

平成23年度特別経費（プロジェクト分）
「香川グライコリソース（希少糖・ヒト型糖鎖）を用いたナノ糖質生命科学研究推進事業」
研究グループ別研究成果報告書

（本報告書は、必要に応じてホームページ上で公開しますので、知的財産に関連する記述等については注意してください。）

研究組織				
研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。				
研究課題名	腸内菌が産生する多糖類の生理機能の解析			
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先	
	桑原知己	医学研究院・教授	e-mail	本人
				秘書等
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等	
	桑原知己	医学研究院・教授	腸内菌が産生する多糖類の生理機能の解析	

平成 23 年度研究成果概要

研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。

偏性嫌気性グラム陰性桿菌である *Bacteroides* (バクテロイデス) 属細菌はヒトや動物の腸内フローラにおける優勢菌群である。*Bacteroides* は敗血症や腹腔内膿瘍、虫垂炎といった嫌気性菌感染症の原因となるが、近年、*Bacteroides* とヒトとの共生システムに大きな関心が寄せられている。我々はヒト腸内常在菌である *Bacteroides thetaiotaomicron* (BT) が偽膜性大腸炎の起因菌である *Clostridium difficile* (CD) の毒素産生を抑制することを見出した。CD はエンテロトキシンである Toxin A とサイトトキシンである Toxin B を保有し、それぞれ HT-29 細胞と Vero 細胞特異的に細胞変性効果を示す。CD と BT を混合培養し、得られた混合培養上清を HT-29 細胞または Vero 細胞に接種して細胞毒性を評価した結果、BT は CD の両細胞に対する細胞毒性を減弱させた。したがって BT は CD の Toxin A および Toxin B 両毒素による細胞毒性を抑制する因子を保有することを明らかにした。CD の細胞内で合成された両毒素は、TcdE タンパク質による自己溶菌作用によって細胞外へ放出される。混合培養時における CD のグラム染色像をみると BT との混合培養においてのみ溶菌が抑制されていたことから、BT が CD の溶菌を阻害することで細胞外への毒素の放出を抑制していると考えられた。また BT の培養上清中には溶菌抑制作用だけでなく、CD の毒素合成を阻害する作用をもつ生理活性物質が存在することも見出している。加熱あるいは分子量に基づき分画した BT の培養上清で CD を培養した結果、BT の Toxin A 抑制因子は耐熱性であり、抑制活性の大部分は 100 kDa 以上の分画に存在していた。

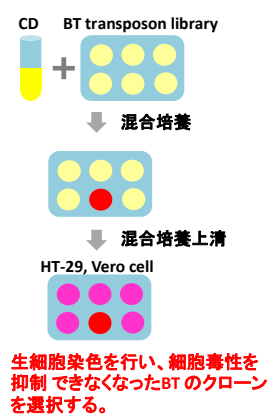
次に、我々が開発した改良形質転換法 (Ichimura, M. *et al.*, *Appl Environ Microbiol*, 2010.) を用いて BT のトランスポゾン挿入変異ライブラリーを作製し、責任遺伝子群を同定することを試みた (上図)。このトランスポゾン挿入変異ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、CD の Toxin A による細胞毒性を抑制できなくなったクローンでは菌体外多糖の結合や取り込みに関与する外膜タンパク質 (SusC/D family) や多糖の分解酵素や糖転移酵素 (Glycosyl hydrolase, Glycosyl transferase family) の遺伝子にトランスポゾンが挿入されていた (右図表)。

BT のゲノム上には PS-T から PS-Z まで 7 種類の莢膜多糖合成領域 (Capsular polysaccharide synthesis: PS) が存在し、細胞内で合成された莢膜多糖は脂質担体 C₅₅ を介して細胞外へと輸送される。特定の莢膜多糖合成領域 (PS-T および PS-U) や C₅₅ 構成分子の遺伝子 *gcpE* にトランスポゾンが挿入されている変異体では、CD の Toxin B による細胞毒性を抑制できなくなっていた。これらの結果から、CD の細胞毒性に対する抑制作用には BT の糖代謝が関与している事が示唆された。一方で、糖代謝におけるどのような中間代謝分子が CD の溶菌を阻害し、毒素の発現を抑制しているのかに関しては十分な結果を得ていないが、腸管感染症の制御に常在菌由来の多糖が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

トランスポゾン挿入変異ライブラリーの作製



CDとの混合培養



B.thetaiotaomicron (BT)

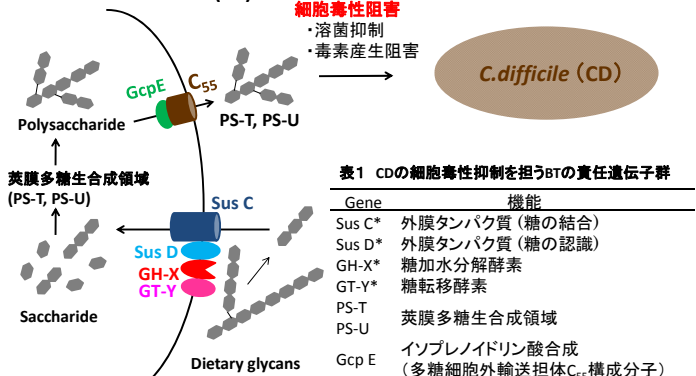


表1 CDの細胞毒性抑制を担うBTの責任遺伝子群

Gene	機能
Sus C*	外膜タンパク質 (糖の結合)
Sus D*	外膜タンパク質 (糖の認識)
GH-X*	糖加水分解酵素
GT-Y*	糖転移酵素
PS-T	莢膜多糖合成領域
PS-U	莢膜多糖合成領域
Gcp E	インプレノイドリン酸合成 (多糖細胞外輸送担体C ₅₅ 構成分子)

* SusC/SusDは、糖加水分解酵素遺伝子群とクラスターを形成している場合が多く、協調的に機能していると考えられる。

今後の研究計画

平成 23 年度に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究計画について具体的に記載してください。図を挿入してもかまいません。

近年、*Bacteroides fragilis* (BF)が産生するある種の莢膜多糖 (PS A) が腸管粘膜固有層において制御性 T 細胞を誘導し、腸炎を抑制することが報告され (Strober, W. et al., *Nat. Medicine*. 2010)、*Bacteroides* が産生する多様な菌体外多糖に大きな関心が寄せられている。*Bacteroides* の莢膜多糖のうち構造決定がなされているのは BF が産生する 2 種の多糖のみである。BT の莢膜多糖の構造は未知であり、生体内における機能も明らかになっていない。我々は *Bacteroides* 属細菌の遺伝子改変技術および解析技術を確立しており、BT 由来の莢膜多糖の役割について解析できる環境にあるが、現時点においては BT の CD に対する細胞毒性抑制作用を確認しているのは試験管内での混合培養系のみであるため、ハムスターを用いた偽膜性大腸炎疾患モデルにおいても BT が CD の毒性を抑制できるか否かについて検討することを今後計画している。また、トランスポゾン挿入変異ライブラリーのスクリーニングによりピックアップした BT の有する CD の細胞毒性抑制因子の生産に関わる遺伝子の欠失株を作製する。さらに、候補因子の大腸菌での大量発現と精製、BT からの候補莢膜多糖の精製を行い、候補遺伝子の欠失株や精製分子を用い *in vitro* および *in vivo* の実験において以下の項目を検証する (下図)。これらの研究により、腸細菌の産生する多糖の宿主に対する有益作用の分子メカニズムの解明を目指す。

a) CD 毒素抑制作用の消失したトランスポゾン挿入変異株の解析

BT の野生株に見られた CD の溶菌抑制や毒素産生に対する抑制作用をグラム染色や qPCR, ELISA, Western blotting 法で解析する。また、SusC/D, Glycosyl hydrolase, Glycosyl transferase family のタンパク質に関してはそれらの基質特異性をデータベース上から推定し、対応する基質を用いて検証する。

b) CD 毒素抑制因子をコードする遺伝子の欠失株の検証

候補遺伝子群の欠失株を作製し、*in vitro* および *in vivo* においてそれら菌株の CD の病原性に対する効果を検証する。

c) CD 毒素抑制因子の合成系の構築

莢膜多糖は BT において目的の莢膜多糖 1 種のみを発現する変異体から精製する。その他の抑制分子は大腸菌内で大量発現させ、当該タンパク質を精製する。

d) 精製抑制因子の解析と検証

精製した抑制因子を用いて *in vivo* でその効果を検証する。また、目的莢膜多糖の精製が可能な場合は構成糖を分析し、特徴を明らかにする。

e) マイクロアレイ解析

CD と精製した抑制因子を混合後、total RNA を精製し、マイクロアレイ解析を行い病原菌側の反応を調べることにより毒素産生抑制メカニズムを明らかにする。

毒素抑制作用の消失したトランスポゾン挿入変異株の解析

CD と BT 野生株または候補遺伝子挿入変異株との混合培養

- ・生菌数測定
- ・形態観察(グラム染色)
- ・毒素定量 (qPCR, Western blotting, ELISA)

↓

候補遺伝子として決定する

候補遺伝子欠失変異株の作製と抑制因子合成系の構築

BT 欠失株の作製

- ・ Δ SusC, Δ SusD, Δ GH-X, Δ GT-Y, Δ GcpE, Δ PS-T, Δ PS-U

大腸菌内での再合成

- ・精製 GH-X, GT-Y → 酵素活性測定

BT 内での再合成

- ・精製 PS-T, 精製 PS-U → 構成糖の解析

欠失変異株と精製抑制因子の検証

in vivo (ハムスター偽膜性大腸炎モデル)での解析

- ・生存率
- ・組織学評価
- ・生菌数測定
- ・糞便中の毒素定量

精製抑制因子に対する CD の反応解析

・CD と精製抑制因子を混合し、Total RNA を抽出する
→ マイクロアレイ解析

特記すべき事項

本研究に関する受賞 (学生対象の賞も含む)・プレスリリース・大型外部資金獲得につながった等、特記すべき事項があれば記述してください (ささいなことでもかまいません)。本欄は必須ではありませんので、「該当なし。」でも可ですが、できるだけ記載してください。

本研究プロジェクトで得た成果をもとに競争的外部資金 (上原生命記念財団研究推進特別奨励金 : 400 万円) を獲得した。

研究業績

本研究に関連した、平成 23 年度中の発表した、[1] 査読がある原著論文 (Corresponding Author には*印を付す。), [2] 著書, [3] 招待講演, [4] 学会発表 (発表者には○印), [5] 産業財産権 (特許等), [6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等) を通し番号を付して記入してください。本事業の参加者にはアンダーラインを引いてください。記入欄が足りない場合は、用紙を追加してください。

[1] 査読がある原著論文

1. Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Iwasa T, Okada N, Ohnishi Y, Kuwahara, T*. Characterization of a gene cluster for sialoglycoconjugate utilization in *Bacteroides fragilis*. J Med Invest., 2012, in press.
2. Nariya H*, Miyata S, Kuwahara T, Okabe A. Development and characterization of a xylose-inducible gene expression system for *Clostridium perfringens*. Appl Environ Microbiol, 77, 8439-8441, 2011.
3. Kuwahara T, Ogura Y, Oshima K, Kurokawa K, Ooka T, Hirakawa H, Itoh T, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Itoh K, Ishifune C, Maekawa Y, Yasutomo K, Hattori M, Hayashi T*. The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a non-culturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing. DNA Res, 18:291-303, 2011.
4. Jinnouchi O, Kuwahara T, Ishida S, Okano Y, Kasei Y, Kunitomo K, Takeda N*. Anti-microbial and therapeutic effects of modified Burow's solution on refractory otorrhea. Auris Nasus Larynx. 2011, in press.
5. Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S*. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. Eur Respir J, 38:415-424, 2011.
6. Nemoto H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, Ohnishi Y, Kuwahara T, Kataoka K*. Effects of fermented brown rice on the intestinal environments in healthy adult. J Med Invest, 58:235-245, 2011.

[2] 著書

なし。

[3] 招待講演

なし。

[4] 学会発表(○は発表者)

1. ○桑原知巳. ゲノムからみたマウス腸内セグメント細菌の生態. ゲノム微生物学会ワークショップ, 仙台, 8月20日-21日, 2011.
2. ○Ichimura M, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yasutomo K. Efficient electrotransformation strategies of *Bacteroides fragilis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 6-10 September 2011.
3. ○Nakayama-Imaohji H, Kuwahara T, Ichimura M, Yasutomo K. Dynamic regulation of the DNA inversions in *susC/susD* genes clusters by a single tyrosine site-specific recombinase in *Bacteroides fragilis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 6-10 September 2011.

[5] 産業財産権 (特許等)

なし。

[6] その他 (プロシーディング, 査読がない論文, 投稿記事等)

なし。