

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2022～2023
課題番号：22K19155
研究課題名（和文）プラズマローゲン生産性細菌の遺伝子構造と生息域から考察する脳-腸-微生物相関

研究課題名（英文）Brain-Gut-Microbe Interaction Based on Genetic Structure and Habitat of Plasmalogen-producing Bacteria

研究代表者

土居 克実（Katsumi, Doi）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：40253520

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、*Lactococcus cremoris*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium longum* がもつプラズマローゲン合成関与遺伝子（*plsA*）を大腸菌に導入し、組換え体を好気条件とまたは嫌気条件で培養した際のPIs生産量を測定した。通性嫌気性菌由来*plsA*を導入した大腸菌は両条件でPIs生産が確認されたが、絶対嫌気性菌由来*plsA*を導入した大腸菌では好気条件下ではPIsを生産はみられなかった。*L. cremoris* をさまざまな条件で培養し、PIs生産量を測定したところ、M17培地、25℃、嫌気培養の条件で最大のPIsが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はプラズマローゲン(PIs)の脳認知機能改善に着目し、通性嫌気性の乳酸菌におけるPIs探索を行った。その結果、複数株が多様なPIs種を生産し、特に腸管常在性乳酸菌株がPIsを高生産する事を認めた。本株由来のPIsの認知機能改善効果を検証するため、PIs生産性増強を試みた。培養条件改変で数倍の生産量増加が達成でき、PIs合成遺伝子の単離と本遺伝子の大腸菌での異種発現によるPIs生産に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, plasmalogen synthesis genes (*plsA*) from *Lactococcus cremoris*, *Enterococcus faecalis*, and *Bifidobacterium longum* were introduced into *E. coli*, and PIs production was measured when the recombinant bacteria were grown under aerobic or anaerobic conditions. The amount of PIs production was measured when the recombinant was cultured under aerobic and anaerobic conditions. *E. coli* transfected with *plsA* from facultative anaerobes produced PIs under both conditions, while *E. coli* transfected with *plsA* from absolute anaerobes did not produce PIs under aerobic conditions.

When *L. cremoris* was cultured under various conditions and PIs production was measured, the maximum amount of PIs was detected in M17 medium, 25 °C, and anaerobic culture conditions.

研究分野：農芸化学

キーワード：プラズマローゲン *Lactococcus* *Enterococcus* *Bifidobacterium* 通性嫌気性 絶対嫌気性

1. 研究開始当初の背景

プラズマローゲン(Plasmalogen (1-O-alk-1'-enyl, 2-acyl glycerolipid; Pls))はグリセロール骨格の sn-1 位にエステル結合の代わりにビニルエーテル結合を含むグリセリン脂質で、殆ど全ての哺乳類細胞においてみられ、組織中の総リン脂質の約 20%を占める。Pls は分泌小胞の細胞膜への膜融合、イオン輸送、コレステロールの細胞外への排出に関与するとともに、G タンパク質共役受容体のリガンドや抗酸化物質として機能するなど、様々な重要生理機能を持っていることが知られている。また、Pls は哺乳動物の細胞膜の構成成分であり、哺乳類の脳、網膜、白血球(免疫細胞)、精子、心臓、および骨格筋に豊富に存在する。これらの Pls 分子種では、sn-1 位の脂肪族部分は主に C16:0、C18:0 または C18:1 で、sn-2 位は、アラキドン酸(C20:4)やドコサヘキサエン酸(C22:6)などの多価不飽和脂肪酸が優占し、Pls 種は多様性に富んでいる。Pls は自然界では非常に珍しい分布をしており、嫌気性細菌や粘菌、原生動物を含む動物組織に存在するものの、菌類や植物には見られない。嫌気性細菌におけるエーテル脂質の存在が初めて観察されたのは 1960 年代で、グラム陰性のルーメン細菌である *Ruminococcus flavefaciens* と *Bacteroides succinogenes* で、その後、*C. beijerinckii*、*Clostridium difficile* 等のグラム陽性偏性嫌気性細菌である *Clostridium* 属で報告されたものの生合成経路は不明なままであった。2017 年に Goldfine はいくつかの生化学的実験から *C. beijerinckii* における Pls 生合成経路を推定し、嫌気性細菌における Pls 生合成は、動物細胞における生合成とは根本的に異なることを推定した。殆どの *Clostridium* 属株はプロバイオティックでないと言われてきたが、Atarashi らは数種の同属株が腸管にプロバイオティック効果を示すことを報告しており(2013)、本属株が腸管常在である意義も見出されている。

また、Mawatari ら(2020)は偏性嫌気性の *Bifidobacterium* 属株から抽出した Pls を調べたところ、ヒト腸管常在性でプロバイオティクスとして知られる *B. longum* では抽出したリン脂質の殆どが Pls であった一方、ヒト腸管非常在性だが、哺乳類の腸内微生物として知られる *B. animalis* では Pls は検出されなかったことを報告している。さらに、Pls の経口摂取による脳病態回復機能が報告されており(Mawatari *et al.*, 2020)、Pls が加齢に伴い減少すること、そして、高齢者に多くみられるアルツハイマー病などの認知症患者の脳でも Pls が減少していることから、Pls と認知症に強い関連性があると推測している。

Pls 合成については、Goldfine の推定したリン脂質生合成経路は酵素活性に基づいたものでしかなかった。我々は、全ゲノム解読の結果、*B. longum* ゲノムおよび *B. animalis* ゲノム上には、Jackson らが本年提唱した *C. beijerinckii* の Pls 生合成遺伝子オペロン(*plsA*, *plsR*)と異なるものの、類似の機能が推測される遺伝子を推測した。本遺伝子(*plsA* と命名)を持つヒト常在性嫌気性細菌のリン脂質生合成経路に関わる遺伝子群を比較したところ、生息場所や菌種によって差異があることがわかった。この結果は、生産する Pls 種に腸脳相関に関与するものとそうでないものがあるのではないかという推測を抱かせた。もし腸脳相関が成立するなら、腸管常在性細菌が生産する特異的な Pls 種が存在し、それが腸と脳のメッセンジャー分子であることになる。

2. 研究の目的

背景のように、加齢に伴い腸内での *Bifidobacterium* 属などの Pls 生産菌数が減少することで、Pls 生産量が減少し、これが認知機能の低下を含むヒト神経変性疾患の一因でないかと推測した。

そこで本研究では、ヒト常在性細菌の Pls 生合成遺伝子を探索し、*C. beijerinckii* や *B. animalis* ゲノムと比較から、ヒト腸管での常在性と Pls 生産(分子種と生産量)について追究する。

さらに、得られた Pls 生合成遺伝子を利用した Pls の大量生産および多様な Pls 分子種の生産を試み、得られた結果から、ヒト神経変性疾患における腸内微生物叢の意義(腸 - 脳 - 微生物相関)を明らかにすることを目的とした。また、Pls 合成能を有する腸内細菌を広く同定する方法を開発すると共に、これら細菌の Pls 合成経路を明らかにして、高生産性や異なる Pls 種の生産株の探索や作出を目指す。

最終的には、Pls 生産株の経口摂取による脳病態回復に繋がる基盤技術開発を目的とした。

3. 研究の方法

まず、研究室保管菌株と微生物保存機関から入手した菌株を至適条件で培養後、菌体よりクロロホルム/メタノール溶液(1:2, v/v)を用いて脂質を抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)解析に供した。脂質抽出液の一部を 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩で処理し、HPLC 解析でアルデヒドが検出された菌株を Pls 生産株とした。

次に、申請者が単離した *B. longum* 株や *E. faecalis*、*L. silagei* など嫌気性細菌について、次世代シーケンサー MiSeq (Illumina)と MinION (ONT)を用いて全ゲノムを解読し、Pls 非生産株ゲノムと比較して生合成に関与する遺伝子を推定した。また、Pls 生合成に機能する遺伝子 *plsA* について各菌株における比較を行った。

本遺伝子の機能を調べるため、pETite N-His SUMO Kan ベクターに PCR 増幅した遺伝子を挿入して発現プラスミドを作製し、大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。形質転換株の組換えタンパク質生産と Pls 生産性は、Western blotting および HPLC 解析によって評価した。

さらに、培地構成の差異による Pls 生産量の変化を検討するため、M17 培地(BD)、MRS 培地(BD)、TYG 培地(トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、NaCl 0.5%、グルコース 1%、pH7.0)を基に改変培地を作製して菌株を培養し、これらから経時的に全脂質を抽出し、HPLC を用いて Pls 生産の有無、及び生産さ

れた Pls 分子種を分析した。上記実験で決定した Pls 生産条件を検討し、高生産を導く至適培養条件や高生産株を選抜した。

4. 研究成果

53 株の乳酸菌培養細胞のうち、*Enterococcus* 属や *Lactococcus* 属など 14 株で Pls が検出された。Pls 生産株の殆どは乳酸球菌であり、調査した菌株のうち Pls を生産する乳酸桿菌は *Loigolactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* のみであった。BLAST 検索やドメイン検索では、Pls 生合成酵素遺伝子ホモログを持つと考えられる乳酸桿菌は、54 種であった。このことから、NCBI に登録されている Lactobacillales 目のうち、多くの乳酸桿菌が含まれる Carnobacteriaceae 科と Lactobacillaceae 科の計 487 種が Pls 合成能を持たないことが推測された。一方、多くの乳酸球菌が属する Enterococcaceae 科と Streptococcaceae 科の合計 263 種のうち、Pls 合成遺伝子が推定されたのは 110 種であった。特に Enterococcaceae 科では、現在登録されている 100 種のうち 68 種が Pls 生合成酵素遺伝子ホモログを持つと推測された。細菌における Pls は脂質二重膜を安定させる役割を持つと考えられることから、乳酸球菌の生育に Pls が機能している可能性がある。

これらの株のうち、当研究室でサイレージより分離した *Enterococcus faecalis* K-4 株は Pls を著量生産したことから、K-4 株由来の *plsA* 遺伝子が大腸菌株での発現を試みた。Pls 非生産性の大腸菌 BL21(DE3)株に K-4 株由来の *plsA* 遺伝子を導入することで Pls を生産することを確認した。BL21(DE3)株は *plsA*, *plsR* を持たないためにリン脂質へのビニルエーテル結合の導入ができず、Pls 非生産であることが推定されたが、本実験により *plsA* が大腸菌の Pls 生合成において重要な役割を持つことが示唆された。一方、*L. cremoris* ATCC BAA-493 を培地、培養温度、嫌気度を変更して培養し、得られた菌体の Pls 生産量を測定した。その結果、M17 培地、25℃、嫌気培養で最も多くの Pls が検出された。

また、TYG 培地の糖源をラクトースに置換した培地(TYL 培地)と、TYG 培地に大豆ペプトンを添加して糖源をラクトースに置換した培地(CSYL 培地)において、K-4 株の Pls 生産量が有意に増加した。特に CSYL 培地では、Pls 生産量の指標となる菌体湿重量 1μg 当たりのアルデヒド量が 1.5 倍に増加した(図 1)。これらの結果より、K-4 株では、植物由来タンパク質の添加とラクトースを糖源とする培地で Pls 生産量が向上する可能性が示唆された。

他方、通性嫌気性の *Lactococcus cremoris* ATCC BAA-493 と絶対嫌気性菌である *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* の *plsA* 遺伝子が大腸菌に導入し、組換え菌を好気条件と嫌気条件で培養した際の Pls 生産量を測定した。その結果、ATCC BAA-493 由来 *plsA* を導入した大腸菌は両条件で Pls 生産が確認されたが、*B. longum* subsp. *suis* 由来 *plsA* を導入した大腸菌では好気条件での Pls 生産はみられなかった。

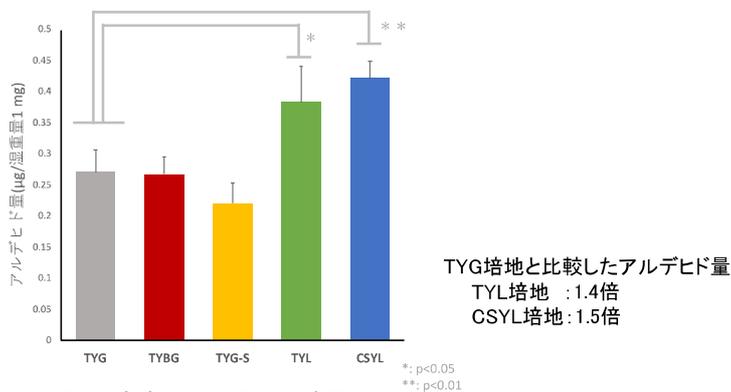


図1 変更培地におけるPls生産量

5. 結論

探索した細菌株のうち、主に乳酸菌株を含む 53 株から、14 株の Pls 生産乳酸菌を同定した。また、乳酸桿菌よりも乳酸球菌で Pls 生産株が多く見られた。*E. faecalis* K-4 株から単離した *plsA* で Pls 非生産の大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換したところ、Pls 生産能を付与することができ、*plsA* は大腸菌の Pls 生合成にも重要な機能を持つことが示唆された。しかし、通性嫌気性菌由来 *plsA* を導入した大腸菌は好気・嫌気のいずれの条件でも Pls 生産が確認されたが、絶対嫌気性菌由来 *plsA* を導入した大腸菌では、好気条件での Pls 生産はみられなかった。このことから、生産された Pls タンパク質の耐酸性に違いがあるものと考えられた。

さらに、植物性タンパク質を添加したラクトースを糖源とする培地を用いた培養では、K-4 株の Pls 生産量が向上することが判明し、ATCC BAA-493 株では、M17 培地、25℃、嫌気培養で最も多くの Pls が検出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Irimajiri Rei, Kuwabara Meimi, Togo Shun, Fujino Yasuhiro, Honsho Masanori, Mawatari Shiro, Fujino Takehiko, Doi Katsumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Complete genome sequence of <i>Lentilactobacillus buchneri</i> subsp. <i>silagei</i> MGR2-32 isolated from guinea grass silage in Okinawa, Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0069523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00695-23	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 -

1. 著者名 Kuwabara Meimi, Irimajiri Rei, Togo Shun, Fujino Yasuhiro, Honsho Masanori, Mawatari Shiro, Fujino Takehiko, Doi Katsumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of the Thermophilic <i>Enterococcus faecalis</i> Strain K-4, Isolated from a Grass Silage in Thailand	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0081422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00814-22	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桑原 芽美, 入交 伶, 藤野 泰寛, 本庄 雅則, 馬渡 志郎, 藤野 武彦, 土居 克実
2. 発表標題 プラズマローゲン生産株の探索と効率的プラズマローゲン生産法の検討
3. 学会等名 第 74 回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 入交 伶, 桑原芽美, 藤野 泰寛, 本庄 雅則, 馬渡 史郎, 藤野 武彦, 土居 克実
2. 発表標題 通性または絶対嫌気性菌由来プラズマローゲンの効率的な生産方法の確立
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023 年度 西日本・中四国支部合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 入交 伶, 桑原 芽美, 藤野 泰寛, 本庄 雅則, 馬渡 史郎, 藤野 武彦, 土居 克実
2. 発表標題 プラズマローゲン生産性細菌株の探索と高生産条件の確立
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東郷 舜, 小田遼史, 藤野泰寛, 森 一樹, 岩本武夫, 廣政恭明, 土居克実
2. 発表標題 炭素源制御によるLactococcus cremorisの寿命延伸
3. 学会等名 第29回日本生物工学会九州支部福岡大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 プラズマローゲン合成用乳酸菌、プラズマローゲン含有組成物及びプラズマローゲンの製造方法	発明者 藤野武彦、馬渡志郎、土居克実、本庄雅則	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-025310	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 プラズマローゲン産生促進用培地、プラズマローゲン含有組成物の製造方法及びプラズマローゲンの製造方法	発明者 藤野武彦、馬渡志郎、土居克実、本庄雅則	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-16628	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換体、プラズマローゲン含有組成物及びプラズマローゲンの製造方法	発明者 藤野武彦、馬渡志郎、土居克実、本庄雅則	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-139676	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	本庄 雅則 (Honsho Masanori) (90372747)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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