

**JOURNAL
OF
GERMFREE LIFE
AND
GNOTOBIOLOGY**
無菌生物

Vol. 51

No. 2

2021

無 菌 生 物

J. germfree life gnotobiol.

日本無菌生物ノートバイオロジー学会

JAPANESE ASSOCIATION OF GERMFREE LIFE AND GNOTOBIOLOGY

無 菌 生 物 Vol. 51, No. 2 Dec. 1 2021

編集委員会

神 谷 茂

一 戸 辰 夫

大 崎 敬 子

印 刷 所 共 立 印 刷 株 式 会 社

発 行 所 日 本 無 菌 生 物 ノ ー ト バ イ オ ロ ジ ー 学 会

〒181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2

杏 林 大 学 医 学 部 感 染 症 学 講 座

大崎 敬子（おおさき たかこ）

TEL (0422)47-5511, 5512 内線3493

FAX (0422)44-7325

E-mail gnotobiolosaki@ks.kyorin-u.ac.jp

JOURNAL OF GERMFREE LIFE AND GNOTOBIOLOGY

Vol. 51, No. 2 Dec. 1 2021

Editorial and Publications Committee

SHIGERU KAMIYA MD PhD

TATSUO ICHINOHE MD PhD

TAKAKO OSAKI PhD

Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology

c/o Dr Takako Osaki

Department of Infectious Diseases

Kyorin University School of Medicine

6-20-2 Shinkawa Mitaka

Tokyo 181-8611 Japan

TEL +81-422-47-5511, 5512 extension3493

FAX +81-422-44-7325

E-mail gnotobiolosaki@ks.kyorin-u.ac.jp

土壌環境に応答する根系構造～酸性土壌アルミニウムストレスを例に

多井 紫織 小山 博之 小林 佑理子

(岐阜大学応用生物科学部生産環境科学課程植物細胞工学研究室)

要 旨：世界の耕作可能地の 40% を占める酸性不良土壌における作物の生産性を向上させることは、持続的な食料生産を達成するための重要な課題である。これに対応して、酸性土壌の主要なストレスであるアルミニウム (Al) 障害に対する耐性機構研究が活発に進められている。現状の多くの研究は、Al による根の伸長阻害に対する耐性機構に関するものであるが、筆者らは根系構造 (Root Architecture) の変化に着目して研究を進めている。本稿では、植物が酸性土壌環境に適応するための根系構造応答を中心に、Al ストレス耐性機構との関係性について筆者らのゲノムワイド関連解析 (GWAS : genome-wide association study) の知見を併せて紹介する。

キーワード：根系構造, 酸性土壌, アルミニウム耐性, GWA

I. 酸性土壌における植物の適応機構

世界の不良土壌の約 40% を占める酸性土壌における作物の生産性向上は人口増加が進む現在の世界的な育種課題である。酸性土壌では粘土鉱物中の Al が可溶化し、強い細胞毒性などにより根の伸長を阻害する。また、Al イオンは土壌中のリン酸と結合し、不可給態となることで植物の必須栄養素であるリンの欠乏を引き起こす¹。これまでの研究から、植物の持つ様々な Al ストレス耐性機構が明らかとなってきた (Figure 1)。

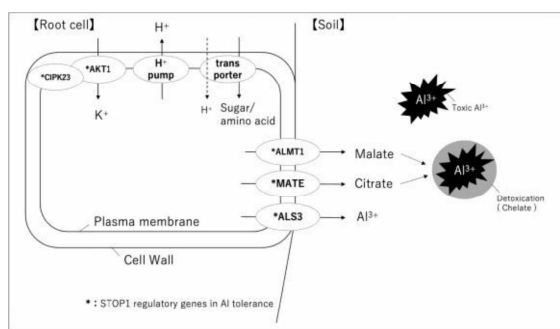


Figure 1. Mechanism and genes involved in resistance to Al toxicity in plant

その一つは根からの有機酸放出である。放出された有機酸は Al イオンをキレート化することで無毒化すると同時に、Al によって不可給態となったリン酸を植物が吸収できる可給態へと変換する²。Al に応じて放出する有機酸の種類は植物種によって異なるが、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ではリンゴ酸とクエン酸である³。一般的にクエン酸の方がリンゴ酸よりもキレート化効率が高いが、シロイヌナズナはリンゴ酸放出量がクエン酸を大きく上回るため、リンゴ酸放 Al 耐性への影響が大きいとされている⁴。リンゴ酸の放出には第一染色体上に存在するリンゴ酸トランスポーター (AtALMT1: *Arabidopsis thaliana* Al-activated Malate transporter 1) が関連することが QTL (quantitative trait loci) 解析などにより明らかとなった^{5,6}。また、クエン酸の放出は同じく第一染色体に存在する AtMATE (multi-drug and toxic compound extrusion) が制御することがゲノムワイド関連解析より明らかとなった⁷。これらのトランスポーターは細胞膜上に局在し、細胞内のリンゴ酸またはクエン酸を根圏に放出する。有機酸トランスポーター遺伝子は Al ストレスに応答して発現量が増加し、その発現量は Al 耐性と関連する^{7,8}。

有機酸放出と異なる Al ストレス耐性機構として、細胞内に取り込まれた Al を隔離または排出するという機構が存在する。変異原処理をしたシロイヌナズナの中から、Al に感受性を示す変異体をスクリーニングした結果、Al 排出機構に関与する ABC 輸送体 (ALS3 : Aluminum sensitive3) が同定された⁹。

これらの Al 耐性機構は、C2H2 型のジンク

フィンガー転写因子 STOP1 (sensitive to protonrhizotoxicity1) が制御する¹⁰. この機構は陸上植物が共通に持つが, AtSTOP1 は AtALMT1 や AtMATE, AtALS3 等 Al 耐性に関わる遺伝子の転写活性だけでなく, カリウムの取り込みに関与する AKT1 (*Arabidopsis-transporter*) や CIPK23 (*CBL-interacting protein kinases*) のような栄養吸収や同化に関連する遺伝子の制御にも大きく関わっている¹¹.

従来のシロイヌナズナを用いた Al 耐性の研究においては, 主根長試験によって明らかとされてきた部分が多い. 一方で, イネやトウモロコシといった作物で調査されている側根の伸長や数などを含めた根系構造がシロイヌナズナにおいても重要である可能性が高い.

II. 土壌環境に適応する根系構造

植物の根は, 土壌にじかに接する器官であり, 土壌環境の変化に敏感に応答して構造を変化させることが知られている. この, 地中に張る根の全体の構造は根系構造と呼ぶが, 異なる栄養条件下において植物は根系構造を変化させることが明らかとなっている. 例として植物の必須栄養素であるリン酸が欠乏した環境下では, モデル植物であるシロイヌナズナのある系統は, 主根の伸長が減少する一方で側根数を増加させることが知られている¹. この根系構造の変化はリン酸欠乏耐性植物として知られるルーピンの根系構造変化のパターンと類似しており, 根端数を増加させることにより, 根分泌有機酸根周辺での濃度を増加させていると考えられている. 高濃度に保たれた有機酸は, 土壌中の不可給態リン酸を効率的に可給態化し植物のリン酸吸収を促進することができる. 一方, 窒素欠乏下においては側根長が伸長することや硫黄欠乏下においては側根の伸長とともに主根の先端部分の側根密度が増加することが明らかとなっている¹². これらの根系構造応答は根内部の栄養素の分布や傷害の程度などが関与していると考えられているが, それをどのように感知し, 根系構造を変化させるのかについての知見は乏しい.

III. 根系構造を変化させる機構と酸性土壌応答との関係

根系構造の変化は, 細胞分裂, 細胞伸長の調節と, 側根の分化の 3 つのイベントで制御される. それぞれの機構と酸性土壌応答との関係は以下のようにまとめられる.

第 1 の要因は, 細胞分裂に対するアルミニウムの影響である. 通常の状態では, 根端に存在する分裂領域 (メリステム) での細胞分裂によって創出された細胞

は, 複数回の分裂の後に, 移行領域で不可逆的に伸長細胞に相転移して細胞伸長を始める¹³. メリステムの大きさはオーキシンとサイトカイニンなどの植物ホルモンの制御を受けるが, これは分裂や細胞周期を制御する因子を植物ホルモンが制御できるためである. ある種のストレスは, 植物ホルモンの比率を変えたり, 細胞周期などの分裂そのものを制御する分子に作用したりしてメリステムに影響する. Al はオーキシンの根の内部での輸送を阻害する作用を持つとともに, 分裂そのものにも作用する. 例えば, 細胞分裂を持続させるためのチェックポイントを制御する ATR1 (*Ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related*) や SOG1 を欠損させると Al 溶液中でも根は伸長を続けるため, “分裂” 自体がアルミニウム傷害の作用点と考えられる¹⁴.

第 2 の要因は, 細胞伸長に対するアルミニウムの影響である. 根の上部の伸長領域での細胞伸長には, 細胞内の膨圧の形成が重要である¹⁵. 膨圧の形成には, 細胞内外のイオンや糖, アミノ酸濃度差による細胞への水の取り込みが必要である. このイオンや糖, アミノ酸の吸収には STOP1 が制御する CIPK23 によるカリウム吸収も大きく関わっている. ストレスがない伸長細胞では, カリウム吸収は能動的な水素イオンの細胞外排出と共役している. この細胞外の水素イオンは, 共輸送により糖やアミノ酸の取り込みに使用される. 一方, 糖やアミノ酸などの代謝酵素の多くは, 中性域が至適であるものが多く, K^+/H^+ による pH 制御も膨圧の向上に貢献する. stop1 変異体は, 低 K 溶液で根の成長が抑制されるが¹⁶, この形質と酸性土壌ストレス感受性の関連は不明である. 第 3 の要因である, 側根の分化は主根が伸長する状態では, オーキシン及びサイトカイニン応答が相互作用する機構により適切な間隔で形成される. 成熟領域の形成層にあるオーキシン応答が高い領域が側根創始細胞となり側根が分化する^{12,17}. この側根の分化はストレス応答では, 主根の細胞分裂と細胞伸長の停止を伴う場合が多い. 例えば, リン酸欠乏で誘導される側根形成では, ALMT1 によるリンゴ酸放出に依存する主根伸長の阻害に関わることが明らかとなっている. ALMT1 や STOP1 を破壊した系統では, リン酸欠乏でも主根が伸長を続け側根が形成されない¹⁸. 根の上部にある側根は, 土壌の表面近くで固定されるリンを効率的に吸収するために, リン酸欠乏ストレス下では有利である. 酸性土壌耐性を制御する遺伝子の多くが, 側根形成を制御する機構と関わるものの, Al ストレス下での側根形成を伴う根系構造との関係はほとんど研究されていない.

IV. ゲノムワイド関連解析を用いた原因遺伝子の探索

古くから近交系を用いた QTL 解析によりシロイヌナズナのストレス耐性関連遺伝子がいくつか同定されてきた¹⁹。近年では様々な植物においてゲノムワイドな一塩基多数多型 (SNPs : single nucleotide polymorphisms)の情報が整備され, それを利用した GWAS が様々な形質の原因遺伝子同定のために実施されるようになった (Table1).

Table 1. Example of recent GWAS research in plants

Species	Number of accessions	Number of SNPs	References
Arabidopsis	206	175,324	Nakano et al., (2020)
	1,004	1,396,438	Zan and Carlborg, (2018)
	133	171,474	Sadhukhan et al., (2017)
Rice	331	19,997	Frouin et al., (2021)
	529	6,428,770	Yang et al., (2018)
Maize	269	43,737	Zhao et al., (2018)
	923	347,765	Hindu et al., (2018)
Soybean	1,391	30,000	Ziegler et al., (2018)

GWAS は, エコタイプ間の遺伝子多型と表現型バリエーションの関連性を解析することで特定の表現型に関連するゲノム領域を推定するという統計学的手法である (Figure 2).

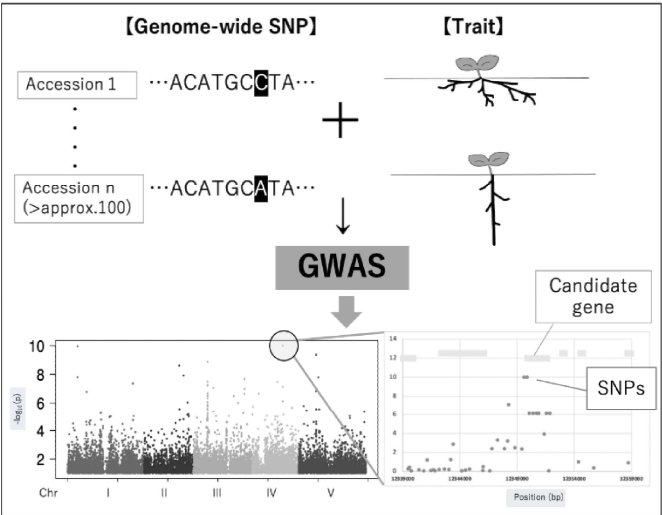


Figure 2. Procedure of GWAS in plant

モデル植物であるシロイヌナズナについても「1001 ゲノムプロジェクト」により 1000 以上の野生系統において全ゲノムが解読されており、精度の高い GWAS が可能となっている²⁰. 世界各地に分布しているシロイヌナズナの野生系統は様々な生息環境に適応進化しており、多くの形質において野生系統の遺伝型に基づく多様な表現型バリエーションが観察できる. また、シロイヌナズナは栽培化されておらず人為的な影響が少ないことから、そのナチュラルバリエーションは植物の環境適応機構を解明するための強力なツールとなる. これまでに筆者らは、シロイヌナズナ約 200 系統の根伸長阻害を指標とした GWAS を実施し、塩耐性や低 pH 耐性、Al 耐性関連遺伝子を同定した^{21,22}.

報告されている Al 耐性遺伝子や機構は、シロイヌナズナやイネ等を用いた主根長試験によって明らかとされてきた部分が多い. 作物で行われているように、シロイヌナズナにおいても主根の伸長に加え、側根の伸長や数などを含めた根系構造が重要であることが示唆されている¹⁶. このことから筆者らは、Al ストレスに応答する根系構造に着目し、根系構造が関与する Al 耐性機構の解明を試みている. 多数の野生系統を栽培し、根系構造を評価した結果、Al ストレス応答性の根系構造のナチュラルバリエーションが確認された (Figure 3).

次に、根系構造を評価した 7 つの形質値を用いて GWAS を実施し、Al ストレス下の根系構造応答に関与する複数の遺伝子座を推定した. そこでは主根長と側根数及び総側根長では重複した遺伝子座は検出されなかったことから、Al ストレスに応答する主根と側根の生育は別の遺伝子座によって説明できることが示唆された. そして、側根関連形質間で重複して検出された SNP の近傍遺伝子には細胞壁を構成するペクチンの分解や細胞質 pH の調節に関わる遺伝子、シグナル伝達に重要な転写因子など、Al ストレス下で根の形態形成への関与が示唆される遺伝子が複数存在した. 今後はそれら遺伝子の同定から、従来の根系構造を変化させる機構との関連性や根系構造形成が関与する Al 耐性機構の解明が期待される.

V. まとめ

植物は生育環境に適応するために根系構造を変化させることを踏まえながら、酸性土壌で問題となる Al ストレス下で植物が示す根系構造や耐性機構について筆者らの知見とともに概説した. 今回は、無菌栽培での Al ストレス応答性根系構造を評価したが、根圏微生物は根の発達に影響を及ぼすため、Al ストレス下の植物-微生物間の有益な相互作用における根系構造形成にも興味をもたれる. また、Al は植物にとって有害であると同時に、動物やヒトにとっても過剰摂取によって害を引き起こす. すなわち、植物の Al 耐性分子機構の解明が進むことは酸性土壌での作物の生産性向上に寄与するだけでなく、医学の分野においても新たな知見を提供することが期待される.

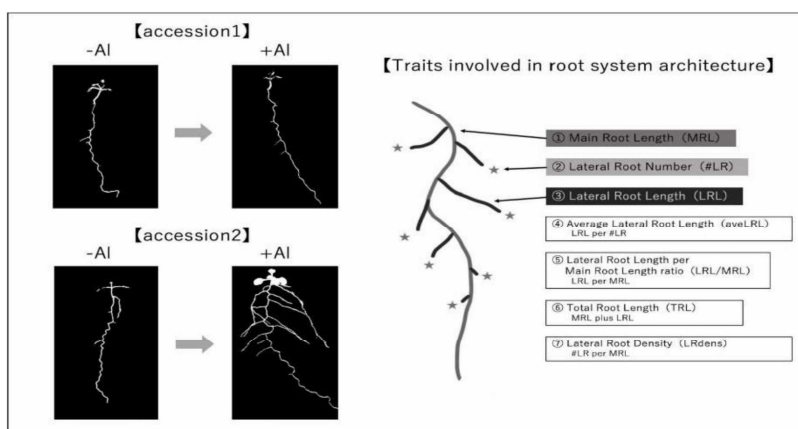


Figure 3. Natural variation of root system architecture response to under Al stress
Numbers 1 to 7 on the right indicate the index of root architecture in this GWAS.

Plant root system architecture response to adapt various soil environments – adaptation to acid soil as a special interest case

SHIORI TAI, HIROYUKI KOYAMA and YURIKO KOBAYASHI

Applied Biological Science, Gifu University, Gifu

Improving productivity of crops on acidic soils is an important challenge in plant breeding to achieve sustainable food production. Acid soils occupy 40% of the world's arable land usually contains aluminum rhizotoxicity that disturb crop production. Therefore, many researches have been actively conducted to understand Al resistance mechanism at molecular level. For example, several critical factors for Al tolerance were identified in various plants such as ALMT1 (ALUMINUM ACTIVATED MALATE TRANSPORTER) detoxifying Al at rhizosphere by chelating, and ALS3 (ALUMINUM SENSITIVE 3) probably excluding cytoplasmic Al, which protect root tips^{5,6,9}. These Al tolerant proteins are transcriptionally regulated by STOP1 (SENSITIVE TO PROTON RHYZOTOXICITY 1) transcription factor in various plants¹⁰. These genes well explain Al tolerance of the root tips particular in the primary roots, but it remains unclear whether Al tolerant mechanisms associated with the development of whole root system.

Whole root system, namely root system architecture (RSA) plays important role for nutrients and water uptake, whereas it is often altered by various factors in soils. RSA is determined by the length and number of lateral roots and the length of primary roots. Modification of RSA would be beneficial to access different nutrients in the soils, which are differently localized in soils. For example, most of soil P localizes at near the soil surface, but K and N localizes comparably deeper region. It suggests that plant ability to control RSA is quite important to adapt in various soil environments. Acid soil tolerance would be improved if we could design RSA along with Al tolerance in the root tips.

Changing RSA may be controlled by three events: 1) cell division, 2) cell elongation and 3) differentiation of lateral roots, which often accompany with arrest of elongation of the primary roots. These three events are usually controlled by phytohormones, but it is also affected by stress factors in soils. For example, cell division in the meristem is enhanced by auxin, which results in the longer roots. By contrast, lateral roots are formed by auxin sensitive cells in the cortex of the mature root region. These auxin-dependent events are antagonistically regulated by cytokinin levels. Several stress factors such as salt and heat alter RSA by affecting biosynthesis of auxin and phytohormones. By contrast, Al and other stressor in acid soil may alter RSA by different manner. For example, checkpoint of cell division is a target of Al rhizotoxicity, while an essential factor for cell elongation is controlled by STOP1/CIPK23 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 23). K-uptake depending STOP1/CIPK23¹¹. coupled with H⁺-excursion to apoplast, allows to maintain pH to activate osmolytes metabolism and uptake from phloem by H⁺ symporters. RSA is also controlled by ALMT1/STOP1 under P conditions¹⁸. It suggests that RSA regulation may interact with several Al tolerance mechanisms of root tips.

Genome-wide association study (GWAS) would be one approach to uncover molecular mechanisms underlying RSA regulation in acid soil environment. In fact, RSA regulation is different in various accessions, and that was associated with various functionally unknown genes along with several genes for proteins controlling cell growth and development.

References

1. SCHACHTMAN, D. P., REID, R. J. & AYLING, S. M.: Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol.* **116**, 447-453, 1998.
2. KOCHIAN, L. V., HOEKENGA, O. A. & PIÑEROS, M. A. : How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 459-493, 2004.
3. HOEKENGA, O. A., VISION, T. J., SHAFF, J. E., MONFORTE, A. J., LEE, G. P., HOWELL, S. H. & KOCHIAN, L. V.: Identification and Characterization of Aluminum Tolerance Loci in Arabidopsis (Landsberg). *Society.* **132**, 936-948, 2003.
4. LIU, J., LUO, X., SHAFF, J., LIANG, C., JIA, X., LI, Z., MAGALHAES, J. & KOCHIAN, L. V.: A promoter-swap strategy between the AtALMT and AtMATE genes increased Arabidopsis aluminum resistance and improved carbon-use efficiency for aluminum resistance. *Plant J.* **71**, 327-337, 2012.
5. KOBAYASHI, Y., FURUTA, Y., OHNO, T., HARA, T. & KOYAMA, H.: Quantitative trait loci controlling aluminum tolerance in two accessions of Arabidopsis thaliana (Landsberg erecta and Cape Verde Islands). *Plant, Cell Environ.* **28**, 1516-1524, 2005.
6. HOEKENGA, O. A., MARON, L. G., PIÑEROS, M A., CANÇADO, G. M. A., SHAFF, J., KOBAYASHI, Y., RYAN, P. R. DONG, B., SASAKI, T., MATSUMOTO, H., MYAMAMOTO, Y., KOYAMA, H. & KOCHIAN, L. V.: AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2006.
7. NAKANO, Y., KUSUNOKI, K., MARUYAMA, H., ENOMOTO, T., TOKIZAWA, M., IUCHI, S., KOBAYASHI, M., KOCHIAN, L. V. KOYAMA, H. & KOBAYASHI, Y.: A single-population GWAS identified AtMATE expression level polymorphism caused by promoter variants is associated with variation in aluminum tolerance in a local Arabidopsis population. *Plant Direct.* **4**, 1-14, 2020.
8. KOBAYASHI, Y., HOEKENGA, O.A., ITOH, H., NAKASHIMA, M., SHAFF, J. E. MARON, L. G. PIÑEROS, M. A. KOCHIAN, L. V. & KOYAMA, H.: Characterization of AtALMT1 expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **145**, 843-852, 2007.
9. LARSEN, P. B., GEISLER, M. J. B., JONES, C. A., WILLIAMS, K. M. & CANCEL, J. D. : ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* **41**, 353-363, 2005.
10. IUCHI, S., KOYAMA, H., IUCHI, A., KOBAYASHI, Y., KITABAYASHI, S., KOBAYASHI, Y., IKKA, T., HIRAYAMA, T. SHINOZAKI, K. & KOBAYASHI, M.: Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 9900-9905, 2007.
11. KOYAMA, H., KOBAYASHI, Y., PANDA, S. K. & TAYLOR, G. J.: The Molecular Physiology and Regulation of Aluminum Resistance in Higher Plants. 169-185, 2015.
12. LÓPEZ-BUCIO, J., CRUZ-RAMÍREZ, A. & HERRERA-ESTRELLA, L. : The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 280-287, 2003.

13. TAKAHASHI, N. & UMEDA, M.: Mechanisms controlling root meristem size. *Forefront of plant science* 201 , 2016 (in Japanese) .
14. SJOGREN, C. A., BOLARIS, S. C. & LARSEN, P. B.: Aluminum-dependent terminal differentiation of the arabidopsis root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1- regulated transcriptional response. *Plant Cell* **27**, 2501-2515 , 2015.
15. MIZUNO, A.: Is hydrogen ion 100% poisonous? -Plant growth and acid rain / acid fog-. *Bulletin of Nihon Fukushi University-Modern and Culture*. **106**, 2002 (in Japanese).
16. SADHUKHAN, A., ENOMOTO, T., KOBAYASHI, Y., WATANABE, T., IUCHI, S., KOBAYASHI, M., SAHOO, L., YAMAMOTO, Y. Y. & KOYAMA, H.: Sensitive to Proton Rhizotoxicity1 Regulates Salt and Drought Tolerance of Arabidopsis thaliana through Transcriptional Regulation of CIPK23. *Plant Cell Physiol.* **60**, 2113-2126 , 2019.
17. GOH, T. & FUKAKI, H.: Key words : lateral root formation , Arabidopsis thaliana Graduate School of Science , Kobe University , Rokkodai 1-1 , Kobe , Hyogo 657-8501 , Japan. 1-10, 2014.
18. BALZERGUE, C. DARTEVELLE, T., GODON, C., LAUGIER, E., MEISRIMLER, C., TEULON, J. M., CREFF, A., BISSLER, M., BROUCHOUD, C., HAGÈGE, A., MÜLLER, J., CHIARENZA, S., JAVOT, H., BECUWE-LINKA, N., DAVID, P., PÉRET, B., DELANNOY, E., THIBAUD, M. C., ARMENGAUD, J., ABEL, S., PELLEQUER, J. L., NUSSAUME, L. & DESNOS, T.: Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat. Commun.* **8**, 2017.
19. KOBAYASHI, Y. & KOYAMA, H. : QTL analysis of Al tolerance in recombinant inbred lines of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1526-1533, 2002.
20. WEIGEL, D., MOTT, R.: The 1001 genomes project for Arabidopsis thaliana. *Genome Biol.* **10**, 2009.
21. KOBAYASHI, Y., SADHUKHAN, A., TAZIB, T., NAKANO, Y., KUSUNOKI, K., KAMARA, M., CHAFFAI, R., IUCHI, S., SAHOO, L., KOBAYASHI, M., HOEKENGA, O. A. & KOYAMA, H.: Joint genetic and network analyses identify loci associated with root growth under NaCl stress in Arabidopsis thaliana. *Plant. Cell Environ.* **39**, 918-934, 2016.
22. NAKANO, Y., KUSUNOKI, K., HOEKENGA, O. A. TANAKA, K., IUCHI, S., SAKATA, Y., KOBAYASHI, M., YAMAMOTO, Y. Y., KOYAMA, H. & KOBAYASHI, Y. Genome-Wide Association Study and Genomic Prediction Elucidate the Distinct Genetic Architecture of Aluminum and Proton Tolerance in Arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* **11**, 1-16, 2020.

第54回 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会

(承 前)

The Fifty-fourth Annual Meeting of
The Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology

January 21-22, 2021

Tokyo

President *Kazuhiro Hirayama*

会 長	平 山 和 宏
会 期	2021年（令和3年）1月21日（木）・22日（金）
会 場	オンライン開催（Zoom 会議形式）

一 般 演 題 セッション I

座長 平 山 和 宏
(東京大学)

1. 胃切除モデルラットを使用した胃癌術後の体重減少とマイクロバイオータの検討 37
高木泰介*, 大崎敬子**
(*杏林大学医学部附属病院消化器・一般外科, **杏林大学医学部感染症学講座)
2. 小腸と大腸の腸管関連リンパ組織の抗体産生能と抗原結合性の比較 39
岡田 開, 津田真人, 細野 朗
(日本大学生物資源科学部食品生命学科食品生命機能学研究室)
3. 熟成中のナチュラルチーズにおける *Listeria monocytogenes* の増殖制御に関する研究 44
川本柊志郎*, 梶川揚申**, 五十君静信*
(*東京農業大学大学院応用生物科学研究科, **東京農業大学農芸化学科)

一 般 演 題 セッション II

座長 大 崎 敬 子
(杏林大学)

4. 乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM394の酸化ストレス耐性メカニズムに関する研究 46
檜木真吾*, 梶川揚申*, 佐々木泰子**, 五十君静信*
(*東京農業大学応用生物科学部農芸化学科応用微生物学研究室,
**明治大学農学部農芸化学科発酵食品学研究室)
5. 食品中での *Clostridium perfringens* の芽胞挙動及び増殖挙動の評価 48
伊藤正弥*, 梶川揚申**, 五十君静信**
(*東京農業大学大学院農学研究科, **東京農業大学応用生物科学部農芸化学科)

一般演題 セッションⅢ

座長 白 川 仁
(東北大学)

6. シロイヌナズナにおけるアルミニウムストレス下での根系構造のナチュラルバリエーション解析・・・・・・・・・・ 50
多井紫織, 小山博之, 小林佑理子
(岐阜大学応用生物科学部生産環境科学課程植物細胞工学研究室)
7. フルオロキノロン系抗菌薬投与による *Campylobacter jejuni* の薬剤耐性誘導・・・・・・・・・・ 53
市川拓磨, 平山和宏
(東京大学農学部獣医公衆衛生学教室)

一般演題 セッションⅣ

座長 細 野 朗
(日本大学)

8. 発酵米糠による DSS 誘発腸炎の腸管外合併症の改善効果・・・・・・・・・・ 55
Jahidul Islam, Affifah Zahra Agista, 大崎雄介, 駒井三千夫, 白川 仁
(東北大学大学院農学研究科栄養学分野)
9. ヒト腸内細菌によるフコイダン分解メカニズムの解明・・・・・・・・・・ 57
鈴木 錠, 大坪和香子
(東北大学農学研究科動物資源化学分野)
10. ケルセチン代謝菌“Bacterium 19-20”のヒトフローラマウスに及ぼす影響・・・・・・・・・・ 59
田村 基*, 平山和宏**
(*農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門, **東京大学大学院農学生命科学研究科)

胃切除モデルラットを使用した胃癌術後の体重減少とマイクロバイオータの検討

高木 泰介* 大崎 敬子**

(*杏林大学医学部附属病院消化器・一般外科, **杏林大学医学部感染症学講座)

I. はじめに

胃癌は胃原発の悪性腫瘍で、国内では全がんの中で2番目に罹患患者数が多く年間10万人以上の新規患者が発生している。根治的な治療として外科的治療があり、その代表的なものとして幽門側胃切除術、噴門側胃切除術、胃全摘術が挙げられる。その全ての手術で頻発する術後合併症として体重減少がある。体重減少や体組成変化はQOLを低下させる他、術後補助化学療法の継続性とも関連し、予後に大きく影響する。体重減少は手術侵襲による蛋白異化亢進、胃内容量の減少、消化管経路変更による消化吸收不全等が関与しているが、近年、胃手術後に腸内細菌叢の攪乱(dysbiosis)が生じることが明らかになっており、体重減少や他の合併症に関与することが示唆されている。胃癌手術後のdysbiosisに関して動物モデルを用いた検討はこれまで行われておらず、詳細については明らかにされていない。

そこで、減量手術モデルとして利用されているRoux-en-Y gastric bypass (RYGB) ラットを用いて術後体重減少とdysbiosisの影響を解析し、その有用性を検証した。

II. 方法

8週齢の雄のSDrat (n=12)を12時間の明暗周期、水・食料(60%高脂肪食)へのアクセスが自由な環境で1週間飼育後にRYGB手術を施行した。麻酔薬を腹腔内投与し全身麻酔下で開腹し胃を腺胃と前胃の境界で切離し縫合閉鎖したのち、Treitz靱帯から10cmの空腸を切離して噴門側胃と吻合、Y脚は吻合部から10cm肛門側で吻合した。

手術前と術後8週目まで糞便の採取と体重・飼料消費量の測定を毎週行った。糞便から抽出した総DNAを

用いて、16S rRNA アンプリコンシーケンスによりメタゲノム解析を行い、腸内細菌叢の変化を追跡した。

III. 結果

体重は術後1週目が最も低く、手術時の85%まで減少した。その後徐々に増加し8週目には手術時の95%になった。8週目の平均体重は355gで、手術を行っていないラットの同時期の体重(約500g)と比較して少なかった。メタゲノム解析の結果から α 多様性をShannon indexを用いて比較すると、術前と4週目、術前と8週目の間で有意に多様性が増加していた($p=0.042$, $p=0.022$)。門レベルの比較では4週目の体重とBacteroidetes, Proteobacteriaの割合に有意な正の相関が認められ($r=0.60$ $p=0.030$, $r=0.63$ $p=0.020$)、体重とFirmicutesの占有率には有意な負の相関関係がみられた($r=-0.81$ $p=0.00070$)。

IV. 考察

RYGBモデルラットを用いて術後のdysbiosisと体重減少との関係性を評価した。手術4週、8週後に腸内細菌叢の多様性が増加したが、これは高脂肪食および手術によって引き起こされたdysbiosisが改善した結果と考えられた。今後、脂肪食の影響を除くため、普通食を投与したラットでの検討が必要と考えられた。体重減少と相関関係がある腸内細菌叢構成菌がそんざいした。従って、これらの細菌叢の変化に対してより効果的なプロバイオティクス等による介入を行うことで体重減少が改善される可能性が考えられた。胃癌術後のdysbiosisと体重減少の関連性はいまだ明らかにされていないことが多く、モデル動物を利用したさらなる検討と、栄養学的・細菌学的な介入が必要と考えられた。

Gut microbiota after gastrectomy in rat: the relationship between body weight loss and dysbiosis

TAISUKE TAKAGI* and TAKAKO OSAKI**

**General & Gastrointestinal surgery, Kyorin University School of Medicine, Tokyo,*

***Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Tokyo*

Gastric cancer is one of common cancer in Japan. Surgery is a curative approach for the treatment of gastric cancer. Body weight loss is detected frequently after gastric cancer surgery. It reduces quality of life for the patient, and it is a risk factor for discontinuation of postoperative adjuvant chemotherapy. The surgical stress, gastric volume change and gastric bypass were thought to be the reasons for body weight loss. Recently, a relationship between dysbiosis and postoperative body weight loss has been reported. We investigated detail of the relationship between postoperative gut microbiota and body weight loss using Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) rat.

Twelve 8-week-old male SD rats had free access water and high fat diet for 1 week before and 8 weeks after operation. Fecal microbiota was analyzed by 16S ribosomal DNA gene sequencing. The 15% of body weight loss of RYGB-rat was observed in SD rat at a week after operation. The body weight of rat increased gradually to 95% by 8 weeks postoperatively.

In the results of alpha-diversity using Shannon-index, it was shown that higher index titers in fecal microbiota of RYGB-rat were observed compared that of preoperational fecal microbiota. There was a positive correlation between body weight and ration of Bacteroidetes and Proteobacteria in fecal microbiota at 4 weeks postoperatively. In addition, the negative correlation between body weight and the ratio of Erysipelotrichia, Clostridia. These bacteria might be effective to dysbiosis and recovery from body weight loss. Future studies should be devoted to finding the mechanisms between body weight loss after gastrectomy and dysbiosis.

(Non-member collaborator : Nobutsugu Abe. *General & Gastrointestinal surgery, Kyorin University School of Medicine*)

小腸と大腸の腸管関連リンパ組織の抗体産生能と 抗原結合性の比較

岡田 開, 津田 真人, 細野 朗

(日本大学生物資源科学部食品生命学科 食品生命機能学研究室)

要 旨： 本研究では、小腸と大腸の腸管関連リンパ組織（GALT）により産生される抗体アイソタイプとその抗原結合性の違いについて検討を行った。BALB/cマウスのパイエル板（PP）と盲腸リンパ節（CeP）では、総IgAを同程度に高く産生し、結腸リンパ節（CoP）の総IgA量はそれと比べて低かった。腸内細菌結合性IgA抗体量はCePとCoPにおいてPPよりも高いことが確認された。また、CeP細胞は総IgG2bおよび腸内細菌結合性IgG2b抗体をPPとCoPに比べて高産生した。卵白オボアルブミン（OVA）特異的T細胞受容体トランスジェニックOVA 23-3マウスのGALT由来細胞において、卵白摂取マウスの各組織のIgA産生量が増加し、PPにおいてのみOVA特異的IgA産生が顕著に誘導された。また、卵白摂取マウスのCeP細胞は最も高い総IgG2b産生量を示したが、OVA特異的IgG2b産生は検出されなかった。以上より、PPは腸内細菌および食品中タンパク抗原に結合するIgA抗体を産生すること、また、CePとCoPは腸内細菌結合性IgA産生に加えて、特にCePは腸内細菌結合性IgG抗体を強く誘導する特徴が示唆された。

キーワード： 腸管関連リンパ組織, 抗体アイソタイプ, 腸内細菌, 食品抗原

I. 目的

腸管関連リンパ組織（GALT）は、小腸に存在するパイエル板（PP）、大腸に存在する盲腸リンパ節（CeP）、結腸リンパ節（CoP）などから構成される。PPでは主に免疫グロブリンA（IgA）が誘導され、病原体の侵入阻止、毒素の中和、腸内細菌叢の制御に重要な役割を果たしている。

CePやCoPも、小腸部位とは異なるメカニズムでIgAを誘導することが示唆されている¹が、その役割については十分に明らかにされていない。我々は、PPの胚中心B細胞中において、IgAの発現が高く、また、CePではIgGサブクラスの抗体発現がPPよりも高いことを報告している²。

一般にIgGサブクラスの抗体は、血中に最も多く存在する抗体アイソタイプであり、全身の感染防御に重要な働きをすることが知られているが、腸管で誘導されるIgGサブクラスの抗体の特徴や、その免疫学的な意義については不明な点が多く残されている。本研究では、小腸と大腸GALTの抗体産生能の比較と産生された抗体の抗原特異性の違いを検討することにより、大腸GALTで誘導されるIgGサブクラスの抗体の役割を明らかにすることを目的とした。

II. 材料と方法

コンベンショナル環境下で飼育した8-12週齢のBALB/cマウスからPP、CeP、CoPを採取し、コラゲナーゼ処理によって細胞を調製した。各細胞をLPS, Pam3CSK4, CpGDNA存在下一週間培養後、上清中の総IgA, IgG2b, およびOVA特異的IgA, IgG2b およびOVA特異的IgA, IgG2b量をELISA法で測定した。

III. 結果

BALB/cマウスのGALT由来細胞において、各組織の細胞は無刺激時と比較して、各TLRリガンドで刺激をした際に総IgA・IgG2b産生量が増加した。総IgA量はPPとCePは同等であり、CoPはそれに比べて低いレベルであった。しかし腸内細菌結合性IgA抗体はCePとCoPにおいてPPよりも高産生された。一方、CeP細胞が総IgG2bおよび腸内細菌結合性IgG2b抗体をPPとCoPに比べて高産生した (Table 1)。

OVA23-3マウスのGALT由来細胞において、卵白摂取マウスの各組織間では同レベルのIgA産生量を示した。PPにおいてのみOVA特異的IgA産生が顕著に誘導された。また、卵白摂取マウスのCeP細胞は最も高い総IgG2b産生量を示したが、OVA特異的IgG2b産生は検出されなかった (Table 1)。

Table 1. Binding properties of each antibody isotype produced by PP and Cep

	Binding to fecal bacteria		Binding to food antigens	
	IgA	IgG2b	IgA	IgG2b
PP	++	+	+	±
CeP	+++	+++	+	±

+++; high, ++; medium, +; low, ±; slightly detected

IV. 考察

本研究において、CeP細胞は腸内細菌に結合性を示すIgAおよびIgG抗体をPPに比べて高産生する特徴を示した。盲腸に存在するCePの切除によって、結腸のIgA産生が低下することや腸内細菌叢が変化することが報告されており³, CeP細胞により産生される抗体は腸内細菌叢の制御にはたらくことが推察された。

一方で、CeP細胞は食品由来タンパク質に結合する抗体をほとんど産生しなかった。結腸では、特定の腸内細菌が存在することにより、食品抗原の侵入を抑制して食物アレルギーの誘導を防いでいるという報告もあることから⁴、盲腸リンパ節に食品由来タンパク質が取り込まれにくい仕組みが存在している可能性も推察される。

V. 結論

PP細胞は腸内細菌および食品中タンパク抗原に結合するIgA抗体を産生すること、また、CeP細胞とCoP細胞は腸内細菌結合性IgA産生に加えて、特にCeP細胞は腸内細菌結合性IgG抗体を強く誘導する特徴が示唆された。したがって、小腸および大腸GALTでは、産生される抗体のアイソタイプや抗原に対する反応性がそれぞれ異なることが示唆された。

VI. 謝辞

本研究は会員外共同研究者である小島菜月氏、石濱史也氏、小熊俊生氏、村木悠平氏、高橋恭子博士、上野川修一博士（日本大学生物資源科学部）、八村敏志博士（東京大学大学院食の安全研究センター）、高橋宜聖博士（国立感染症研究所免疫部）との共同研究によって行われたものであり、ここに深謝いたします。

Generation of antibodies with different isotypes and their binding property between GALT from small and large intestine

HIRAKU OKADA, MASATO TSUDA and AKIRA HOSONO

*Department of Food Bioscience and Biotechnology, College of Bioresource Sciences,
Nihon University, Fujisawa*

In this study, we investigated the ability of gut-associated lymphoid tissue from small and large intestines to produce different isotypes of antibodies and their binding property. BALB/c mice bred under conventional condition were used. Single cell suspensions were prepared from Peyer's patches (PP) and cecal patches (CeP) and colonic patches (CoP). They were cultured in the presence of either LPS or Pam3CSK4 or CpG DNA, the ligands for Toll-like receptors. The amounts of total antibodies and fecal bacteria-specific antibodies in supernatant were measured by ELISA. PP cells produced higher level of total IgA than CeP and CoP cells. On the other hand, fecal bacteria-specific IgA was strongly produced by CeP and CoP cells, whereas the levels of total and fecal bacteria-specific IgG2b was preferentially produced by CeP cells.

Next, we examined the antibody production against food-derived protein using ovalbumin (OVA) -specific T cell receptor transgenic OVA23-3 mice. The amounts of total and OVA-specific antibodies in supernatant was measured by ELISA. The amount of total IgA was comparable among all tissues. In contrast, only PP cells produced OVA-specific IgA against dietary antigens. In addition, CeP cells showed the highest total IgG2b production, however the total IgG2b did not show the ability to bind to OVA. These results suggest that GALT in the large intestine have a different ability from PP to generate antibodies with different isotypes and their specificity.

Keywords: gut-associated lymphoid tissue, antibody isotypes, intestinal bacteria, food antigens

References

1. YANAGIBASHI, T., HOSONO, A., OYAMA, A., TSUDA, M., SUZUKI, A., HACHIMURA, S., TAKAHASHI, Y., MOMOSE, Y., ITOH, K., HIRAYAMA, K., TAKAHASHI, K. & KAMINOGAWA, S. : IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA⁺ B cells. *Immunology*, **218**, 645-651, 2013.
2. TSUDA, M., HOSONO, A. : Correlation between the antibody expression on B cells in gut-associated lymphoid tissue from small and large intestines and the amount of serum antibodies is regulated by intestinal microbiota. *J. Germfree Life Gnotobiol*, **50**, 88-89, 2020.
3. MASAHATA, K., UMEMOTO, E., KAYAMA, H., KOTANI, M., NAKAMURA, S., KURAKAWA, T., KIKUTA, J., GOTOH, K., MOTOOKA, D., SATO, S., HIGUCHI, T., BABA, Y., KUROSAKI, T., KINOSHITA, M., SHIMADA, Y., KIMURA, T., OKUMURA, R., TAKEDA, A., TAJIMA, M., YOSHIE, O., FUKUZAWA, M., KIIYONO, H., FAGARASAN, S., IIDA, T., ISHII, M. & TAKEDA, K. : Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat Commun*, **5** : 3704, 2014.
4. STEFKA, A.T., FEEHLEY, T.J., TRIPATHI, P., QIU, J., MCCOY, K.D., MAZMANIAN, S.K., TJOTA, M.Y., SEO, G.Y., CAO, S., THERIAULT, B.R., DIONYSIOS, D.A., ZHOU, L., CHANG, E.B., FU, Y., X., & NAGLER, C., R. : Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**(36), 13145–13150, 2014.

熟成中のナチュラルチーズにおける *Listeria monocytogenes* の

増殖制御に関する研究

川本 柊志郎* 梶川 揚申** 五十君 静信*

(*東京農業大学大学院応用生物科学研究科, **東京農業大学農芸化学科)

I. 目的

Listeria monocytogenes は低温増殖性、酸や塩に対する高い抵抗性を持つ通性嫌気性の食中毒菌である。この食中毒の原因食品は多岐にわたり、中でもソフトタイプのナチュラルチーズが原因食品として多数報告されており、この理由として原料や製造中のクロスコンタミネーションで増殖した本菌を加熱殺菌せずに摂取することが挙げられる。一般的に食品中の pH や水分活性は微生物の増殖に影響を与えることが知られており、加えてチーズ中では乳酸菌の代謝産物によって他の微生物の増殖を抑制されている。しかし、このような微生物の増殖抑制作用があるにも関わらず実際には本菌による食中毒事例は発生している。そこで、五十君らはナチュラルチーズに *L. monocytogenes* を接種し生菌数の計測から増殖挙動を評価したところチーズごとに減少、増加と傾向が異なることを明らかにした。この増殖挙動の違いはチーズの物性や構成する微生物によるものだと考えられるため、チーズの物性として pH と水分活性の計測、分離した乳酸菌による抗菌活性の評価が必要である。そこで本研究の目的をチーズの物性と構成する乳酸菌による抗菌活性から *L. monocytogenes* が異なる増殖挙動を示した要因を明らかにすることとした。

II. 材料と方法

供試菌株として臨床株である *L. monocytogenes* ScottA 株、4456 株を使用し、ナチュラルチーズはソフトタイプのカマンベールとダナブルーを用いた。ScottA 株と 4456 株の混合菌液をカマンベールに 4.0×10^3 cfu/g、ダナブルーに 4.0×10^5 cfu/g になるよ

うに接種し、チーズの熟成温度や冷蔵温度を考慮して 4°C、10°C で保存した後、経時的に pH、水分活性、*L. monocytogenes* の生菌数を計測した。また、各チーズから MRS 寒天培地を用いて乳酸菌を分離し、各乳酸菌の培養上清を *L. monocytogenes* 混釈 BHI 寒天培地に滴下し、形成される阻止円から抗菌活性を評価した。

III. 結果、考察、結論

先行研究と同様に *L. monocytogenes* はカマンベールでは菌数の増加が見られ、ダナブルーでは減少が確認された。チーズの物性の計測結果、カマンベールでは pH と水分活性は増殖可能域を示し、特に pH は増殖至適 pH である pH 7 に近い値であった。一方ダナブルーは pH が増殖可能域ではあったが至適からは離れており、水分活性は増殖可能域を下回っていた。また、各チーズから分離した乳酸菌の培養上清からは抗菌活性が確認された。これらの結果から、主に異なる増殖挙動を示した要因として pH や水分活性は関与していることが示唆された。加えて、菌数の減少には乳酸菌の代謝産物による影響が考えられる。しかし、増殖が確認されたカマンベールからも抗菌活性を示す乳酸菌が分離されたことや、pH や水分活性によって静菌作用が予想される中ダナブルーでは大幅に菌数が減少したことから各チーズ中の微生物の相互作用や代謝産物などの検討が必要であると考えられる。

Exploration of factors that involve in growth behavior of *Listeria monocytogenes* in ripening natural cheese

SHUJIRO KAWAMOTO, AKINOBU KAJIKAWA and SHIZUNOBU IGIMI

Department of Applied Bioscience, Graduate School of Tokyo University of Agriculture, Tokyo

Listeria monocytogenes (LM) is a facultative anaerobic bacterium, which has been known as a food poisoning pathogen occasionally found in natural cheese. The source of contamination is usually unpasteurized milk. LM could propagate and survive in the dairy products throughout fermentation and ripening steps. Since pH, water activity (Aw), and the metabolites of lactic acid bacteria (LAB) in cheese could affect the growth of microorganisms, these factors are important for control of the food poisoning pathogen. Previous studies have revealed that the growth behavior of LM depend on type of cheese. The aim of this study is to find the factors by comparing growth behavior of LM in different type of cheese. Camembert and Danish Blue were inoculated with LM, then pH, Aw, and CFU of LM was measured. The results showed that pH and Aw of Camembert were in acceptable range for LM to grow. On the other hand, the pH of Danish Blue was too low to grow, Aw was below the acceptable range, and the number of LM decreased. In addition, antibacterial activity was detected in the culture supernatant of LAB isolated from each cheese. From these results, it was suggested that pH, Aw, and LAB were involved in the different growth behavior of LM. Since these factors are considered to have only bacteriostatic effects, additional factors are also suggested for the bactericidal effects.

乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM394 の酸化ストレス

耐性メカニズムに関する研究

檜木 真吾* 梶川 揚申* 佐々木 泰子** 五十君 静信*

(*東京農業大学応用生物科学部農芸化学科応用微生物学研究室,

**明治大学農学部 農芸化学科発酵食品学研究室)

I. 背景

乳酸菌の酸素に対する応答は非常に多様性に富み、株によるその応答の違いは酸素の毒性や生物の適応能力を理解する上で興味深いばかりでなく、応用の面から重要な課題である。乳酸菌を食品等の製造に用いる際は、酸素に対する応答を解析・制御することが機能性や生産性の向上、安定化をもたらす重要な要因となる。また、遺伝子組換え技術の発達により、一部の乳酸菌では異種遺伝子を導入・発現させることが比較的容易になってきており、組換え乳酸菌を用いた機能製剤への利用など医療分野への応用研究も開始されている。本研究で使用する *Lactobacillus casei* IGM394 は好気環境下で非常に良好な生育を示す乳酸菌であり、腫瘍抑制効果を示すなどの高い免疫賦活能力を持つ菌株である。今後の応用研究を行う上で、本菌株の酸化ストレス耐性メカニズムを明らかにすることは重要である。このような背景から、乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM394 の酸化ストレス耐性メカニズムの解明を目的とし、抗酸化因子の遺伝子欠損株の作出、ストレス耐性の評価を行った。

II. 材料と方法

二重交叉法により *L. casei* IGM394 の NADH oxidase などの様々な酸化ストレス耐性関連遺伝子の欠損を行い、変異株を作出した。得られた変異株に対して、静置および好気培養での生育能評価や、過酸化水素耐性の検討を行った。

III. 結果, 考察

変異株の中で静置条件に比較して好気条件により生育能が低下したのは、 H_2O_2 分解酵素 NADH ペルオキシダーゼ遺伝子を欠損させた Δnpr のみであった。また、好気条件下で野生株および他の変異株培養液からは H_2O_2 が全く検出されなかったのに対し、 Δnpr 培養液からは約 1000 μM の H_2O_2 が検出された結果から、 H_2O_2 の消費は全て Npr に依存している可能性が示唆された。この蓄積した H_2O_2 が Δnpr の生育を阻害していると考え、好気条件下での培養液にカタラーゼを添加したところ、カタラーゼの濃度依存的に生育が回復した、このことから、 Δnpr は酸素消費に伴って発生する H_2O_2 を分解できず、その蓄積した H_2O_2 により菌体がダメージを受けるため、生育能が低下したことが示唆された。

次に、各変異株の H_2O_2 耐性能を評価した。 H_2O_2 を添加した培地で培養を行い、24 時間後の菌体濁度を測定した。その結果、 Δnpr はやはり野生株よりも耐性能が低下していたが、転写制御因子である organic hydroperoxide transcriptional regulator 遺伝子を欠損させた $\Delta ohrR$ は野生株よりも高い耐性能を示した。この高い耐性能と H_2O_2 消費能に相関があるかを検討するために、野生株、 Δnpr 、 $\Delta ohrR$ の H_2O_2 消費能を測定した。その結果、 $\Delta ohrR$ は野生株よりも高い消費能を示し、この高い H_2O_2 消費能が H_2O_2 存在下での生育能の高さに寄与していることが示唆された。以上のことから、*L. casei* IGM394 にとって H_2O_2 消費は必須な過程であり、かつ他の遺伝子で相補できないことが明らかになった。

Functional analysis of oxidative stress tolerance mechanisms in *Lactobacillus casei* IGM394

SHINGO NARAKI*, AKINOBU KAJIKAWA*, YASUKO SASAKI** and
SHIZUNOBU IGIMI* *

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Applied Biosciences, Tokyo university of Agriculture, Tokyo

**Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Meiji university, Kawasaki

The facultative anaerobic bacterium *Lactobacillus casei* IGM394 is used as a host for drug delivery systems, and it exhibits the same growth rate under aerobic and anaerobic conditions. *L. casei* strains carry several genes that facilitate oxygen and reactive oxygen species (ROS) tolerance in their genomes, but their complete functions have not been uncovered. To clarify the oxygen and ROS tolerance mechanisms of *L. casei* IGM394, we constructed many deficient mutants targeting genes that confer oxidative stress resistance. Significantly decreased growth and high H₂O₂ accumulation were observed in the NADH peroxidase gene-mutated strain (Δnpr) compared with the findings in the wild type. The H₂O₂ degradation capacity of Δnpr revealed that NADH peroxidase is a major H₂O₂-degrading enzyme in *L. casei* IGM394. Interestingly, $\Delta ohrR$, a mutant deficient in the organic hydroperoxide regulator, exhibited higher H₂O₂ resistance than the wild-type strain. Increased Npr expression and H₂O₂ degradation ability were observed in $\Delta ohrR$, further supporting the importance of Ohr protein to ROS tolerance mechanisms. The other mutants did not exhibit altered growth rates, although some mutants had higher growth in the presence of oxygen. From these results, it is presumed that *L. casei* IGM394 has multiple oxygen tolerance mechanisms and that the loss of a single gene does not alter the growth rate because of the presence of complementary mechanisms. Contrarily, the H₂O₂ tolerance mechanism is solely dependent on NADH peroxidase in *L. casei* IGM394.

食品中での*Clostridium perfringens*の芽胞挙動及び増殖挙動の評価

伊藤 正弥* 梶川 揚申** 五十君 静信**

(*東京農業大学大学院農学研究科, **東京農業大学応用生物科学部農芸化学科)

I. はじめに

*Clostridium perfringens*は偏性嫌気性の食中毒菌であり, この細菌は高温や紫外線などの様々なストレスに耐性のある芽胞という構造を取ることで過酷な環境下においても生存が可能である. この細菌を原因とした食中毒は主にカレーやシチューといった深鍋により調理される大量調理食品内で起こるため, 食中毒件数は少ないが1件当たりの患者数が非常に多い. そのため食中毒原因の細菌部門では毎年1位から3位に位置しており, この食中毒への対策が重要視されている. 食品を加熱した際にこの菌は一般的な細菌とは異なり耐熱性の芽胞を形成することで生存し, 発芽を経て食品内の温度が下がるとともに増殖する. しかし, *C. perfringens*は他の芽胞形成菌のように芽胞の形成が容易ではなく, 特定の培養条件を用いて形成した芽胞の多くは熱に弱い易熱性の芽胞である. 易熱性芽胞は100°C数分で死滅してしまうため, *C. perfringens*芽胞を評価するためには耐熱性芽胞の形成が必須であり, 過去の研究では耐熱性芽胞を用いての議論がされていない. したがって本研究では, 実際に食中毒の原因となっている耐熱性芽胞の作成を試み, 得られた耐熱性芽胞を用いて食品に添加後, 食品内の温度変化による芽胞の挙動及び増殖挙動を評価することを目的とした.

II. 材料と方法

一般的に用いられている芽胞形成条件及び温度ストレスを経日的に与える方法により得られた菌体培養液をグラム染色し, 芽胞形成を確認した. その後, 調製した菌体培養液を様々な温度に30分間供し, CFU により生菌数を測定し耐熱性評価とした. 耐熱性芽胞の形成後, 80°Cのシチューにヒートショックを行った芽胞液を加え温度調節を行い1時間ごとに生菌数を測定した. また, 菌数減少の原因を調べるためシチュー内の温度を78°Cに固定し1時間ごとに生菌数を測定した.

III. 結果と考察

一般的に用いられている芽胞形成条件により得られた芽胞の耐熱性は低く80°C以降の生育が確認できなかったため耐熱性芽胞の形成はされなかった. 経日的に温度ストレスを与える条件により得られた芽胞は加熱処理前と比較して菌数は減少したが100°Cにおいても生育が確認された. そのため経日的に温度ストレスを与えることにより耐熱性芽胞の形成に成功した. シチュー添加実験においては添加1時間後に菌数が減少した. その後, 菌数の減少は見られず, 食品内の温度が増殖可能域に入ると菌数は増加した. 78°Cに固定した増殖挙動試験では加熱処理後2時間は菌数が減少したが, その後菌数の変化はなかった. したがって芽胞液に易熱性芽胞と耐熱性芽胞が混在しているためシチュー内の温度により易熱性芽胞が死滅し, 菌数が減少していると示唆された.

Evaluation of spore behavior and proliferation of *Clostridium perfringens* in food

MASAYA ITO*, AKINOBU KAJIKAWA** and SIZUNOBU IGIMI**

*Department of Agricultural Chemistry, Graduate school of Tokyo University Agriculture, Tokyo

**Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Tokyo

Clostridium perfringens is an obligately anaerobic food poisoning bacterium, which can survive in harsh environments by forming spore resistant to various stresses such as high temperature. Food poisoning caused by *C. perfringens* occurs mainly in large-scale cooked foods. So, the number of food poisoning cases is small, but the number of patients per case is very large. Therefore, countermeasures against this food poisoning are regarded as important. However, *C. perfringens* is not easy to form heat-resistance spores in laboratory. Therefore, in this study, heat-resistant spores were formed. After preparation, it is added to food and evaluated. The spore formation was confirmed by Gram-staining the cell culture obtained by the general spore formation conditions and the method of applying temperature stress over time. Then, the prepared cell culture solution was subjected to various temperatures for 30 minutes, and the viable cell count was measured by CFU to evaluate the heat resistance. Then, heat-shocked spore solution was added to a stew to control the temperature and fixed, and the viable cell count was measured every hour. Heat-resistance spores were formed only by the method of applying temperature stress. In the stew addition experiment, the number of bacteria decreased after 1 hour. After that, the number of bacteria didn't decrease, and the number of bacteria increased when the temperature in the food entered the proliferative range. It was suggested that since the spores contains heat-resistant spores and heat-sensitive spores, the heat-sensitive spores are killed by the temperature in the stew.

シロイヌナズナにおけるアルミニウムストレス下での 根系構造のナチュラルバリエーション解析

多井 紫織 小山 博之 小林 佑理子

(岐阜大学応用生物科学部生産環境科学課程植物細胞工学研究室)

要 旨：植物の土壌ストレス環境への適応機構の一つとして根系構造が注目されている。本研究では Al ストレス下でのシロイヌナズナの根系構造のナチュラルバリエーション解析を行い、アルミニウム (Al) 耐性機構の解明を目的とした。主根長および側根形成関連形質の 7 形質で根系構造を評価した。その結果、Al ストレスに応答する根系構造には幅広いナチュラルバリエーションが存在することが明らかとなった。そこでは、Al 耐性系統の示す根系構造応答は感受性系統の示す応答よりも多様であることが示唆された。さらに、GWAS により検出された複数の側根形成関連遺伝子座と主根伸長関連遺伝子座はそれぞれ異なっていたことから、それらの形質は別の機構によって制御されていることが推察された。

キーワード：根系構造, 酸性土壌, アルミニウム耐性, ナチュラルバリエーション, GWAS

I. はじめに

植物の生存のためには生育環境への適応が不可欠である。世界の耕作地に広く分布する酸性土壌は作物の生育を阻害する不良土壌であり、酸性土壌における作物の生産性向上は世界的な育種課題である。また、近年では植物の土壌ストレス環境への適応機構のひとつとしてストレスに応答する根系構造の形成が注目されている。従来の研究より、酸性土壌の主要ストレスであるアルミニウム (Al) に対する作物の感受性品種では、主根長が阻害される一方、耐性品種は様々な Al 応答性の根系構造を示すことが明らかとなっている^{1,2}。これまでの Al 耐性機構は主根長評価によって明らかにされてきた部分が多く、Al 応答性根系構造とその分子制御機構の知見は乏しい。そこで本研究では、Al ストレス下で根系構造が関与する新規 Al 耐性機構の解明を目的とし、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて Al ストレス下での根系構造のナチュラルバリエーション解析および、ゲノムワイド関連解析 (GWAS : genome-wide association study) を行った。

II. 材料と方法

ゲノムワイドな一塩基多型 (SNPs : single nucleotide polymorphisms) が整備されているシロイヌナズナ野生系統 86 株および、Al 耐性遺伝子機能欠損株 (KO : knock out) 9 系統 (*almt1*, *stop1*, *als3*, *mate*, *trx1*, *trm28*, *nrt1.1*, *gs1;2.1;3*, *gdh1gdh2*) を用いた。無菌寒天栄養培地に各系統約 30 粒を播種し、培地シャーレを立てかけて無菌的に栽培した。4 日間の初期栽培後、系統毎に生育の揃った 5 個体を無菌寒天栄養培地±AlCl₃ 900 μM に移植し、12 日間栽培した。2 日毎に植物体の写真を撮影し、十分なバリエーションが確認できた移植後 8 日の植物について根系構造を評価した。EZ-Rhizo を用いた画像解析により主根長、側根数、総側根長を獲得し、さらにそれら値から平均側根長、総側根長割合、側根密度、総根長を算出した。これらの 7 つの形質値を用いて、R による階層的クラスタリングおよび GWAS を実施した。

Ⅲ. 結果と考察

野生株 86 系統の AI ストレス下における 7 つの形質値を用いて、根系構造をクラスタ解析により分類した。その結果、野生系統は主根が短く側根の生育も小さい群（クラスタ 1 と 3）、短い側根と長い主根を示す群（クラスタ 4）、短い主根と長い側根を示す群（クラスタ 6）、全ての生育量が多い群（クラスタ 7）など、7 つのクラスタに分類された。このように AI ストレス下での根系構造には、幅広いナチュラルバリエーションが存在することが明らかとなった。

次に、野生株 86 系統と従来の初期主根長評価で AI 感受性を示した KO 9 系統について、7 つの形質の相対値でクラスタ解析を行った。その結果、供試系統は 10 のクラスタに分類された。クラスタ 9, 10 に分類された系統は主根長が短く、そこには全ての AI 感受性 KO も分類された。よって、同グループ野生系統もまた感受性であること、そしてその根系構造形成にはそれら AI 耐性関連遺伝子が関連することが示唆された。一方、従来の初期主根長評価によって耐性とされた野生系統群は複数の異なるクラスタに分類された。このことから、耐性系統の AI 応答性根系構造形成は感受性系統のそれよりも遺伝的に多様であり、複数の新規 AI 耐性遺伝子によって制御されることが示唆された。

また、GWAS により各形質に関連する複数の遺伝電子座が推定された。4 つの主根伸長関連 SNPs は特異的であったが、側根形質関連 SNPs の多くは複数の側根形質間で重複していた。従って、主根伸長と側根形成は異なる遺伝子座により制御されていることが強く示唆された。

Ⅳ. 結論

栄養欠乏等の土壤ストレスと同様に AI ストレス下においても根系構造形成が耐性に関与することが考えられた。AI ストレス応答性根系構造のナチュラルバリエーションが存在したことから GWAS を行った。その結果、主根伸長と側根形成は異なる遺伝子座で制御されており、根系構造形成には複数の遺伝子座が関与しており、複雑に制御されていることが示唆された。

Natural variation of root system architecture under aluminum stress in *Arabidopsis thaliana*

SHIORI TAI, HIROYUKI KOYAMA and YURIKO KOBAYASHI

Gifu University, Faculty of Applied Biological Science, Agriculture and Environmental Science, Laboratory of Plant Cell Technology, Gifu

Aluminum of a major stress in acid soil inhibits root growth. Root system architecture (RSA) is thought to be associated with Al tolerance. In this study, we conducted natural variation analysis and genome-wide association study (GWAS) for RSA formation under Al stress in *Arabidopsis thaliana*. We used 86 *Arabidopsis* accessions with genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 9 knock-out (KO) lines of Al tolerant genes. Healthy five individuals of 4-d-old seedlings of each line were transplanted to a sterile agar medium with and without AlCl_3 . After 8 days, the RSA was evaluated by image analysis using EZ-Rhizo, in which seven traits of taproot length, number of lateral roots, total lateral root length, average lateral root length, total lateral root length ratio, lateral root density and total root length were obtained. Hierarchical clustering and GWAS for these traits were performed by R. The cluster analysis revealed that there are wide range of natural variations in the RSA under Al stress. We found that short taproot groups included the previous Al-sensitive KO lines and various high-growth groups included previous Al-tolerant accessions. These results suggested that multiple Al tolerance genes other than the known Al tolerance genes may contribute to form the RSA responding to Al. In addition, GWAS detected many significant SNPs associated with the seven traits. The four SNPs associated with the taproot length were distinct from that of the lateral root traits. On the other hand, most of the SNPs associated with lateral root traits overlapped each other.

References

1. FAMOSO, AN., CLARK, RT., SHAFF, JE., CRAFT, E., MCCOUCH, SR., KOCHIAN, LV. : Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant Physiol.* **153**, 1678–1691, 2010.
2. BUSHAMUKA, VN., A4 - ZOBEL, RICHARD, W., VNA-B.: Maize and Soybean Tap, Basal, and Lateral Root Responses to a Stratified Acid, Aluminum-Toxic Soil. *Crop Sci.* v. **38**, no. 2 , 416-421, 1998.

フルオロキノロン系抗菌薬投与による *Campylobacter jejuni* の

薬剤耐性誘導

市川 拓磨 平山 和宏
(東京大学農学部獣医公衆衛生学教室)

I. 目的・背景

現在、薬剤耐性菌の蔓延が公衆衛生上問題となっており、対策が必要とされている。こうした薬剤耐性菌の発生の原因の背景に、畜産現場での抗菌薬の使用が挙げられる。食中毒菌として知られる *Campylobacter jejuni* においても養鶏場等でのフルオロキノロン系抗菌薬耐性菌が報告されており、中には医療用フルオロキノロンとの交差耐性が見られるケースもある。このような耐性菌制御のためには、家畜体内での耐性菌の動向を知る必要があるが、生体内でフルオロキノロン耐性を誘導した報告は非常に少ない。そこで本実験では、無菌マウスに *C. jejuni* を定着させた後フルオロキノロン系抗菌薬であるオフロキサシンを投与し、薬剤耐性を誘導できるか試験した。

II. 方法

24 週齢の雌無菌マウス9 頭を実験に用いた。定着させる菌株として *C. jejuni* JCM2013株を、投与抗菌薬としてオフロキサシンを用いた。マウスは、投与抗菌薬の濃度により Control (C) , Low dose (L) , High dose (H) の3群に分けた。全群に *C. jejuni* を経口投与し、定着確認後、オフロキサシンを5日間飲水投与した。投与濃度は、L群で5mg/L, H群で50mg/L とした。実験期間中、抗菌薬投与から2, 5, 7, 10, 12日でマウスの糞便をサンプリングした。サンプルを段階希釈したものを3種類のMH培地 (5%馬脱線血, 5%馬脱線血+8mg/L オフロキサシン, 5%馬脱血+4 mg/L シプロフロキサシン) に接種し、42℃微好気環境で培養して培地上で

見られたコロニーをカウントした。

III. 結果

抗菌薬投与前では、どの群もいずれのフルオロキノロン添加培地にも発育が見られなかった。C群, L群では、実験期間を通して、抗菌薬無添加の培地上でのみコロニーが発育し、フルオロキノロン添加培地では発育が見られなかった。一方、H群では、オフロキサシン投与2日目の糞便中の菌数が大幅に減少し、どの培地上でも発育が見られなかった。しかし、5日目では無添加培地およびオフロキサシン添加培地で発育が見られ、9日目にはシプロフロキサシン添加培地でも発育が見られるようになった。

IV. 考察/ 結論

今回L群とC群では、耐性菌が出現しなかったことから、耐性菌誘導には一定濃度以上の抗菌薬による選択圧が必要なことがうかがえた。一方、H群では、抗菌薬投与により菌数が大幅に減少したが、耐性を持った菌が生き残ったことで、マウス腸内に耐性菌が定着したと推測される。また、オフロキサシンを投与した結果、別のフルオロキノロンのシプロフロキサシンに交差耐性を持つことが確認された。これは、畜産現場でのフルオロキノロン系抗菌薬使用の結果、医療用フルオロキノロンに対する交差耐性が獲得されることを実験的に再現していると考えられる。

Administration of fluoroquinolones induces resistant *Campylobacter jejuni* in mice

TAKUMA ICHIKAWA and KAZUHIRO HIRAYAMA

Laboratory of Veterinary Public Health, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo

Antibiotic resistance (AMR) is a serious public health problem worldwide and one of the causes for emergence of AMR is uncontrolled usage of antibiotics on livestock. However, information on how bacteria gain resistance against antibiotics in vivo is limited. In this study, we administered ofloxacin, a registered fluoroquinolone for chickens, to gnotobiotic mice colonized with *Campylobacter jejuni* and monitored the emergence of AMR.

We divided germfree mice into three groups, Control (C), Low dose (L) and High dose (H). Mice were monoassociated with *C. jejuni* JCM2013 and administered ofloxacin in drinking water for 5 days. Doses of ofloxacin were 5 mg/L in group L and 50 mg/L in group H. We collected fecal samples at 2, 5, 7, 9 and 12 days after the first day of ofloxacin administration.

Samples were serially diluted and inoculated on MH agar containing 5 % defibrinated horse blood without antibiotics, with 8 mg/L ofloxacin or with 4 mg/L ciprofloxacin. The media were incubated for 48 h under microaerobic conditions at 42 °C.

In group L and C, colonies were only observed on antibiotic-free plates. In group H, the population of *C. jejuni* was significantly decreased right after antibiotic treatment, but colonies were formed on both ofloxacin and ciprofloxacin agar 5 days of ofloxacin administration and thereafter.

The present study suggested that the administration of ofloxacin induces resistant *C. jejuni* against not only to the antibiotics administered but also other fluoroquinolones.

発酵米糠による DSS 誘発腸炎の腸管外合併症の改善効果

Jahidul Islam Afifah Zahra Agista 大崎 雄介 駒井 三千夫 白川 仁
(東北大学大学院農学研究科栄養学分野)

I. 目的

米糠は精米時の副産物であるが、必須アミノ酸、ビタミン、食物繊維、 γ -オリザノール、イノシトールなどを豊富に含み、健康機能性が高いことが知られている。しかし、精米後、短時間で劣化すること、特有の匂いがあることなどから、十分に活用されていない。我々は米糠の高度利用を目的として、麹カビと乳酸菌による2段階の発酵により、フレーバーや健康機能性を向上させた発酵米糠 (FRB) を開発した。これまで、FRB は生活習慣病モデル動物における血圧上昇抑制やインスリン抵抗性の改善作用¹、サルコペニアモデルにおいて、筋萎縮の抑制作用² を示すことを報告してきた。さらに、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスにおいて、FRBの給餌により、腸炎の発症抑制効果が観察された³。炎症性腸疾患では、腸炎のほかに、肝障害、サルコペニア、神経炎症など腸管外合併症 (EIM) が高頻度で見られる。本研究では、DSS誘発大腸炎のEIMに対するFRB給餌の影響を解析した。

II. 方法

C57BL/6Nマウス (10–12週齢, 雌) にコントロール食 (Con), 10%未発酵米糠食 (RB), 10%発酵米糠食 (FRB) を7日間給餌した後、1.5% DSS溶液を飲水として4日間与えて大腸炎を誘発し、その後、12日間、精製水を与えて、炎症を回復させた。この炎症誘発–回復のサイクルを計4回繰り返し、64日間飼育した。飼育期間中、体重、DAI (disease activity index; 下痢と血便で評価) を測定した。飼育終了後、血清を採取し、炎症性サイトカインをELISA法で測定した。また、各臓器を採取し、炎症性関連遺

伝子のmRNA発現量を定量RT-PCR法で解析した。

III. 結果

飼育期間を通じて、FRB群のDAI値は他二群に比べ低値を示した。また、血清IL-6、TNF- α はFRB群で有意な低下が観察された。さらに、大腸、小腸、肝臓、筋肉、海馬における炎症性サイトカインmRNA量はFRB群において有意に低下した。これらの結果より、FRBは腸炎の抑制とともに、EIMの発症を抑制する活性をもつ可能性が示唆された。

Fermented rice bran supplementation mitigates chronic colitis-associated extraintestinal manifestations in mice

JAHIDUL ISLAM, AFIFAH ZAHRA AGISTA, YUSUKE OHSAKI, MICHIO KOMAI and
HITOSHI SHIRAKAWA

Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai

Patients with inflammatory bowel disease (IBD) have higher incidence of extraintestinal manifestations (EIM) like liver disorders, sarcopenia, and neuroinflammation. Fermented rice bran (FRB), generated from rice bran (RB), is rich in bioactive compounds and exhibits anticolitis activity. However, its role in EIM prevention is still unclear. Here, for the first time, we investigated whether EIM in female C57Bl/6N mice is attenuated by FRB supplementation. EIM was induced by repeated administration of 1.5% dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water (4 d) followed by drinking water (12 d). Mice were divided into 3 groups-control (AIN93M), 10% RB, and 10% FRB. FRB ameliorated relapsing colitis and inflammation on muscle by significantly lowering proinflammatory cytokines $\text{Tnf-}\alpha$ and Il-6 in serum and advanced glycation end product-specific receptor (Ager) in serum and muscle when compared with the RB and control groups. As FRB reduced aspartate aminotransferase levels and oxidative stress, it might prevent liver disorders. FRB downregulated proinflammatory cytokine and chemokine transcripts in hippocampus responsible for neuroinflammation and upregulated mRNA expression of G protein coupled receptors (GPRs), Gpr41 and Gpr43 , in small and large intestines, which may explain the FRB mediated protective mechanism. Hence, FRB can be supplemented to prevent IBD-associated EIM.

References

1. ALAUDDIN, M., SHIRAKAWA, H., KOSEKI, T., KIJIMA, N., ARDIANSYAH, A., BUDIJANTO, S., ISLAM, J., GOTO, T. & KOMAI, M. ; *BMC Complement. Altern. Med.*, **16**, 442. 2016.
2. RUSBANA, T.B., AGISTA, A.Z., SAPUTRA, W.D., OHSAKI, Y., WATANABE, K., ARDIANSYAH, A., BUDIJANTO, S., KOSEKI, T., ASO, H., KOMAI, M. & SHIRAKAWA, H. : *Nutrients*, **12**, 2409. 2020.
3. ISLAM, J., KOSEKI, T., WATANABE, K., ARDIANSYAH, A., BUDIYANTO, S., OIKAWA, A., ALAUDDIN, M., GOTO, T., ASO, H., KOMAI, M. & SHIRAKAWA, H. : *Nutrients*, **9**, 747. 2017.

ヒト腸内細菌によるフコイダン分解メカニズムの解明

鈴木 錠 大坪 和香子
(東北大学農学研究科動物資源化学分野)

I. 目的

オキナワモズクを構成する硫酸化多糖オキナワモズクフコイダンは、有益性が報告されているヒト腸内細菌の増殖促進効果（プレバイオティクス効果）が期待されるが（昨年度本学会において有川らが報告）、その分解機作は不明である。本研究では集積培養液から単離した *Bacteroides* 属細菌を用いて、オキナワモズクフコイダンの資化・増殖特性およびオキナワモズク摂取後の糞便中の増殖について検証を行った。

II. 材料と方法

【材料・培地】

本研究で使用したヒト糞便は、「東北大学大学院農学研究科ヒトを対象とする研究に関する倫理委員会」の承認を受けて採取、使用した。オキナワモズクフコイダン粉末は株式会社サウスプロダクトのご厚意により提供を受けた。*Bacteroides* 属細菌の単離・培養には市販 BBE 培地、GAM 培地および *Bacteroides* 属細菌用半合成培地 (Martens, 2005) を使用した。

【資化試験】

Bacteroides 属細菌株の増殖は、嫌気・37℃における 660 nm の吸光度の増加により評価した。フコイダンの資化性は、薄層クロマトグラフィー (TLC) により、既知濃度のフコイダン溶液および培養液上清を 3 時間展開後、発色試薬を噴霧し、150℃で 3 分間加熱後に出現した各スポットについて、Image J により発色強度を測定し、検量線からフコイダン濃度 (%) を求めた。

【菌叢解析】

糞便から抽出した DNA の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域の次世代シーケンス解析は、株式会社生物技研の委託により実施した。

III. 結果および考察

オキナワモズクフコイダンを唯一の炭素源として添加したヒト腸内細菌の集積培養液を BBE 寒天培地に接種したところ、*Bacteroides ovatus* を含む *Bacteroides* 細菌株が複数単離された。このうち、*B. ovatus* D2 株の資化試験では、オキナワモズクフコイダンをはじめ、複数種の単糖、オリゴ糖、糖アルコール、多糖の資化性を有することが知られた。さらに、オキナワモズクフコイダンを唯一の炭素源として与えた D2 株の培養上清中フコイダンが半分程度資化されたことが TLC の結果から示唆された。しかし、本研究で調査した *Bacteroides* 属菌株のオキナワモズクフコイダンの資化増殖性は、他の糖と比較すると微少であったため、腸管内において当該細菌が単独でオキナワモズクフコイダンを資化している可能性は低いと考えられた。一方、オキナワモズク摂取前後の糞便中の細菌叢解析では、*Bacteroides* 属の存在比が 2 倍以上に増えていたことから、我々の *in vitro* 実験において見出されたオキナワモズクフコイダンによる本属細菌の増殖効果を支持する結果となった。以上の結果から、ヒト腸管内におけるオキナワモズクフコイダンの資化には、*Bacteroides* 属細菌が関与していると考えられる。

Elucidation of fucoidan degradation mechanism by human intestinal bacteria

JO SUZUKI and WAKAKO IKEDA-OHTSUBO

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai

Fucoidan, indigestible polysaccharides derived from brown seaweeds, has been known for its modulatory function of intestinal microbiota. This study aims to clarify the mechanism how human intestinal microbiota degrade fucoidan extracted from Japanese seaweed Okinawa mozuku (OM fucoidan), which has previously shown to enhance the growth of potentially beneficial human gut bacteria in enrichment batch cultures (Arikawa et al, 53th JAGG, 2020). These bacteria included Lachnobiaceae and multiple species of the genus *Bacteroides*. Here, we isolated *Bacteroides ovatus* strain D2 and additional strains of *Bacteroides* species from an enrichment culture of human fecal bacteria supplemented with OM fucoidan. We investigated growth properties of the strain D2 and found that the strain can utilize a wide range of sugars including OM fucoidan. While the maximum OD660 of the culture of strain D2 grown on OM fucoidan was much lower than that of those grown on mono- and oligosaccharides, thin-layer chromatography of the culture supernatants showed that the strain utilized approximately ~50% OM fucoidan in the medium. 16S rRNA gene (V3-V4 region) Illumina MiSeq sequencing of fecal samples from an individual, who temporally consumed Okinawa mozuku as a daily side dish, have shown that ingestion of OM fucoidan increases the proportion of bacterial species of the genus *Bacteroides* in fecal microbiota by a factor of two. Our current findings collectively support that *Bacteroides* species are involved in the degradation of OM fucoidan in human intestinal tracts.

ケルセチン代謝菌“Bacterium 19-20”のヒトフローラマウスに 及ぼす影響

田村 基* 平山 和宏**

(*農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門, **東京大学大学院農学生命科学研究科)

I. 目的

ケルセチンは、主要なフラボノイドの一つであり、その健康促進効果が注目されている。腸内細菌は、ケルセチンの代謝に重要な役割を果たしており、例えばケルセチンは、*Flavonifractor plautii* などの腸内細菌によって分解される。ヒト糞便から分離したケルセチン代謝菌“Bacterium 19-20”は、*F. plautii* とホモロジーの高い腸内細菌である。Bacterium 19-20 の投与が、無菌マウスにヒトの腸内菌叢を移植したヒトフローラマウスに及ぼす影響を検討した。

II. 方法

ヒトフローラマウスに 0.05%ケルセチン添加ペレット食を 4 週間給餌した。ケルセチン代謝菌投与 (QHF) 群のマウスには、変法 GAM 平板培地で 37°C, 2 日間嫌気培養した“Bacterium 19-20”を Nutrient broth No. 2 に懸濁した菌液(約 2.2×10^7 CFU)を月、水、金の週に 3 回、合計 11 回経口投与した。対照 (CHF) 群のマウスには、菌を含まない Nutrient broth No. 2 を経口投与した。飼育試験終了後解剖を行い、ケルセチン分析を行うとともに、血漿脂質の測定、肝脂質含有量測定、小腸・大腸の遺伝子発現解析、内臓脂肪重量測定、盲腸内容物の短鎖脂肪酸測定等を行った。

III. 結果

盲腸内容物のケルセチンとケルセチン代謝物イソラムネチン濃度は、ケルセチン代謝菌投与群 (QHF) で低い傾向が観察された。肝臓の脂質含有量は、QHF 群が CHF 群よりも有意に低値を示した ($P < 0.05$)。内臓脂肪重量は、QHF 群で有意に低値を示した ($P < 0.05$)。QHF 群では、盲腸内容物の酪酸とプロピオン酸濃度が有意に高値を示した。

IV. 考察

ケルセチン代謝菌は、盲腸内容物のケルセチン濃度を低下させたことから、消化管内でケルセチンを分解している可能性が示唆された。一方、QHF 群は、対照群にて、肝脂質含有量が低く、内臓脂肪重量も有意に低値を示したことから、ケルセチン代謝菌は宿主の脂質代謝に影響を与えていることが示唆された。また、QHF 群は、対照群に比べて盲腸内容物の酪酸やプロピオン酸濃度が有意に高かったが、今回試験に用いたケルセチン代謝菌は、酪酸産生能を持っていたため、ヒトフローラマウスの腸内で酪酸産生を増加させたのかもしれない。ケルセチン代謝菌はヒトフローラマウス腸内でケルセチンを代謝し、ケルセチン量を低下させるとともに、脂質代謝にも影響を及ぼしている可能性が考えられた。

(会員外共同研究者:農研機構食品研究部門; 中川博之, 堀幸子, 猪瀬篤子)

Effects of quercetin-metabolizing bacterium “Bacterium 19-20” on human microbiota-associated mice

MOTOI TAMURA* and KAZUHIRO HIRAYAMA**

**Food Research Institute, The National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba*

*** Laboratory of Veterinary Public Health, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo*

Much attention has been focused on health promoting effects of quercetin. We examined the effect of administration of quercetin-metabolizing bacteria (Bacterium 19-20) on human microbiota-associated mice.

Human microbiota-associated mice were fed a pelleted diet with 0.05% quercetin for 4 weeks. Mice in the quercetin-metabolizing bacteria (QHF) group were orally administered about 2.2×10^7 CFU of quercetin-metabolizing Bacterium 19-20 in a Nutrient broth No. 2 three times a week. Mice in the control (CHF) group were orally administered a Nutrient broth No. 2 without bacteria. We measured plasma and cecal quercetin, plasma lipids, liver lipid content, gene expression levels of the small and large intestine, visceral fat weight, and short-chain fatty acid concentration of the cecal contents.

Quercetin-metabolizing bacteria decreased the quercetin and its metabolite concentrations in the cecal contents, suggesting that quercetin may be degraded in the gastrointestinal tract. In contrast, the quercetin-metabolizing bacteria significantly increased the butyrate and propionate concentration in the cecal contents compared to control group. Because the quercetin-metabolizing bacterium used in this study are butyrate-producing bacterium, it may have increased butyrate production in the intestines of human microbiota-associated mice. QHF group had significantly lower visceral fat weight and liver lipid content than the CHF group. Quercetin-metabolizing bacteria may metabolize quercetin in the gut of human microbiota-associated mice and may also affect lipid metabolism.

(Non-member collaborators: Hiroyuki Nakagawa, Sachiko Hori, Atsuko Inose. *Food Research Institute, The National Agriculture and Food Research Organization*)

原稿執筆要綱

1. 一般演題の演者と共同発表者は本学会員とします。未入会の方は本学会事務所へ入会申込をしてください。無菌生物学・ノートバイオロジーに関する新しい知見を有する研究で、未発表のものに限ります。本誌への掲載の可否は編集委員会の審査を経て決定します。編集委員会は加除修正を行うことがあります。カラー印刷は全額自己負担とします。掲載論文等の著作権は、本学会に帰属し、当該論文の全部または一部を本学会が認めたネットワーク媒体、その他の媒体において、任意の言語で、掲載、出版（電子出版を含む）できるものとします。

2. 原著・総説については英文 Guideline for Authors B をご参照ください。

注1 電子データを下記アドレス宛にお送りください。

日本無菌生物ノートバイオロジー学会事務所

gnotobiolosaki@ks.kyorin-u.ac.jp

注2 略語 (abbreviation) は初出のところに「略さない語」full term をお示しください。

例)

1. 演題 気管支喘息への肺炎マイコプラズマ感染の影響
2. 発表者 蔵田 訓 田口晴彦* 大崎敬子 花輪智子 米澤英雄 神谷 茂
3. 所 属 (杏林大学医学部感染症学講座, *同保健学部免疫学)
4. 和文要旨 (400字)
肺炎マイコプラズマ感染は気管支喘息の増悪因子の……
5. キーワード (5 項目)
気管支喘息, 肺炎マイコプラズマ, 無菌マウス, 動物モデル, ……
6. 和文抄録 (2000字)
I. 目的 (はじめに, 背景, ……)
Mycoplasma pneumoniae (*M. pneumoniae*) は学童から青年……
II. 材料 (対象)
実験動物として BALB/c マウス (雄, 5 週齢) と IQI 系……
III. 方法
感作初日に *M. pneumoniae* M129株を超音波により……
IV. 結果
BALB/c マウスの血清中 OVA 特異的 IgE 濃度は……
V. 考察
M. pneumoniae 菌体抗原による感作は……
VI. 結論
M. pneumoniae ノートバイオート肺炎モデルの肺内サイトカインの検討より……
VII. 謝辞
7. 表, 図・写真 (5 点以内) Table 1, Figure 1, ……とし, 本文中に入る場所を示してください。タイトル, 説明および表・図中の文字は英語にしてください。図・写真は, 中の文字をふくめ, そのままオフセット印刷できる原図にしてください。カラー印刷も可 (別途, 実費請求となります)。
8. 英文演題 The effect of *Mycoplasma pneumoniae* infection on asthma model in mice
9. 英文発表者 (フルネーム, 大文字) SATOSHI KURATA, HARUHIKO TAGUCHI*, TAKAKO OSAKI, TOMOKO HANAWA, HIDEO YONEZAWA and SHIGERU KAMIYA
10. 英文所属 Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Mitaka
*Department of Immunology, Faculty of Health Sciences, Kyorin University, Hachioji
11. 英文抄録 (250 words)
Mycoplasma pneumoniae infection is known as one of the factors deteriorating asthma.……
12. 英文キーワード (5項目)
Keywords: asthma, *Mycoplasma pneumoniae*, germfree mouse, animal model...

13. 引用文献 *References* は引用順に番号をつけ、本文の引用場所に右肩付けとする。著者（全著者名、大文字）、表題、雑誌・図書の名称（イタリック）、巻数（太字）、頁数（最初と最後）、年の順に記載する。
1. TAGUCHI, H., TAKAHASHI, M., YAMAGUCHI, H., OSAKI, T., KOMATSU, A., FUJIOKA, Y. & KAMIYA, S.: Experimental infection of germfree mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J. Med. Microbiol.*, **51**, 336-343, 2002.
 2. LINDAHL, G., HEDEN, L.-O. & STENBERG, L.: Streptococcal IgA receptors. In: *Molecular recognition in host-parasite interactions*, Edited by KORHONEN, T. K., MAKELA, P. H. & HOVI, T. New York, Plenum Press, pp.77-83, 1992.
 3. SAKAGAMI, T., FUKUDA, Y., TAMURA, K., TANIDA, N. & SHIMOYAMA, T.: Does *Helicobacter pylori* promote gastric carcinogenesis? *J. germfree life gnotobiol.*, **31**, 25-26, 2001. (in Japanese)
14. 連絡先 〒181-8611 東京都三鷹市…… 蔵田 訓
 15. TEL (0422) 47-…… 内線……
 16. FAX (0422) 44-……
 17. E-mail kurata@……

3. 倫理指針：ヒトを対象とした研究は「ヘルシンキ宣言」（World Medical Assembly, 1964年, 2004年追加）, 「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年厚生労働省告示第415号）, 「疫学研究に関する倫理指針」（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）に従って行われ、動物を用いた研究は「実験動物の飼養および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年環境省告示第88号）に従って行われ、倫理委員会等で承認されたものでなければならない。

Guideline for Authors

A. Annual meeting proceedings

I. Proceeding manuscripts (oral presentations)

1. Authors and all co-authors must be members of the Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology (JAGG). Papers submitted for review must convey new unpublished findings from studies in germfree research or gnotobiology. Manuscripts are accepted for publication following review by the Editorial and Publications Committee. Please prepare manuscripts according to the instructions below, with reference to the printing sample available through our website. Reproduction in color is available, at the full expense of the author.
2. Manuscripts are accepted in both English and Japanese. However, in the case of Japanese papers, the information carried in the title page, abstract, and key words must also be duplicated in English. All titles and legends to tables, figures, and photos, as well as the reference list must be prepared in English regardless of whether the papers are prepared in English or Japanese.
The title page of the manuscript should carry manuscript title, name of authors and affiliations, postal address, zip code, phone, fax, and e-mail address of the corresponding author.
Begin the manuscript on page two, starting with abstract (within 250 words), five key words, and text (2000 words), in the order of: I) Objective (or Introduction), II) Materials (or Subjects), III) Methods, IV) Results, V) Discussion, VI) Conclusion, VII) Acknowledgments (if any), References, and a maximum of 5 figures, tables, or photos in total.
3. An electronic copy in MS-Word format, tables and figures may be incorporated into the Word file, submitted as separate Excel or PowerPoint files, or as jpg, pct, eps, or tif images adjusted to actual printing size. Tables and figures should each be numbered consecutively in Arabic numerals (Table 1, Figure 1), with a title for tables and descriptive legends for figures. The location of tables and figures in the text should be indicated in the margin of the typescript. Each table and figure should be printed on a separate sheet of paper. The manuscripts in the journal are generally printed in black and white. However, if the authors prefer color printing of figure(s) in the manuscript, additional page charge will be added.
4. Abbreviations must be preceded by the full term at first mention. Use standard units of measure such as: m, cm, mm, μ m, nm, l, ml, μ l, kg, g, mg, μ g, ng, pg.
5. References should be cited in the text using superscript Arabic numbers, in order of appearance. In the reference list, the references should be numbered, followed by authors (all authors in full, all capitals), title, journal name (italicized, abbreviated according to Index Medicus), volume (boldface), page numbers (first and last), and year of publication.

Example:

1. TAGUCHI, H., TAKAHASHI, M., YAMAGUCHI, H., OSAKI, T., KOMATSU, A., FUJIOKA, Y. & KAMIYA, S.: Experimental infection of germfree mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J. Med. Microbiol.*, , 336-343, 2002.
2. LINDAHL, G., HEDEN, L-O. & STENBERG, L. : Streptococcal IgA receptors. In: *Molecular recognition in host-parasite interactions*, Edited by KORHONEN, T. K., MAKELA, P. H. & HOVI, T. New York, Plenum Press, pp.77-83, 1992.
3. SAKAGAMI, T., FUKUDA, Y., TAMURA, K., TANIDA, N. & SHIMOYAMA, T.: Does *Helicobacter pylori* promote gastric carcinogenesis? *J. germfree life gnotobiol.*, , 25-26, 2001. (in Japanese)
6. Manuscripts should be sent by E-mail to gnotobiolosaki@ks.kyorin-u.ac.jp.
7. Copyright of manuscripts accepted for publication will become the property of the Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology (JAGG).
8. The JAGG retains the right to publish accepted manuscripts in part or full in any network or other media recognized by the Association, in any language (including electronic publishing).

B. Original articles and reviews

I. Original articles

1. Submission of manuscripts to this journal is limited to members of the Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology (JAGG) or the International Association for Gnotobiology (IAG), based on material presented at the annual meeting of the JAGG or International Symposium for Gnotobiology.
2. Papers submitted as original articles must convey unpublished findings and conclusions of note from innovative studies capable of contributing to the development of germfree research or gnotobiology.
3. Acceptance of manuscripts for publication will be judged by the Editorial and Publications Committee and referees.
4. Original articles must be prepared in English throughout, in accordance with the instructions for proceeding manuscripts above, with the exception that there is no limitation in word count or number of tables, figures and photos.
5. Authors will be charged 5,000 yen/printed page for manuscripts submitted as original articles. Color reproductions are possible at the full expense of the author.

II. Reviews

1. Reviews are accepted in either English or Japanese as invited papers as a rule, to be prepared in accordance with instructions for oral presentation manuscripts. Color reproductions are possible at the full expense of the author.

C. Ethical guidelines

Study protocol must have obtained approval by an appropriate institutional Ethics Committee. Studies on human subject must also conform to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Seoul 2008), the Ethical Guidelines for Clinical Research (2008 Ministry of Health, Labour and Welfare Public Notice 415), and the Ethical Guidelines for Epidemiological Research (2007 Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, and Ministry of Health, Labour and Welfare Public Notice 1). Animal studies must conform to the Standards for the Rearing, Housing, and Alleviation of Pain of Experimental Animals (2006 Ministry of the Environment Public Notice 88). Compliance with these guidelines must be stated within the text of original articles.

CONTENTS

REVIEW

Plant root system architecture response to adapt various soil environments – adaptation to acid soil as a special interest case.....	27
--	----

SCIENTIFIC PROCEEDINGS OF THE JAPANESE ASSOCIATION

Gut microbiota after gastrectomy in rat: the relationship between body weight loss and dysbiosis <i>Taisuke Takagi et al.</i>	37
Generation of antibodies with different isotypes and their binding property between GALT from small and large intestine <i>Hiraku Okada et al.</i>	39
Exploration of factors that involve in growth behavior of <i>Listeria monocytogenes</i> in ripening natural cheese <i>Shujiro Kawamoto et al.</i>	44
Functional analysis of oxidative stress tolerance mechanisms in <i>Lactobacillus casei</i> IGM394 <i>Shingo Naraki et al.</i>	46
Evaluation of spore behavior and proliferation of <i>Clostridium perfringens</i> in food <i>Masaya Ito et al.</i>	48
Natural variation of root system architecture under aluminum stress in <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Shiori Tai et al.</i>	50
Administration of fluoroquinolones induces resistant <i>Campylobacter jejuni</i> in mice <i>Takuma Ichikawa et al.</i>	53
Fermented rice bran supplementation mitigates chronic colitis-associated extraintestinal manifestations in mice <i>Jahidul Islam et al.</i>	55
Elucidation of fucoidan degradation mechanism by human intestinal bacteria <i>Jo Suzuki et al.</i>	57
Effects of quercetin-metabolizing bacterium “Bacterium 19-20” on human microbiota-associated mice <i>Motoi Tamura et al.</i>	59

GUIDELINE FOR AUTHORS

Guideline for authors	61
-----------------------------	----