

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780273

研究課題名（和文） 牛乳中の優占種細菌がウシ乳房に与える影響

研究課題名（英文） Effect of predominant milk bacteria on bovine udder

研究代表者

萩 達朗 (HAGI TATSURO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・畜産物研究領域・研究員

研究者番号：00510257

研究成果の概要（和文）：本研究では、ウシ生乳中の優占種細菌が、ウシ乳房内のウシ乳腺上皮細胞（細菌を認識する細胞；以下 BMEC）に与える影響を調べた。まず、乳中で最優占種の *Lactococcus lactis* が BMEC に与える影響をマイクロアレイで解析した結果、BMEC の細胞内シグナル伝達関連遺伝子の発現が大きな影響を受けることが示された。次に、乳中細菌優占種であるグラム陽性菌 (*L. lactis* を含む 3 株) とグラム陰性菌 (4 株) に対する BMEC の遺伝子発現量変化を定量 PCR で調べた結果、ウシ乳房の炎症を引き起こす炎症性サイトカインがグラム陰性菌によって強く誘起されることが示された。また、菌種によって細胞内シグナル伝達への影響が異なることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effect of predominant bacteria in bovine milk on bovine mammary gland epithelial cells (BMEC) which could recognize bacteria. Microarray analysis of gene expression in BMEC in response to the most predominant milk bacteria *Lactococcus lactis* showed that change in gene expression related to intracellular signaling pathway was observed after treatment of *L. lactis*. The real time PCR analysis of gene expression in BMEC in response to gram-positive bacteria (3 strains including *L. lactis*) and gram-negative bacteria (4 strains) showed that gram-negative bacteria strongly enhanced gene expression of inflammatory cytokines. Furthermore, the effect of predominant milk bacteria on signaling pathway in BMEC was different among species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

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：微生物、ウシ乳腺上皮細胞、マイクロアレイ、牛乳

## 1. 研究開始当初の背景

ウシ乳房は環境中の微生物に曝されており、微生物は乳頭を通過して乳房内の牛乳中に侵入する。その結果、牛乳中には多種の細菌が存在しており、マイクロフローラを形成している。病原菌が侵入した場合は乳房炎を引き起こし、体細胞数増加など牛乳の品質に大きく影響する。そのため、*Staphylococcus*

*aureus* や *Escherichia coli* などの病原菌が、乳房に与える影響について広く研究されている。一方、乳酸菌など非病原性細菌として知られる乳中細菌が生乳中に存在するにもかかわらず、病原菌以外の細菌がウシ乳房に与える影響は不明であった。乳房内には、細菌を認識して免疫反応を起こす乳腺上皮細胞が存在し、この細胞は免疫反応を起こすだ

けでなく、乳タンパク質など乳成分の分泌にも関係しており、乳品質を決定する重要な細胞でもある。牛乳中に細菌が存在することは、乳腺上皮細胞が病原菌だけではなく、それ以外の非病原性細菌からも刺激を受けていることが予想される。そのため、病原菌以外の細菌が乳房に与える影響を調べることは、細菌が乳房および乳質に与える新たな作用の解明に繋がり、乳房健康管理および乳質管理の観点から重要である。

## 2. 研究の目的

病原菌以外の乳中細菌がウシ乳房に与える影響を明らかにするために、乳中細菌優占種がウシ乳腺上皮細胞 (BMEC) に与える影響を解明する。非病原性細菌が BMEC に与える影響についてはまったく知見がないため、まず、非病原性細菌として知られる *Lactococcus lactis* に応答する BMEC の遺伝子変動をマイクロアレイで網羅的に解析し、変動が大きい遺伝子群を解明する。次に、変動が大きかった遺伝子群と炎症のマーカー遺伝子を標的として、他の乳中細菌に対する BMEC の遺伝子変動を定量 PCR で解析し、乳中細菌がウシ乳房に与える影響を遺伝子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) *Lactococcus lactis* に影響を受ける遺伝子の網羅的解析—マイクロアレイ—

試験開始前、健康な乳房から搾乳したウシ生乳中の細菌叢解析を行い、乳中で優占的に存在する細菌を分離していた。その中で、ウシの生乳で最も優占的に存在していた *L. lactis* をマイクロアレイ試験に用いた。*L. lactis* は細菌用培地で培養後、菌体を生理食塩水で洗浄し、63°C30 分間熱処理した。BMEC は、20%ウシ胎児血清を含む DMEM に接種し、培養した。コンフルエントになった BMEC に熱処理した *L. lactis* を接種し、6 時間共培養後、BMEC を PBS で洗浄して *L. lactis* を取り除いた後、トリプシン処理して BMEC を回収し、RNA を抽出した。抽出した RNA は Filgen Array (フィルジェン社) に供し、*L. lactis* を接種した BMEC と未接種の BMEC との遺伝子発現パターンについて、DNA マイクロアレイで比較した。

### (2) 乳中細菌優占種によって影響を受ける特定遺伝子の発現量変化解析—定量 PCR—

乳中細菌優占種として、グラム陽性菌 (*L. lactis* 2 株と *Microbacterium* sp.) およびグラム陰性菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp.) の計 7 株を用いた。(1) の試験と同様に、乳中細菌を熱処理して BMEC

に接種し共培養後、BMEC から RNA を抽出し、遺伝子発現量変化を定量 PCR で調べた。なお、共培養の時間は、6 時間および 24 時間でおこなった。また、前年度行ったマイクロアレイ結果を踏まえ、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  と IL-8) と免疫に関わると推測される G-protein signaling pathway 関連遺伝子 (発現変動の大きかった上位 5 遺伝子) を標的とした。

## 4. 研究成果

### (1) BMEC のマイクロアレイ解析

細菌を接種していない BMEC をコントロールとして、*L. lactis* を接種した BMEC の遺伝子発現量の増減を比較した結果、27665 個のウシ遺伝子のうち、*L. lactis* を接種することで 353 個の遺伝子が 1.5 倍以上に発現上昇し、334 個の遺伝子が 0.66 倍以下に発現抑制した。変動した遺伝子について、その機能を階層化して分類する Gene Ontology 解析を行った結果、変動した遺伝子は、Cellular process に最も多く分類され (表 1)、特に細胞内シグナル伝達に関係していた。

細菌に対して免疫反応を起こすことが予想されていたが、免疫系遺伝子の増減は少なく、病原菌によって強く誘導されることがわかっている炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  と IL-8) 遺伝子の発現量増加は 1.5 倍未満で、ほとんど影響を受けなかった。

表 1. Gene Ontology 解析による遺伝子分類

Gene Ontology term	変動した遺伝子数*	
	$\geq 1.5$	$\leq 0.66$
Biological adhesion	5	8
Biological regulation	116	104
Carbohydrate utilization	0	0
Carbon utilization	0	0
Cell killing	0	1
Cell proliferation	9	10
Cellular component organization or biogene	31	28
Cellular process	177	163
Death	10	10
Developmental process	31	25
Establishment of localization	44	30
Growth	4	6
Immune system process	9	10
Localization	49	34
Locomotion	10	9
Metabolic process	101	116
Multiorganism process	8	4
Multicellular organismal process	37	35
Negative regulation of biological process	16	23
Nitrogen utilization	0	0
Phosphorous utilization	0	0
Pigmentation	1	0
Positive regulation of biological process	24	26
Regulation of biological process	111	100
Reproduction	7	5
Reproductive process	7	5
Response to stimulus	93	71
Rhythmic process	0	0
Signaling	82	61
Sulfur utilization	0	0
Viral reproduction	1	0

\*各階層には、遺伝子が重複して含まれる

細胞内シグナル伝達のうち、G-protein signaling pathway 関連遺伝子が多く変動し

た。これは、細胞膜上に存在する G 蛋白共役型受容体を介し、免疫系を含む様々な細胞応答に関与するシグナル伝達経路である。免疫系に関連する G-protein coupled receptor や G-protein signaling regulator などの遺伝子が、それぞれ 1.5 倍以上増加、0.66 倍未満に低下していた (表 2)。病原菌では BMEC の炎症性サイトカインが強く誘導されることが知られているが、*L. lactis* は炎症性サイトカイン遺伝子の発現にほとんど影響せず、G-protein signaling pathway に影響することがわかった。

表 2. *L. lactis* によって変動した G-protein signaling pathway 関連遺伝子

遺伝子名	Accession No.	比	p 値
発現量が増加した遺伝子			
1 Probable G-protein coupled receptor	52 NM_001100304	2.1	0.047
2 G protein gamma 4	NM_001103324	1.9	0.014
3 G protein-coupled receptor 77	NM_001077947	1.7	0.005
4 G-protein coupled receptor 183	NM_001046472	1.6	0.01
5 C-C chemokine receptor type 1-like	NM_001075921	1.5	0.03
発現量が低下した遺伝子			
1 G-protein signaling modulator 3	XM_594391	0.44	0.012
2 G-protein coupled receptor 4	NM_001075583	0.5	0.03
3 G protein-coupled receptor 150	XM_003582493	0.51	0.031
4 regulator of G-protein signalling 13	NM_001080232	0.58	0.04
5 G protein-coupled receptor 162	NM_001076217	0.62	0.049

## (2) 定量 PCR を用いた BMEC の特定遺伝子の発現量解析

定量 PCR 解析の結果、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  と IL-8) 遺伝子については、グラム陰性菌の接種によって、発現量が大きく上昇した (図 1)。IL-1 $\beta$  の方が強く誘導される傾向があり、菌種によって発現量変化に差があった。一方、グラム陽性菌 (*L. lactis* および *Microbacterium sp.*) では発現量比は 1.5 ~ 2 倍程度で、グラム陽性菌よりもグラム陰性菌の方が炎症性サイトカインを強く誘導することがわかった。これは、グラム陰性菌が持つ細胞外多糖が BMEC の免疫応答を強く活性化させたと考えられる。また本結果は、乳房炎原因菌とされていないグラム陰性菌についても、乳房内で増殖することによって乳房の炎症に関与する可能性があることを示唆する。

表 2 に示した G-protein signaling pathway に関連する遺伝子について、各菌株に対する遺伝子発現量変化を調べたところ、グラム陽性菌を BMEC に接種することによって、G-protein gamma 4 の遺伝子発現が 2 倍程度上昇した。また、G-protein coupled receptor 77 の遺伝子は、*L. lactis*、*Microbacterium sp.*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Serratia sp.* を接種後、その発現量比は 1.5 ~ 2 倍程度となった。他の菌種では 1.5 倍未満と発現量の増加は確認できず、菌種によって G-protein signal pathway に対する影響が異なることが明らかとなった。なお、他の遺伝子については、定量 PCR では遺伝子発現量の有意な増減は確認できなかった。これは、マイクロアレイのプロ

ブが標的とする遺伝子配列と、定量 PCR で用いたプライマーの標的配列が異なることが理由として考えられる。マイクロアレイの結果を反映しなかったものについては、標的遺伝子のプライマー設計部位を再検討する必要がある。

以上の結果、非病原性で優占種の *L. lactis* は、G-protein signaling pathway を通して、BMEC を刺激する可能性が示唆され、病原菌以外にも乳中細菌が乳房の免疫系を刺激していることが明らかとなった。また、属に関係なくグラム陰性菌は BMEC の炎症性サイトカインを強く誘導することを明らかにした。

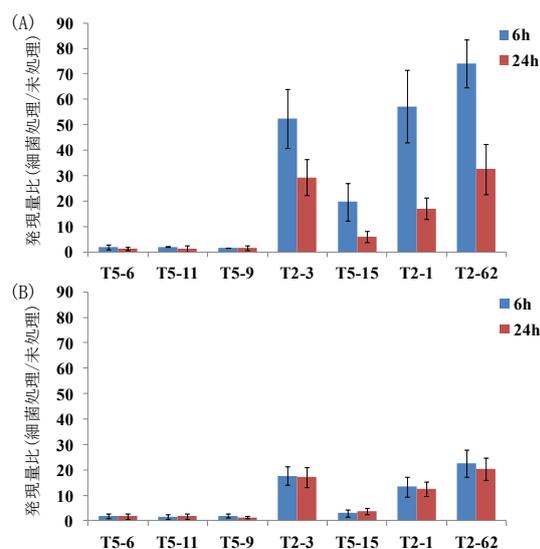


図 1. 各乳中細菌が BMEC の炎症性サイトカインに与える影響

(A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-8. 菌株名: T5-6, *L. lactis* ssp. *cremoris* (Accession number: AB624339); T5-11, *L. lactis* ssp. *lactis* (AB624340); T5-9, *Microbacterium sp.* (AB624342); T2-3, *Stenotrophomonas maltophilia* (AB624341); T5-15, *Chryseobacterium sp.* (AB624343); T2-1, *Pseudomonas sp.* (AB624344); T2-62, *Serratia sp.* (AB624345).

本研究では、病原菌以外の乳中細菌が乳房に与える影響を、遺伝子レベルで初めて明らかにした。今後、細胞膜に存在する G タンパク質制御因子群をプロテオーム解析等で明らかにすることで、乳中常在菌が乳房に与える作用機構解明が期待される。

## 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)

① Hagi T, Sasaki K, Aso H, Nomura M. Adhesive properties of predominant

bacteria in raw cow's milk to bovine mammary gland epithelial cells. Folia Microbiologica, 印刷中, DOI 10.1007/s12223-013-0240-z, 査読有

[学会発表] (計1件)

- ①萩達朗, 麻生久, 野村将、牛乳中の優占種細菌がウシ乳腺上皮細胞の遺伝子発現に与える影響、日本農芸化学会大会、2012年3月26日、京都女子大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

萩 達朗 (HAGI TATSURO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・畜産物研究領域・研究員

研究者番号：00510257