

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08335

研究課題名(和文)植物乳酸菌が産生する病原毒素阻害物質の発見と感染症の予防改善への応用

研究課題名(英文) Finding of the pathogenic toxin inhibitor and its application to the prevention of infectious diseases

研究代表者

ナランダライ ダンシーツォーダロ (Narandalai, Danshiitsoodol)

広島大学・医系科学研究科(薬)・特任助教

研究者番号：00786072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、マタタビから分離されたLb.reuteri BM53-1株の病原性菌の毒素阻害活性に関する研究を行った。BM53-1株が産生するTS-inhibitorはtstの発現を抑制すると共に、黄色ブドウ球菌のクオラムセンシング機構に関わるいくつかの遺伝子の発現を低下させると共に炎病原性菌の感染によるIL-8産生量を有意に阻害することが分かった。また、ペロ毒素の産生を阻害する乳酸菌のスクリーニングを行い、7つのQS阻害物質を産生する候補株を取得した。続けて、BM53-1株のオレンジ発酵液には緑膿菌の毒素であるピオシアニンの産生を阻害する物質が存在することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は大学院医系科学研究科(薬科学分野)に所属し、未病・予防医学の立場から、機能性食品、サプリメントの開発を目標とした基礎研究を進めている。今回の研究では、病原性細菌の感染により誘発される「腸管バリアの破綻」に伴う炎症性サイトカインの発現を制御する物質の探索に注目し、構造と機能を明らかにすることを目標とした。これまで、感染症の治療には抗生物質が汎用されてきたが、多剤耐性菌の出現により、新たな感染症制御法を模索せざるを得ない状況下にある。そのため、安全性の高いプロバイオティクスに着目し、感染病予防に対する新たな感染症制御法の確立へ向けた、重要な知見を提案することができると思われる。

研究成果の概要(英文)：Probiotics are non-pathogenic microorganisms that, when administered in adequate amounts, exert health benefits on the host. In our laboratory, we have isolated over than 1000 probiotic strains from plant sources and determined various functions against human pathogens. As a result, a biosurfactant produced by Lactobacillus reuteri BM53-1 strain isolated Actinidia polygama shows significant inhibitory assay against toxic shock syndrome toxin from S. aureus (TSST). Moreover, the gene expression of extracellular toxins significantly reduced as well. We have screened the effect of 11 plant derived LAB strains on the adhesion of Caco-2 cells by pathogens. It was revealed that EPS produced by Lb. plantarum SN35N and TS-inhibitor from BM53-1 showed significant inhibition rates against adhesion of pathogens on Caco-2 cell. Further, the same probiotic strains were screened for IL-8 suppression assay in vitro. As a result, TS-inhibitor was found to be most inhibitory against IL-8 production.

研究分野：応用微生物学

キーワード：植物乳酸菌 TSST-1 病原性菌 IL-8

1. 研究開始当初の背景

トキシンショック症候群 (Toxic Shock Syndrome, TSS) は、黄色ブドウ球菌が産生する TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1) と呼ぶ外毒素が、免疫システムを攪乱することにより誘発される疾患である。TSST-1 は、スーパー抗原として非特異的に T 細胞を活性化することで、過剰な炎症性サイトカインの産生を引き起こし、播種性血管内凝固や多臓器不全等の重篤なショック症状を引き起こす。臨床分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の 75% が TSST-1 産生遺伝子を保有しており [1]、毒素産生性の MRSA に感染すると、その治療は極めて困難となる。

申請者は、広島県が採択された、文部科学省・都市エリア産学官連携促進事業 (発展型) における杉山プロジェクト (事業期間：平成 20-22 年度) に研究員として参加し、機能性分子を産生する植物由来乳酸菌 (植物乳酸菌) の分離探索研究に力を注いだ。これまでに分離・同定された 1000 株を超える植物乳酸菌をスクリーニングした結果、マタタビから分離された植物乳酸菌 BM53-1 株が、黄色ブドウ球菌の TSST-1 産生を阻害する物質「TS-inhibitor」をつくることを発見した。

これまでの研究結果から、*Lactobacillus (Lb.) reuteri* と同定された BM53-1 株の培養液上清中に存在する TS-inhibitor はリポ多糖であろうと推測している。また、最近実施した定量 RT-PCR 法による解析結果から、TS-inhibitor は TSST-1 遺伝子 (tst) の発現を転写レベルで阻害することも明らかにした。一般的に、乳酸菌が分泌する乳酸や、乳酸菌株特異的に産生する抗菌性ポリペプチドは、病原細菌の増殖を阻害することがある。他方、ピフィズス菌による腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7 株に対する感染防止効果 [2] と、*Lb. gasseri* LG21 の抗ピロリ菌効果 [3] が報告されているが、これらは有機酸による粘膜保護作用や増殖抑制作用によるものである。本研究における BM53-1 株がつくる TS-inhibitor ように、病原性細菌の毒素産生を転写レベルで阻害する物質に関する報告は未だ知られていなかった。

2. 研究の目的

申請者は、植物乳酸菌 *Lb. reuteri* BM53-1 の培養液上清中には、虫歯菌によるバイオフィルムの形成を強く阻害する物質が存在することも見出している。一般的に、細菌のバイオフィルム形成は、黄色ブドウ球菌における TSST-1 の産生と同様に、クオラムセンシング (quorum sensing) と呼ばれる機構によって制御される [4,5]。従って、BM53-1 株の産生する TS-inhibitor は、クオラムセンシング機構を阻害して、tst 遺伝子の発現を抑制している可能性がある。本研究では、BM53-1 株が産生する TS-inhibitor の生合成遺伝子クラスターを明らかにするとともに、本阻害物質による阻害機序を明らかにし、更に BM53-1 株以外の乳酸菌が、TS-inhibitor-like 物質をつくるか否か調査することを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 乳酸菌培養

-80℃の冷凍庫に保存された各乳酸菌株のグリセロールストックを 1%になるよう、MRS ブロスに接種し、28℃または 37℃にて 24 時間、静置培養した。続いて、この種培養液を 1%になるよう MRS ブロスに接種し、28℃または 37℃にて 24 時間静置培養した。出来上がった培養上清をフィルター殺菌し、サンプルとした。

(2) 定量的 PCR によるサイトカイン遺伝子の発現解析

黄色ブドウ球菌 TF-2991 株を BHI (Brain Heart Infusion) ブロスに培養し、6 時間、10 時間、24 時間後の菌体を回収した。その後 PBS にて洗浄し、全 RNA 抽出、cDNA に変換後、TaqMan PCR 法で黄色ブドウ球菌のクオラムセンシング関連遺伝子である *agrA*, *agrB*, *agrC*, *srrA*, *srrB*, *hla*, *tst* 遺伝子発現量を測定した。各標的遺伝子発現量は 16S 遺伝子発現量で標準化後、無処理区に対する相対発現比として表示した。

(3) 病原性菌の Caco-2 細胞への接着活性

腸管上皮細胞モデルとしてヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞を用いた。腸管上皮細胞モデルとしてヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞を用いた。5x10⁶cells/ml の Caco-2 細胞を 24well plate に播種し 10% FBS を含む DMEM 培地で、37℃、5% CO₂ 条件下で培養した。70%コンフルエントになった細胞に DMEM 培地に懸濁した細菌を 50 MOI (multiplicity of infection) で接種し、約 1 時間培養した。その後 0.1% の Triton X-100 にて処理を行いそれぞれ病原性菌を LB アガーを用いてコロニーカウントを行った。

(4) IL-8 測定

Caco-2 細胞を 10% FBS を含む DMEM 培地で、37℃、5% CO₂ 条件下で 70%コンフルエントになるまで培養した後、5%のサンプルを含む DMEM 培地で 30 分間インキュベートした。その後、病原菌で腸管の炎症を起こし、炎症サイトカインであるインターロイキン-8 (IL-8)の分泌量を測定した。

(5) *Lb. reuteri* BM53-1 株の全ゲノム解析

全ゲノム解析は口腔常在微生物叢解析センターへの委託解析として実施した。BM53-1 株を MRS 培地にて 24 時間培養し、遠心分離により回収した菌体をサンプルとして、ゲノム DNA の抽出を行った。

4. 研究成果

4.1. 黄色ブドウ球菌のクオラムセンシングにおける *Lb. reuteri* BM53-1 がつくる TS-inhibitor の影響

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌MRSAは、多くの抗生物質に耐性を示すと共に、その75%がTSST-1毒素を産生する。黄色ブドウ球菌には、2つのクオラムセンシングシステム (SQS1及び2) の存在が報告されている。そのうちSQS2は遺伝子調節系であるagr (accessory gene regulatory) の生産物で構成される。Agrが活性化されると、RNAIIおよびRNAIIIが産生され、そのRNAIIIが TSST-1の発現を誘導する。定量RT-PCRの結果、BM53-1株の産生するTSST-1阻害物質はtstの発現を抑制すると共に、黄色ブドウ球菌のクオラムセンシング機構に関わるいくつかの遺伝子の発現を低下させることがわかった (図1A)。BM53-1が産生するTS-inhibitorの*S. aureus*凝集体阻害活性を調べたところ、TS-inhibitor処理することで黄色ブドウ球菌の凝集が有意に抑制されることが分かった。また、培養6時間および10時間後にTSIを0.06%の最終濃度で適用すると、TSIの毒素阻害活性が大幅に低下した (図1B)。従って、発育の後期対数期でのTSST-1遺伝子の発現が阻害されてないことから、TS-inhibitorは末に産生されたTSST-1毒素蛋白質を不活性化するよりは黄色ブドウ球菌の対数期時のクオラムセンシングに関わっていることを確認した。

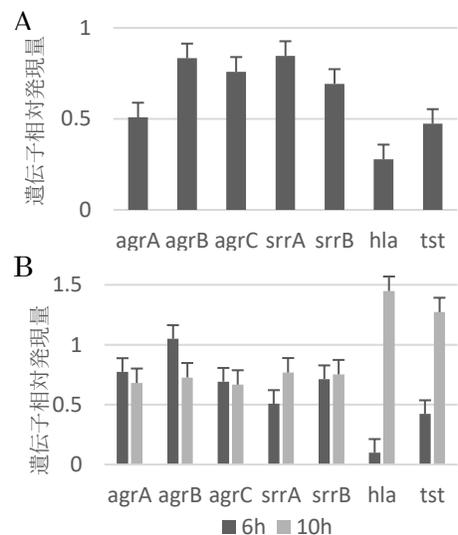


図1. 定量 RT-PCR 法によるクオラムセンシング遺伝子発現の比較

4.2. 腸管出血性大腸菌O-157株のペロ毒素産生に対する阻害物質をつくる乳酸菌をスクリーニング

腸管出血性大腸菌におけるペロ毒素の産生は、QseCおよびQseBより成る二成分制御系によって制御されるが、同時に鞭毛形成に必要なflhDC遺伝子の転写も制御している。この系を応用したアッセイ用のベクターは既に構築済みであり、当研究室が保有する植物乳酸菌ライブラリーに対し、ペロ毒素の産生を阻害する乳酸菌のスクリーニングを行った。その結果、7つのQS阻害物質を産生する候補株を取得した。そ

の1つである*B. coagulans* 29-2E株の培養液上清を添加した培地で*E. coli* DH5 α [pLES-AQSA] を培養した場合に、培養開始から30時間で青色素の産生抑制が確認された。続いて、抗 β -gal抗体を用いて、western blottingを行った。この結果から、29-2E株培養液上清を添加した場合には、 β -Galの産生が抑制されていることが示された（図2）。一方で、29-2E株培養液上清では、 β -Galタンパク質の酵素活性には影響しないことから、29-2E株の培養液上清にAI-3を介したQS機構に対する阻害物質の存在する可能性が示唆された。

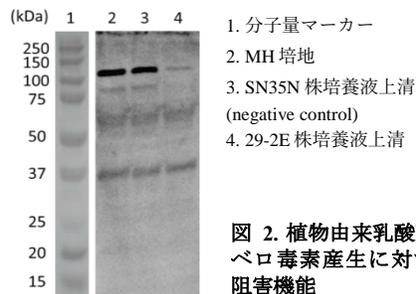


図2. 植物由来乳酸菌のペロ毒素産生に対する阻害機能

4.3. 植物乳酸菌のヒト腸管上皮細胞 Caco-2 における抗炎症作用の解析

本研究では、貴重植物、薬用植物、野菜などから植物由来乳酸菌を分離し、1000株を超える同定済みの植物由来乳酸菌からなるライブラリーを樹立した。これらの植物由来乳酸菌は動物由来乳酸菌と比べ、胃酸などの耐性が高く、生きて腸までたどり着く確率が高いことが分かった。そこで、*S. enterica*, *S. aureus*, *C. jejuni* に対する植物乳酸菌の腸管感染症予防効果について in vitro 実験を行った。スクリーニングを行った11菌株の培養上製のうちBM53-1株のみが*C. jejuni* 菌のヒト腸管細胞 Caco-2 細胞への接着阻害効果を示した（図3A）。一方で、梨から分離された*Lb. plantarum* SN35N、ミラクルフルーツから分離された*Lb. plantarum* M30や伊予柑から分離された*Lb. brevis* 174A株は*S. enterica*の細胞への接着を有意に抑制することが分かった。また、これまでの研究の結果 *Lb. plantarum* SN35N株はいくつかの機能性を持つ細胞外多糖類（EPS）を産生することが確認された。よって、精製されたSN35N株のEPS及びBM53-1株のTS-inhibitorの接着阻害活性を調べた（図3B）。その結果、両物質が各病原性菌の細胞接着能を有意に低下させていることが分かった。続けて、植物乳酸菌の炎症性サイトカインに対する阻害機能についてスクリーニングを行った（図4A）。

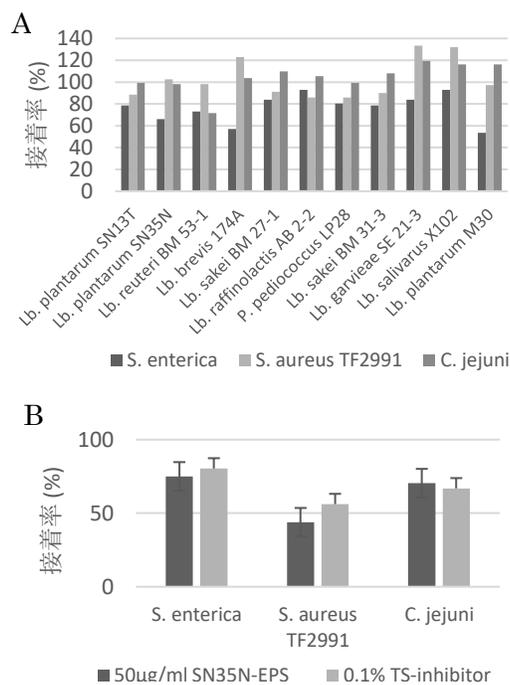


図3. Caco-2における抗炎症作用の解析

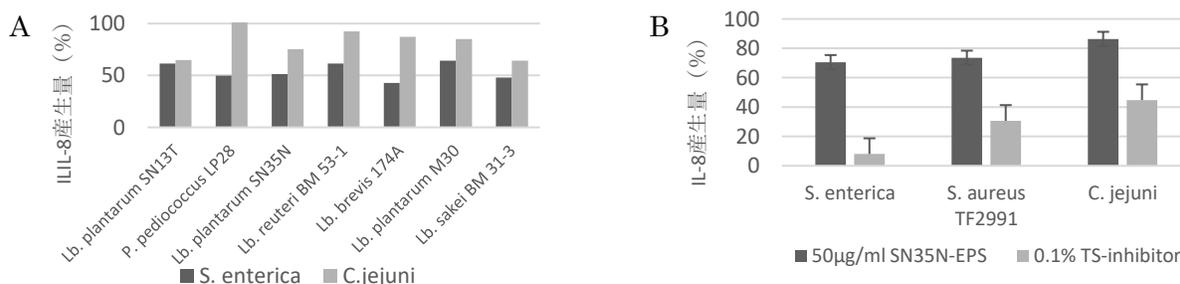


図4. 植物由来乳酸菌の炎症性サイトカイン IL-8 に対する阻害活性

その結果、バナナの葉由来 *Lb. plantarum* SN13T 及びトチノキから分離された *Lb. sakei* BM31-3 株の培養上製には *S. enterica* または *C. jejuni* の感染による IL-8 産生を有意に抑制する物質が存在するこ

とが明らかになった。一方で、ロンガンから分離された *P. pediococcus* LP28 株は *S. enterica* に対する IL-8 阻害活性を示すものの、*C. jejuni* に対する阻害作用は認められなかった。また、精製された SN35N 株の EPS 及び BM53-1 株の TS-inhibitor の IL-8 阻害活性を行った結果、SN35N の産生する EPS と比べ BM53-1 株の TS-inhibitor の IL-8 阻害率は高いことが明らかになった (図 4B)。

4.4. *Lb. reuteri* BM53-1 株の緑膿菌に対する増殖及び毒素産生阻害機能

BM53-1 を 9 種類の果汁で培養した結果、オレンジ果汁培地でのみ、培養液上清中に緑膿菌の増殖阻害活性が確認された。抗菌物質の構造解析の結果、酢酸であることが分かった。また、酢酸濃度を測定した結果、今まで報告された乳酸菌培養条件の中で最も高い酢酸収率であることが明らかになった (図 5)。

緑膿菌の病原因子は菌体と菌体外成分と大きく二つに分かれる。菌体外成分にはアルギン酸やエステラーゼなどの高分子成分と、ミトコンドリアの呼吸機能を阻害するピオシアニンが含まれる。そこで、BM53-1 株のオレンジ果汁発酵液のピオシアニン抑制効果について検討した。その結果、BM53-1 株の産生量と同量の酢酸と比べ、オレンジ発酵液には緑膿菌の毒素であるピオシアニンの産生を阻害する物質が存在することが分かった (図 6)。

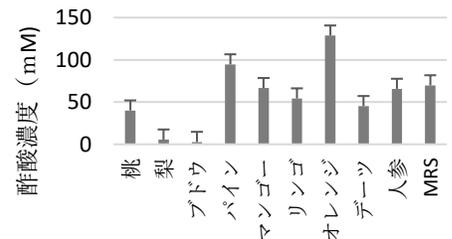


図 5. オレンジ果汁発酵液中の酢酸産生

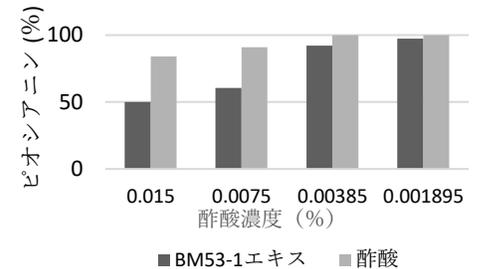


図 6. オレンジ果汁発酵液のピオシアニン阻害活

4.5. *Lb. reuteri* BM53-1 株の全ゲノム解析

黄色ブドウ球菌の毒素 TSST-1 を阻害する機能を持つ植物乳酸菌 BM53-1 株の全ゲノムシーケンス分析を行った。その結果、BM53-1 株のゲノムは総塩基数 2,033,877bp (GC含有率 38.0%) であり、得られた配列について解析を行った結果 Protein coding sequence (CDS) 数は 1,891 であった (図 7)。

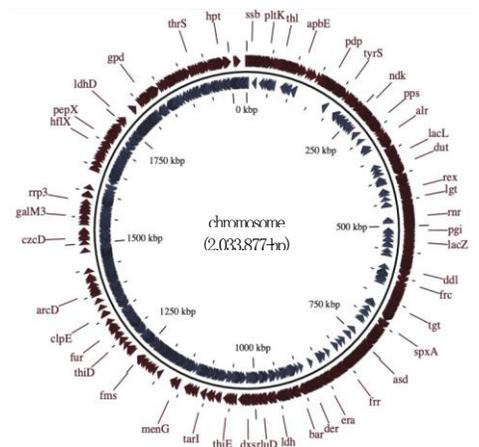


図 7. *Lb. reuteri* BM53-1 株の全ゲノムアノテーション結果

<引用文献>

1. Nagao, M. *et al.*, (2009) *BMC Microbiol.* **9**:52.
2. Fukuda, S. *et al.*, (2011) *Nature.* **469**:543–547.
3. Hamilton-Miller, J.M. *et al.*, (2003) *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**:360–366.
4. Andrey, D.O. *et al.*, (2010) *J. Bacteriol.* **192**:6077–6085.
5. Yoshida, A. *et al.*, (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6283–6291.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noda M, Sugimoto S, Hayashi I, Danshiitsoodol N, Fukamachi M, Sugiyama M	4. 巻 164
2. 論文標題 A novel structure of exopolysaccharide produced by a plant-derived lactic acid bacterium <i>Lactobacillus paracasei</i> IJH-SONE68.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 87-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy048	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M.	4. 巻 84
2. 論文標題 Expression of Genes Involved in Bacteriocin Production and Self-Resistance in <i>Lactobacillus brevis</i> 174A Is Mediated by Two Regulatory Proteins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Appl. Environ. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e02707-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.02707-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noda M, Shiraga M, Kumagai T, Danshiitsoodol N, Sugiyama M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Characterization of the SN35N Strain-Specific Exopolysaccharide Encoded in the Whole Circular Genome of a Plant-Derived <i>Lactobacillus plantarum</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 536-545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b17-00840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 杉山政則, Narandalai Danshiitsoodol	4. 巻 17
2. 論文標題 腸内細菌と胆汁酸	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 たんじゅうさん	6. 最初と最後の頁 14 - 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Narandalai Danshiitsoodol, 野田正文, 山野幸子, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 植物由来乳酸菌 <i>Lactobacillus reuteri</i> BM53-1の産生する緑膿菌増殖阻害物質に関する研究
3. 学会等名 日本乳酸菌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本知子, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 飯塚徳男, 杉山政則
2. 発表標題 乳酸菌と生薬のコラボレーションによる新規医薬品の創生
3. 学会等名 日本乳酸菌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Md Rakhimuzzaman, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 <i>Weissella confusa</i> K-28 isolated from <i>Senna obtusifolia</i> produces both ornithine and exopolysaccharide
3. 学会等名 日本乳酸菌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Md Rakhimuzzaman, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 Isolation and characterization of the ornithine-high producing lactic acid bacteria (オルニチンを高生産する植物乳酸菌の分離および同定とその特徴)
3. 学会等名 第32回 バイオテクノロジー研究成果発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田正文, 丸山昌史, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 植物乳酸菌Lactobacillus plantarum SN13Tの摂取によるマウスのアルコール中毒症状の改善 腸内細菌叢との関連性
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会,
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田正文, 野口詩乃, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 病原性細菌の毒素産生能を阻害する物質をつくる植物由来乳酸菌の探索研究
3. 学会等名 日本食品衛生学会第114回 学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Narandalai Danshiitsoodol, 野田正文, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 病原細菌の毒素産生能を阻害するLactobacillus reuteri BM53-1由来物質の特性
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Md Rakhimuzzaman, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 Isolation and characterization of the lactic acid bacteria from natural sources to screen high ornithine-producing strains
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山昌史, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 飲酒に及ぼす植物乳酸菌の保健機能性
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 山野幸子, 東川史子, 林幾江, 深町光宏, 杉山政則
2. 発表標題 果実より新しく分離した植物由来乳酸菌Lactobacillus paracaseiの特性
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2017年度大会,
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野田正文, 丸山昌史, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 肝機能傷害を改善する植物乳酸菌SN13T株の機能解析 アルコール中毒症状と腸内細菌叢の改善
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野口詩乃, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 杉原奈穂, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 Quorum sensing機構を阻害する物質のスクリーニングシステムの構築とその応用
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉原奈穂, 野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 野口詩乃, 東川史子, 林幾江, 杉山政則
2. 発表標題 植物乳酸菌Lactobacillus reuteri BM53-1の産生するバイオフィーム形成阻害物質の作用機構
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田正文, 丸山昌史, Narandalai Danshiitsoodol, 東川史子, 杉山政則
2. 発表標題 : アルコールに対する植物乳酸菌SN13T株の保健機能性 アルコールによる肝機能傷害と腸内細菌叢の改善 ,
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	杉山 政則 (Sugiyama Masanori) (30106801)	広島大学・医系科学研究科(薬)・共同研究講座教授 (15401)	
研究 分担者	野田 正文 (Noda Masafumi) (40457289)	広島大学・医系科学研究科(薬)・特任准教授 (15401)	