

平成24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	TEL	087-891-2129		
			e-mail	本人	tomomi@med.kagawa-u.ac.jp	
				秘書等		
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等			
	今大路治之	医学研究院・助教	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> と <i>Clostridium difficile</i> との <i>in vivo</i> での相互作用の解析			
	市村 穰	協力研究員 (徳島大学大学院医学研究科・博士後期課程4年)	<i>Clostridium difficile</i> 毒素の定量			

平成24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。

これまでの研究成果により、腸内常在菌叢を構成する主要な菌種である *Bacteroides thetaiotamicron* (BT)が *Clostridium difficile* (CD)の細胞毒性を抑制することが明らかとなっている。また、昨年度は、BT においてトランスポゾン (Tn4351) がゲノムにランダムに挿入された変異ライブラリーのスクリーニングを行い、莢膜多糖合成や糖加水分解酵素の遺伝子にトランスポゾンが挿入した変異株では抑制効果が消失することを明らかにした。この結果は BT の糖代謝産物が CD の細胞

毒性に対する抑制作用に参与している可能性が考えられた。本年度はこの BT の CD の細胞毒性に対する抑制効果が *in vivo* でも認められるか否かを検討するため、無菌マウスの腸管に BT と CD を同時に定着させ、マウスの死亡率、盲腸内 Toxin B

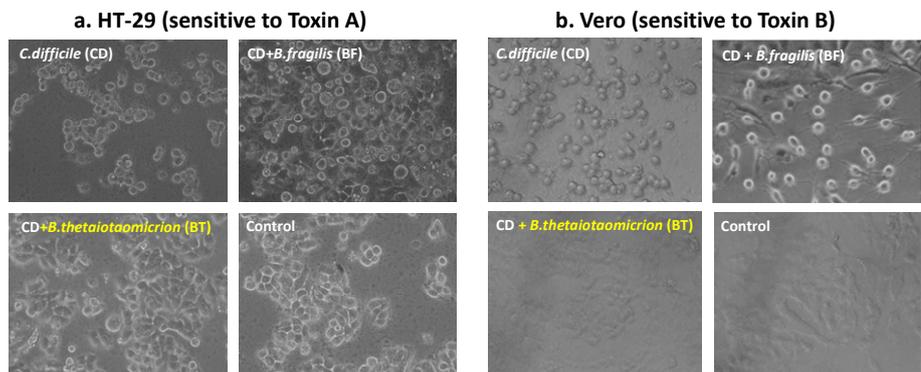


図1. BTのCDの細胞毒性に対する抑制作用

の定量、および盲腸内容物のグラム染色像を比較した。BT は野生株と昨年度のスクリーニングにより得られた莢膜多糖 (PS-4)欠損株 (CD の細胞毒性抑制効果を消失した変異株) を用いた。その結果、図 2 に示すように、BT の野生株と CD を共感染させた群では 80%が生存したのに対し、PS-4 の欠損株を投与した群の生存率は 20%であり、BT の CD の細胞毒性に対する抑制効果が *in vivo* においても認められた。この結果は、また、莢膜多糖 PS-4 がこの抑制作用

に参与していることを示している。これらの群において盲腸内での Toxin B 量を ELISA 法により定量した結果、BT の野生株と CD を共感染させた群の Toxin B 量は PS-4 欠損株と CD を共感染させた群と比較して有意に低かった。盲腸内のグラム染色像を比較すると、BT の野生株と CD を共感染させた場合、CD はグラム陽性 (図 2 左下の青く染まる菌体) に保たれる菌体が多く、PS-4 欠損株と共感染させた場合には CD の多くの菌体がグラム陰性 (赤く染まる) に染色された。このことは、BT の PS-4 が CD の自己融解を抑制することにより Toxin A や Toxin B の遊離を抑えている可能性が考えられた。

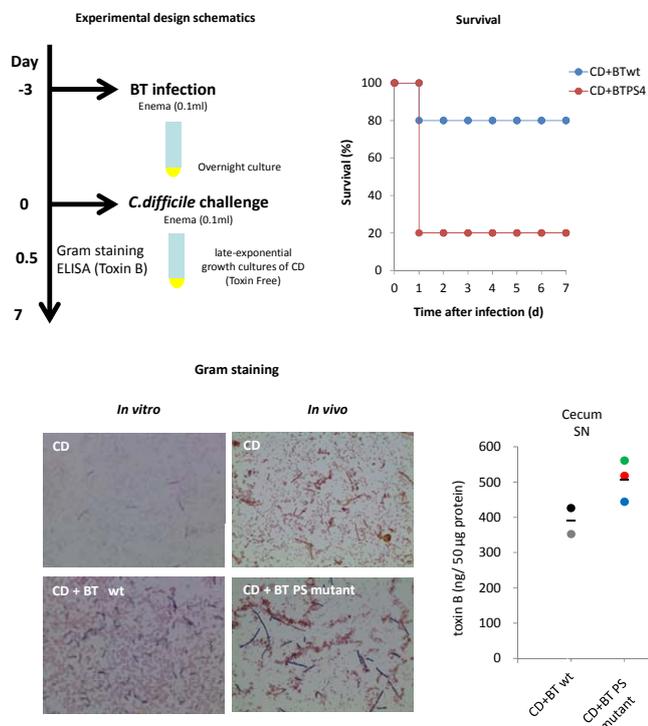


図2. BTのCDの細胞毒性に対する*in vivo*での効果

今後の研究計画

平成24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。

平成25年度はBTのCDの細胞毒性に対する抑制作用のメカニズムを解明するために以下の研究を行う。

1. PS-4の精製と構造決定

BTは7種類の莢膜多糖を合成することが知られているため、PS-4以外の6種の莢膜多糖の合成遺伝子領域を欠損させた変異株を作製する。この変異株より莢膜多糖を精製し、その構成糖や構造を決定する。

2. CDの細胞毒素に対する抑制作用のメカニズムの解明

(1) PS-4の自己融解阻害作用

無菌マウスへの接種実験において、BTの野生株がCDの自己融解を阻害している可能性が示唆されたため、PBS-0.05% Triton-X 中での autolysis assay を行い検討する。

(2) 毒素の自己分解誘導作用

CDのToxinAとToxinBは自身のcysteine protease活性により自己消化を受け、細胞内で活性ドメインが遊離する。PS-4またはその構成糖がToxinAおよびToxinBの自己分解を誘導するか否かを recombinant ToxinA および Toxin B を用いて検討する。

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。

メンバーの市村 穰（徳島大学大学院医学研究科・博士後期課程4年、香川大学医学部分子微生物学にて受入れ）が関連研究課題により日本学術振興会特別研究員（DC2）に採用された。

研究業績

本研究に関連した,平成24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. Ichimura M, Uchida K, Nakayama-Imaohji H, Hirakawa H, Tada T, Morita H, Yasutomo K, Okazaki K, Kuwahara T. Mariner-based transposon mutagenesis for *Bacteroides* species. J Basic Microbiol, 2013, in press.
2. Wakimoto S, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Morita H, Hirakawa H, Hayashi T, Yasutomo K, Kuwahara T. PhoB regulates the survival of *Bacteroides fragilis* in peritoneal abscesses. PLoS One, 8, e53829, 2013.
3. Takami H, Taniguchi T, Moriya Y, Kuwahara T, Kanehisa M, Goto S. Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. BMC Genomics, 13, 699, 2012.
4. Ishibashi H, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Ohnishi Y, Mori H, Shimada M. Effect of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on bile and pancreatic juice excretion in rats. J Med Invest, 59, 246-252, 2012.
5. Nemoto H, Kataoka K, Ishikawa H, Ikata K, Arimochi H, Iwasaki T, Ohnishi Y, Kuwahara T, Yasutomo K. Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. Dig Dis Sci, 57, 2955-2964, 2012.

[2] 著書

なし。

[3] 招待講演

○桑原知己. 腸管内における宿主微生物間相互作用に関わる分子の検索。第86回日本細菌学会総会、ワークショップ「細菌間および細菌宿主間の相互作用」、千葉、2013年3月。

[4] 学会発表(○は発表者)

1. ○市村 穰、今大路 治之、内田 景子、安友 康二、桑原 知己. 腸管内常在菌による *Clostridium difficile* の病原性抑制機構。第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月。
2. ○内田景子、市村 穰、今大路 治之、岡崎 勝一郎、桑原 知己. *Bacteroides thetaiotaomicron* におけるマリナートランスポゾン挿入変異ライブラリーの開発。第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月。

[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。