

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00822

研究課題名(和文)腸内菌由来ヒスタミンの産生制御機構と生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Regulation and physiological significance of histamine production in *Raoultella ornithinolytica*

研究代表者

今大路 治之(中山治之)(Imahji, Haruyuki)

香川大学・医学部・講師

研究者番号：80294669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児糞便から分離された*Raoultella ornithinolytica* AA097株におけるヒスタミン産生制御メカニズムを解明した。*R. ornithinolytica*におけるヒスタミン産生は、CRPが関与するカタボライト抑制機構に加えてFisによっても正に制御されていることが示唆された。また、ヒスタミン産生性*R. ornithinolytica*の定着によって無菌マウスの大腸上皮細胞の増殖亢進が認められた。さらに、*R. ornithinolytica*におけるヒスタミン産生はH2O2等の酸素ストレスを回避するためのシステムとして機能していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：*Raoultella ornithinolytica* is a member of Enterobacteriaceae, which widely distributes the environment including human intestine. In this study, we revealed the mechanism of histamine production in *R. ornithinolytica* strain AA097. We found that histamine production in *R. ornithinolytica* is under coordinate positive regulation by CRP and Fis. The histamine-producing *R. ornithinolytica* stimulated colonic epithelial cell growth in germ-free mice. We disclosed that histamine plays a role in oxidative stress response in *R. ornithinolytica*.

研究分野：細菌学

キーワード：*Raoultella* ヒスタミン産生 ヒスチジン カタボライト抑制 酸素ストレス

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管には 1,000 種、100 兆個に及ぶ細菌が定着し、常在細菌叢を形成している。これら腸内菌は食物の消化、微量栄養素の供給、免疫賦活や種々の薬物の解毒、さらには外来病原体との競合作用など、宿主にとって有益な生理活性を担っている。一方で、過度のストレス、偏食、抗菌剤投与等による腸内菌叢の破綻 (intestinal dysbiosis) は、肥満、糖尿病、アレルギー等の生活習慣病の発症要因であることを示す知見が蓄積されている。*Raoultella ornithinolytica* は腸内細菌科に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌であり、遺伝学的に近い大腸菌と共に腸内細菌叢を構成する菌種である。また、同じく腸内細菌科に属する *Morganella morganii* とともにヒスタミン食中毒の原因菌としても知られている。我々はこれまで、日本人 13 人の糞便メタゲノム解析を行い、各個人が保有する属レベルでの菌組成を解析したところ、ひとりの乳幼児 (7 ヶ月女児) において、ヒスタミン産生性 *Raoultella* が腸内菌叢の約 20% を占めていることを報告した。また *Raoultella* が腸内菌叢の約 5% を占める成人女性も確認している。なぜ腸管常在菌である *Raoultella* が炎症やアレルギーのメディエーターとなるヒスタミンを腸管内で産生する能力を有する必要性があるのか、その理由は明かではない。

2. 研究の目的

ヒスタミンは宿主生体内あるいは細菌由来の histamine decarboxylase (Hdc) により histidine が脱炭酸されて生成される。主に生体内では肥満細胞、好塩基球、腸クロム親和性細胞様細胞により産生され、ヒスタミン受容体 (H1-H4 型受容体) を介して炎症やアレルギーのメディエーターとして作用する。一方、サバ・マグロ等の赤身魚やワイン・チーズ等に付着した *hdc* 遺伝子保有細菌によって産生されたヒスタミンを経口摂取することによりヒスタミン食中毒が引き起こされる。今回、我々はアレルギーに関連するヒスタミンを多量に産生する *Raoultella* が、腸内優勢菌として存在する場合があることに着目し、腸内菌由来のヒスタミンが宿主腸管との共生のためのメディエーターとして作用しているのではないかと仮説を立てるに至った。我々はこれまでに *R. ornithinolytica* 由来のヒスタミンが宿主腸管粘膜細胞増殖に与える影響を解析した。無菌マウスに *R. ornithinolytica* を定着させ 1% histidine を飲料水として与えると水投与群や無菌群と比べ杯細胞の著しい増加が認められた。以上の知見は、腸内菌由来のヒスタミンが宿主腸管環境のホメオスタシスの維持に何らかの影響を及ぼしている事を示唆するものである。本研究では、*R. ornithinolytica* におけるヒスタミン産生制御機構の解明を通してヒスタミン産生に影響する細胞内外分子を同定するとともに、*Raoultella* 由来ヒスタミンと宿主細胞

とのクロストークを明らかにし、本菌のヒスタミン産生の生理学的意義を解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒスタミン産生に関わる遺伝子の網羅的スクリーニング

mariner Tn 挿入変異株ライブラリーを用いた大規模スクリーニングにより、ヒスタミンの産生制御に関わる遺伝子群を網羅的に探索した。

(2) 遺伝子破壊株の作製

同定したヒスタミン産生に関わる遺伝子の破壊株を、*sacB* 遺伝子を用いた counter selection 法を適応して作製した。作製した遺伝子破壊株におけるヒスタミン産生能をチェックカラーヒスタミン (キッコマン) を用いて定量的に評価した。

(3) プロモーター解析

上記スクリーニングで同定された遺伝子が、転写調節遺伝子である場合は、その転写因子によるヒスタミン産生制御がダイレクトな作用であるのかを *hdc* 遺伝子プロモーターへの結合性で評価した。候補転写因子タンパク質を GST 融合タンパク質として大腸菌内で大量発現させ、glutathione sepharose カラムでアフィニティー精製した。精製したタンパク質と *hdc* 遺伝子プロモーター領域の DNA 断片を用いてゲルシフトアッセイを行った。

(4) *R. ornithinolytica* の宿主環境中でのヒスタミン産生性

R. ornithinolytica AA097 株のノトパイオートマウスを水投与群および 1% histidine 投与群に分け、大腸内容物中のヒスタミン量を HPLC を用いて定量した。

(5) *R. ornithinolytica* 定着ノトパイオートにおける腸管上皮細胞増殖

R. ornithinolytica AA097 株の野生株及び *hdc* 欠失株を 4 週間定着させた無菌マウスの腸管上皮細胞の形態変化を観察するとともに、細胞増殖能を EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) の取り込みを指標にして蛍光顕微鏡下にて評価した。

4. 研究成果

(1) *R. ornithinolytica* におけるヒスタミン産生制御機構の解明

ヒスタミンの産生制御に関わる遺伝子群を網羅的に決定するために、広域な宿主域を有する *mariner* Tn を用いて Tn 挿入変異株ライブラリーの作製を試みた。その結果、一回のエレクトロポレーションで最大 2,496 クローン得られ、そのうちの 1,462 個の変異株におけるヒスタミン産生性をスクリーニングしたところ、ヒスタミン産生能が野生株の 20% 以下に減弱した株を 26 個得た。それらについて、ゲノム上における Tn 挿入部位を AP-PCR 法を用いた sequencing により決定した (図 1)。その結果、ヒスタミン産生能が

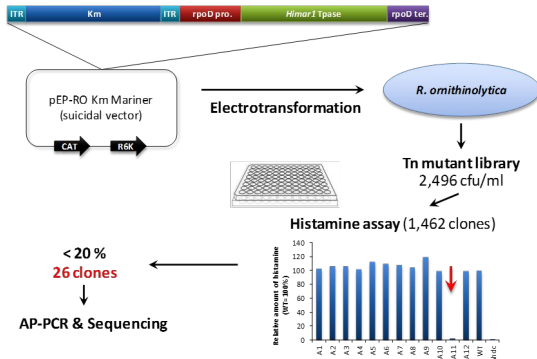


図 1. mariner Tn 挿入変異株ライブラリーの作製

弱まった株として *crp* (cyclic AMP receptor protein) 変異株および *fis* (factor for inversion stimulation) 変異株を同定した。*sacB* 遺伝子を用いた counter selection 法を用いて *crp* 欠失株および *fis* 欠失株を作製しヒスタミン産生能を調べたところ、両遺伝子欠失株は野生株と比較して著しくヒスタミン産生能が減弱していた (図 2-B)。また、*crp* 欠失株および *fis* 欠失株における *hdc* 遺伝子発現は野生株と比べて著しく低下していた (図 2-C)。以上より、*R. ornithinolytica* におけるヒスタミン産生は、CRP および Fis によって共制御されていることが示唆された。

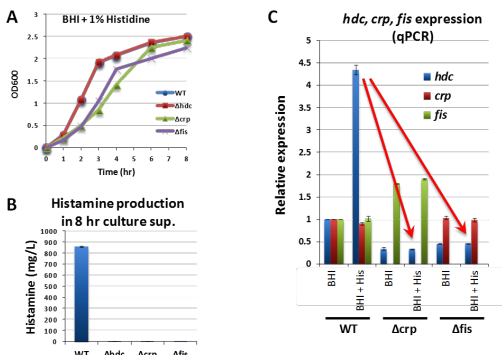


図 2. ヒスタミン産生における *crp* および *fis* 遺伝子の役割。(A) 1% histidine 添加 BHI 培地での各種遺伝子欠失株の増殖。(B) 各遺伝子欠失株のヒスタミン産生。(C) 各遺伝子欠失株の *hdc*, *crp*, *fis* 遺伝子発現。

hdc 遺伝子の発現制御において *crp* 遺伝子の関与が示唆されたため、次に *R. ornithinolytica* における *hdc* 遺伝子の発現抑制にグルコース効果いわゆるカタボライト抑制が関わっているのか調べた (図 3)。その結果、野生株を 0.1% glucose 添加した M9+1% histidine 培地で培養するとヒスタミンの産生が全く認められず (図 3-A)、またグルコース存在下では *hdc* 遺伝子発現も著しく抑制された (図 3-B)。以上より、*hdc* 遺伝子の発現制御にカタボライト抑制機構が関与していることが示唆された。

次に CRP および Fis がダイレクトに *hdc* 遺伝子の発現を制御しているのかを検討するために、CRP および Fis タンパク質を GST 融合蛋白として発現精製し、*hdcP1* および *lysR*

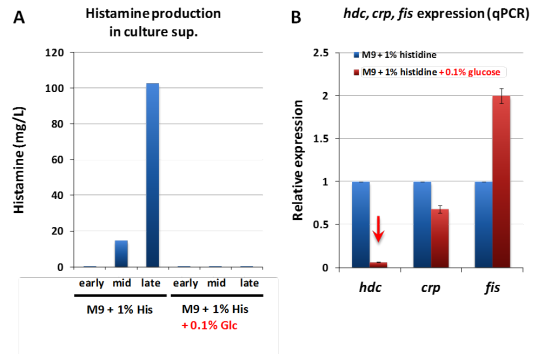


図 3. *hdc* 遺伝子発現制御におけるカタボライト抑制機構の関与。(A) 1% histidine 添加 M9 培地でのヒスタミン産生における glucose の影響。(B) *hdc*, *crp*, *fis* 遺伝子発現における glucose 添加の影響。

遺伝子上流プロモーター領域への結合性をゲルシフトアッセイで調べた (図 4)。その結果、CRP は P^{hdc} (*hdc* プロモーター) 領域には結合するが P^{lysR} (*lysR* プロモーター) 領域には結合しないことが明らかとなった (図 4-B)。一方 Fis は両方のプロモーター領域への結合が認められた。以上より、*hdc* 遺伝子の発現制御に CRP および Fis が直接的に関与していることが示唆された。

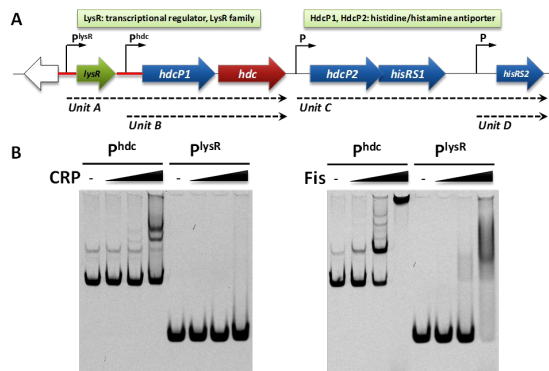


図 4. CRP および Fis タンパク質の *hdcP1* および *lysR* 遺伝子上流プロモーター領域への結合性。(A) *hdc* 遺伝子近傍の遺伝子構造。*hdc* 遺伝子の上流下流には histidine/histamine antiporter ホモログ遺伝子 *hdcP1* および *hdcP2* が存在しており、また *hdcP1* の上流には LysR ファミリーに属する転写調節遺伝子 *lysR* が存在している。予想されるプロモーター配列の存在を P で示す。(B) ゲルシフトアッセイ。

(2) *R. ornithinolytica* の宿主環境中でのヒスタミン産生性

R. ornithinolytica のヒスタミン産生能がマウス腸管環境中で認められるか否かを確認するため、*R. ornithinolytica* AA097 株のノトバイオートマウスを水投与群および 1% histidine 投与群に分け、大腸内容物中のヒスタミン量を HPLC を用いて定量した。その結果、無菌マウスと比較するとノトバイオートマウスの糞便中にはヒスタミンの存在が認められたが、その検出量は約 0.1 mg/L と極めて低かった。また、ノトバイオートマウスに

1% histidine を投与した群の糞便中ヒスタミン量は水投与群と比べると明らかに高い傾向であり、約 0.35 mg/L 認められた。また、*R. ornithinolytica* AA097 株を嫌気条件下で培養した時のヒスタミン産生性を検討したところ、好気条件下と比べて嫌気条件下ではヒスタミン産生量の低下が認められた (図 5)。

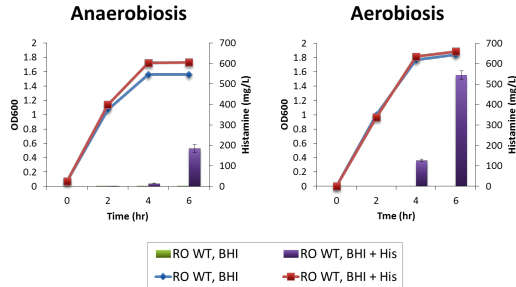


図 5. 嫌気的环境下および好気的环境下におけるヒスタミン産生性の比較。

(3) ヒスタミンによる宿主 細菌クロストークの解明

腸内菌由来ヒスタミンによる宿主 細菌クロストークの解明の一環として、*R. ornithinolytica* 定着ノトバイオトにおける腸管上皮細胞増殖を調べた。*R. ornithinolytica* AA097 株の野生株及び *hdc* 欠失株を 4 週間定着させた無菌マウスの腸管上皮細胞の形態変化を観察するとともに、細胞増殖能を EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) の取り込みを指標にして蛍光顕微鏡下にて評価した。その結果、空腸・回腸部位の上皮細胞増殖能は野生株及び *hdc* 欠失株のノトバイオト間で違いは認められなかったが、大腸上皮細胞は野生株ノトバイオトにおいて増殖能の亢進が認められた (図 6)。

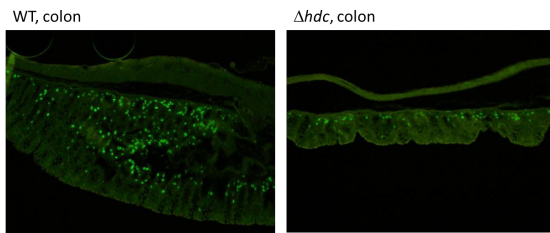


図 6. *R. ornithinolytica* AA097 株の野生株及び *hdc* 欠失株定着ノトバイオトにおける腸管上皮細胞増殖の比較。

また、妊娠マウスに *R. ornithinolytica* AA097 株の野生株及び *hdc* 欠失株を定着させた後、誕生した幼若マウスの体重および体長変化を 4 週間に渡って観察したところ、野生株定着ノトバイオト親マウスから誕生したマウスは *hdc* 欠失株定着ノトバイオト親マウスから誕生したマウスと比べて、誕生時の体重および体長が有意に高かった。またそれらの差は 4 週間に渡って維持された (図 7)。大腸および小腸長、パイエル板数、脾臓重量および腹腔内脂肪量等については差は認められなかった (図 8)。

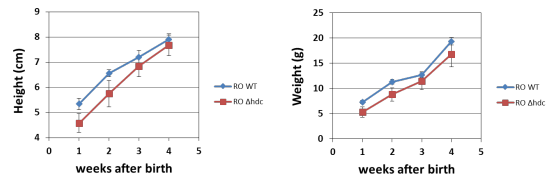


図 7. *R. ornithinolytica* AA097 株の野生株及び *hdc* 欠失株定着妊娠マウスから誕生した幼若マウスの体重および体長変化。

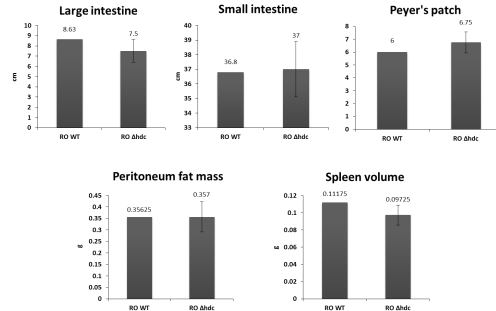


図 8. *R. ornithinolytica* AA097 株の野生株及び *hdc* 欠失株定着妊娠マウスから誕生した幼若マウス (4 週令) の大腸および小腸長、パイエル板数、脾臓重量および腹腔内脂肪量。

(4) *R. ornithinolytica* におけるヒスタミン産生性の生理学的意義

R. ornithinolytica 自身にとってヒスタミン産生は何の意味があるのかについて考察した。*mariner* Tn 挿入変異株ライブラリーを用いた大規模スクリーニングにより、ヒスタミンの産生制御に関わる遺伝子群をさらに探索したところ、ヒスタミン産生能が著しく減弱した株として *recA* 株を同定した。そこで、DNA damage とヒスタミン産生性との関わりを調べるために、UV-C と mitomycin C に対する感受性試験を野生株と *hdc* 欠損株について行ったが、UV および mitomycin C に対する感受性は両株間で差は認められなかった (図 9)。

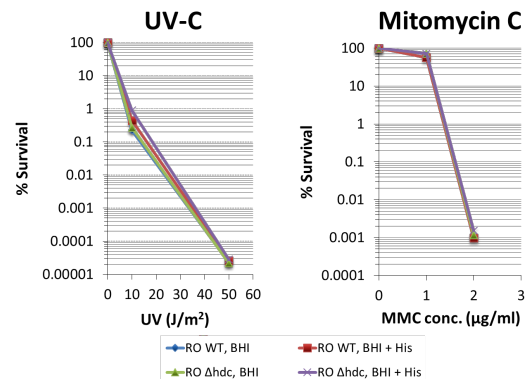


図 9. *R. ornithinolytica* AA097 株の野生株及び *hdc* 欠失株における UV-C および mitomycin C に対する感受性。

また、野生株および *hdc* 破壊株について、1% ヒスチジン存在下における H_2O_2 に対する耐性を調べたところ、*hdc* 破壊株は野生株と比較して著しく H_2O_2 感受性であった (図 10-A)。

さらに、野生株を対数増殖期中期まで培養後、1mM H₂O₂ 刺激を加えると *hdc* 遺伝子の発現誘導が認められた (図 10-B)。

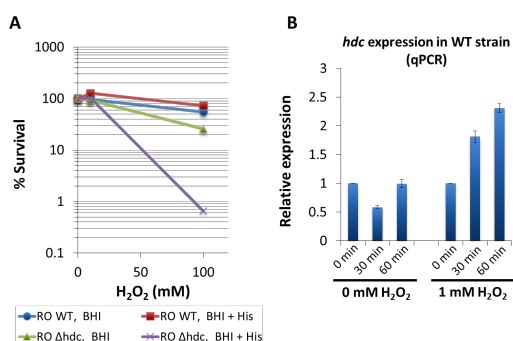


図 10. (A) *R. ornithinolytica* AA097 株の野生株及び *hdc* 欠失株における H₂O₂ に対する感受性。 (B) H₂O₂ 刺激による *hdc* 遺伝子の発現誘導。

過剰の細胞内外ヒスチジンは、H₂O₂ の DNA 傷害作用を増強することが報告されている。したがって *R. ornithinolytica* におけるヒスタミン産生は、マグロ・サバ等の histidine-rich な環境中においてヒスチジンを除去することで H₂O₂ 等の酸素ストレスを回避するためのシステムとして機能していると考えられた。

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 12 件)

1. Yamamoto T, Ugai H, Nakayama-Imaohji H, Tada A, Elahi M, Houchi H, Kuwahara T. Characterization of a recombinant *Bacteroides fragilis* sialidase expressed in *Escherichia coli*. *Anaerobe*, 2018, 50, 69-75, doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.02.003, 査読有.
2. Nagao T, Nakayama-Imaohji H, Elahi M, Tada A, Toyonaga E, Yamasaki H, Okazaki K, Miyoshi H, Tsuchiya K, Kuwahara T. L-histidine augments the oxidative damage against Gram-negative bacteria by hydrogen peroxide. *Int J Mol Med*, 2018, 41, 2847-2854, doi: 10.3892/ijmm.2018.3473, 査読有.
3. Hasibul K, Nakayama-Imaohji H, Hashimoto M, Yamasaki H, Ogawa T, Waki J, Tada A, Yoneda S, Tokuda M, Miyake M, Kuwahara T. D-tagatose inhibits the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Mol Med Rep*, 2018, 17, 843-851, doi: 10.3892/mmr.2017.8017, 査読有.
4. Hashimoto M, Waki J, Nakayama-Imaohji H, Ozono M, Hashiguchi S, Kuwahara T. TLR2-stimulating contaminants in glycoconjugate fractions prepared from *Bacteroides fragilis*. *Innate Immun*, 2017, 23, 449-458, doi: 10.1177/17534259177143

13, 査読有.

5. Goda H, Yamaoka H, Nakayama-Imaohji H, Kawata H, Horiuchi I, Fujita Y, Nagao T, Tada A, Terada A, Kuwahara T. Microbicidal effects of weakly acidified chlorous acid water against feline calicivirus and *Clostridium difficile* spores under protein-rich conditions. *PLoS One*, 2017, 12, e0176718, doi: 10.1371/journal.pone.0176718, 査読有.
6. Ishijima N, Lee KI, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yoneda S, Iguchi A, Ogura Y, Hayashi T, Ohnishi M, Iyoda S. Identification of a New Virulent Clade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- Sequence Type 29. *Sci Rep*. 2017, 7, 43136, doi: 10.1038/srep43136, 査読有.
7. Uemura M, Imataki O, Uchida S, Nakayama-Imaohji H, Ohue Y, Matsuka H, Mori H, Dobashi H, Kuwahara T, Kadowaki N. Strain-specific transmission in an outbreak of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in the hemato-oncology care unit: a cohort study. *BMC Infect Dis*. 2017, 17, 26, doi: 10.1186/s12879-016-2144-4, 査読有.
8. Kino Y, Nakayama-Imaohji H, Fujita M, Tada A, Yoneda S, Murakami K, Hashimoto M, Hayashi T, Okazaki K, Kuwahara T. Counterselection employing mutated *pheS* for markerless genetic deletion in *Bacteroides* species. *Anaerobe*. 2016, 42, 81-88, doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.09.004, 査読有.
9. Bernard KA, Pacheco AL, Loomer C, Burdz T, Wiebe D, Huynh C, Kaplen B, Olson AB, Cnockaert M, Eguchi H, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Shiota H, Boudewijns M, Van Hoecke F, Vandamme P. *Corynebacterium lowii* sp. nov. and *Corynebacterium oculi* sp. nov., derived from human clinical disease and an emended description of *Corynebacterium mastitidis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016, 66, 2803-2812, doi: 10.1099/ijsem.0.001059, 査読有.
10. Tada A, Nakayama-Imaohji H, Yamasaki H, Hasibul K, Yoneda S, Uchida K, Nariya H, Suzuki M, Miyake M, Kuwahara T. Cleansing effect of acidic L-arginine on human oral biofilm. *BMC Oral Health*. 2016, 16, 40, doi: 10.1186/s12903-016-0194-z, 査読有.
11. Nakayama-Imaohji H, Hirota K, Yamasaki H, Yoneda S, Nariya H, Suzuki M, Secher T, Miyake Y, Oswald E, Hayashi T, Kuwahara T. DNA Inversion Regulates Outer Membrane Vesicle Production in *Bacteroides fragilis*. *PLoS One*. 2016, 11,

e0148887, doi: 10.1371/journal.pone.0148887, 査読有.

12. Yamaoka H, Nakayama-Imaohji H, Horiuchi I, Yamasaki H, Nagao T, Fujita Y, Maeda H, Goda H, Kuwahara T. Tetramethylbenzidine method for monitoring the free available chlorine and microbicidal activity of chlorite-based sanitizers under organic-matter-rich environments. *Lett Appl Microbiol.*, 2016, 62, 47-54, doi: 10.1111/lam.12506, 査読有.

〔学会発表〕(計8件)

1. 今大路治之、田中彩、下野隆一、豊田敦、高見英人、桑原知巳、機能メタゲノム解析から見た抗菌薬投与前後の乳幼児腸内フローラ、第91回日本細菌学会総会、福岡、2018年、3月
2. 今大路治之、田中彩、下野隆一、豊田敦、高見英人、桑原知巳、抗菌薬投与前後における乳幼児腸内フローラの機能メタゲノム解析、第12回日本ゲノム微生物学会年会、京都、2018年、3月
3. 今大路治之、伊豫田 淳、綿引正則、大西 真、桑原知巳、デキストラン硫酸ナトリウム処理マウスでの非 O157 腸管出血性大腸菌の病原性の比較、第70回日本細菌学会中国・四国支部総会、広島、2017年、10月
4. 今大路治之、大岡唯祐、後藤恭宏、小椋義俊、林 哲也、桑原知巳、*Raoultella ornithinolytica* におけるヒスタミン産生制御、第90回日本細菌学会総会、仙台、2017年、3月
5. 新井貴大、今大路治之、岡崎勝一郎、桑原知巳、*Bacteroides* の promoter inversion による表層変異機構、第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年、11月 - 12月
6. Haruyuki Nakayama-Imaohji, Tomomi Kuwahara, DNA Inversion Regulates Outer Membrane Vesicle Production in *Bacteroides fragilis*, *ASM microbe* 2016, Boston, 2016, June.
7. 今大路治之、藤田雅、岡崎勝一郎、桑原知巳、*Bacteroides* における変異型 *pheS* 遺伝子を用いた遺伝子組換えシステムの開発、第89回日本細菌学会総会、大阪、2016年、3月
8. 今大路治之、桑原知巳、*Bacteroides fragilis* におけるシアリダーゼとエステラーゼは腹腔内膿瘍形成に関与する、第85回日本感染症学会西日本地方会学術集会、奈良、2015年、10月

6. 研究組織

(1)研究代表者

今大路 治之 (中山 治之) (IMAOHJI, Haruyuki)

香川大学・医学部分子微生物学・講師

研究者番号：80294669

(2)研究分担者

桑原 知巳 (KUWAHARA, Tomomi)

香川大学・医学部分子微生物学・教授

研究者番号：60263810