

機関番号：32701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580298

研究課題名（和文）グリセロールに対する *L. reuteri* の遺伝子発現様式の *in vivo* 解析研究課題名（英文）In vivo analysis of the gene expression of *L. reuteri* under the presence of glycerol

研究代表者

森田 英利（MORITA HIDETOSHI）

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：70257294

研究成果の概要（和文）：

*Lb. reuteri* は、グリセロールを基質として 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (3-HPA) を生成する。菌体外に放出された脱水型の 3-HPA は、液体培地中では可逆性のある 3-HPA 水和型や二量体などの形態をとり (HPA システム)、それら 3-HPA はロイテリンと総称されている。ロイテリンは、グラム陽性菌、グラム陰性菌、酵母、カビ、原生動物、ウイルスに至るまで非常に広い抗菌スペクトルを示し、その生育を抑制する。それら微生物への抗菌機序は、その広い抗菌スペクトルから、微生物のリボヌクレオチド還元酵素活性の抑制によるものと推察され、酵素結合部位へのリボヌクレオチドとの競合やリボヌクレオチド還元酵素のスルフヒドリル基への作用などが考察されている。

3-HPA は反応性に富んだ物質であるため、消化管内で *Lb. reuteri* がロイテリンを産生している報告はなかった。そこで、無菌マウスに *Lb. reuteri* JCM 1112 の 1 菌株を定着させ、<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-グリセロールを用いた二次元核磁気共鳴法によりマウス盲腸内で 3-HPA を *in vivo* 検出した。さらに、<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-グリセロールを自由摂取させたマウス消化管から回収した *Lb. reuteri* では、グリセロールからの 3-HPA 産生に関する遺伝子が、グリセロール無摂取群と比較して有意に発現していた。特に、グリセロールトランスポーター遺伝子である *pduF* の発現量は、グリセロールを摂取していない群との有意差を認めた。腸内フローラ構成細菌に対し、消化管内で産生される抗菌物質の作用がプロバイオティクスの整腸効果として示唆されているが、*in vivo* でそのような抗菌物質を検出した報告はなかった。*Lb. reuteri* の産生した 3-HPA の *in vivo* 検出により、プロバイオティクスが哺乳動物の消化管内で抗菌物質を産生していることが初めて証明された。

研究成果の概要（英文）：

*Lb. reuteri* generates 3-hydroxy propionaldehyde (3-HPA) as a substrate with glycerol. The dehydration type of 3-HPA is released from the cells and the hydration type or the dimer of 3-HPA with the reversibility (HPA system) in broth. All the types of 3-HPA are named generally with reuterin. There are no report that *Lb. reuteri* produced reuterin in animal gastrointestinal tract. Therefore, *Lb. reuteri* JCM 1112 associated gnotobiotic mouse was used, and 3-HPA in the mouse cecal contents was detected *in vivo* by the two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) using <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-glycerol. The genes which associated with 3-HPA production from <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-glycerol was expressed in intentionality comparison with no glycerol intake group. Particularly, the expression of *pduF* which was a glycerol transporter gene recognized the significant difference with the group which take in no glycerol. here was no report that detected from probiotics such an antibacterial *in vivo*. It was proved that probiotics produced antibacterial in the gastrointestinal tract of the mammal according to our first report that *in vivo* detection of 3-HPA which was produced by *Lb. reuteri*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：畜産学・草地学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 畜産学・草地学

キーワード：Lactobacillus reuteri ロイテリン in vivo 検出 ノトバイオートマウス  
グリセロール代謝

1. 研究開始当初の背景

我々は、世界に先駆けて、Lactobacillus reuteri の全ゲノム情報とその解析に関する論文を報告し、抗菌物質であるロイテリンの in vivo 検出に成功した (Morita et al., DNA Res., 15: 151-161, 2008)。そのゲノム情報から、L. reuteri の特徴であるロイテリン産生能に関するすべての遺伝子を抽出した。それにより、以下の実験を遂行することが可能であった。

2. 研究の目的

本申請では、ヒト消化管由来の乳酸菌 Lactobacillus reuteri JCM 1112 (親株) と、その抗菌物質 (ロイテリン) 合成酵素遺伝子群の破壊 ( $\Delta$ gupCDE) 株のノトバイオートマウスを作出する。13C3-グリセロールを自由摂取させた各々のマウス消化管内容物から 2 次元核磁気共鳴法を用いてロイテリンの in vivo 検出を試み、gupCDE および dlt 遺伝子の機能解析を行う。また、ノトバイオートマウスの消化管内容物で増殖した L. reuteri のトランスクリプトーム解析を行う。グリセロール存在下での L. reuteri の消化管内生育性や細胞付着性への影響を検討し、最終的には L. reuteri がグリセロール代謝経路を有する意義を考察する。L. reuteri を用いた抗菌性試験は数多く報告されているが、in vivo でのロイテリン産生はこれまで証明されていない。研究代表者と連携研究者の福田は、ループアッセイ法による L. reuteri ノトバイオート monoassociate (消化管内 L. reuteri 単一フローラ) マウスの盲腸内容物から 1H, 13C-2 次元核磁気共鳴 (NMR) 法によ

りロイテリンを高感度で in vivo 検出できるシステムを構築し、2007 年度の日本乳酸菌学会大会で報告した。ノトバイオートマウスは、特定の微生物の生体影響やプロバイオティクス効果を検討できる有効な実験材料である。

本研究では、L. reuteri JCM 1112 (親株) と、その gupCDE 遺伝子破壊 ( $\Delta$ gupCDE) 株および dlt 遺伝子破壊 ( $\Delta$ dlt) 株のノトバイオートマウスを用いて、13C3-グリセロール存在下でのロイテリンおよび周辺代謝産物の in vivo 検出と定量を行う。

3. 研究の方法

L. reuteri の  $\Delta$ gupCDE 株の作出は完了している。これら遺伝子破壊株および L. reuteri JCM 1112 (親株) を germ-free マウスへ経口投与し、それぞれのノトバイオートマウスを作出する。グリセロール投与群と無投与群の各ノトバイオートマウス糞便中の菌数を比較する。各ノトバイオートマウスに 13C3-グリセロールを含む飲料水を自由摂取させ、1H, 13C-2 次元 NMR 法により、消化管内容物および糞便中のロイテリンを検出する。各ノトバイオートマウスの腸管内容物から L. reuteri の RNA を精製し、グリセロール代謝に関する遺伝子についてトランスクリプトーム解析を行う。各菌株においてグリセロールの有無による遺伝子発現プロファイルを比較し、in vivo でグリセロールが L. reuteri に対して与える影響を検討する。

4. 研究成果

無菌マウスに Lb. reuteri JCM 1112 を定着させ、

$^{13}\text{C}_3$ -グリセロールを用いた二次元核磁気共鳴法によりマウス盲腸内で 3-HPA を *in vivo* 検出した。さらに、 $^{13}\text{C}_3$ -グリセロールを自由摂取させたマウス消化管から回収した *Lb. reuteri* では、グリセロールからの 3-HPA 産生に関与する遺伝子が、グリセロール無摂取群と比較して有意に発現していた。特に、グリセロールトランスポーター遺伝子である *pduF* の発現量は、グリセロールを摂取していない群との有意差を認めた。腸内フローラ構成細菌に対し、消化管内で産生される抗菌物質の作用がプロバイオティクスの整腸効果として示唆されているが、*in vivo* でそのような抗菌物質を検出した報告はなかった。*Lb. reuteri* の産生した 3-HPA の *in vivo* 検出により、プロバイオティクスが哺乳動物の消化管内で抗菌物質を産生していることが初めて証明された。

#### 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 1 件)

森田英利・鈴木武人, ロイテリ菌 (*Lactobacillus reuteri*) の感染防御能とそのメカニズムについての一知見, 食品工業, 54: 65~71 (2011).

[学会発表] (計 7 件)

森田英利, 乳酸菌とビフィズス菌のゲノム解析: 昨今のシーケンス事情とメタゲノム解析の話題も交えて, 第9回微生物研究会シンポジウム「微生物分子生物学の新たな挑戦」2010年6月, 法政大学小金井キャンパス.  
森田英利, 乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析と医食分野での有効利用技術, セミナー「生物資源の安全利用のための乳酸菌・ビフィズス菌利用における遺伝子工学と安全性評価の実際」2010年6月, 全国家電会館.

森田英利, 乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析, 日本微生物系統分類研究会第29回年次大会シンポジウム「ゲノムから探る微生物像(原核生物)」2009年11月, 木更津市・かずさアカデミアホール.

森田英利, 乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析, 第61回日本生物工学会大会シンポジウム「醸造原料植物および醸造微生物の特性とその進化」2009年9月, 名城大学.

森田英利, 乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析, 第63回日本栄養・食糧学会大会シンポジウム「プロバイオティクスのゲノム解析から生理効果へのアプローチ」2009年5月, 長崎市・長崎新聞文化ホール.

森田英利, 乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析・メタゲノム解析, テクニカルセミナー「現代生物学の先端解析手法: COE 複眼的視点を養うバイオサイエンス教育」2008年12月, 岡山大学.

森田英利, 乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析, 2008年度日本農芸化学会大会シンポジウム「腸内細菌のゲノム解析から見えてきたこと」2008年3月, 名城大学.

[図書] (計 1 件)

森田英利, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会, 5 (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森田 英利 (MORITA HIDETOSHI)

所属研究機関・所属・職:

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号: 70257294

##### (2) 研究分担者

桑原 知巳 (KUWAHARA TOMOMI)

所属研究機関・所属・職:

徳島大学・

ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 60263810

藤 英博 (TOH HIDEHIRO)

所属研究機関・所属・職：

独立行政法人理化学研究所・基幹研究  
所・基幹研究所研究員

研究者番号：10353468

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：