

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22784

研究課題名(和文) 紅麹菌代謝産物によるコレラ菌の持つ病原性の抑制作用に関する研究

研究課題名(英文) Fermentation products of the fungus *Monascus* spp. impairs the physiological activities of toxin-producing *Vibrio cholerae*

研究代表者

許 駿 (XU, JUN)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40881735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：紅麹菌属糸状菌は発酵食品、天然着色料および食品防腐剤などに使用されている。沖縄県の伝統食品である豆腐ようも、紅麹によって発酵・熟成させた発酵食品である。紅麹菌の特定の代謝物はコレステロールを下げ、人間に健康促進効果をもたらす。本研究では、コレラの病原細菌である毒素産生コレラ菌のATP合成と運動性を阻害した。コレラ菌を初め、腸炎ピブリオ、緑膿菌、サルモネラ、レプトスピラなどの病原菌の運動性を著しく阻害した。紅麹菌発酵抽出物が、予防薬として複数の病原菌によって引き起こされる感染を潜在的に防止し、それらの進行を遅らせ、死亡率および罹患率を低下させる可能性があることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌の活動に関するエネルギー源を標的としたコレラ菌感染の新規な予防および治療戦略の開発につながる先進的な研究に発展する可能性がある。紅麹菌発酵抽出物が、予防薬として複数の病原菌によって引き起こされる感染を潜在的に防止し、それらの進行を遅らせ、死亡率および罹患率を低下させる可能性があることを示している。紅麹菌発酵抽出物および関連食品をコレラ流行地域に普及させることによって、低コストでコレラの蔓延防止と予防対策にも役に立つ。

研究成果の概要(英文)：Monascus sp are filamentous fungi used in fermented foods. They are also natural colorants and food preservatives. Certain metabolites of Monascus lower cholesterol and have other health-promoting effects in humans. In the present study, we demonstrated that the fermentation products of Monascus inhibited ATP synthesis and motility in toxigenic *Vibrio cholerae*. Cell tracking and rotation assays on single flagellum showed that Monascus fermentation extract (MFE) significantly impaired *V. cholerae* swimming by disrupting flagellar rotation. The study revealed that MFE depolarized the *V. cholerae* cell membrane which, in turn, lowered the membrane potential and, by extension, restricted ATP synthesis and flagellar rotation. MFE also severely hindered the motility of other pathogenic bacteria. The foregoing findings indicate that MFE could potentially prevent infection caused by multiple pathogenic bacteria as the conventional prophylaxes and slow their progression and lower mortality.

研究分野：細菌学

キーワード：紅麹菌 コレラ菌 細菌運動性 代謝産物 感染抑制 予防対策

1. 研究開始当初の背景

コレラ菌の病原性は、CTx、卓越した運動能力、そして宿主小腸上皮細胞への付着に集約される。CTx および付着因子 GbpA は 型分泌装置 (T2SS) から能動的に分泌され、運動能力は一本の極べん毛が担っている。それぞれに必要なエネルギーは、T2SS では ATP を基質とした ATP 駆動型ポンプ (ATPase) が、べん毛モーターではナトリウムイオン駆動力 (SMF) が担う (図 1)。SMF はプロトン (H⁺) 駆動力 (PMF) 性アンチポーターである [Na⁺-H⁺]系の制御を受ける。我々は予備実験において、一部の紅麹菌抽出物がコレラ菌の ATP 活性を抑制する現象を確認した。先行研究によると、グラム陰性桿菌における ATP 活性の抑制は PMF の低下に起因することが多いとされている。ここで、コレラ菌の ATP 活性を抑制する紅麹菌抽出物は、ATP-ATPase 系を駆動力とする T2SS の抑制を導き、その結果として CTx の分泌を抑制し、同時に GbpA の分泌抑制を介するコレラ菌の小腸上皮細胞への付着性の低下を招来するののか、また ATP 産生を抑制した一部の紅麹菌抽出物は、ATP 産生を上流で制御する PMF をも低下させているののかを検討し、その結果としての SMF 低下に基づくべん毛運動の低下が認められるのかも学術的な問いとなる

2. 研究の目的

本研究の目的を以下のように設定する。

- (1) 紅麹菌抽出物による ATP 活性抑制により CTx の分泌も抑制されるか を検討する。
- (2) 紅麹菌抽出物による ATP 活性抑制により付着因子 GbpA の分泌も抑制され、その結果コレラ菌の小腸上皮細胞への付着が抑制されるか を検討する。
- (3) 紅麹菌抽出物による ATP 活性抑制に関連する影響を PMF-SMF 系が受け、その結果として コレラ菌のべん毛運動が抑制されるか を検討する。

3. 研究の方法

我々の講座で開発した効果的に CTx を誘導する AKI-SW 法 (高感度) を用いて、紅麹菌抽出物の存在下で CTx が抑制されるかどうかを評価した。同時に T2SS におけるリパーゼ活性等を検討した。ELISA 等で紅麹菌抽出物の存在下で GbpA を定量した。定着因子 TCP の影響を除外するため、*tcp* 遺伝子欠損株を作成し、その定着能を検証した。フローチャンバーを用い、紅麹菌抽出物の存在下でコレラ菌の細胞への定着が抑制されるかを検討した。顕微鏡と高速 CMOS カメラを用いて、紅麹菌代謝産物の影響下のコレラ菌の遊泳速度、べん毛モーター回転効率等を定量評価した。SMF を計測するための細胞内イオン (Na⁺、H⁺) をモニタリングするため、pH 感受性蛍光蛋白質 (EGFP 予定) 発現株の作製を行った。東北大学工学研究科生物物理工学分野と共同で、開発した宿主細胞上の細菌運動の動態を定量解析する実験系を導入して「運動 / 付着」と動的な特性への影響を明らかにした。

4. 研究成果

紅麹菌属糸状菌は発酵食品、天然着色料および食品防腐剤などに使用されている。沖縄県の伝統食品である豆腐ようも、紅麹によって発酵・熟成させた発酵食品である。紅麹菌の特定の代謝物はコレステロールを下げ、人間に健康促進効果をもたらす。本研究では、コレラの病原細菌である毒素産生コレラ菌の ATP 合成と運動性を阻害した。その原因として、紅麹菌発酵抽出物をコレラ菌に添加した際に、細菌細胞膜における膜電が減少し、脱分極現象が観察された(図1)。膜電位の低下により、ATP 合成、運動性など、一連の生理現象にも影響を及ぼし、結果として細菌の生理活動を抑えることとなった。

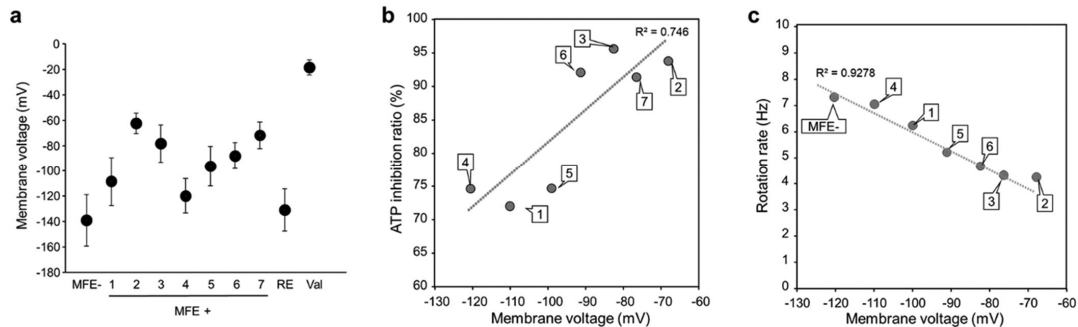


図1、紅麹菌発酵抽出物 (MFE) によるコレラ菌生理活動への影響。a、7種類の MFE の影響下でコレラ菌細胞膜における脱分極が発生した。b、膜電位の低下による ATP 合成抑制効果。c、膜電位の低下によるコレラ菌べん毛回転速度の低下。

コレラ菌を初め、腸炎ビブリオ、緑膿菌、サルモネラ、レプトスピラなどの病原菌の運動性を著しく阻害した(図2)。紅麹菌発酵抽出物が、予防薬として複数の病原菌によって引き起こされる感染を潜在的に防止し、それらの進行を遅らせ、死亡率および罹患率を低下させる可能性があることを示している。

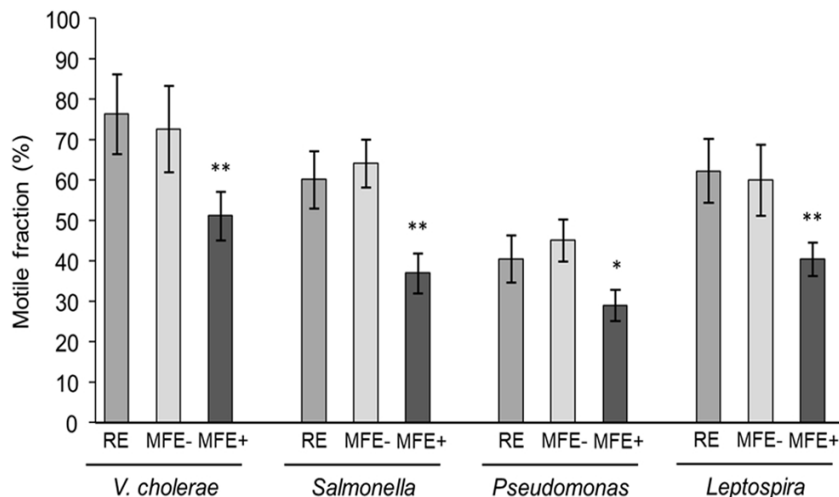


図2、紅麹菌発酵抽出物 (MFE) による異なる病原細菌の運動性に対する影響。コレラ菌、サルモネラ、緑膿菌、レプトスピラなどの病原細菌にもそれぞれ異なるエネルギー源、及び運動性機構を持つことに関わらず、MFE が運動性抑制効果を示した。(RE: 米抽出物)

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 Jun Xu, Rino Arakaki, Shinjiro Tachibana, Tetsu Yamashiro	4. 巻 258
2. 論文標題 Fermentation products of the fungus <i>Monascus</i> spp. impairs the physiological activities of toxin-producing <i>Vibrio cholerae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiological Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micres.2022.126995	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 許駿、新垣梨乃、橘信二郎、山城哲
2. 発表標題 Biological Extracts of <i>Monascus</i> spp. Alters the Virulent Factors of Cholera Toxin-Producing <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
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
研究協力者	橘 信二郎 (Tachibana Shinjiro)	琉球大学農学研究科	
研究協力者	中村 修一 (Nakamura Shuichi)	東北大学工学研究科	

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