Ebisawa, M., Kato, T., Obata, Y., Fukuda, S., Kawamura, Y., Dohi, T., Katsuno, T., Yokosuka, O., Waguri, S., and Ohno, H. The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B secures gut immune homeostasis in mice.

- Gastroenterology 141: 621-632 (2011). 査読有
- ⑥ Prakash, T., Oshima, K., Morita, H., Fukuda, S., Imaoka, A., Kumar, N., Sharma, V. K., Takahashi, M., Saitou, N., Taylor, T. D., Ohno, H., Umesaki, Y., and Hattori, M. Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of Th17 cell differentiation. Cell Host Microbe 10:273-284 (2011). 査読有
- ⑦ Morita, H., Nakano, A., Onoda, H., Toh, H., Oshima, K., Takami, H., Murakami, M., Fukuda, S., Takizawa, T., Kuwahara, T., Ohno, H., Tanabe S., and Hattori, M. *Bifidobacterium kashiwanohaense* sp. nov., isolated from healthy infant faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 2610-2615 (2011). 査読有
- ⑧ 福田真嗣 ビフィズス菌が産生する酢酸が病原性大腸菌感染を予防する：糖トランスポーターの重要性、科研費 NEWS 1 : 17 (2011) 総説
- ⑨ 福田真嗣、大野博司 食品と腸内細菌叢、臨床検査 55 : 183-187 (2011) 総説
- ⑩ 福田真嗣、服部正平、大野博司 ビフィズス菌の産生する酢酸が病原性大腸菌感染を予防する－糖トランスポーターの重要性－、実験医学 29:923-926 (2011) 総説
- ⑪ 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. 110: 87-93 (2010). 査読有
- ⑫ 福田真嗣、大野博司 腸管出血性大腸菌 O157H7 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、日本臨床腸内微生物学会誌 12 : 35-40 (2010) 総説
- [学会発表] (計 11 件)
- ① Fukuda, S. Integrated omics approach identified acetate produced by probiotic bifidobacteria to protect host from enteropathogenic infection. The 4th Stage Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 3rd Meeting, Osaka, 23rd March (2012) 招待講演
- ② Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clark, JM., Topping, DL., Suzuki, T., Taylor, TD., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Keystone Symposia: The Microbiome, Keystone, Colorado, 5th March (2012)
- ③ Fukuda, S. and Ohno, H. Acetate producing bifidobacteria equipped with ‘probiotic transporters’ protects the host against enteropathogenic infection. International symposium, the 40th annual meeting of the Japanese society for Immunology, Chiba, 29th November (2011) 招待講演
- ④ Fukuda, S., Nakanishi, Y., Date, Y., Ohno, H., Kikuchi, J. Application of statistical correlation method for understanding complex gut ecosystem. The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance 2011 (ISNMR 2011), Yokohama, 16th November (2011)
- ⑤ Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clark, JM., Topping, DL., Suzuki, T., Taylor,

- TD., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Keystone Symposia: Malnutrition, Gut-Microbial Interactions and Mucosal Immunity to Vaccines, New Delhi, 9th November (2011)
- ⑥ 福田真嗣 マルチオーミクス解析から見てきた腸内エコシステムの様相、第6回メタボロームシンポジウム、大阪、10月13日(2011) 招待講演
- ⑦ 福田真嗣 マルチオーミクス解析技術が解き明かす腸内エコシステムの様相、2011年度乳酸菌・腸内細菌工学研究部会講演会、東京、9月28日(2011) 招待講演
- ⑧ Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clark, JM., Topping, DL., Suzuki, T., Taylor, TD., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. Integrated omics approach identified acetate produced by probiotic bifidobacteria to protect host from enteropathogenic infection. 15th International Congress of Mucosal Immunology, Paris, 7th July (2011)
- ⑨ Fukuda, S. Carbohydrate transporters confer a probiotic effect to bifidobacteria. The International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics 2011. Kosice, Slovakia, 14th June (2011) 招待講演
- ⑩ 福田真嗣、藤英博、長谷耕二、大島健志朗、中西裕美子、吉村和敏、戸邊亨、鈴木徹、伊藤喜久治、菊地淳、森田英利、服部正平、大野博司 “腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染死マウスモデルを用いたビフィズス菌による感染死抑止機構の解明” 日本農芸化学会 2011年度大会、

京都、3月27日(2011)

- ⑪ Fukuda, S., Toh, H., Nakanishi, Y., Hase, K., Oshima, K., Yoshimura, K., Tobe, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. Multiple omics identified probiotic bacterial metabolites to prevent gut inflammation provoked by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 26th August, (2010)

[図書] (計3件)

- ① 福田真嗣：微生物機能学 第5章 代謝経路を人工的に修飾して物質を効率よく生産する－代謝制御発酵－pp.62-70 編集責任者 森田英利 三共出版 (2012)
- ② 福田真嗣 (共著)：世紀を超えるビフィズス菌の研究 ～その基礎と臨床応用から製品開発へ～ 第2章2部 ビフィズス菌定着マウスのマルチオーミクス解析 pp.165-170 編集責任者 上野川修一 財団法人日本ビフィズス菌センター (2011)
- ③ 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～ 第14章 微生物群集のメタボローム統合解析 pp.147-155 監修 工藤俊章/大熊盛也 シーエムシー出版 (2010) ISBN 978-4-7813-0183-9

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

1. 福田真嗣、大野博司 ビフィズス菌が産生する酢酸による病原性大腸菌感染症の予防、大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 ライフサイエンス統合データベースセンター ライフサイエンス新着論文レビュー (2011)
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/2284#more-2284>

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・研究員

研究者番号：8 0 4 3 5 6 7 7