

<令和3年度助成>

プレバイオティクスおよびプロバイオティクスの健康効果におけるマイクロ RNA の役割

逢坂 文那

(北海道大学大学院 農学研究院 基盤研究部門 生物機能化学分野 食品機能化学研究室)

1. 要約

我々はこれまでに無菌 (GF) マウスと通常 (SPF) マウスの比較解析により、腸内細菌叢の存在が、大腸の粘膜固有層白血球 (lamina propria leukocyte, LPL) における microRNA (miRNA) -200 ファミリーの発現を増加させ、その標的遺伝子である *Bcl11b*、*Ets1* および *Zeb1* の mRNA 発現を減少させることを観察した。またこれらの遺伝子は、腸管免疫の恒常性維持に重要な働きを担うサイトカインであるインターロイキン 2 (interleukine-2, IL-2) の転写因子をコードする遺伝子であり、実際に腸内細菌叢の存在は IL-2 産生も減少させた¹⁾。ところで、プレバイオティクスおよびプロバイオティクスによる腸内細菌叢を介した免疫調節機能が報告されているが、このことに miRNA が関与することはほとんど知られていない。本研究では、難消化性オリゴ糖の摂取およびマウスの主要な腸内ビフィズス菌である *Bifidobacterium pseudolongum* の投与がマウスの大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現を増加させることを明らかにした。これらのことは、腸内細菌叢のうち、ビフィズス菌が大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現を増加させる結果、腸管粘膜免疫の調節の一端を担うことを示唆している。

2. 目的

プレバイオティクスおよびプロバイオティクスは腸内細菌叢を介してさまざまな健康効果を発揮する食品素材である。本研究では、代表的なプレバイオティクスであるフルクトオリゴ糖の摂取やプロバイ

オティクスとしてよく用いられるビフィズス菌の投与がマウス大腸 LPL の miRNA 発現に及ぼす影響ならびに腸管免疫機能の変化を詳細に解析し、プレバイオティクスおよびプロバイオティクスの腸管免疫調節作用における miRNA の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 方法

6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを精製飼料 AIN-93G で飼育し、フラクトオリゴ糖の一種である 1-ケストース (KES) の 4% 水溶液を 2 週間飲水投与した。飼育最終日にセボフルラン麻酔下で安楽死させ、盲腸および結腸を摘出し、定法により LPL を分離した。LPL から miRNeasy mini kit を用いてトータル RNA を分離し、マイクロアレイ (3DGene、東レ株式会社) により miRNA の発現プロファイルを網羅的に解析した。マイクロアレイで発現が変化した miRNA については、リアルタイム定量 PCR (qPCR) による確認を行い、miRNA の標的 mRNA についても同様に解析した。また、マウスの盲腸内容物から QIAmp Fast DNA stool Mini kit を用いて DNA を分離し、qPCR によりビフィズス菌数を定量した。

次に AIN-93G を与えた C57BL/6J マウスに対して、マウスの主要な腸内ビフィズス菌である *B. pseudolongum* (1.0×10^9 CFU/day) (BIF+) あるいは溶媒 (PBS) (BIF-) を 1 週間毎日胃内投与し、上記と同様に盲腸および結腸から LPL を分離し、miRNA の発現レベルおよび盲腸内容物中のビフィズス菌数を qPCR により解析した。

4. 結果・考察

難消化性オリゴ糖の一つである KES を摂取させたマウスの盲腸および結腸から分離した大腸 LPL よりトータル RNA を分離し、マイクロアレイ解析により miRNA プロファイルと比較した。その結果、miR-182-5p、miR-192-5p、miR-194-5p、miR-141-3p/-200a-3p、miR-200b-3p/-200c-3p/-429-3p、miR-205-5p、miR-215-5p および miR-290a-5p が KES 摂取により 2 倍以上増加することを観察した (Figure 1A)。これらの miRNA について KES 投与群 (KES (+)) および非投与群 (KES (-)) の各 3 頭ずつのヒートマップを作成したところ、両群に対応する二つのクラスターに明瞭に分離された (Figure 2)。このことは、KES 摂取により miRNA の発現が変化することを示している。さらに、マイクロアレイで KES (-) に比べて KES (+) で発現レベルが 2 倍以上高かった 11 個の miRNA について qPCR で解析したところ、miR-192-5p、miR-194-5p、miR-200a-3p、miR-200b-3p/-200c-3p/-429-3p および miR-205-5p は KES (-) に比べて KES (+) で統計的に有意に高値、あるいは高い傾向を示し、マイクロアレイの結果を確認できた (Figure 1B)。しかし、miR-141-3p および miR-182-5p は群間に差はみられず、miR-290a-5p は検出限界以下となった。興味深いことに、KES 摂取に

よる miR-200 ファミリー (miR-141-3p/-200a-3p、miR-200b-3p/-200c-3p/429-3p) の発現増加は、GF マウスと SPF マウスの比較解析の結果と概ね一致した¹⁾。先行研究で予測された IL-2 の転写因子である *Bcl11b*、*Ets1* および *Zeb1* の mRNA レベルを qPCR により解析したところ、予想に反して発現変化は観察されなかった。このような結果になった一つの原因として、KES 摂取により変化した腸内細菌やそれらの代謝産物による miRNA の遺伝子サイレンシングを介さない標的遺伝子の制御機構が存在する結果、miRNA による発現制御の結果を打ち消し、見かけ上、標的遺伝子の発現変化を観察できなかった可能性が考えられる。

難消化性オリゴ糖の摂取は、腸管におけるビフィズス菌を増殖させることが広く知られているため、本実験においてもマウスの盲腸内容物中のビフィズス菌数を qPCR により測定した。その結果、KES 摂取によりビフィズス菌数が増加することを観察した (Figure 3)。

次に、KES 摂取による大腸 LPL の miRNA の発現プロファイルの変化に、このようなビフィズス菌の関与を想定し、マウスへのビフィズス菌の投与を行った。具体的には、マウスに常在するビフィズス菌種の一つである *B. pseudolongum* をマウスに投与し、大腸 LPL における miRNA および標的 mRNA の

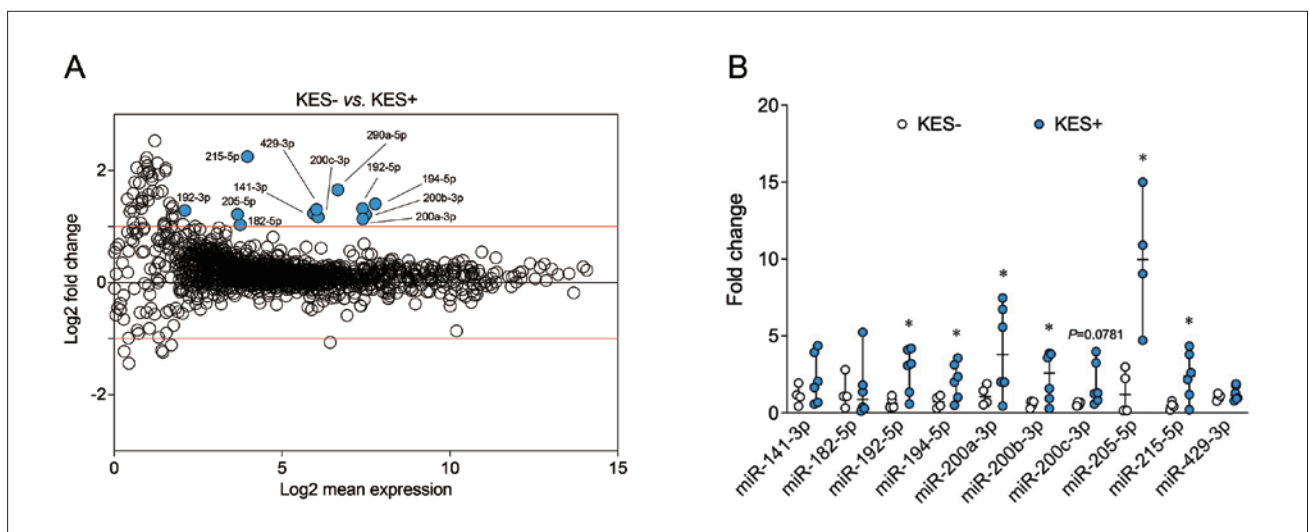


Figure 1 Comparison of miRNA expression profiles in large intestinal LPL between KES (-) and KES (+) mice.
 (A) MA plot of average of miRNA expression (log2, x-axis) and fold change (log2, y-axis) calculated from microarray data of pooled samples in each group. Blue-colored symbols with miRNA names represent higher (≥ 2 -fold) miRNA in KES (+), respectively.
 (B) Results are presented as scatter plots composed of medians, KES (-) and KES (+) respectively. White and blue dots represent KES (-) and KES (+) mice, respectively.
 Mean values between groups were compared using Welch's corrected t-test. * $P < 0.05$ vs. KES (-) mice.

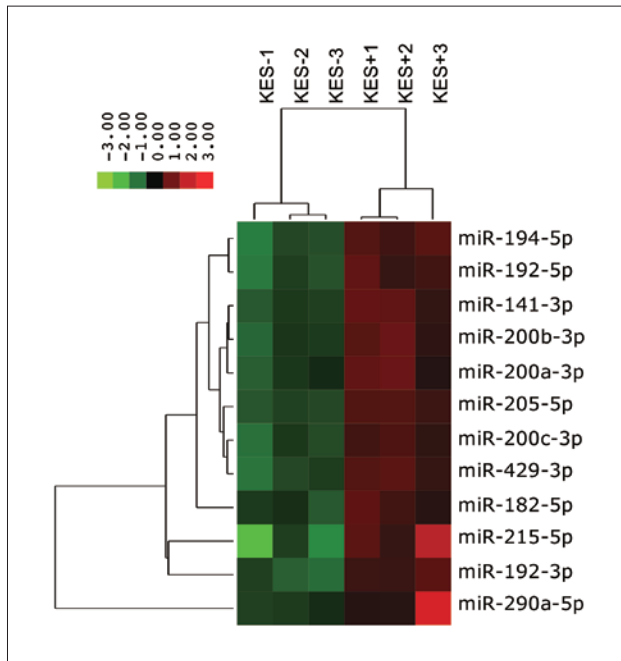


Figure 2 Heat map miRNA expression levels by microarray analysis in the large intestinal LPL between KES (-) and KES (+). Red and green columns indicate higher and lower levels, respectively.

発現レベルを解析した。その結果、*B. pseudolongum* の投与によりマウスの大腸 LPL における miR-200 ファミリーを含む miR-182-5p、miR-194-5p、miR-200a-3p、miR-200b-3p/-429-3p、および miR-215-5p の発現が有意に増加、あるいは増加する傾向が観察された (Figure 4)。また、マウスにビフィズス菌が定着しているかどうかを qPCR により確認したところ、盲腸内容物中のビフィズス菌数および *B.*

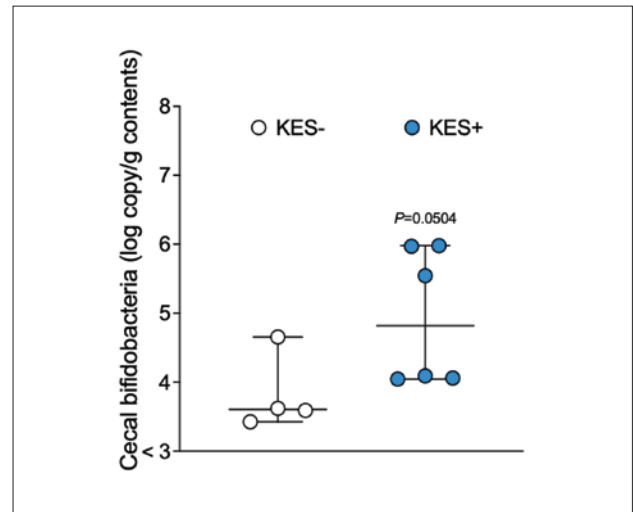


Figure 3 The population of genus *Bifidobacterium* estimated by qRT-PCR in cecal contents. Results are presented as standard box plots composed of medians and interquartile ranges with minima and maxima, in each group. White and blue dots represent KES (-) and KES (+) mice, respectively. Mean values between groups were compared using Welch's corrected t-test. * $P < 0.05$ vs. KES (-) mice.

pseudolongum 数がいずれも *B. pseudolongum* 投与により有意に増加した (Figure 5)。マウスへの KES 摂取試験と同様に、miR-200 ファミリーの標的遺伝子である *Bcl11b*、*Ets1* および *Zeb1* の mRNA レベルを解析したところ、ビフィズス菌の投与により、*Bcl11b* の mRNA レベルは減少傾向にあった。しかしながら、*Ets1* および *Zeb1* の mRNA レベルに群間差はみられなかった。

これらの結果は、難消化性オリゴ糖の摂取により

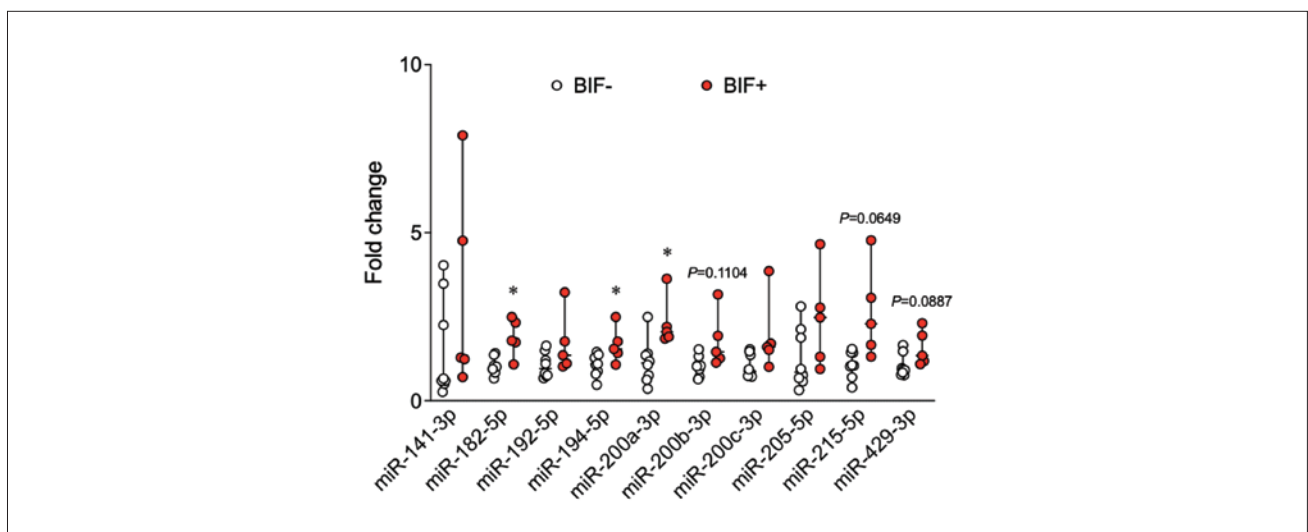


Figure 4 Comparison of miRNA expression in large intestinal LPL between BIF (-) and BIF (+) mice. Results are presented as scatter plots composed of medians, BIF (-) and BIF (+) respectively. White and red boxes represent BIF (-) and BIF (+) mice, respectively. Mean values between groups were compared using Welch's corrected t-test. * $P < 0.05$ vs. BIF (-) mice.

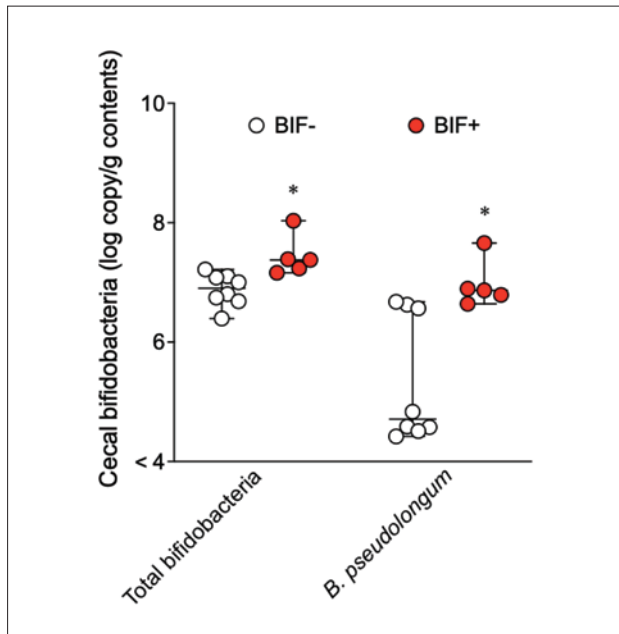


Figure 5 The population of genus Bifidobacterium estimated by qRT-PCR in cecal contents.

Results are presented as standard box plots composed of medians and interquartile ranges with minima and maxima, in each group. White and red dots represent BIF (-) and BIF (+) mice, respectively. Left and right show the number of total bifidobacterial and *B. pseudolongum*, respectively. Mean values between groups were compared using Welch's corrected t-test. *P<0.05 vs. BIF (-) mice.

増加したビフィズス菌が大腸 LPL における miRNA 発現に寄与する可能性を示唆するものである。

本研究をまとめると、難消化性オリゴ糖摂取により増加した *B. pseudolongum* が大腸 LPL における miR-200 ファミリーの発現を増加させ、標的遺伝子である *Bcl11b*、*Ets1* および *Zeb1* の発現を抑制する

結果、腸管粘膜免疫調節に重要な役割を果たす IL-2 産生を抑制することを示唆している。miRNA の遺伝子サイレンシングを介したプレバイオティクスおよびプロバイオティクスの作用機構を明らかにすることができれば、プレバイオティクスおよびプロバイオティクスなどの新たな機能性食品開発の新機軸を提供することが期待できる。

なお、上述した内容の一部はすでに Journal of Nutritional Science and Vitaminology に投稿し、採択されたものである²⁾。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり多大なご援助を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に深謝いたします。

参考文献

- 1) Ohsaka F, Karatsu Y, Kadota Y, Tochio T, Takemura N, Sonoyama K. Gut commensals suppress interleukin-2 production through microRNA-200/BCL11B and microRNA-200/ETS-1 axes in lamina propria leukocytes of murine large intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;534:808-814.
- 2) Ohsaka F, Honma D, Kadota Y, Tochio T, Sonoyama K. Consumption of 1-Kestose Upregulates MicroRNA-200 and -192/215 families in lamina propria leukocytes of the murine large intestine. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2023;69(2):150-154.

The role of microRNAs in the health promoting effects of prebiotics and probiotics

Fumina OHSAKA

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University

We previously observed that the presence of gut commensals suppresses IL-2 production in large intestinal lamina propria leukocytes (LPLs), at least in part due to post-transcriptional downregulation of *Bcl11b* and *Ets1* genes by miR-200 family members, by comparing specific-pathogen-free and germ-free mice (Ohsaka, *et al.* 2021 *Biochem Biophys Res Commun*). Prebiotics and probiotics exert their immunoregulation functions through gut microbiota. However, the manner in which alteration of the gut microbiota by food composition (e.g., prebiotics and probiotics) affects microRNAs (miRNAs) and mucosal immunoregulation in large intestinal LPLs has not been investigated. In the present study, it was demonstrated that supplementation with prebiotics/probiotics increased the expression of the miRNA-200 family in large intestinal LPLs in mice. In addition, we showed that FOS feeding and *Bifidobacterium pseudolongum* administration increased Bifidobacteria in the cecal contents.

Taken together, this suggests that *B. pseudolongum* suppresses IL-2 production in large intestinal LPLs, at least in part due to post-transcriptional down regulation of *Bcl11b* and *Ets1* genes by miR-200 family members.