

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660071

研究課題名(和文)腸内細菌学の明日を切り開く新規シンビオジェニック因子の探索

研究課題名(英文) Screening of novel symbiogenic factors which exploit the future of studies of intestinal bacteria

研究代表者

栗原 新 (KURIHARA, Shin)

石川県立大学・生物資源環境学部・寄附講座准教授

研究者番号：20630966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：「食餌成分の一部が特定の腸内細菌を生育させる」という仮説のもと、サツマイモを摂取したイヌの糞便中の腸内細菌をサツマイモを添加した培地を用いてスクリーニングしたところ、*Fusobacterium varium* JCM6320と16S rDNAが97%一致する腸内細菌が得られた。また、「腸内細菌の代謝産物がコレステロール輸送ABCトランスポーターの活性に影響を与える」という仮説のもと、腸内常在菌優勢種の培養上清をスクリーニングしたところ、複数の腸内細菌由来成分がABCトランスポーターによるコレステロール排出を促進すること、マクロファージにおける炎症応答を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Based on the hypothesis that the intestinal bacteria grow on dietary compounds of the host, novel intestinal bacteria from sweet-potato-fed dog were screened using media containing sweet potato. A intestinal bacterium where 16S rDNA sequence shows 97% identity to that of *Fusobacterium varium* JCM6320 was isolated. Also based on the hypothesis that the metabolite of the intestinal bacteria modulates the activity of cholesterol ABC transporter, the compounds were screened from the culture supernatant of predominant intestinal bacteria. Compounds synthesized by the intestinal bacteria facilitated the export of cholesterol by the ABC transporter and repressed the inflammatory response in the macrophage.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内細菌 代謝産物 シンビオジェニック因子

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌とホストである動物の間には、分類学上の「界」を越えた共生関係が存在する。この共生関係は互いの細胞間で容易にやり取りが可能な腸管内化合物によって主に成立していると考えられる。腸管内に存在する化合物として、食餌由来、ホスト由来、腸内細菌由来の3つが存在する。このうち、「ホスト 腸内細菌」へ、あるいは、「腸内細菌 ホスト」へと受け渡されヒトと腸内細菌との共生を支える低分子化合物を申請者らは「シンビオジェニック因子(共生生成因子)」と名付け、これをキーワードにして2013年10月より新規に開設された石川県立大学腸内細菌共生機構学講座において、研究を開始したところである。

「ホスト 腸内細菌」へ受け渡されるシンビオジェニック因子の例としては、人乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖が挙げられる。乳児は栄養源としてヒトミルクオリゴ糖を利用できない(分解酵素を持たない)が、ビフィズス菌は利用できる(分解酵素を持つ)ため、ビフィズス菌の乳児への腸管定着に必須の「ビフィズス因子」の実体であると考えられている。他方、「腸内細菌 ホスト」へ受け渡されるシンビオジェニック因子としては、腸内細菌が合成、分泌するポリアミンが挙げられる。ポリアミンは腸内細菌にとっても重要な化合物であるが、腸内細菌は外界の環境によってはポリアミンを積極的に放出する。放出されたポリアミンは大腸粘膜を通じてホスト体内に取り込まれ、炎症抑制やオートファジー促進などの様々な好影響をホストに与えている。

本研究では、「ホスト 腸内細菌」へ、あるいは、「腸内細菌 ホスト」へと受け渡されヒトと腸内細菌との共生を支える低分子化合物を我々は「シンビオジェニック因子(共生生成因子)」と名付けて研究を行った。

2. 研究の目的

シンビオジェニック因子は、腸内で起こっている様々な現象を *in vitro* で再現するのに必要不可欠であることが予想される。例えば、これまで培養に成功していない腸内細菌(未培養腸内細菌)の培養について、

実験系にシンビオジェニック因子を添加することで成功する可能性がある。また、シンビオジェニック因子はポリアミンのようにヒト健康へ有益な影響を与えている可能性が高い。例えば、小腸腸管内でのコレステロール吸収は腸管内成分に影響を受けると考えられるが、この機構に腸内細菌由来のシンビオジェニック因子が有効である可能性がある。そこで、以下の2つを目的として研究を行い、腸内細菌とヒトとの共生関係を化合物レベルで解明する。

1. ホスト由来シンビオジェニック因子を用いた未培養腸内細菌の培養および同定

2. 腸内細菌由来シンビオジェニック因子を用いたホスト側のコレステロール吸収と排出の制御

3. 研究の方法

(1) 母乳添加培地を用いた未培養腸内細菌の分離

母乳を10%添加したGAM培地を用いて乳児糞便(生後1か月)から未培養腸内細菌の分離を試みた。得られたコロニーについて画線培養により純化したのち、16S rDNA解析を行うことで菌種を簡易同定した。

(2) ヒト腸内常在細菌最優勢種コレクションの作成

これまでに報告のある(Nature, 464:59-65. (2010))ヒト腸内常在細菌最優勢種56種のうち、入手可能なものすべてに相当する44種を購入し、コレクションを作成した。

(3) コレステロール代謝制御シンビオジェニック因子の探索

母乳添加培地またはGAM培地で培養した複数種の腸内細菌から、培養上清、培養液油層の酢酸エチル抽出画分、菌体破碎後の水溶性画分、菌体のDMSO抽出画分を調製した。それらのサンプルを、培養細胞の培地に添加し、ABCトランスポーターによるコレステロール輸送活性が変化するか調べた。

(4) 食餌成分を添加した培地を用いた動物

糞便からの未培養腸内細菌の分離

電子レンジで加熱した兼六イモを 50% (w/w)含むドッグフードを 70g、一日 2 回、7 日間に渡ってイヌに与え、7 日目に糞便を採取した。採取した糞便を 10% (w/v)の兼六イモ断片を含む GAM プレートに段階希釈して塗布し、現れたコロニーのうち 23 コロニーについて、画線により純化したのちに、16S rDNA 解析により菌種を簡易同定した。

4. 研究成果

(1) 母乳添加培地を用いた未培養腸内細菌の分離

母乳を 10%添加した GAM 培地を用いて乳児糞便(生後 1 か月)から未培養腸内細菌の分離を試みたが、*Bifidobacterium* などの既存細菌のみが分離された。また、母乳を 10%添加した非加熱寒天にフィルターを置き、その上に GAM 培地を重層した母乳重層培地を用いて乳児糞便を(生後 1 か月)の未培養腸内細菌の分離を試みたが、*Bifidobacterium* などの既存細菌のみが分離された。

(2) ヒト腸内常在細菌最優勢種コレクションの作成

これまでに報告のある(Nature, 464:59-65, (2010))ヒト腸内常在細菌最優勢種 56 種のうち、入手可能なものすべてに相当する 44 種を購入し、コレクションを作成した。このうち、GAM 培地での生育を解析し、32 種が生育可能であることを確認した。この 32 種については、腸内細菌の培養上清を用いたシンビオジェニック因子の探索を目的として、96 穴プレート上でのハイスルーブット培養系(-80 保存用のグリセロールストックを 96 穴プレート上に作成し、これを 8 連マルチピペット及び 96 穴プレート用植菌スタンプを用いることで、迅速に植菌、培養が可能になる系)を構築した。現在、この腸内常在最優勢菌種のハイスルーブット培養系を用いて合計 4 件の共同研究が進行中である。

(3) コレステロール代謝制御シンビオジェニック因子の探索

母乳添加培地と GAM 培地で培養したそれぞれ 1 株ずつの培養上清で ABC トラン

スポーターによるコレステロール輸送に影響を与える可能性が見出された。

(4) 食餌成分を添加した培地を用いた動物糞便からの未培養腸内細菌の分離

兼六イモを摂取させたイヌの糞便について、兼六イモを 10% (w/v)含む GAM 培地で培養を行った。解析した 23 種のうち、画線の過程で生育不能となった 4 種を除く 19 種に関して 16S rDNA 解析を行った。この結果、15 種が *Escherichia coli*、2 種が *Clostridium rectum*、1 種が *Clostridium sp.* S9 と 99%以上の相同性を示した。これらは既存菌種あるいはその近縁種であることが考えられた。この中で 1 種は *Fusobacterium varium* と 97%の相同性を示し、新種であることが期待されたが、継代途中で生育不能となったことから、研究を続行することが出来なかった。しかし、このようなアプローチ(いわば、腸内における集積培養)が未同定腸内細菌の分離に有効であることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 新 (KURIHARA, Shin)

石川県立大学・生物資源環境学部・寄附講座准教授

研究者番号: 20630966

(2)研究分担者

松尾 道憲 (MATSUO, Michinori)
京都女子大学・家政学部・准教授
研究者番号：00335308

辨野 義己 (BENNO, Yoshimi)
国立研究開発法人理化学研究所・イノベーション推進センター・特別招聘研究員
研究者番号：40087599

片山 高嶺 (KATAYAMA, Takane)
京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：70346104

(3)連携研究者

なし