

令和元年6月24日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04896

研究課題名(和文) ビフィズス菌-宿主腸管における細胞間相互作用の分子基盤の包括的理解

研究課題名(英文) Comprehensive study of molecular interaction between bifidobacterium-host intestinal cell

研究代表者

鈴木 徹 (Suzuki, Tohru)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20235972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ビフィズス菌の表層因子、宿主側の腸管上皮細胞、腸管免疫の要で細菌が腸管壁を通過し免疫系に認識される際の関門となる細胞の分化状態に着目し、各状態の表層に発現するタンパク質、糖タンパク質、糖脂質とビフィズス菌側の因子との相互作用を分子ごとに明らかにすることを目的とする。1)ビフィズス菌の表層タンパク、糖鎖に関する遺伝子の破壊株コレクションを構築する。2)腸管上皮状態、M細胞分化状態の両分化ステージにおけるビフィズス菌との相互作用を1)のビフィズス菌多重遺伝子破壊株を用いて解析する。これらを通してビフィズス菌-細胞相互作用に関与する分子の対応関係と細胞接着への関与を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビフィズス菌は、ヒトの大腸に生息する腸内細菌である。本菌はこれまでに、下痢や便秘を抑える、ビタミンの供給、免疫の刺激、アレルギーの緩和、感染菌の防御、抗肥満などの様々な健康効果が知られている。最近では、さらに鬱、自閉症、統合失調、アルツハイマーなどの脳精神疾患への効果が期待されている。これらの機能を発揮するためにビフィズス菌はヒトの大腸腸管に吸着し、宿主に健康効果を発揮する遺伝子を有している筈である。これらのメカニズムを明らかにすることにより、ビフィズス菌をはじめとする腸内細菌の持つ健康効果の意義とその有効な利用法を見いだすことができる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the interactions between the gut cell factors, including membrane proteins, glycoproteins and also glycolipids, and Bifidobacterial surface factors.

1) Construct Knockout mutant collection of Cell surface proteins and polysaccharides genes of Bifidobacterium. 2) Research the interaction between the animal cell-line of Intestinal epithelial cells and macrophage.

Through these, we will clarify the correspondence between molecules involved in Bifidobacterium-cell interaction and the involvement in cell adhesion.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：腸内細菌 ビフィズス菌 遺伝子破壊 環境適応 共生系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌の健康増進効果は、以下のように大別できる。

(1) 栄養供給(ビタミン、アミノ酸供給など)、(2) 整腸作用(下痢、便秘の改善)、(3) 病原菌に対する抵抗性(大腸菌O-157などによる感染死の回避)、(4) 免疫調節(免疫賦活・アレルギー症状の低減)、(5) 代謝調節(食欲増進、肥満制御、血中リン酸の低減)、(6) 抗老化(皺(しわ)、皮膚のくすみ、アルツハイマー症)、(7) 脳・神経(鬱(うつ)、自閉症、統合失調などの神経症の症状改善)

これらの作用で、ホストの健康をサポートし、ホストがより個体数を増やすことが、腸内細菌の菌数やニッチの拡大(=進化)につながると考える。これを狙って、ピフィズ菌が共生進化してきたなら、これらの効果を担当する遺伝子は、大腸下部に定着している時に特異的に発現すると考えられる。

2. 研究の目的

上記の、機能を実現するためにピフィズ菌が大腸下部の環境で発現する遺伝子の候補は、現在のところ BL0005株で遺伝子発現の変動が見出された、約73遺伝子(全遺伝子の1/20)であった。

これらの中には、接着因子などの大腸下部への定着に必要な因子の他に、新たな健康増進効果を有する遺伝子が隠されている可能性が高い。これらの遺伝子発現システムについて詳細な検討を行えば、これまで思いもつかなかったピフィズ菌の新たな機能が発見できると考えられる。例えば上記(7)の脳・神経作用が発見できれば、鬱、自閉症、統合失調などに有効な新規のサイコバイオティクスなどの新規のプロバイオティクスが開発の端緒とする。

3. 研究の方法

B. longum 105-A 株及び *B. longum* 105-A CPS/EPS 非生産株(*cpsD* 領域欠損株 : *cpsD*) を作成した。本変異株について、細胞外多糖の合成、細胞の凝集、大腸細胞 Caco-2 および、マクロファージ RAW 264.7 細胞への接着と細胞内への取り込みを、顕微鏡および SEM で観察した。

B. longum NCC2705 株を対象に、二成分制御系のレスポンスレギュレーター(RR)遺伝子群(9 遺伝子)について遺伝子破壊株を二重交差相同組換え法を用い、欠失変異株を獲得した。

B. longum NCC2705 株の RR 遺伝子破壊株を用い、各環境(低 pH、胆汁、NaCl、PEG)への応答性の変化を確認した。また、各破壊株の遺伝子の発現量の変化を次世代シーケンサーによりトランスクリプトーム解析(RNA-seq)した。RNA-seq 解析の結果から、BL0005-BL0006 制御系の DNA 結合モチーフを推定することで、本制御系の調節ネットワークの一端の解明を試みた。また、本制御系の活性化条件を探るために、ストレス環境下で上流配列を用いたレポーターアッセイを行った。また、BL0005 については、CHIP-Seq、G-SELEX を用いて結合 DNA 配列に関する詳細な解析を行った。

4. 研究成果

ピフィズ菌は、整腸作用、免疫賦活、感染防御を通じてホストの健康に貢献すると考えられている。しかしその腸管定着および免疫刺激の分子メカニズムは未だ明らかにされていない。我々は、これまでに本菌がもつ環境適応と細胞接着に関わると推定される遺伝子について破壊株コレクションを作成した。本研究では、これらの破壊株コレクションを用いることで、ピフィズ菌の宿主への定着および免疫刺激のメカニズムの解明に取り組み、ピフィズ菌-ヒト共生システムを細胞接着と免疫刺激のメカニズムの統合的理解を目指した。本研究に用いるツールは、我々がこれまでに開発してきたピフィズ菌の温度感受性プラスミド、GoldenGate 法を改良した多遺伝子結合法、プロモーターの最適化法を組み合わせ、ダブルクロスオーバーによる遺伝子破壊を高効率で行う方法を構築した。これを用いて、ピフィズ菌における高効率の遺伝子破壊系を構築した。

ビフィズス菌には、複数の二成分制御系(TCS)調節遺伝子が存在している。本菌は、これらを用い様々な環境に適応していると考えられる。Bifidobacterium longum NCC2705 株の場合、9 セットの TCS を有していた。今回は、これらのうちレスポンスレギュレータを系統的に遺伝子破壊株のコレクションを作成した。

また、腸管とビフィズス菌のインターアクションに重要な役割を有すると考えられる、菌体表層の細胞外多糖(EPS)生産系の遺伝子破壊株を取得した。

これらを用いて、腸内環境の定着機構について解析した。

ビフィズス菌には、複数の二成分制御系(TCS)調節遺伝子が存在している。本菌は、これらを用い様々な環境に適応していると考えられる。Bifidobacterium longum NCC2705 株の場合、9 セットの TCS を有していた。今回は、これらのうちレスポンスレギュレータ遺伝子を系統的に破壊したコレクションを作成した。現在までに7つのRRの破壊株を取得している。これらを用いて、酸素耐性(体外)、低pH耐性(胃)、胆汁酸耐性(十二指腸>小腸>大腸)低栄養(大腸)、高浸透圧(大腸下部)の環境をミミックした培養条件で、生育させたところ、それぞれのTCSが、どの環境因子に対応しているかの関係づけをすることができた。

また、莢膜多糖(CPS)生産系の遺伝子破壊株については、B. longum 105-A が有する特異的なEPS構造を生産させる鍵となる、プライマーゼcpsD遺伝子の破壊株を作成したところ、この変異株は、完全に表層の多糖層を失い、凝集性が高まり、酸、胆汁酸に対する耐性が低下した。また、Caco-2細胞への接着性が高まり、マクロファージに取り込まれやすくなることを明らかにした。またCPS層が消失した、cpsD下部では、多糖層の代わりに繊毛が出現していることが観察された。これらのことから、B. longum 生産する菌体外多糖は、従来考えられていた細胞への接着に寄与するという説は否定され、むしろ、胃から小腸にかけて、腸管への接着を妨げ、大腸への移送させ、その後、大腸の低栄養状態において、繊毛を発現させ、大腸表層に定着すると考えられた。

B. longum NCC2705 の二成分制御系に関しては、それぞれの遺伝子破壊株については、そのレスポンスレギュレータの支配下にある遺伝子を、RNA Seqを用いて特定を試みる。これらの遺伝子候補を用い、野生株と破壊株とで発現の異なる遺伝子のプロモータをクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子の upstream につけ、pKKT428 に導入する。CAT をレポータ遺伝子として、これらの候補遺伝子の発現調節について詳細に評価した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Hend Essam Altaib , Yuka Ozaki, Tomoya Kozakai , Yassien Badr , Izumi Nomura , Prof. Tohru Suzuki, A new *E. coli* entry vector series (pIIS18) for seamless gene cloning using Type IIS restriction enzymes. Microbiology Resource Announcement, *submitted*, (2019).
査読あり
2. Tomoya Kozakai, Ayako Izumi, Izumi Nomura, Tohru Suzuki, Structure of the core promoter in *Bifidobacterium*, *J. Bacteriol.*, *submitted*, (2019). 査読あり
3. Tanaka K, Satoh T, Kitahara J, Uno S, Nomura I, Kano Y, Suzuki T, Niimura Y, Kawasaki S. O₂-inducible H₂O₂-forming NADPH oxidase is responsible for the hyper O₂ sensitivity of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. *Scientific Reports* 8:10750, (2018).
査読あり

4. Kawada Y, Goshima T, Sawamura R, Yokoyama S, Yanase E, Niwa T, Ebihara A, Inagaki M, Yamaguchi K, Kuwata K, Kato Y, Sakurada O, Suzuki T. Daidzein reductase of *Eggerthella* sp. YY7918, its octameric subunit structure containing FMN/FAD/4Fe-4S, and its enantioselective production of *R*-dihydroisoflavones. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 126:301–309, (2018). 査読あり
5. Amin T, Masutani H, El-Sharkawy Hanem ES, Gillespie T, Honda R, Kuwata K, Inagaki M, Yabe T, Nomura I, Suzuki T. *Gut Pathogens*, 9:9-27 10.1186/s13099-017-0177-x, (2017). 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

1. ディサヤナカ ムディヤンセルジ、河野 麻実子、児玉 高幸、野村 泉、鈴木 徹、プロバイオテックピフィズス菌 *Bifidobacterium longum* JBL05 株の腸溶性シームレスカプセルによる経口投与がヒト腸内細菌叢に与える効果 日本農芸化学会大会 東京(2019)
2. 足立 貴康、タホン アミン、榎谷 尚慶、エル シャルカウィ ハネム、矢部 富雄、野村 泉、鈴木 徹、*Bifidobacterium longum* 105-A *cpsD* 欠損変異株を用いた菌体外多糖の解析、日本農芸化学会大会、(2019)
3. 小酒井 智也、和泉 絢子、下総 葉子、野村 泉、鈴木 徹、ピフィズス菌のもつ二成分制御系 *BL0005-BL0006* の転写制御機構の解明 第12回ゲノム微生物学会大会(2019)
4. 小酒井 智也、和泉 絢子、下総 葉子、野村 泉、小田巻 俊孝、堀米 綾子、鈴木 徹 *Bifidobacterium longum* NCC2705 株の *BL0005-BL0006* 制御系の機能に関する研究 日本乳酸菌学会 2018 年度大会
5. 岩田 遥香、川田 結花、五島 智子、澤村 理恵、横山 慎一郎、丹羽 利夫、柳瀬 笑子、稲垣 瑞穂、海老原 章郎 3、島田 敦広 3、山口 圭一 6、加藤 雄太 7、桑田 一夫 6、櫻田 修 7、鈴木 徹 エクオール産生乳酸菌 *Lactococcus* sp. 20-92 と相同性を有する *Eggerthella* sp. YY7918 株由来の旧黄色酵素 ダイゼインレダクターゼの機能及び構造解析、日本乳酸菌学会 2018 年度大会
6. Hend Altaib, Tomoya Kozakai, Izumi Nomura, Tohru Suzuki, Bifidobacteria as a Cell Factory for Biochemical Production, Amin Tahoun, Hisayoshi Masutani, Tohru Suzuki, 16th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Singapore), 2017.
7. Amin Tahoun, Hisayoshi Masutani, Tohru Suzuki, Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages, Amin Tahoun, Hisayoshi Masutani, Tohru Suzuki, Tohru Suzuki, 16th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Singapore), 2017.
8. Kawada Y, Goshima T, Sawamura R, Yokoyama S, Yanase E, Niwa T, Ebihara A, Inagaki M, Yamaguchi K, Kuwata K, Kato Y, Sakurada O, Suzuki T., Daidzein Reductase of *Eggerthella* YY7918; Three-dimensional Structure Analysis Using SAXS, 16th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Singapore), 2017,.
9. 宇野 早織、佐藤 拓海、野村 泉、加納 康正、鈴木 徹、新村 洋一、川崎信治 *Bifidobacterium*

infantis の O₂ 高感受性に關与する原因酵素に關する研究, 日本乳酸菌学会大会ビフィズス菌,
2017

10. 鈴木 徹, タフオン アミン, 野村 泉, ビフィズス菌のゲノム操作系の構築, 第 69 回日本生物工学会大会(シンポジウム), 2017
11. Tohru Suzuki, Amin Tahoun, Hisayoshi Masutani, Hanem El-Sharkawy, Trudi Gillespie, Ryo P. Honda, Kazuo Kuwata, Mizuho Inagaki, Tomio Yabe and Izumi Nomura, Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages, World Conference on Prebiotics & Probiotics, (Geneva, swiss), 2017
12. 小酒井智也, 和泉絢子, 野村 泉, 小田巻俊孝, 堀米綾子, 鈴木 徹, ビフィズス菌ビフィズス菌の二成分制御系による環境適応機構の解明, 日本乳酸菌学会大会, 2017
13. 水谷綾乃, 稲垣瑞穂, 鈴木 徹, ヒト大腸フローラモデルで再現した腸内菌叢に対する Stachyose の影響, 日本乳酸菌学会大会, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。