

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20656

研究課題名（和文）スマート乳酸菌の創製研究

研究課題名（英文）Development of smart lactic acid bacteria

研究代表者

下里 剛士（Shimosato, Takeshi）

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：00467200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：日々の食事にもとづく健康づくりや、疾病予防が重要である。そのために、乳酸菌やビフィズス菌と行ったプロバイオティクスの産業的利用が年々増加している。一方で、乳酸菌により健全な腸内生態系を維持するためには、個体や特定の集団に適した菌株を使用する必要があることが指摘されている。このような背景から、遺伝子組換えや育種技術に基づく次世代プロバイオティクスの開発研究が注目されている。本研究では、遺伝子工学とリボソーム工学を乳酸菌に適用した次世代プロバイオティクスとして、機能強化乳酸菌を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人々のQOL（Quality of Life）の増進や健康寿命の延伸が望まれる中、プロバイオティクスはその利用機会を増やしている。本研究では、強力で安定した生体調節作用を有する乳酸菌の取得を目的として、遺伝子工学を用いた機能性乳酸菌の創出と、リボソーム工学を用いた乳酸菌の育種研究を実行した。日頃の食生活が、疾患の予防・軽減や健康の増進を担うライフスタイルはまさに理想的であり、機能強化乳酸菌の創出は学術的、社会的意義の高い研究として位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：Health promotion and prevention of disorders through daily diet is an ideal approach. The use of probiotics, whose safety is well-established, has been increasing annually for this purpose. Much research about probiotic properties has been performed, however, it is pointed out that even the effectiveness of the same probiotic strain varies depending on the individual host because of the environmental background and gut microbiota. In this context, developmental research on probiotics based on designing and/or breeding technology is gaining attention. In this study, we provided an application of genetic engineering and ribosome engineering to lactic acid bacteria to propose probiotics with robust functionality.

研究分野：乳酸菌科学

キーワード：乳酸菌 機能強化 育種 リボソーム工学 遺伝子組換え

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌には多種多彩な機能が示されている一方で、その効果には個体差、ばらつきがあることが報告されている。このようなばらつきが生じる要因として、食生活などの生活環境や遺伝的背景が大きくかかわっている。とくにZmoraらは、プロバイオティクスのヒト介入試験にもとづき、腸管定着性における個体差について興味深い知見を報告している(1)。同論文では、個体によってプロバイオティクスの腸管定着性が異なることや、腸管粘膜上のコロニー形成部位に差異があることを内視鏡検査により明らかにした。また個体差が生じる要因の一つとして、個々特有の腸内生態系の影響を指摘している。つまり、プロバイオティック機能を効果的に発揮させる上で、①動物個体に最適化されたプロバイオティクスを選定すること、加えて、②既存の機能性乳酸菌の腸管定着性や生体調節作用そのものを強化することで、より多くの人々や動物にとっての健康維持・増進に寄与するプロバイオティクスの提案につながるだろう。そこで研究代表者らの研究グループでは、上記②の観点から、遺伝子工学やリボソーム工学といった技術を駆使し、乳酸菌機能を強化することに主眼をおいた研究を実行した。

2. 研究の目的

研究代表者らの研究グループでは、遺伝子工学の技術を用いて機能性乳酸菌を創出するだけでなく、乳酸菌を育種する研究を併行して進めてきた。これは既に利用されている乳酸菌の機能性をさらに強化し、より高機能な乳酸菌を取得することをコンセプトとする。これまでに、紫外線照射やN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG)、エチルメタンサルホン酸 (EMS) などの変異誘起剤を用いて乳酸菌のゲノムDNAに突然変異を引き起こし、多様な表現型を示す株を取得する方法が報告された(2-4)。しかし、紫外線や変異誘起剤を用いる方法は実験実施者に発がんなどのリスクが伴うと共に、ゲノム上にランダムに変異が入ることから、適用した菌における影響を制御できないという問題がある。そこで研究代表者らの研究グループは、プロバイオティック乳酸菌における新たな育種技術を提案することを目指し、リボソーム工学に注目し、機能強化乳酸菌の取得を目指した。

3. 研究の方法

リボソーム工学 (リボゾーム工学とも呼ぶ) とは、RNAポリメラーゼやリボソーム攻撃性の抗生物質を利用して、転写・翻訳機能をコードする遺伝子に自然突然変異を誘発することで、微生物の潜在能力を活性化する方法である。リボソーム工学は主に放線菌や大腸菌等の微生物に応用されており、抗生物質をはじめとする二次代謝産物や組換えタンパク質の産生増強作用が示されている。リボソーム工学で主に用いられるストレプトマイシンは、アミノグリコシド系の抗生物質であり、リボソームの30Sサブユニットに結合しタンパク質合成の開始を阻害する。ストレプトマイシンを用いて自然突然変異を誘発すると、30Sリボソームタンパク質S12をコードする*rpsL*遺伝子に変異の入った変異株を取得することができる(5)。リボソーム工学は変異箇所・変異パターンをある程度管理しながら微生物の能力を改変できるため、乳酸菌の育種技術として大いに検討すべき手法と考えられるが、研究代表者らの研究が報告されるまでリボソーム工学を乳酸菌に適用した例はなかった。本研究では、ストレプトマイシンを様々な濃度で含むMRS培地にWTおよびMT (同じアミノ酸変異を有する株は代表的なもの1株) を接種し培養した。菌の増殖を吸光度の測定により確認することで、各菌株のストレプトマイシン耐性濃度を検証した。また、菌体表層GAPDH、EF-Tuの発現解

析：前培養したWTおよびMTsの培養液をOptical Density 600 (OD₆₀₀) が約0.02となるようMRS (-) 培地12 mLに接種し、37 °Cで6, 9, 12, あるいは24 hr静置培養した。表層タンパク質を含む菌体洗浄液 (Bacterial Lavage Fluid; BLF) pH 7.3をSDS-PAGEおよびCBB染色に供し、タンパク質プロファイルを調査した。24 hr培養のWT, MTsから得たBLF_pH 7.3について、タンパク質濃度を測定し、LC-MSを用いたプロテオーム解析によりタンパク質を同定した。また、ヒト腸管細胞株HT-29を用い、菌体表層タンパク質による接着性を評価した。HT-29に表層タンパク質が結合したWT, MT-Cell_pH 4.2、表層タンパク質が解離したCell_pH 7.3を添加培養し、菌の接着率を算出した。別に、マクロファージ細胞株RAW264.7を用い、菌体表層タンパク質の免疫調節作用を評価した。RAW264.7にBLF_pH 7.3を添加し、定量的PCR, ELISAによりTNF- α , IL-6の発現を解析した。また、タンパク質を分解処理したPK-treated BLF_pH 7.3、表層タンパク質を含まないBLF_pH 4.2を添加し、同様の試験を実施した。REの影響を網羅的に解析するため、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 薬剤感受性試験：SMを64, 128, 256, 512, 1,024, 2,048, 4,096, 8,192, 16,384, 32,768 および65,536 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含むMRS培地にWTおよびMTを接種し培養した。菌の増殖速度を測定することで、各菌株のSM耐性濃度を検証した。試験では、*Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) におけるストレプトマイシンの最小発育阻止濃度 (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で、LGGを生育すると $10^{-7}\sim 10^{-8}$ (1,000万~1億分の1) の頻度で薬剤耐性変異株が出現した。また、各菌株における*rpsL* 遺伝子の配列を解析した結果、56番目の変異が4種類 (K56N, K56T, K56M, K56R)、101番目の変異が3種類 (K101E, K101R, K101M)、そして、99番目の変異が2種類 (R99C, R99G) の合計9種類の変異株 (MTs; mutants) の取得に成功した。56番目のアミノ酸に変異を有する株では、65,536 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても生育することが確認された。また、その生育は4,096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度まで低下せず、その後、高濃度になるにつれ低下することが観察された。101番目のアミノ酸に変異を有する株では、2,048-4,096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、99番目のアミノ酸に変異を有する株では、512-2,048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がMICとなることが明らかになった (Table 1)。

(2) 菌体表層タンパク質の発現解析とヒト腸管細胞株を用いた接着性試験：各MTsにおける特徴付けを行うために、分泌タンパク質の解析を行った。特にK56N変異を持つ変異株 (MT_{K56N}) では、多彩なタンパク質の分泌量が顕著に増加することが示された。質量分析により同分子の同定を行ったところ、解糖系酵素GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) およびEF-Tu (Elongation Factor Tu) であることが明らかとなった。GAPDHおよびEF-Tuは多機能性を持つMoonlighting Protein (“副業”タンパク質) として盛んに研究されており、乳酸菌においては細胞表面におけるGAPDHが、ムチンに対する接着因子として機能することが知られている (6)。そのため、MT_{K56N}の細胞表面におけるGAPDHおよびEF-Tuの存在量を調査したところ、LGGの親株と比較して顕著にGAPDHおよびEF-Tu量が増加していた。GAPDHの分泌メカニズムの一つに、ABCトランスポーターを介した細胞外輸送が考えられている (6)。また、乳酸菌の抗生物質への耐性機構の獲得においてABCトランスポーターの発現増強が知られており (7)、GAPDHおよびEF-Tuの分泌に関与していると考察している。また、HT-29を用いた接着性試験において、MT_{K56N}-Cell_pH 4.2の接着率はWT-Cell_pH 4.2と比較し有意に向上した。また、MT_{K56N}-Cell_pH 4.2と比べ、MT_{K56N}-Cell_pH

7.3 の接着率は有意に低下した。RAW264.7 を用いた免疫調節作用の検証において、MT_{K56N}-BLF_pH 7.3 添加時に WT-BLF_pH 7.3 と比較し、TNF- α 、IL-6 産生が有意に増加した。MT_{K56N}-BLF_pH 7.3 と比べ、PK-treated MT_{K56N}-BLF_pH 7.3、MT_{K56N}-BLF_pH 4.2 添加時には TNF- α 、IL-6 産生の増加は有意に抑制した。トランスクリプトーム解析において、MT_{K56N} では ABC transporter 関連遺伝子の発現増加が見られた。

(3) 本研究では簡便で安全な乳酸菌の育種法の確立を目指し、代表的なプロバイオティック乳酸菌 (*Lactocaseibacillus rhamnosus* GG;LGG) にリボソーム工学を適用した9種のMTs の特性評価を実施した。その結果、MT_{K56N}において菌体表層タンパク質発現が増加し、腸管細胞付着性および免疫細胞賦活作用が活性化されていることを見出した。腸管に対する接着性はプロバイオティック乳酸菌の重要な特徴であり、乳酸菌に対するリボソーム工学が有効な育種技術となり得る。すなわち、リボソーム工学が菌体表層タンパク質を介した機能性乳酸菌の強化手法として有効であることが示唆された。

(4) 薬剤耐性遺伝子の水平伝播は望まない耐性株の出現を誘発する危険性があり、リボソーム工学を適用した薬剤耐性乳酸菌の利用にはさらなる検証が必要である。例えば、臨床現場においては抗生物質の投与と同時に、整腸作用を狙った抗生物質耐性乳酸菌製剤が処方される場合がある。これらの乳酸菌は薬剤耐性遺伝子の水平伝播の有無や宿主に対する安全性が検証されている (8)。さらに、遺伝子の突然変異がLGGの機能性のみならず代謝等に影響を与えることは十分に考えられるため、腸管ムチン接着性以外の機能についてさらに調査していくと共に、代謝活性試験や動物試験による検証等を進めていく必要がある。

Table 1. LGG-MTs のストレプトマイシン耐性のプロファイル

Strain	Relevant genotype <i>rpsL</i>	Frequency of mutants	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
WT	-	-	256
#001	K56N	58/136	>65,536
#006	K101E	41/136	4,096
#010	K56T	8/136	>65,536
#022	K101R	4/136	2,048
#027	K56M	5/136	>65,536
#045	K56R	14/136	>65,536
#112	K101M	4/136	4,096
#134	R99C	1/136	512
#157	R99G	1/136	2,048

4. 引用文献

- 1) Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, et al. (2018) Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell* 174: 1388-1405 e1321.

- 2) Joshi D S, Singhvi M S, Khire J M, Gokhale D V. (2010) Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production. *Biotechnol Lett* 32: 517-520.
- 3) Sato Y, Okamoto-Shibayama K, Takada K, Igarashi T, Hirasawa M. (2009) Genes responsible for dextran-dependent aggregation of *Streptococcus sobrinus* strain 6715. *Oral Microbiol Immunol* 24: 224-230.
- 4) Seme H, Bogovic Matijasic B, Svigelj K, Langerholc T, Fujs S, et al. (2017) Generation of *Lactobacillus plantarum* strains with improved potential to target gastrointestinal disorders related to sugar malabsorption. *Food Res Int* 94: 45-53.
- 5) Okamoto-Hosoya Y, Hosaka T, Ochi K. (2003) An aberrant protein synthesis activity is linked with antibiotic overproduction in rpsL mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology (Reading)* 149: 3299-3309.
- 6) Kinoshita H, Uchida H, Kawai Y, Kawasaki T, Wakahara N, et al. (2008) Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J Appl Microbiol* 104: 1667-1674.
- 7) Konings W N, Lolkema J S, Bolhuis H, van Veen H W, Poolman B, et al. (1997) The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71: 117-128.
- 8) Ouwehand A C, Forssten S, Hibberd A A, Lyra A, Stahl B. (2016) Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Ann Med* 48: 246-255.

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 0件）

1. 著者名 生井楓、下里剛士	4. 巻 33
2. 論文標題 機能強化乳酸菌の創製研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本乳酸菌学会誌	6. 最初と最後の頁 5-11
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Namai Fu, Shigemori Suguru, Shimosato Takeshi
2. 発表標題 A breeding strategy of ribosome engineering for probiotics enhances the adhesion to human colonic mucin in Lacticaseibacillus rhamnosus GG
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021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	荻田 佑 (Ogita Tasuku) (50738010)	信州大学・学術研究院農学系・助教 (13601)	
研究分担者	佐藤 隆 (Sato Takashi) (70510436)	信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・特任教授 (13601)	
研究分担者	重盛 駿 (Shigemori Suguru) (90803487)	信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教（特定雇用） (13601)	

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
---------	---------