

平成25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、知的財産に関する記述等については注意してください。)

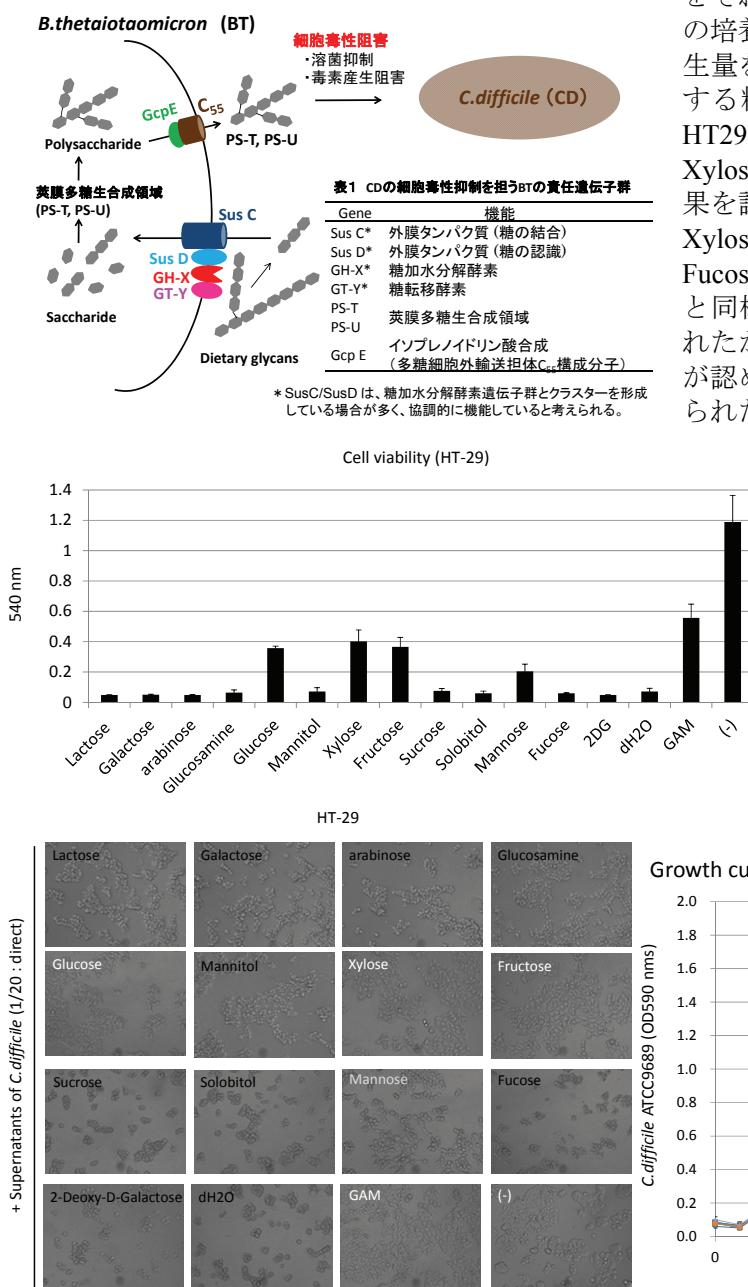
<b>研究組織</b>			
研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。			
研究課題名	腸内菌が産生する多糖類の生理機能の解析		
グループリーダー	氏 名	所属・職名	連絡先
	桑原知己	医学部・教授	087-891-2129 TEL e-mail
メンバー	氏 名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等
	今大路治之	医学部・助教	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> と <i>Clostridium difficile</i> との <i>in vivo</i> での相互作用の解析

## 平成25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。

これまでの研究から、腸内フローラにおける優勢菌種である *B. thetaiotaomicron* が *C. difficile* の毒素産生を抑制することを見出している。*B. thetaiotaomicron* の培養上清を添加した培地で *C. difficile* を培養すると Toxin A による HT29 細胞の変性作用および Toxin B による Vero 細胞の変性作用がともに抑制されることをこれまでの研究成果として明らかにしている。また、トランスポゾンを用いた本抑制作用の責任遺伝子の探索の結果、下図に示すようにすべて糖代に関連するものであり、莢膜多糖、糖加水分解酵素や糖鎖輸送担体構成分子である GcpE などがリストアップされている。特に莢膜多糖 PS-4（表中では PS-T）合成遺伝子の挿入変異による抑制活性の低下が顕著であり、本多糖が、*C. difficile* の細胞毒性に対する抑制効果の主たる要因ではないかと考えている。そこで、本研究ではどのような糖が本細胞毒性抑制効果に関与しているのかを推測するため、13 種類の糖

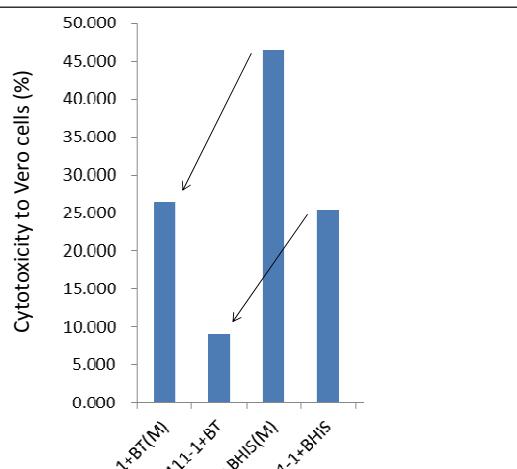
をそれぞれ 0.5% 濃度になるように *C. difficile* の培養液中に添加し、細胞増殖および毒素産生量を比較した。すると興味深いことに添加する糖により、*C. difficile* の培養上清中の HT29 細胞毒性に違いが認められた。Glucose, Xylose, Fructose, Mannose に細胞毒性抑制効果を認めた。また、増殖については、Glucose, Xylose, Fructose, Mannose, Glucosamine, Fucose を添加した場合、Fucose は陰性对照と同様に溶菌を示す OD<sub>590</sub> の低下が認められたが、その他の糖については OD<sub>590</sub> の低下が認められず、溶菌が抑制されていると考えられた。したがって、*B. thetaiotaomicron* の產生する PS-4 や PS-6 の構成糖が *C. difficile* の溶菌を抑制することにより、本菌の細胞障害性毒素の遊離を抑えていることが示唆された。これら莢膜多糖の構造解析により、*C. difficile* 関連下痢症の治療薬の開発につながる知見が得られるものと考えられる。



## 今後の展望

本事業期間内（平成22－25年度）に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究発展の展望について記載してください。図を挿入してもかまいません。

腸管内常在菌が腸管への病原細菌の定着を阻止することはよく知られており、常在菌との定着部位および栄養素の競合がそのメカニズムと考えられている。広域抗菌薬の投与は腸管内常在菌のこのような病原細菌への防御機構を破綻させ病原細菌の腸管内での過増殖につながるとされている。我々は腸管内常在菌がこのような競合的阻害に加えて病原細菌の病原因子の発現を積極的に抑制する機構を有するという仮説のもとに、本事業において研究を進め、ヒト腸内フローラの主要な構成菌種である *B. thetaiotaomicron* が *C. difficile* や EHEC O111 の毒素産生を抑制する活性を有することを見出した。また、トランスポゾンの挿入変異ライブラリーのスクリーニングからこの病原体抑制機構の分子基盤には糖代謝が関連している可能性を示す結果を得ており、本研究は、これまで知られていなかった腸内細菌の恒常性維持機構の解明に結びつく可能性を秘めている。本研究成果は常在菌と病原細菌との相互作用の分子基盤の解明という学術的な意義とともに、*C. difficile* 下痢症の治療法の開発にとどまらず、EHEC など、他の腸管病原菌に対する制御法の確立への展開も予定している。



BHIS培地で培養した *B. thetaiotaomicron* の培養上清は EHEC O111 Toyama 株の Vero 細胞に対する細胞毒性を低下させる。M は mitomycin C 处理。

## 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。

本事業での研究成果をもとに「腸内恒常性維持における腸管内常在菌の糖代謝の役割」との研究課題で日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(C)に応募し、採択された（研究機関 H26~H28）。

## 研究業績

本研究に関連した、平成25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. Tamai E, Yoshida H, Sekiya H, Nariya H, Miyata S, Okabe A, Kuwahara T, Miaki J, Kamitori S. X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. Mol. Microbiol., 2014, in press.
2. Utsunomiya H, Ichinose M, Ikeda K, Uozaki M, Morishita J, Kuwahara T, Koyama AH, Yamasaki H. Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication in vitro. Int. J. Mol. Med., 2014, in press.
3. Yoshikawa K, Shimada M, Kuwahara T, Hirakawa H, Kurita N, Sato H, Utsunomiya T, Iwata T, Miyatani T, Higashijima J, Kashihara H, Takasu C, Matsumoto N, Nakayama-Imaohji H. Effect of Kampo medicine “Dai-kenchu-to” on microbiome in the intestine of the rats with fast stress. J. Med. Invest., 60, 221-227, 2013.
4. Eguchi H, Miyamoto T, Kuwahara T, Mitamura S, Miamura Y. Infectious conjunctivitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a bathroom. BMC Res Notes. 6, 245, 2013.

### [2] 著書

なし。

### [3] 招待講演

○鈴木基生、今大路治之、堀内功典、桑原知己. マウス腸内難培養菌の胞子精製と発芽誘導. 第87回日本細菌学会総会、ワークショップ「難培養を如何に克服するか」、東京、2014年3月..

### [4] 学会発表(○は発表者)

1. ○今大路治之、堀内功典、桑原知己. 腸管内常在菌が *Clostridium difficile* の病原性に与える影響. 第83回日本感染症学会西日本地方会、大阪、2012年11月.
2. ○今大路治之、大岡唯祐、後藤恭宏、成谷宏文、堀内功典、鈴木基生、岡崎勝一郎、林哲也、桑原知己. *Raoultella ornithinolytica* における histamine 産生は酸素ストレス耐性に関与する. 第87回日本細菌学会総会、東京、2014年3月.
3. ○田川淳平、井上哲圭、佐藤啓子、内藤真理子、中山真彰、中山浩次、桑原知己、大原直也. *Porphyromonas gingivalis* における電気穿孔法に適した新規プラスミドベクターの構築. 第87回日本細菌学会総会、東京、2014年3月.
4. ○成谷宏文、今大路治之、宮田茂、桑原知己. Novel cloning system of large exogenous DNA as artificial chromosome in *Clostridium perfringens*. 第87回日本細菌学会総会、東京、2014年3月.
5. 島本 敏、成谷宏文、桑原知己、島本 整. O1エルトール型コレラ菌のレトロン-Vc95 内機能未知遺伝子 orf205 の機能解析. 第87回日本細菌学会総会、東京、2014年3月.
6. 堀内功典、今大路治之、鈴木基生、桑原知己. “亜塩素酸水”の殺微生物効果について. 第87回日本細菌学会総会、東京、2014年3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。