

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882032

研究課題名(和文) ビフィズス菌の長寿効果に寄与する構成成分の探索

研究課題名(英文) Specific upregulation of candidate gene by probiotics in *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

小村 智美 (Komura, Tomomi)

大阪市立大学・大学院生活科学研究科・客員研究員

研究者番号：10736515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：わが国は世界一の長寿大国となったが、免疫力の低下による高齢者の肺炎死亡率増加など老化に関する課題も多い。そこで老化に伴う免疫力の低下を食品成分により制御する可能性について、線虫(*Caenorhabditis elegans*)をモデル動物として研究を進めている。これまでにビフィズス菌の一種(BI)が、線虫の老化を抑制し寿命を延長させることを発見した。本研究では、GFPをレポーターとして、BIのターゲットと推定された遺伝子のトランスジェニック線虫に種々の菌を与えて遺伝子誘導を調べた。その結果、BIを与えるとGFPが顕著に誘導される一方で、病原菌や長寿効果のない菌では誘導されない遺伝子を発見した。

研究成果の概要(英文)：Immunosenescence is one of the most important determinants of disease morbidity and mortality in elderly humans. We have studied whether food factors could control senescence of immune function and contribute to the successful aging. More than 70% of human genes have an ortholog in *Caenorhabditis elegans* genome. This organism has been used as an experimental system to study aging because of its short lifespan and the discoveries of genes associated with the senescence. We previously showed that probiotics could prolong the lifespan of metazoan, the first in the world, using the nematodes (Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 6404-9). I had successfully established a transgenic nematode of that candidate gene was fused to GFP. This study is to reveal the immunogenics, which is immunomodulatory factors of the probiotics, by a molecular biological approach using the nematodes. The reporter assay would be used to screen probiotic bacteria as immunoenhancer.

研究分野：免疫栄養学

キーワード：線虫 ビフィズス菌 プロバイオティクス 老化 寿命

1. 研究開始当初の背景

世界一の長寿大国となった我が国では、急速な高齢化社会の進行に伴い、免疫力の低下による高齢者の肺炎死亡率の増加や Quality of life (生活の質: QOL) の低下、介護ニーズの増大などが社会問題となっている。

栄養学や免疫学の研究では、実験動物としてマウスやラットを用いるのが一般的であるが、老化のモデル生物として哺乳類を用いる場合、長期の実験期間を要し、動物倫理の制約も厳しい。そこで線虫 (*Caenorhabditis elegans*: 図1) に着目した。

線虫は、腸管、神経、生殖器など生物としての基本的な構造を持ち、寿命が短く(約3週間)、倫理上の制約もない。そして、遺伝子レベルではヒトと70%以上の相同性を有し、老化に関連する遺伝子が数多く同定され老化研究のモデル動物として世界中で利用されている。



図1. 線虫の体構造

2. 研究の目的

近年、食品の生理調節機能が世界的に注目され、そのひとつとしてプロバイオティクス(宿主に有益な保健効果を示す微生物)が挙げられる。1907年、ノーベル賞受賞者のメチニコフはヨーグルトに含まれる乳酸菌が長寿を導くとする「不老長寿説」を提唱した。以来100年、その長寿効果を当研究室は線虫モデルを用いることで *in vivo* で初めて実証した (Ikeda T, Yasui C, Hoshino K, Arikawa K, Nishikawa Y, "Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *Salmonella enterica* serovar enteritidis", Appl. Environ. Microbiol., 73(20): 6404-6409, 2007)。

広義の乳酸菌に含まれるプロバイオティクスとして利用されているピフィズス菌について線虫の寿命や老化指標に与える影響を検証し、体内の酸化物質の蓄積や運動機能の低下が抑制されることを見出した (Komura, T., Ikeda, T., Yasui, C., Saeki, S., and Nishikawa, Y., "Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans*", Biogerontology, 14(1): 73-87, 2013.)。しかしながら、ピフィズス菌体側の有効成分に関しては、抽出したい成分によって分画方法が異なり煩雑なこと、精製が難しいことなどもあいまって、菌体のどの部分が長寿効果に関与するのかすら未だ明らかにできていない。そこで本研究は、その機構を解明するための糸口として、

線虫の寿命を延ばすピフィズス菌体成分を探索する方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ピフィズス菌のランダム変異株作製
EZ-Tn5™ pMOD™ -2<MCS> Transposon Construction Vector(Epicentre)を用いて、ピフィズス菌のランダム変異株の作製を試みた。

(2) 各ピフィズス菌体成分の分画

ピフィズス菌の細胞壁・細胞質(タンパク質・DNA・RNA)の抽出を試みた。細胞壁分画は Tejada-Simon らの方法(Tejada-Simon MV, Pestka JJ., "Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria.", J Food Protect, 62(12), 1435-1444, 1999) に準じて作製した。

タンパク質分画は Bacterial PELB (G-Biosciences), DNA は DNA すいすい-F(リーゾ), RNA はリゾチームと Sepsol (ナカライテスク)を用いて抽出することを試みた。

(3) GFP 挿入トランスジェニック線虫の作製

これまでマイクロアレイ法と RT-PCR 法を用いて生体防御系に関わる遺伝子が、通常のエサを与えた時に比べてピフィズス菌を与えた時に顕著に発現量が増加することを見出した。そこで、ピフィズス菌摂取時に発現増加する遺伝子のプロモーターに GFP を繋いだベクターをインジェクションし、トランスジェニック線虫を作製した。

(4) トランスジェニック線虫の GFP 発現観察

トランスジェニック線虫をレポーターアッセイに用いてピフィズス菌体成分を給餌し、蛍光顕微鏡下で GFP 誘導能力を観察した。

4. 研究成果

(1) ピフィズス菌のランダム変異株作製
ピフィズス菌などグラム陽性菌は細胞壁成分のペプチドグリカン層が厚く、変異株の作製報告はグラム陰性の大腸菌などと比べて少ない。しかしながら Ito らは、EZ-TN5 トランスポゾムを用いた *Lactobacillus casei* (乳酸菌の一種)の挿入変異をエレクトロポレーション法を用いて作製できることを報告した (Ito M, Kim YG, Tsuji H, Kiwaki M, Nomoto K, Tanaka R, Okada N, Danbara., "A practical random mutagenesis system for probiotic *Lactobacillus casei* using Tn5 transposition complexes.", Appl. Microbiol., 109(2): 657-666, 2010)。そこで Ito らの方法に基づき、菌種の異なる *L. acidophilus* を用いたランダム変異株の作製を成功させ、菌種が異なっても同法で作製できることを確認した。

本研究では先行研究で報告したピフィズス菌の中でも、最も寿命延長効果が顕著であった *B. infantis* を使用した。*B. infantis* はクロラムフェニコールに対して感受性があるため、EZ-Tn5 pMOD-2<MCS>

Transposon Construction Vector のマルチクロニングサイトにプラスミド pSFS2A のクロラムフェニコール耐性遺伝子を組み込み (pMOD-2<Cmr>)、コンピテントセルの大腸菌を形質転換させた。大腸菌からプラスミド pMOD-2<Cmr>を抽出し、トランスポソーム (トランスポゾンと転位酵素の複合体) を作製した。その後、エレクトロポレーション法を用いて *B. infantis* を形質転換させるを試みた。しかし、組み込んだクロラムフェニコール耐性遺伝子が、本菌では作用しないことが判明した。そこで本菌に適する可能性が高いピフィズス菌で利用可能なプラスミドを海外販売業者から取り寄せようとしたが発注後1年を経っても納品されず困難になった。今後、プラスミドを作製した海外研究者から直接入手できる予定である。

(2) 各ピフィズス菌体成分の分画

グラム陽性菌であるピフィズス菌は、大腸菌 (グラム陰性菌) と比べて細胞壁が厚く、タンパク質や DNA, RNA を抽出することが難しいとされる。各試薬を用いて抽出方法を検討したところ、前ページに記載した方法を用いてピフィズス菌の各菌体成分を分画することに成功した。

(3) GFP 挿入トランスジェニック線虫の作製

ピフィズス菌摂取時に発現増加する遺伝子に GFP, 咽頭部の *myo-3* 遺伝子に DsRed を繋いだトランスジェニック線虫の作製に成功した (図 2)。 *myo-3::DsRed* はいかなる環境下でも赤く光り、トランスジェニック線虫を容易に選別できるレポーターアッセイとして機能した。

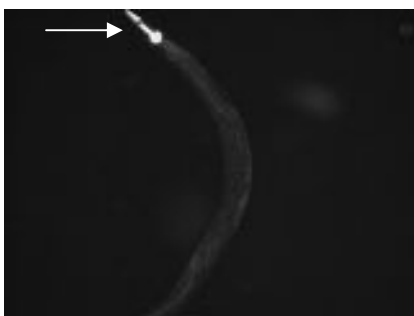


図 2. トランスジェニック線虫

(白部 : GFP 誘導部位, : DsRed::*myo-3*)

(4) トランスジェニック線虫の GFP 発現観察

トランスジェニック線虫にピフィズス菌などプロバイオティクスを与えると GFP が顕著に誘導された (図 3)。

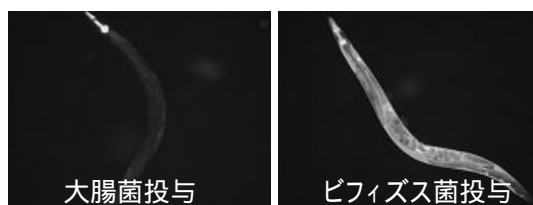


図 3. 大腸菌またはピフィズス菌を与えたトランスジェニック線虫

ピフィズス菌の加熱死菌でも GFP の発現誘導は観察されたが、加熱死菌を DNase や Protease で処理した菌をトランスジェニック線虫に与えると、GFP 発現が消失した。しかしながら、RNase 処理した菌体を与えた場合は顕著な GFP 発現が確認できた。これは、本遺伝子を発現させるピフィズス菌の成分が DNA やタンパク質であることを示唆していると推察される。

ピフィズス菌から抽出した DNA や RNA だけをトランスジェニック線虫に与えても顕著な GFP の発現が認められなかった。DNA を高濃度にする粘着が増し、線虫を正常飼育することが困難であった。また、抽出した DNA 単独では線虫に必要な栄養成分が欠如しているために、正常な応答が起こらなかった可能性も考えられる。今後、各成分の投与濃度および給餌条件を検討していく余地がある。

ピフィズス菌とは対照的に、病原菌 (サルモネラ, 緑膿菌, 黄色ブドウ球菌, レジオネラ) や寿命延長効果のない大腸菌では GFP は全く誘導されなかった。そのため本遺伝子はプロバイオティクスに特異的な菌体成分で誘導されることが期待される。今後、本研究で作製したトランスジェニック線虫のレポーターアッセイ系を用いて長寿効果に関与するピフィズス菌体成分を同定し、ピフィズス菌による寿命延長の機構解明に向けて継続的に研究を進めていきたい。

本研究により、レポーターアッセイ系の実験システムを整えることができたので、今後ピフィズス菌のランダム変異株の作製に成功すれば、これらをスクリーニングすることが可能であり、長寿効果に関連している菌側の遺伝子とその産物の同定に向けた道が開かれた。将来的には、乳酸菌をはじめプロバイオティクスのアンチエイジング効果の探求にも応用できる新たなシステムとなり、食品の新規機能性 (アンチエイジング効果) 研究における基礎実験系への応用やサプリメントへの応用も期待できると考えている。

以上、ピフィズス菌の長寿効果に寄与する菌体成分の探索とスクリーニングに有用なモデルを作製できた。有効成分が明らかになれば、その機構解明からヒトへの応用など、超高齢社会に突入した我が国で課題となっている平均寿命と健康寿命の較差短縮にも役立てられるものと期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

小村智美, 水野靖子, 池田高紀, 安井智佳子, 佐伯茂, 西川禎一, 「Caenorhabditis elegans (線虫)におけるピフィズス菌の長寿効果とその機構」, 第67回日本細菌学会関西支部総会, 2014年11月23日, 兵庫医科大学(兵庫県西宮市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

小村 智美 (KOMURA, Tomomi)

大阪市立大学 大学院生活科学研究科・客員
研究員

研究者番号: 10736515