



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Exploring the Role of the Microbiota Member Bifidobacterium in Modulating Gamma Amino Butyric Acid Production

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2021-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Hend Essam Amin Mohamed Altaib メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81610

氏名 (本国籍)	Hend Essam Amin Mohamed Altaib (エジプト・アラブ共和国)		
学位の種類	博士 (農学)		
学位記番号	農博甲第764号		
学位授与年月日	令和3年3月31日		
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Exploring the Role of the Microbiota Member <i>Bifidobacterium</i> in Modulating Gamma Amino Butyric Acid Production (ヒト腸内フローラによるガンマアミノ酪酸生産における ビフィズス菌の役割)		
審査委員会	主査	岐阜大学 教授	中川 智行
	副査	岐阜大学 教授	鈴木 徹
	副査	静岡大学 教授	小川 直人
	副査	岐阜大学 准教授	中村 浩平

論文の内容の要旨

GABA は、グルタミン酸の不可逆的な脱炭酸によって生成され、中枢神経系の主要な抑制性神経伝達物質である。GABA には、生理学的および心理的な健康機能があり、広く研究されてきた。

ビフィズス菌は、ヒトの腸に生息する重要なプロバイオティクスである。近年、ビフィズス菌の特定の菌株が GABA 生産菌として報告された。ビフィズス菌の GABA 産生能力の研究は、本菌の新たな活用方法につながる。本研究では、産業利用、またヒト宿主の健康のために、ビフィズス菌の GABA 産生能力を調査する。さらに、研究をサポートする有用なクローニング戦略を開発した。

最初の章では、分子クローニングに役立つツールを開発した。以下に記述する新しい大腸菌エントリーベクター (pIIS18-SapI, pIIS18-BsmBI, pIIS18-BsaI, pIIS18-BfuAI-1, および pIIS18-BfuAI-2) は、pUC18 のバックボーンに基づいて構築され、2つの向かい合う IIS 型制限酵素切断部位と 1つの平滑末端制限酵素切断部位からなる。これらのベクターは、インサートに制限酵素切断部位などの余分な配列を付加する必要がない。また、これらのベクターを用いた遺伝子発現ベクターの構築戦略は、本研究の第2章で使用した。

第2章では、GABA の生産性を向上させるために、野生株および組換えビフィズス菌株における GABA 産生のメカニズムを解明した。ヒトの糞便分離ビフィズス菌株である *Bifidobacterium adolescentis* 4-2 を、高 GABA 産生株として同定した。この菌株の GABA 産生遺伝子であるグル

タミン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (*gadB*) とグルタミン酸/GABA 対向輸送体遺伝子 (*gadC*) を、GABA 非産生ビフィズス菌株に導入した。元の *gadB* プロモーターに加えて、2 つの高発現プロモーター (*gap*, BLt43) を介して発現量を測定した。また、培地の種類、基質量 (グルタミン酸ナトリウム、MSG)、pH などの発酵条件を調整した。その結果、2 つのモデル株は効率的な生産性と独特の特徴を持っていた。*gap* プロモーターを備えた *B. longum* 105-A/*gadBC* の GABA 産生は、5% MSG および pH 6.7 で約 23 g/L に達し、元のプロモーターを備えた *B. adolescentis* JCM 1275/*gadBC* は、pH 4.4 の 4% MSG 含有 MRS 培地で増殖させると、興味深い pH 誘導が見られた。本研究は、GABA 高生産へ向けた新たな微生物 Cell Factory 系を、ビフィズス菌で初めて構築した例となる。

第 3 章では、70 人以上のボランティアの糞便中の GABA 含有量と細菌叢組成の関係を分析した。この研究により、高 GABA 生産グループの腸内細菌叢は低・中 GABA 生産グループよりも α 多様性が低いことが明らかになった。また、興味深いことに、高 GABA 生産グループでは、*Bifidobacteriaceae* 科が細菌叢に豊富に含まれていた。この現象を詳しく検証するために、*B. adolescentis* 4-2 を低 GABA 産生細菌叢と共培養したところ、GABA 生産性が大幅に向上した。そこで、次に、GABA 含有量の少ないヒト腸内での GABA 生産能力の向上を目指し、さらなるアプローチを試みた。本研究では、ビフィズス菌の資化できるオリゴ糖をプレバイオティクスとして用いた。低 GABA 産生細菌叢の糞便培養に各種オリゴ糖を添加した結果、GABA 生産性とビフィズス菌の存在比率の両方が向上した。その中で最も GABA 生産の向上に効果的だったのは、マンノオリゴ糖 (MOS) と *B. adolescentis* 4-2 の組み合わせの場合だった。本研究は、ビフィズス菌の存在量が、健康なヒトの糞便中の GABA 含有量と相互に関連していることを示している。さらに、*B. adolescentis* 4-2 と MOS は、*in vitro* 培養系で糞便の GABA レベルを向上させることができることから、新規シンバイオティクスへの利用が今後期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者、Hend Essam Amin Mohamed Altaib は、近年注目されているヒト腸内細菌が作る γ -アミノ酪酸 (GABA) に関する研究を行った。

まず、腸内に置いて GABA 生産が知られる、ビフィズス菌を研究し応用するための多遺伝子発現を容易に実現するため、タイプ IIS 型の制限酵素を有効に利用したベクター系を構築し、ビフィズス菌内に複数の遺伝子を容易かつ正確に導入するベクター系を構築した。

次に、GABA 生産能を有するビフィズス菌、*B. adolescentis* 4-2 株を選別しその GABA 生産に関わるグルタミン酸脱炭酸酵素とグルタミン酸・GABA アンチポーターをコードする遺伝子 *gadB*, *gadC* をベクター系を用いクローン化し上記の、GABA 日生産菌に導入し、プロモーター、基質濃度、培養 pH を最適化することにより 23 g/L という高効率の GABA 生産を行うことが出来た。

これらのことから、ビフィズス菌を物質生産のためのセル・ファクトリーとする基盤を確立できたと考える。

また、腸内細菌による GABA の生産能を理解することは、GABA の腸・脳相関を理解する上

で、最も基礎となる知見であるがこれまでに、広範にこれを調べた報告がなかった。本研究においては、72人のボランティアを対象に、便中のGABAおよびグルタミン酸の濃度を測定した。その結果、GABAは0–330 µg/gと著しく広い分布を見せ、グルタミン酸濃度は緩く逆相関していた。また、GABA濃度を3段階に分け、その間の菌叢のちがいを統計的行ったところ、GABA生産グループでは、ビフィズス菌 Bifidobacteriaceae 科が有意に多いことが示された。

以上の結果から、本研究は、脳の健康における腸内細菌、とりわけビフィズス菌の役割を、基礎と応用の両方の視点から示し、今後の腸内細菌研究とその応用のために重要な知見を提供するものと認められる。

基礎となる学術論文

- 1) Hend Altaib; Kohei Nakamura; Mayuko Abe; Yassien Badr; Emiko Yanase; Izumi Nomura; and Tohru Suzuki, Differences in the Concentration of the Fecal Neurotransmitters GABA and Glutamate are Associated with Microbial Composition Among Healthy Human Subjects, *Microorganisms*, in press (2021).
- 2) Hend Altaib; Yassien Badr; and Tohru Suzuki, Bifidobacteria and Psychobiotic Therapy: Current Evidence and Future Prospects, in press (2021)
- 3) Hend Altaib; Yuka Ozaki; Tomoya Kozakai; Yassien Badr; Izumi Nomura; and Tohru Suzuki, A New *Escherichia coli* Entry Vector Series (pIIS18) for Seamless Gene Cloning Using Type IIS Restriction Enzymes, *Microbiology Resource Announcements*, 8,41, e00323-19, (2019). 短報

既発表学術論文

- 1) 長野 宏子, 泉 善七, 上原 葵, ヘンダ アルタイプ, 磯部 由香, 柳瀬 笑子, 野村 泉, 鈴木 徹: 岐阜のアユなれずしの成分と菌叢の特徴. 日本食品科学工学会誌. 67 : 101~108. (2020)