

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07564

研究課題名(和文)嫌気性菌Bifidobacterium属細菌のO<sub>2</sub>感受性メカニズムの解明研究課題名(英文)Elucidation of the sensitivity mechanism of bifidobacteria to O<sub>2</sub>

研究代表者

川崎 信治 (Kawasaki, Shinji)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：50339090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は嫌気性菌のO<sub>2</sub>感受性機構の解明を目的として、嫌気性菌のクロストリジウム菌やビフィズス菌、乳酸菌を用いて研究を行ってきた。乳児由来のビフィズス菌:Bifidobacterium infantisは低濃度のO<sub>2</sub>下で生育が著しく阻害されることを見だし、O<sub>2</sub>感受性の原因となる活性酸素H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する酵素を同定した。本酵素をコードする遺伝子をO<sub>2</sub>耐性株のB. minimumに導入した結果、O<sub>2</sub>感受性株に変化したことを受け、本申請にてさらに研究を進めた。申請課題では、本酵素がO<sub>2</sub>に対して高い親和性を持つことを検出し、かつ他のビフィズス菌のO<sub>2</sub>感受性にも深く関与することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビフィズス菌は乳児腸内菌叢の優占種であり、高いプロバイオティクス効果を持つ。健康や医療分野での利用が期待されるが、高いO<sub>2</sub>感受性をもつが故に産業利用が困難である。我々は、高いプロバイオティクス活性を持つ乳児由来のビフィズス菌:Bifidobacterium infantisが、低濃度のO<sub>2</sub>下で生育が著しく阻害されることを見だし、本菌株からO<sub>2</sub>感受性の原因となる活性酸素H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する酵素を同定した。1つの原因酵素がビフィズス菌のO<sub>2</sub>感受性を左右する可能性が推定され、本酵素の機能を分子生物学の観点から解明することで、高いO<sub>2</sub>感受性を示す有用菌種の育種開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We are conducting research using anaerobic bacteria Clostridium, Bifidobacterium, and lactic acid bacteria with the aim of determining the O<sub>2</sub> sensitivity mechanism of anaerobic bacteria. We have previously discovered that the growth of Bifidobacterium infantis, a bacterium derived from infants with high probiotic activity, is significantly inhibited under low concentrations of O<sub>2</sub>. The enzyme that produces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was identified. Furthermore, when the gene encoding this enzyme was introduced into an O<sub>2</sub>-resistant strain of B. minimum, this strain became O<sub>2</sub>-sensitive. Further research revealed that this enzyme has a high affinity for O<sub>2</sub>, strongly suggesting that it may function as a causative enzyme involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in other Bifidobacterium strains.

研究分野：嫌気微生物学

キーワード：Anaerobe oxygen sensitivity ROS Bifidobacterium Clostridium probiotics

## 1. 研究開始当初の背景

ビフィズス菌は乳児腸内菌叢の優占種であり、高いプロバイオティクス効果を持つ。健康や医療分野での利用が期待されるが、高い  $O_2$  感受性をもつが故に産業利用が困難な菌種として知られている。

ビフィズス菌が  $O_2$  感受性を示す分子機構は不明である。ビフィズス菌の  $O_2$  感受性に関する研究では、 $O_2$  に感受性を示す菌株が培地中に活性酸素の  $H_2O_2$  を生成する現象が報告されたが (deVries *Arch Micro*. 1969, Shimamura *J Dairy Sci*. 1992) 現在も  $O_2$  感受性の起因となる  $H_2O_2$  生成の分子メカニズムは不明である。筆者らはヒト由来の菌株が高い  $O_2$  感受性を示し、ウシやミツバチの腸内由来の菌株が高い  $O_2$  耐性能を示すことを報告して以降、両菌株の比較解析による  $O_2$  感受性メカニズムの解明を行ってきた。ビフィズス菌種を様々な  $O_2$  濃度下で培養した結果、ヒト由来の菌株は 5% 程度の  $O_2$  下での液体振盪培養でも生育が阻害されるが、牛やミツバチ由来の菌株は高い耐性を示すなど、菌株ごとの  $O_2$  感受性が顕著に異なる特徴が観察された (Kawasaki et al. *AEM*. 2006)。様々なビフィズス菌種を異なる  $O_2$  濃度下で培養した結果、株に応じて  $O_2$  高感受性、 $O_2$  感受性、 $O_2$  耐性、微好気性、の 4 つのグループに区分された (Kawasaki et al. *Academic Press*, 2017)。菌株ごとに顕著に異なる  $O_2$  感受性は何に起因するのであろうか。本疑問の解明を目的として、 $O_2$  感受性株の  $H_2O_2$  生成機構の解析に着手した。その結果、筆者らはビフィズス菌の  $H_2O_2$  生成酵素の精製に世界で初めて成功し、2 種類の酵素を同定した。1 つは属の代表種の *B. bifidum* から NADH oxidase (*b*-type dihydroorotate dehydrogenase、以下 bDHOD) を精製し、反応機構解析から本酵素が  $H_2O_2$  生成に関与しうることを報告した (Kawasaki et al. *AEM*, 2009)。また高いプロバイオティクス効果を持つ *B. infantis* はビフィズス菌の中でも特に高い  $O_2$  感受性を示すことを見だし、 $H_2O_2$  生産型の NADPH oxidase (NPOX) の精製に成功した (Tanaka et al. *Sci Rep.*, 2018)。本酵素をコードする *npoxA* 遺伝子のノックアウト変異株は、 $H_2O_2$  生産量が減少し、菌株の  $O_2$  感受性が低下した。さらに *npoxA* 遺伝子を  $O_2$  耐性株の *B. minimum* に導入したところ、 $H_2O_2$  生産量が増大し、かつ  $O_2$  感受性株へと変化した (Tanaka et al. *Sci Rep.*, 2018)。以上の結果から、NPOX が  $O_2$  感受性の原因酵素の 1 つであることが判明した。また *B. infantis* の *npoxA* 遺伝子は「 $O_2$  の混入に呼応して発現が誘導される」という興味深い現象が観察された。本現象の意味するところは、 $O_2$  高感受性株は  $O_2$  に遭遇すると毒性の高い  $H_2O_2$  を生産することで自らの生育を低下させる自発的な酵素系を有することを示唆していた。

## 2. 研究の目的

上記の背景を基に、 $O_2$  に高い感受性を示すビフィズス菌は  $H_2O_2$  を生産する原因酵素を

保持し、かつ本酵素は  $O_2$  下で発現が誘導されることから、 $O_2$  感受性が高いビフィズス菌株は自発的に  $O_2$  を感知して自身の生育を抑制する機構を持つ可能性を推定した。そこで本研究では、 $O_2$  感受性の原因酵素の解析を基盤とするビフィズス菌の  $O_2$  感受性メカニズムの全容解明を目的とした。また  $O_2$  に高い耐性を持つビフィズス菌をミツバチの腸管から単離した Scardovi らの研究結果に学び、より高い  $O_2$  耐性能を持つビフィズス菌の単離と、単離された株の  $O_2$  耐性に関与する分子機構の解明を目的として、花と訪花昆虫に生息するビフィズス菌の探索を行った。

### 3 . 研究の方法

本研究に用いる株は JCM もしくは DSMZ に寄託されている種の基準株 (type strain) を使用した (以下、記載は種名のみとする)。

筆者らはこれまでに  $O_2$  に高い感受性を示す *B. infantis* において、NAD(P)H を電子供与体として  $O_2$  から  $H_2O_2$  を生成する酵素の精製に成功し、本酵素は nitroreductase-like protein と同定された (Kawasaki et al. *Sci Rep.*, 2018)。そこで *B. infantis* と同様に、特に高い  $O_2$  感受性を示す未解析株の *B. adolescentis* を供試菌として用い、類似酵素の保持の有無を同定することで  $O_2$  感受性の分子機構の共通性を調査することとした。研究手法としては *B. infantis* で用いたカラムクロマトグラフィーによる酵素精製法を用いた。また精製酵素の同定と、 $O_2$  に対する反応機構の同定を目的とした酵素反応解析を行った。

$O_2$  耐性能が高いビフィズス菌の探索に関しては、花を訪花するハナバチを中心に探索を行った。探索の方法としては、筆者らが 2011 年に花から嫌気性の新種乳酸菌として *Lactobacillus floricola* (現 *Holzapferiella floricola*) を単離した方法に準じて (Kawasaki et al. *IJSEM* 2011) 嫌気培養法を組み合わせた培養法にて行った。単離した  $O_2$  耐性能が高いビフィズス菌株は、全ゲノム解読を実施した。

### 4 . 研究成果

$O_2$  感受性の原因酵素として同定した  $H_2O_2$  生産酵素の他菌株における分布を調査するために、*B. infantis* よりも高い  $O_2$  感受性を示す *B. adolescentis* を用いて  $H_2O_2$  生成酵素の精製を試みた。各種クロマトグラフィーを用いた結果、目的とする酵素の完全精製に成功した。論文投稿準備中のため詳細な記述を控えるが、 $O_2$  に対する親和性の測定結果より、*B. infantis* に類似する  $O_2$  親和性を持つことが判明した。一方、本酵素のオルソログは  $O_2$  耐性株にも分布するが、その機能性は不明であった。そこで  $O_2$  耐性株の同酵素をコードする遺伝子を大腸菌の発現ベクターに組み込み、酵素精製と酵素化学的諸性質の解析を行った。本結果も論文投稿準備中のため詳細な記述を控えるが、 $O_2$  に対して低い親和性を示す結果を得た。本酵素の一次構造の比較解析の結果を参考にして、部位特異変異の手法を用いた機能予測を行った。PCR 法にて部位特異変異を挿入した遺伝子を *B. infantis* で作出した本酵素のノックアウト変異株に組み込んだ結果、若干ではあるが  $O_2$  感受性が高くなる結果が得ら

れた。現在、本変異株を用いて詳細な  $O_2$  応答性に関する生理解析を実施している。

$O_2$  に高い耐性を持つビフィズス菌の探索は、ハナバチを中心にして、筆者らが考案した独自の単離方法にて様々な培養法にて試験を行った。その結果、クマバチの腸内から、大気環境（21%  $O_2$  大気）下でもコロニー形成能があるビフィズス菌株が単離された。得られた  $O_2$  耐性能が高いビフィズス菌は、系統分類学的には *Bifidobacterium* 属のクレード内に位置することから *Bifidobacterium* 属に分類されるが、*Bifidobacterium* 属の分類指標である「嫌気性」の定義からはずれるため、ビフィズス菌科（*Bifidobacteriaceae*）の *Bombiscardovia* 属の 2 種として、*Bombiscardovia nodaiensis*, *Bombiscardovia apis* と新種提唱し受理された。両株は、Pacbio シーケンサーにて全ゲノム解読に成功した。現在は、大気下でもコロニー形成が可能な 2 株のビフィズス菌の高度な  $O_2$  耐性能に寄与する分子機構の解明を目的として、 $O_2$  高感受性株を対照区とした比較解析を進めている。なお、本研究成果の一部はアメリカ微生物学会が発行する *Microbiology Spectrum* 誌に掲載された（**Kawasaki et al. *Microbiology Spectrum* 2023**）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kawasaki Shinji, Ozawa Kaori, Mori Tatsunori, Yamamoto Arisa, Ito Midoriko, Ohkuma Moriya, Sakamoto Mitsuo, Matsutani Minenosuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Symbiosis of Carpenter Bees with Uncharacterized Lactic Acid Bacteria Showing NAD Auxotrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00782-23	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 青木 麻由、Fariza Junialfatiha、和泉 翔、佐藤 拓海、佐々木 泰子、川崎 信治
2. 発表標題 乳酸菌とビフィズス菌のO2感受性メカニズムに関する研究
3. 学会等名 日本乳酸菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤芳里、森達則、伊藤翠子、出口恵美理、櫻井天晴、服部夏、松谷峰之介、川崎信治
2. 発表標題 クマバチに分布する新種乳酸菌群で構成される菌叢の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇津 智晴、青木 麻由、和泉 翔、川崎 信治
2. 発表標題 絶対嫌気性菌 Clostridium acetobutylicum の酸化ストレス存在下における生育停止機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎信治
2. 発表標題 嫌気性菌と酸素：ピフィズス菌のO <sub>2</sub> 適応機構
3. 学会等名 ピフィズス菌研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本安里沙、鈴木大貴、森達則、石毛太郎、佐藤拓海、川崎信治
2. 発表標題 花と訪花昆虫に生息する嫌気性細菌の微生物生態に関する研究
3. 学会等名 日本乳酸菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永塚健司、宇津智晴、田島怜、佐藤拓海、新村洋一、川崎信治
2. 発表標題 絶対嫌気性菌 Clostridium 属細菌のO <sub>2</sub> 適応機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野 寿広、渡部 拓也、佐藤 拓海、川崎 信治
2. 発表標題 ピフィズス菌の生理状態に影響を及ぼす環境要因に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤翠子、小澤芳里、森達則、山本安里沙、大熊盛也、坂本光央、松谷峰之介、川崎信治
2. 発表標題 クマバチ属のコア腸内菌叢を構成する乳酸菌とビフィズス菌の新種提唱と機能解析
3. 学会等名 ビフィズス菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 畠典雅, 富岡 哲平, 小宮山 新大, スチュワード グナルディ, 川崎信治
2. 発表標題 絶対嫌気性Clostridium属のO2感受性の分子機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kawasaki, S., K. Ozawa, Mori, T., A. Yamamoto, M. Ohkuma, M. Sakamoto, M. Matutani
2. 発表標題 Symbiosis of Carpenter Bees with Uncharacterized Lactic Acid Bacteria Showing NAD Auxotrophy
3. 学会等名 Discover BMB 学会 (開催地Texas, USA) (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------