

別刷

生命を科学する 明日の医療を切り拓く

実験医学

Experimental Medicine

Vol.38 No.11

2020

7

特集

環境因子 と 発がん

喫煙・肥満・アスベストによる
がん発生機構から
がんの“予防”に挑む

企画／戸塚ゆ加里

遺伝子ドーピングと
その検査

新連載 免疫染色のお悩み、すべて答えます

定量的なウェスタンブロッティング
のためのデータ補正

羊土社

腸内細菌叢とがん発生の分子メカニズム

川西優喜, 若林敬二, 渡辺賢二

近年, 「コリバクチン」とよばれる遺伝子損傷性毒素を産生する菌が腸内細菌叢のなかに存在することがわかってきた。コリバクチンはDNAを損傷する比較的小分子の有機化合物である。炎症モデルマウスにコリバクチン産生菌を感染させると大腸発がんが惹起されることや, 大腸がん患者の腸内細菌叢には高頻度のコリバクチン産生菌が検出されることなどから, コリバクチン産生菌は新たな大腸発がん因子として注目されている。本稿では, 解明が進みつつある「コリバクチン」の遺伝毒性発現メカニズムを概説する。

キーワード 腸内細菌, コリバクチン, 大腸がん, 遺伝毒性, DNA損傷

はじめに

厚生労働省がん登録によると, 日本全国で1年間に約15万8千人が大腸がんと診断されている。大腸がんはやや男性に多い傾向にあり, 男性では胃がん, 前立腺がんに次いで3番目, 女性では乳がんに次いで2番目に多い¹⁾。大腸がんは生活習慣とかかわりがあり, 赤肉や加工肉の摂取, 飲酒, 喫煙はリスク要因である²⁾。

ところで, ヒトの腸内には細菌がおよそ千種類, 百兆個生息している。腸内細菌は互いに関係を保ちながら腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢は個人によってさまざまで, また, 食事や在住国の生活習慣, 環境などの要因によっても異なる³⁾⁴⁾。

腸内細菌は, さまざまなビタミンや二次胆汁酸を生産するなど, ヒトの健康には不可欠のものである。健康への寄与という観点から, 腸内細菌は「善玉菌」, 「悪玉菌」, そしてそのどちらでもない中間の菌に分類されることが多い。このうち「悪玉菌」はタンパク質や脂質中心の食事, 不規則な生活, ストレス, 便秘な

どが原因で優勢となることが知られている。また, 大腸がんのほか, 肥満, 糖尿病, 動脈硬化症, 炎症性腸疾患などの患者の腸内細菌は健康者のそれと比べて著しく変化していることが報告されている⁴⁾。

近年, 腸内細菌叢のなかには, 「コリバクチン」とよばれる遺伝子損傷性毒素を産生する菌が存在することがわかってきた⁵⁾。「コリバクチン」は比較的小分子の有機化合物である。コリバクチン産生菌は, 感染した大腸細胞のDNAを損傷すること⁵⁾⁶⁾, 炎症モデルマウスに感染させると大腸発がんが惹起されること⁷⁾, 大腸がん患者の55~67%からコリバクチン産生菌が検出されること⁷⁾⁸⁾, 大腸がんで見つかる遺伝子変異の部位とコリバクチンの作用する塩基配列に共通性がみられることなどから⁹⁾, コリバクチン産生菌は新たな大腸発がん因子として注目されている。そこで本稿では, 解明が進みつつある「コリバクチン」の遺伝毒性発現メカニズムを, われわれの研究成果もまじえつつ概説する。

Molecular mechanism of carcinogenesis by intestinal flora

Masanobu Kawanishi¹⁾/Keiji Wakabayashi²⁾/Kenji Watanabe³⁾: Graduate School of Science, Osaka Prefecture University¹⁾/ Graduate Division of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka²⁾/Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka³⁾ (大阪府立大学理学系研究科¹⁾/静岡県立大学食品栄養環境科学研究所²⁾/静岡県立大学薬学研究所³⁾)

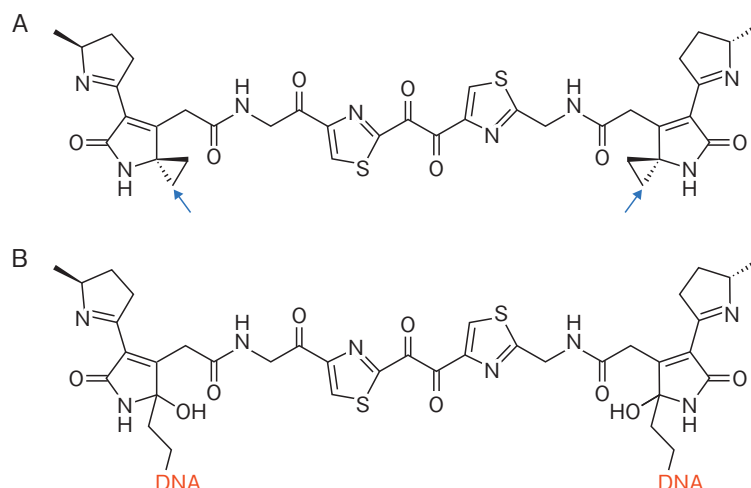


図1 コリバクチン (A) とコリバクチン-DNAクロスリンク (B) の化学構造
Aの矢印は2つのシクロプロパン構造を示す。(文献11より引用)

1 コリバクチンの化学構造

2006年に、ある種の病原性大腸菌を哺乳動物に感染させると、細胞のDNA二重鎖切断や分裂停止が起こることが報告された⁵⁾。大腸菌 (*E. coli*) の産生する未知の毒素が原因物質とされ、そのDNA損傷性毒素は「コリバクチン (colibactin)」と命名された。以来、世界中の多くの研究グループによってコリバクチンの構造決定が試みられてきた。しかし、その化学的不安定さにより、大腸菌から単離・精製したコリバクチン分子そのものをを用いた構造決定の報告はない。一方、生合成過程の中間代謝物や、生合成にかかわる酵素遺伝子の情報などをもとにした、多角的なアプローチで、その化学構造が予測されてきた¹⁰⁾。2019年には、コリバクチンが結合したDNA分子の構造解明を突破口に、コリバクチンの化学構造が示された (図1A)¹¹⁾。それによるとコリバクチンは、ほとんど対称的な構造の、左右に一つずつ、ふたつの求電子性のシクロプロパン構造をもつ化合物である。このシクロプロパンがDNA分子を攻撃し共有結合を形成することが示された (図1B)。ちなみに山菜のワラビが含む発がん物質として知られるブタキロシドもこのシクロプロパン構造をもっておりDNAと共有結合する¹²⁾。

2 コリバクチンの生合成

コリバクチンの生産を担う遺伝子群は、産生菌のゲノム上の1箇所、*pks* アイランドと名付けられた54 kbの領域に集積して存在している (図2)⁵⁾。ここには、ポリケチド^{※1}合成酵素 (polyketide synthetases, PKS) と非リボソームペプチド^{※2}合成酵素 (nonribosomal peptide synthetases, NRPS) などをコードする20近くの遺伝子 (*clbA* ~ *clbS*) がある。

不安定で反応性に富む化合物の生合成に際して、微生物はしばしば、安定で不活性な前駆体を合成し、これを必要に応じて高活性分子に変換する。コリバクチンも、おそらく産生菌自身のDNAを傷つけないために、ミリストイルアスパラギンを結合した不活性な前駆体「プレコリバクチン」として合成される¹³⁾。大腸菌は内膜と外膜をもつグラム陰性菌である。NRPS-PKS

※1 ポリケチド

微生物によって産生される複雑な天然物ファミリーで、抗菌・抗カビ・抗腫瘍作用などをもつ1万を超える化合物が知られている。その合成酵素は真核生物の脂肪酸合成酵素に似た多機能酵素タンパク質集団であり、延長/修飾ステップをくり返してポリケチドを伸長する。

※2 非リボソームペプチド

リボソームを経由せずに合成されるペプチドで、微生物の二次代謝産物に見出される。ポリケチド合成と同じように、延長/修飾ステップをくり返してペプチド鎖を伸長する。

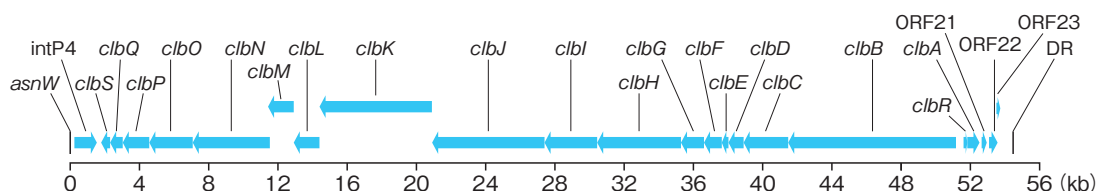


図2 コリバクチン生成遺伝子クラスター^{16) 27)}

酵素群が並ぶ酵素複合体の「製造ライン」によって細胞質で合成されたプレコリバクチンは、細胞内膜から膜間（ペリプラズム）に輸送され、ペリプラズムでペプチターゼCibPがミリストイルアスパラギンの「安全装置」を切り離し活性のあるコリバクチンとなった後、外膜から外界に放出されると考えられている^{13)~16)}。

3 コリバクチンのDNA損傷機構

前述したように、コリバクチンにはDNAを攻撃するシクロプロパン構造が2つあり、それぞれがアデニン塩基と共有結合してDNAクロスリンク（分子架橋）を形成する（図1B）¹¹⁾。また1箇所では結合したDNA付加体（モノアダクト）を生ずることも報告されている¹⁷⁾。コリバクチン結合によるDNAの不安定化や、DNA複製阻害などに起因すると思われるDNA二重鎖切断が、コリバクチンの感染した哺乳動物細胞で観察されている^{6) 7)}。また染色体異常や突然変異誘発も報告されている⁷⁾。Dziubańska-Kusibabらは、次世代シーケンサーをもちいて、コリバクチンによるDNA二重鎖切断は、**AAWTTT**（**W**は**A**もしくは**T**）の塩基配列の部位で起こることを明らかにした。さらに、がん細胞の全エキソンシーケンス・全ゲノムシーケンスデータベースと照合したところ、その配列に合致する**AAATTT**や**AAAATT**が、大腸がんを含む消化管がんが多くみつかると報告している⁹⁾。

4 大腸がん患者のコリバクチン産生菌保有率

pks アイランドをもつ細菌がヒト腸管内にどの程度みつかるかも調査されている。Arthurらは、健康者のコリバクチン産生菌保有率は21%であったのに対し、

大腸がん患者のコリバクチン産生菌保有率は67%であったことを報告している⁷⁾。またBucらも、健康者の保有率19%に対し、大腸がん患者では55%であることを明らかにした⁸⁾。

以上のことは、大腸発がんに対するコリバクチン産生菌の寄与を強く示唆している。

5 日本人大腸がん患者から単離したコリバクチン産生菌の遺伝毒性

ここまで紹介した研究は、ほとんどが欧州あるいは北米でおこなわれたものである。すでに述べたように腸内細菌叢は文化（食事や生活習慣など）や環境に依存する。そこでわれわれの研究グループは日本人の腸内細菌を対象に研究をおこなった。

日本人の大腸がん組織検体より数十株のコリバクチン産生菌を単離・培養し、コリバクチン産生量に相関すると考えられるミリストイルアスパラギン量を定量した。その結果、ある株（*E. coli*-50と命名）は既報のコリバクチン産生菌（Nissle1917株）と比較して20~30倍もの高産生量を示すことがわかった¹⁸⁾。

この*E. coli*-50株と、同じく高産生量を示す単離菌*E. coli*-253株の2つの株が、哺乳動物細胞に示す遺伝毒性について詳しく解析した¹⁹⁾。まず両株を、遺伝毒性試験によく使用されるチャイニーズハムスターCHO AA8細胞に接触（感染）させ、抗リン酸化ヒストン γ H2AX蛍光抗体でCHO AA8を染色した。 γ H2AXはDNA二重鎖切断惹起の指標である。CHO細胞の γ H2AX発現量をフローサイトメーターで測定したところ、MOI（multiplicity of infection：感染多重度、被感染1細胞あたりの感染菌数）=500~1,000の感染で蛍光強度がネガティブコントロール株（コリバクチン

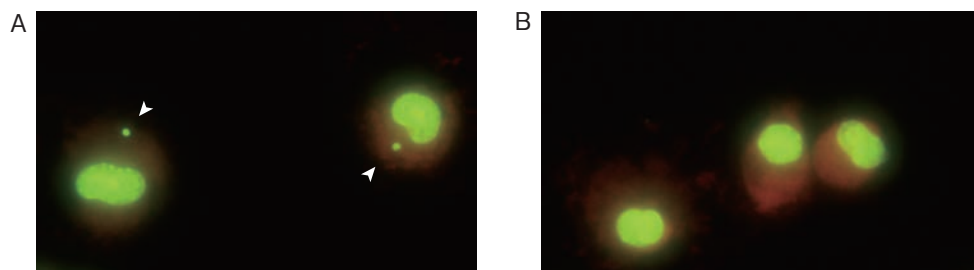


図3 コリバクチン産生菌が誘発する染色体切断

A) 日本人大腸がん患者より単離したコリバクチン産生菌 *E. coli*-50 株を感染させたチャイニーズハムスター細胞の核酸染色画像。細胞核の近傍に染色体断片が小さな核として見える (矢頭)。B) ネガティブコントロール (コリバクチン非産生) 株を感染させた細胞の染色画像。(文献 19 より引用)

非産生菌) の 2.2～3.3 倍 (*E. coli*-50 株感染時), 1.7～2.1 倍 (*E. coli*-253 株感染時) となり, DNA 損傷能を示すことを確認した。

次に, *umu* 試験によってこれら大腸菌の粗抽出物が DNA 損傷能をもっているか調べた。 *umu* 試験は, ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) の DNA 損傷修復機構の 1 つである SOS 応答の誘導量を測定することで, 被験物の DNA 損傷能を評価するバイオアッセイである。大腸菌溶菌液の可溶画分でネズミチフス菌を処理し, SOS 誘導量を定量した。その結果, *E. coli*-50 抽出物はネガティブコントロール株抽出物の 1.7 倍, *E. coli*-253 株倍は 1.6 倍の SOS 応答誘導が認められた。ポジティブコントロールの変異原物質 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) による 3.2 倍の誘導量にくらべると弱いものの, 大腸菌粗抽出画分も DNA 損傷能をもつことが確認できた。

両株とも DNA 損傷能をもつことがわかったため, 哺乳動物細胞に染色体異常を誘発するかを, 潜在的がん原性を短期間でスクリーニングする試験としてよく用いられている小核試験で評価した。この試験法は, 細胞分裂過程で染色体の切断あるいは不分離が起こると, DNA 断片あるいは少数の染色体が小さな核 (小核) としてとり残されるが, この小核保有細胞の出現頻度を測ることで被験物の染色体異常誘発能を評価するものである。CHO AA8 細胞に大腸菌を感染させた後, 核酸を染色して小核頻度を測定した。 *E. coli*-50 と 253 株ともに MOI = 1,000 の感染で, コリバクチン非産生のネガティブコントロール株に比べ 4～6 倍高頻度小

核保有細胞を出現させ, 両株は染色体異常誘発能をもっていることがわかった (図 3)。このように, 日本人大腸がん患者から単離された大腸菌株も遺伝毒性をもつことが示された。

6 理研 BRC 大腸菌のジェノタイピングと遺伝毒性

コリバクチン生合成遺伝子は自然界に広く分布しているらしいということもわかってきた。 *pks* アイランドは大腸菌 (系統群 B2) のほか, 肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*), シトロバクターコセリ (*Citrobacter koseri*) などといったヒト腸管常在菌⁵⁾²⁰⁾, 海綿やミツパチの共生菌, 植物病原菌の仲間のうちにも見出されている^{21)～23)}。そこで, 理化学研究所バイオリソース研究センター (理研 BRC) Japan Collection of Microorganisms (JCM) より購入した大腸菌 6 株について, 次世代シーケンサーや PCR で *pks* アイランドの有無を調べ, また CHO 細胞に対する遺伝毒性を評価した²⁴⁾。その結果, 6 株のうち 2 株が生合成遺伝子を保有, その 2 株のみ動物細胞に対し遺伝毒性を示し, 生合成遺伝子群と遺伝毒性の有無が一致することがわかった。

おわりに

最近, コリバクチンの化学構造や生合成経路の解明が進んだ。しかしながら, コリバクチンがどのように分泌され被感染細胞に送達されるのか, またコリバク

チン産生量と遺伝毒性の関係などはまだあまりわかっていない。実際、*E. coli*-50や253株のコリバクチン産生量はNissle1917株に比べ20～30倍高いものの、遺伝毒性（小核頻度）は逆にNissle1917株より低かった^{18) 19)}。

ちなみにこのNissle1917株はヨーロッパで潰瘍性大腸炎の治療に長年使用されているプロバイオティクス製剤である。コリバクチン産生菌が炎症治療効果をもつ機構も未解明である¹⁰⁾。

コリバクチンとヒト大腸がんの関係はまだ完全に解明されたとは言えない。日本におけるコリバクチン産生菌保有率は大腸がん患者と健常者で有意差がなかったという報告もある²⁵⁾。しかし本稿執筆中に、コリバクチン産生菌で処理したヒト大腸オルガノイドの全ゲノム解析で、コリバクチン特異的変異シグネチャーを明らかにし、そしてそれが実際に大腸がんゲノムで見つかることが報告された²⁶⁾。今後コリバクチンと大腸がんの因果関係、特に大腸発がんに対するコリバクチンの寄与率、また産生菌の感染ルートの解明などといった研究が進むと思われる。そしてがん予防のために、コリバクチン産生のない腸内細菌叢をつくる食生活や生活習慣の研究なども期待される。

文献

- 1) 「平成28年 全国がん登録 罹患数・率 報告」, 厚生労働省, 2016
- 2) 全国がんセンター協議会編, 「大腸がん—受診から診断, 治療, 経過観察への流れ」, 国立がん研究センターがん情報サービス, 2020 (https://ganjoho.jp/data/public/qa_links/brochure/odjrh3000000uj16-att/103.pdf)
- 3) 光岡知足「腸内細菌のはなし」, 岩波書店, 1978
- 4) 別冊 医学のあゆみ「腸内細菌と臨床医学」(安藤朗/編), 2018
- 5) Nougayrède JP, et al : Science, 313 : 848-851, 2006

- 6) Cuevas-Ramos G, et al : Proc Natl Acad Sci U S A, 107 : 11537-11542, 2010
- 7) Arthur JC, et al : Science, 338 : 120-123, 2012
- 8) Buc E, et al : PLoS One, 8 : e56964, 2013
- 9) Dziubańska-Kusibab PJ, et al : biorxiv, doi:10.1101/819854, 2019
- 10) 恒松雄太 : 有機合成化学協会誌, 76巻 5号 : pp490-493, 2018
- 11) Xue M, et al : Science, 365, doi:10.1126/science.aax2685, 2019
- 12) 山田静之他 : 蛋白質核酸酵素, 43 : 752-761, 1998
- 13) Pérez-Berezo T, et al : Nat Commun, 8 : 1314, 2017
- 14) Dubois D, et al : J Biol Chem, 286 : 35562-35570, 2011
- 15) Cougnoux A, et al : J Mol Biol, 424 : 203-214, 2012
- 16) Bossuet-Greif N, et al : Mol Microbiol, 99 : 897-908, 2016
- 17) Vizcaino MI & Crawford JM : Nat Chem, 7 : 411-417, 2015
- 18) Hirayama Y, et al : Org Lett, 21 : 4490-4494, 2019
- 19) Kawanishi M, et al : J Toxicol Sci, 44 : 871-876, 2019
- 20) Putze J, et al : Infect Immun, 77 : 4696-4703, 2009
- 21) Bondarev V, et al : Environ Microbiol, 15 : 2095-2113, 2013
- 22) Engel P, et al : Appl Environ Microbiol, 81 : 1502-1512, 2015
- 23) Moretti C, et al : Int J Syst Evol Microbiol, 61 : 2745-2752, 2011
- 24) Kawanishi M, et al : Genes Environ, 42 : 12, 2020
- 25) Shimpoh T, et al : Gut Pathog, 9 : 35, 2017
- 26) Pleguezuelos-Manzano C, et al : Nature, doi:10.1038/s41586-020-2080-8, 2020
- 27) Homburg S, et al : FEMS Microbiol Lett, 275 : 255-262, 2007

Profile

筆頭著者プロフィール

川西優喜 : 1994年, 京都大学工学部卒業, '98年京都大学大学院工学研究科博士後期課程修了, 日本学術振興会特別研究員などを経て, 現在大阪府立大学理学系研究科准教授。長らく化学物質の遺伝毒性を研究してきました。共著者の先生方に誘われて, 被験物質として細菌を扱うようになり, 世界がひろがりました。



自らの毒に対する防御策

pks アイランド中の遺伝子 *clbS* がコードするタンパク質は「中和抗体」で、コリバクチン分子と結合し、無毒化します¹⁶⁾。不活性なプレコリバクチンを生合成した後、ペリプラズムで活性コリバクチンを完成させるだけでなく、誤って菌体内に生じたり侵入した活性コリバクチン分子を不活化する、二段構えの自家中毒防止策です。自然界の巧妙さには舌を巻きます。(川西優喜)

column