でも HR 細胞死は起こらない。そこで筆者らは、CEBiP を改変することで、キチンオリゴ糖認識後に HR 細胞死を誘導するイネを作出できないかと考えた。イネの *Xa21* は当初、*R* 遺伝子に分類されていたほど白葉枯病抵抗性に大きく寄与し、HR 様の細胞死を伴って発病を阻止する受容体様プロテインキナーゼをコードする。広範囲のイネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) が *Xa21* と相互作用する硫酸化ペプチド Ax21 を分泌することが明らかとなり、今では *Xa21* は PRR に分類されている。筆者らは、キチンオリゴ糖と特異的に結合する CEBiP と、この *Xa21* を組み合わせた防御応答システムをデザインした (図 1)。CRXA は CEBiP の細胞外領域と、*Xa21* の細胞内領域を膜貫通ドメインを介して連結したキメラタンパク質である。

CRXA 遺伝子を発現するイネの培養細胞では、キチンオリゴ糖処理による一過的な活性酸素・窒素生成や細胞死誘導が非形質転換細胞よりも亢進したことから、キチンオリゴ糖が CRXA を介して HR 様の防御応答を誘導するようになったことが強く示唆された。次に、CRXA 遺伝子を発現するイネの葉にいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) を接種したところ、侵入菌糸の伸展、増殖、および病斑形成が抑制された。一方、キチンをもたないイネ白葉枯病菌に対する抵抗性は変化しなかった⁽⁵⁾。したがって、いもち病菌の侵入部位でキチンオリゴ糖が生成し、それに対し CRXA を介した認識・応答が起こった結果、いもち病抵抗性が向上したと考えられる。

PRR 遺伝子を操作して耐病性を高めるアプローチには、広範な病原菌に対して持続的抵抗性を付与する可能

性があるが、防除効果は、おそらく、菌由来の MAMPs 生成量や用いる受容体の防御応答誘導能に依存する。たとえば、*Xa21* よりも効果的に HR を誘導する受容体様プロテインキナーゼを用いれば、さらに抵抗性を高めることができるかもしれない。一方、殺生菌に分類される病原菌は、毒素などで宿主細胞を殺すことで感染することが知られている。したがって、MAMPs による細胞死誘導の亢進は殺生菌の感染促進を招く恐れがある。これまでのところ、CRXA を恒常的に発現させても、殺生菌であるイネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) に対する感受性は変化しなかったが⁽⁵⁾、さらに強い細胞死を誘導する人工受容体を作製した場合、再評価が必要であろう。

PRR に着目して耐病性を高める研究は始まったばかりである。今後、新たな PRR の同定と作用機構の解明が進むにつれ、より防除効果の高い PRR 改変法が見いだされることが期待される。

- 1) G. De Lorenzo, A. Brutus, D. V. Savatin, F. Sicilia & F. Cervone: *FEBS Lett.*, **585**, 1521 (2011).
- 2) H. Kaku, Y. Nishizawa, N. Ishii-Minami, C. Akimoto-Tomiyama, N. Dohmae, K. Takio, E. Minami & N. Shibuya: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11086 (2006).
- 3) T. Shimizu *et al.*: *Plant J.*, **64**, 204 (2010).
- 4) A. Miya, P. Albert, T. Shinya, Y. Desaki, K. Ichimura, K. Shirasu, Y. Narusaka, N. Kawakami, H. Kaku & N. Shibuya: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19613 (2007).
- 5) K. Kishimoto, Y. Kouzai, H. Kaku, N. Shibuya, E. Minami & Y. Nishizawa: *Plant J.*, **64**, 343 (2010).
- 6) S. Lacombe *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **28**, 365 (2010).

(西澤洋子, 香西雄介, 岸本久太郎, 農業生物資源研究所)

ビフィズス菌の産生する酢酸が O157 感染死予防に重要である マルチオーミクス手法の有用性

ヒトをはじめとする動物の腸内には膨大な数の細菌群が定着しており、これを腸内フローラという。ヒトの腸内フローラには 500~1,000 種類の異なる菌種が含まれると考えられており、その総数は 100 兆個以上と、約 60 兆個とされるわれわれの体細胞数を凌駕し、腸内フローラがコードする全遺伝子数もヒト全遺伝子の 100 倍以上と想定されている⁽¹⁾。腸内フローラは宿主が摂取する食物成分から栄養を得て増殖するが、その際にビタミンや

アミノ酸などを産生したり宿主が消化できない難消化性食物繊維を分解することで宿主の栄養補給を助けたり、宿主の免疫系を賦活したり、さらには食物などとともに摂取された病原微生物と競合することにより感染防御に働くなど、宿主に有益な作用をもたらすいわゆる「善玉菌」が存在する一方、ニトロソアミンなどの発がん物質を産生したり、また日和見感染の原因となったりといった有害な側面をもつ「悪玉菌」も存在することがわかっ

てきた⁽²⁾。このような腸内フローラの多彩な機能は、従来は腸内容物から細菌を単離・培養し、試験管内や培養シャーレ上などでの *in vitro* 試験によりその性状を調べることににより明らかにされてきた。しかし、このような単離された細菌の *in vitro* での振る舞いが、実際にわれわれの腸管内という *in vivo* 環境下で、また腸内フローラという他の多くの細菌との共存下においても同様に認められるのか否かは不明であった。その一因として、*in vivo* における細菌の性状を解析できるよい実験系がなかったことが挙げられる。

今世紀に入り、遺伝子の網羅的解析としてのゲノミクス、遺伝子発現の網羅的解析としてのトランスクリプトミクス、低分子化合物・代謝物の網羅的解析としてのメタボロミクスなどの網羅的解析手法が開発され、一般的な解析技術として普及し始めるとともに、これらの手法の腸内フローラ解析や宿主・腸内細菌相互作用の解析への応用が試みられつつある。ここでは、腸管出血性大腸菌 O157:H7 によるマウス感染死のビフィズス菌による予防の分子機構の解析⁽³⁾を例に、網羅的解析法を駆使したマルチオミクス手法の有用性を紹介したい。

ビフィズス菌は善玉菌のひとつであり、糖を代謝して乳酸、酢酸などを産生する。プロバイオティクスとは、経口摂取することによって「宿主に保健効果を示す生きた微生物を含む食品」であるが、ビフィズス菌は乳酸桿菌とならんでその代表的な菌であり、乳児では腸内の最優勢菌で離乳とともに占有率は低下するが、成人でも主要な腸内細菌の一つとして整腸作用、免疫調節作用などが示唆されている⁽⁴⁾。一方、O157:H7 は腸管出血性大腸菌感染症の主たる原因菌であり、シガ毒素（ベロ毒素）を産生する。O157:H7 で汚染された生肉などを摂取することにより下痢や血便などの消化器症状をひき起こし、重症例では血中に移行したシガ毒素による溶血性尿毒症症候群や脳症などにより死に至ることもある⁽⁵⁾。

O157:H7 はヒトに対する病原菌であり、ヒトの腸管上皮に付着・定着して上皮細胞を損傷するため血便を呈するが、通常環境で飼育され正常な腸内フローラを有するマウスに経口投与しても腸管上皮に付着・定着できず、腸内フローラとの競合により糞便とともに排泄されてしまい感染は成立しない。しかし、細菌のまったくいない環境で飼育された無菌マウスに経口投与すると、O157:H7 は糞便 1g 当たり約 10^{10} 個とかなりの増殖を示し、産生されたシガ毒素が血中に移行することでマ

ウスは神経障害を来し、1 週間ほどで死に至る。ところが、O157:H7 投与の 1 週間前に無菌マウスにあらかじめビフィズス菌を投与して定着させておくと、この感染死を防ぐことができる。ただし、投与するビフィズス菌の菌株によって、その後の O157:H7 による感染死を予防する菌株（予防株）としない菌株（非予防株）があるのである⁽⁶⁾。予防株か非予防株にかかわらずマウス糞便中の O157:H7 の菌数や産生されるシガ毒素の量には差が見られないことから、予防株が O157:H7 の増殖やシガ毒素産生量を抑制するわけではない。それにもかかわらず、血中のシガ毒素濃度は予防株投与マウスでは O157:H7 単独投与マウスおよび非予防株投与マウスに比較して顕著に低いこと、またこれに呼応するように、後二者で認められる大腸下部の上皮細胞死とそれに引き続いて見られるごく軽度の炎症所見が前者では認められない⁽³⁾。これらを総合すると、予防株に特有の代謝物がマウス大腸上皮に作用することにより、大腸上皮がその後の O157:H7 感染による細胞死に対する抵抗性を獲得すると考えられる。

実際、予防株および非予防株投与マウスの糞便中の代謝物のメタボロミクスによる網羅的な解析の結果、予防株では非予防株と比較して酢酸が有意に多く存在していた。酢酸などの短鎖脂肪酸は腸管上皮の増殖促進や抗炎症効果を示す⁽⁷⁾。酢酸が O157:H7 による細胞死に対する抵抗性を上皮細胞に付与することは、ヒト大腸上皮細胞株の培養液中に酢酸を添加しておくとその後の O157:H7 による細胞死が抑制されることで確かめられた⁽³⁾。予防株ならびに非予防株の全ゲノム配列決定に基づく比較ゲノム解析の結果、両者の酢酸産生能の違いは予防株にのみ存在する果糖トランスポーターに起因することが示された。マウスの O157:H7 感染死予防における酢酸の重要性は、酢酸を徐放性に遊離する特殊な餌を与えることにより感染死が予防できることから明らかである。解析の詳細は原著⁽³⁾に譲るが、マウス腸内では以下のようなことが起きていると考えられる（図 1）。

すなわち、大腸上部までは腸内容物にブドウ糖が存在しており、予防株、非予防株ともブドウ糖を利用して十分量の酢酸を産生できるため、O157:H7 が存在しても上皮細胞は細胞死抵抗性を示し、炎症も見られない（図 1-上）。一方、大腸下部では、ブドウ糖はすでに宿主と菌による吸収・分解により枯渇しているが果糖は残っている。果糖トランスポーターをもつ予防株は果糖を利用し

図1 ■ 予防株，非予防株ビフィズス菌の作用の違い

詳細は本文を参照 (<http://leib.rcai.riken.jp/riken/index.html> より転載)

て十分量の酢酸を産生するため大腸下部でも上皮細胞は細胞死抵抗性を付与されるが，果糖トランスポーターをもたない非予防株は果糖を利用できないため酢酸濃度が不十分となり，上皮細胞死をまねいてシガ毒素が血中へと移行し，マウスは死亡する（図1-下）⁽³⁾。

上述の系は，本来ヒトの病原菌である O157:H7 による無菌マウス感染死のビフィズス菌による予防という，解析の容易さを優先させたモデル系であり，得られた知見がそのままヒトにおける感染予防に当てはまるとは限らない。それよりもここで評価されるべきは，マルチオミクス手法が複雑な宿主-細菌相互作用の解析に効果的であることを実証した点にある。今後は，より複雑な腸内フローラをもつ通常のマウスやヒトの解析に応用することにより，宿主-腸内フローラ相互作用の全貌の

解明に迫ることも可能となろう。また，プロバイオティクスの作用メカニズムの解明が進めば，より効果的なプロバイオティクスの開発につながり，健康増進や予防医学へ応用することで，社会への還元が期待できる。

- 1) R. E. Ley, D. A. Peterson & J. I. Gordon: *Cell*, **124**, 837 (2006).
- 2) 光岡知足: “腸内細菌の話”，岩波書店，1978.
- 3) S. Fukuda *et al.*: *Nature*, **469**, 543 (2011).
- 4) 今岡明美: *Functional Food*, **4**, 400 (2011).
- 5) 谷口 暢，内田隆一，本田武司: 治療，**91**, 1231 (2009).
- 6) K. Yoshimura, T. Matsui & K. Itoh: *Antonie Van Leeuwenhoek*, **97**, 107, (2010).
- 7) S. Tedelind, F. Westberg, M. Kjerrulf & A. Vidal: *World J. Gastroenterol.*, **13**, 2826 (2007).

(大野博司，福田真嗣，理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター)