

## (論文内容の要旨)

近年、ヒト腸内常在菌叢における最優勢種が報告され (*Nature* 2010. 464: 59–65.)、腸内常在菌叢最優勢種のほとんどが機能不明の「日和見菌」に分類されることが明らかとなった。また、これらの日和見菌の一部は、食物繊維が不足した食餌を摂取した際に腸管バリア機構を破壊すること (*Cell* 2016. 167:1339-1353.) 等が報告され、「日和見菌」に分類された腸内細菌の新しい機能が日々明らかとなっている。本研究では、「機能が研究途上にある腸内常在菌や悪玉菌 (病原菌) を増殖させず、善玉菌のみを増殖させる」という、新しい機序を持つ次世代型プレバイオティクスの開発と、その特異的な増殖促進機構の解明を目的とした。また、この応用として、次世代型プレバイオティクスを用いた善玉菌の増殖促進による腸内環境改善作用を介した偽膜性腸炎原因菌の生育抑制を試みた。

次世代型プレバイオティクス候補物質として、既存のプレバイオティクスや酵素合成した $\beta$ -ガラクトシドを含む、11種のオリゴ糖について、腸内常在菌叢最優勢27種および善玉菌による資化性を解析した。その結果、多くの候補物質は、善玉菌に加え、日和見菌に含まれる一部の腸内常在菌叢最優勢種の増殖促進効果を持つことが明らかとなった。一方で、ガラクトシル- $\beta$ -1,4-ラムノース (Gal- $\beta$ 1,4-Rha) は、ビフィズス菌のみを特異的に増殖させた。この特異的な増殖促進機構を明らかにする目的で、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A 株の糖質 ABC トランスポーターの基質結合タンパク質である BL105A\_0502遺伝子変異株を作製し、Gal- $\beta$ 1,4-Rha を単一糖源として含む培地で培養した。BL105A\_0502遺伝子変異株は野生株と比較して生育の低下がみられた。さらに、BL105A\_0502遺伝子の相補株を用いると、生育の低下がみられなくなったことから、*B. longum* 105-A 株は、BL105A\_0502が基質結合タンパク質として働く ABC トランスポーターを介して Gal- $\beta$ 1,4-Rha を資化すると考えられた。Gal- $\beta$ 1,4-Rha により増殖促進効果のあった *B. longum* subsp. *infantis* JCM 1222<sup>T</sup> 株と偽膜性腸炎の主な原因のひとつである *Clostridioides difficile* を共培養したところ、*C. difficile* の菌数は、Gal- $\beta$ 1,4-Rha の添加により、1,850分の1に抑制された。一方で、*B. infantis* BLIJ\_2090 (Gal- $\beta$ 1,4-Rha のトランスポーターである BL105A\_0502とアミノ酸配列が96%一致しているタンパク質) の変異株との共培養では、*C. difficile* の生育抑制効果が失われた。また、ヒトへの応用を視野に入れ、Gal- $\beta$ 1,4-Rha を含む培地でヒト糞便、*B. infantis*、*C. difficile* を同時に培養し、*C. difficile* が産生するディフィシル毒素を定量した。この結果、Gal- $\beta$ 1,4-Rha を含まない培地で同条件の実験を行った時と比較して、*C. difficile* による毒素産生が大きく抑制された。次いで、*in vivo* における Gal- $\beta$ 1,4-Rha と *B. infantis* の効果を検証することを目的として、動物実験を行った。マウスに Gal- $\beta$ 1,4-Rha、*C. difficile* 及び *B. infantis* を経口投与したところ、*C. difficile* の感染に伴う体重減少が緩和された。

本研究では、ビフィズス菌を特異的に増殖促進し、病原菌の生育を抑制することが可能な次世代型プレバイオティクス候補 Gal- $\beta$ 1,4-Rha を見出すことに成功した。

氏名	平野里佳
----	------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ヒトが健康増進を目的として使用してきたプレバイオティクスについて、既存のものとは異なる「プロバイオティクス細菌のみを選択的に増殖させる次世代型プレバイオティクス」というコンセプトを打ち出し、複数の知見を示した。評価できる具体的な点は以下の通りである。

(1) 本論文はこれまでにプロバイオティクス細菌の増殖を促進させることを目的として使用されてきたいくつかのプレバイオティクスについて、数十種の腸内細菌を一斉に培養するシステムを用いることにより、日和見菌の増殖を促進させるという新たな側面を持つ可能性を示した。これは、既に上市されているものの在り方や適切な利用方法を考える上で重要な知見である。

(2) 上記の要素を考慮し、「腸内常在菌や病原菌を増殖させることなく、ビフィズス菌のみを増殖させることのできる次世代型プレバイオティクス」として候補物質を選抜した。次世代型プレバイオティクスという新しい概念の提唱に寄与することのできる知見である。さらに、ビフィズス菌が候補物質を利用する上で重要な因子であるトランスポーター遺伝子を同定し、その遺伝子の保存性は腸管由来ビフィズス菌では高いが、ヒト腸内で大きな割合を示す腸内細菌では低いことを報告した。プレバイオティクスとヒト腸内に存在する腸内細菌が持つ糖質利用能力の組み合わせが選択的な増殖促進の可否を左右することは、個人差の大きいヒト腸内細菌叢をターゲットとするプレバイオティクスを使用する場合に重要な知見である。また、ビフィズス菌の遺伝子操作は非常に困難であることが知られているが、本論文ではビフィズス菌の遺伝子破壊技術を用いて遺伝学的にトランスポーター遺伝子を同定した点も評価に値する。

(3) 本論文では、次世代型プレバイオティクスの応用として、ビフィズス菌とビフィズス菌を選択的に増殖させる次世代型プレバイオティクス候補の組み合わせが偽膜性腸炎の新たな治療法となる可能性を *in vitro* における混合培養試験・糞便培養試験および *in vivo* におけるマウスへの偽膜性腸炎原因菌 *Clostridioides difficile* 感染試験を通して報告した。プロバイオティクス細菌を使用した偽膜性腸炎の治療法確立に向けた重要な基礎的な知見である。

以上のような新しいコンセプトを持つプレバイオティクスを創出することは、「機能未知の腸内常在菌や病原菌を増やさない」という安全性に配慮した食品の流通に寄与することが期待される。さらに、次世代型プレバイオティクスとビフィズス菌の組み合わせは、プロバイオティクス細菌を使用した偽膜性腸炎の新規治療法の確立に寄与することが期待される。また、本論文の内容は国際誌にすでに掲載済みである。

よって、本論文は博士（生物資源環境学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、令和4年1月26日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。