

博士論文

消化管酵素トリプシンの分解に関与するヒト腸内常在細菌
の同定および分解メカニズムの解明に関する研究

渡辺 栄一郎

目次

要旨.....	1
1 序文.....	2
2 結果.....	9
3 考察.....	58
4 方法.....	67
略語一覧.....	87
謝辞.....	90
参考文献.....	91

要旨

大腸に残存するトリプシンは、潰瘍性大腸炎やクローン病として知られている炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease、以下、IBD)の発症や症状の増悪への関与が示唆されている。

本研究では、膵臓から分泌されるタンパク分解酵素であるトリプシンを分解する腸内細菌 *Paraprevotella clara* (パラプレボテラ クララ、以下、*P. clara*)を健常者の便検体から単離し、さらに、腸炎発症モデルマウスを使い、*P. clara*の投与が、トリプシンの残存に起因すると考えられる大腸炎に対して有効な治療法である可能性を示した。

1. 序文

ヒトの消化管には、約 100 兆個の腸内細菌が生息していると考えられている¹。これは、約 37 兆個のヒト体細胞よりも遥かに多くの腸内細菌が我々と共存し、腸内細菌叢を形成していることになる²。腸内細菌学が提唱されて以来、様々な研究が行われてきており³、近年の無菌動物を用いた研究により、腸内細菌叢が宿主免疫系の成熟や宿主の機能に対して様々な影響を与えていることが明らかになってきている。例えば、腸内細菌は、病原性微生物とニッチを競合することで病原性微生物の定着や増殖の抑制に貢献していること⁴、肥満のヒトの腸内細菌は *Bacteroidetes* が少なく、その便を移植された無菌マウスは体脂肪が増加すること⁵が挙げられる。加えて、培養した既知の細菌を無菌動物に投与するノトバイオート技術の普及により、腸内細菌叢の全体から個々の細菌種が、宿主の免疫系に与える詳細な研究も報告され始めている。例えば、健常者から単離された *Clostridia* 群の 17 菌株が、マウス大腸で制御性 T 細胞を誘導し、宿主の炎症を緩和する⁶。マウス小腸に生息するセグメント細菌が、小腸上皮に接着することで、強力に Th17 細胞を誘導する⁷。また、クローン病(Crohn 病、以下、CD)患者の唾液から単離された *Klebsiella pneumoniae* は、マウス大腸に異所性に定着することで強力に Th1 細胞を誘導し大腸炎を惹起する⁸。さらに、健常者の腸内

細菌由来の 11 菌株がマウス大腸で IFN γ 産生 CD8 T 細胞を誘導し、抗腫瘍効果を発揮する⁹。

このように、腸内細菌が宿主免疫系に与える影響を検討する研究は、今尚、多く報告される一方で、便中に存在するタンパク質に着目し、個々の腸内細菌が便中に存在するタンパク質自体に与える影響を検討した研究は少ない¹⁰。

そこで、細胞、組織、体液に含まれるタンパク質を網羅的に検出でき、近年、急速に発展しつつあるプロテオーム解析技術¹¹に着目し、研究が進められ始めている糞便プロテオーム解析技術¹²⁻¹⁵を構築し、糞便中に存在するタンパク質の詳細を明らかにする事を試みた。

著者が所属する理化学研究所・生命医科学研究センターのプロテオミクス専門部門である統合ゲノミクス研究グループ・小原収チームリーダー及び川島祐介研究員と協働して糞便プロテオーム解析の実験系を立ち上げる事から本研究を開始した。糞便プロテオーム解析の実験系は、糞便中の多種多様な夾雑物や糞便の粘度の高さ等の質量分析計に持ち込むサンプル調整の問題、特殊なサンプルを使った質量分析計の実操作の問題、解析結果の解釈に関する問題等が障壁になった。それでも、約 1 年の歳月を経て、糞便プロテオーム解析技術を構築するに至った。

次に、糞便プロテオーム解析技術を用いて、腸内細菌の有無が、糞便中のタン

パク質の組成に与える影響を検討した。理化学研究所・横浜研究所の SPF 環境下で維持・繁殖された SPF マウスと、同施設内の無菌アイソレーター内で維持・繁殖され、腸内細菌、ウイルス、真菌などが排除された無菌マウス(Germ-free マウス、以下、GF マウス)の盲腸内容物について、プロテオーム解析を行った。その結果、713 種の宿主由来タンパク質が検出できた。

盲腸内容物を使ったプロテオーム解析で得られた 713 種の宿主由来タンパク質の結果を詳細に検討すると、盲腸内容物中には、唾液腺、肝臓、膵臓、小腸、大腸などの消化管臓器に由来するタンパク質が多く、糖質分解酵素、タンパク分解酵素、脂質分解酵素などの消化管酵素が存在していることがわかった。一方で、プロテオーム解析技術は、サンプル中に含まれるタンパク質の網羅的検出には優れるが、タンパク質の形状やそれ自体が有する酵素活性などの機能評価は困難である。それ故に、プロテオーム解析によって、糞便中に検出されたタンパク質が、それ自身の機能を有するか否かの検討は重要である。

腸内細菌と糞便中に含まれる消化管酵素の関係については、以前から、無菌動物の糞便中には、膵臓から分泌されるタンパク分解酵素のトリプシン^{16,17}が、その酵素活性を維持した状態で存在していることが知られていた。最近では、炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease、以下、IBD)、特に CD 患者の便中には、トリプシンがその活性を維持したままの状態が存在する事を示す報

告があり、大腸に残存するトリプシンと IBD の発症や症状増悪との関連が示唆され始めている¹⁸⁻²²。また、腸炎発症モデルマウスのひとつとして知られている IL-10 遺伝子欠損マウス(以下、IL10^{-/-}マウス)を使い、抗生物質投与による腸内細菌叢の乱れ(以下、Dysbiosis)に随伴する大腸のプロテアーゼ活性残存が、大腸炎を惹起することを示す報告があり²³、大腸に残存するトリプシンと腸炎発症の関連の検討も必要である。

IBD は、主として消化管に対して慢性的な炎症をおこす疾患の総称で、潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis、以下、UC)と CD が代表疾患として知られている。UC は主として病変部位が大腸に局限し、肛門から連続する表層粘膜病変と出血を伴う下痢が特徴的である。一方、CD は、口腔から肛門までの全消化管に非連続性に発症しうる慢性肉芽腫性病変を主体とし、その炎症は、消化管壁全層に広がり、症状の増悪に伴って瘻孔や消化管穿孔などを伴うことが知られている。これら IBD の原因は、今尚、不明な部分が多いが、遺伝的素因を背景にして、腸管免疫系に対する腸内細菌の持続作用が複雑に影響する腸管の慢性炎症状態と考えられている²⁴⁻²⁶。

IBD に関連する遺伝的素因は、UC よりも CD の方が多いとされており²⁷、interleukin-23 receptor (IL23R)、 interleukin-12B, p40 subunit (IL12B)に関連する遺伝子変異が CD の病態に関与していることが genome wide association

study(GWAS)で明らかにされた²⁸。また、CDに関連をもつ他の遺伝子異常については、欧米で nucleotide-binding oligomerization domain 2(NOD2) 及び autophagy-related, 16-like (ATG16L1)の関与も知られているが、GWAS で得られた疾患感受性遺伝子は、欧米と東アジア地域では大きく異なり、IL23R や NOD2 遺伝子の一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNP)は東アジアでは検出されなかった²⁹。さらに、UCに関連をもつ遺伝子異常としては、interleukin-10(IL10)³⁰ 及び interferon- γ (IFN γ)³¹の異常が知られている。

一方、IBD と腸内細菌の関係は、小児期での抗生物質使用に伴う IBD 発症の増加³²や抗生物質投与に伴う IBD 患者の症状改善³³、ヒトの腸内細菌の大きな構成要素として知られる *Bacteroides* 属が IBD 患者で減少していること¹⁹など、IBD と腸内細菌の関連を示唆する臨床研究が多くある。加えて、マウスを使った研究においては、腸炎発症モデルマウスの腸炎発症には腸内細菌の関与が必要であること³⁴、腸炎発症モデルマウスとして知られる IL10^{-/-}マウスは、SPF 環境下では大腸炎を自然発症するが無菌状態では発症しないこと³⁵⁻³⁷、また、特定の細菌種が IL10^{-/-}マウスにおいて大腸炎を誘導する³⁸など、IBD と腸内細菌の関連を示唆する報告が多数ある。

このように、IBD の発症と症状の増悪に関しては、遺伝的素因や腸内細菌が大きな影響を及ぼしていると考えられるが、ウイルスなどの環境因子さらには

自然免疫系を主とした宿主免疫の不均衡などが複雑に絡みあっていると考えられており、IBD の病因は未だ明らかにされてはいない。

IBD の治療は、その病因が明らかではないため、対症的な治療が主となってきた。副腎皮質ステロイドは、IBD に対する対症的治療薬のひとつであるが、ステロイド単剤投与では、多くの CD 患者がステロイド依存ないし抵抗性に進むことが知られており、IBD に対する有効な治療法とは言えない^{39,40}。一方で、以前から、IBD 患者の腸管上皮や血清では、Tumor necrosis factor- α (TNF- α)が上昇していることが知られ、infliximab などの抗 TNF- α モノクローナル抗体が IBD の治療薬として効果を発揮することが明らかにされてきた⁴¹⁻⁴³。しかしながら、CD 患者の中には、抗 TNF- α モノクローナル抗体無効例やその副作用による治療継続困難例が少なからず存在するため、新たな治療法の開発が必要とされている。それ故に、腸内細菌と IBD の関係に着目し、健常人の便を投与する糞便移植(Fecal Microbiome Transplantation: FMT)⁴⁴や制御性 T 細胞を誘導する *Clostridia* 群の 17 菌株投与⁶など、腸内細菌が IBD に対する新規治療法として注目を集めている。

IBD とトリプシンに関連するこれまでの報告¹⁸⁻²²に加え、著者らが実施したマウス盲腸内容物のプロテオーム解析の結果から、腸内細菌が存在しない無菌マウスの大腸には、トリプシンが残存している事を確認できた。また、健常者

に比べて、CD 患者の便中では、トリプシン活性が高いとする報告^{18,19}があることから、ヒト大腸での異常なトリプシンの残存は、IBD の発症やその症状の増悪に関与している可能性がある。さらには、健康なヒトの便中にはトリプシン活性を消失させる何らかの腸内細菌種が存在する可能性が高いと考える。

以上より、トリプシン活性を消失させる腸内細菌を同定し単離することができれば、IBD に対する新たな治療戦略として、トリプシン活性を消失させる腸内細菌株カクテル療法の開発に繋がることを期待できると考え、本研究を行った。

2. 結果

2.1 無菌マウスの便中にはトリプシンが多い

理化学研究所で維持された SPF マウス(以下、理研・SPF マウス)と GF マウスの盲腸内容物の網羅的タンパク質解析(shotgun proteomics、以下、プロテオーム解析)を行った。その結果、713 種の宿主由来タンパク質が検出され、そのうち 45 種のタンパク質が GF マウスの盲腸内容物中に有意に多く存在していた(図 1)。これらの中で、理研・SPF マウスに比べて、GF マウスの盲腸内容物に顕著に多く存在し、IBD、特に CD の発症と症状増悪との関連が示唆されているが、未だ解決に至らない、タンパク分解酵素のトリプシン(Anionic trypsin-2: PRSS2)に着目した¹⁸⁻²²。

理研・SPF マウス及び GF マウスの、便中のトリプシンの活性測定及びウェスタン・ブロッティング(Western blotting、以下、WB)に基づくタンパク質量の評価を行った。トリプシン活性は、理研・SPF マウスと比較して、GF マウスにおいて有意に高かった(図 2A)。また、トリプシンのタンパク質量は、GF マウスで多かった(図 2B)。さらに、理研・SPF マウス及び GF マウスの遠位大腸の腸管断面を、免疫組織化学染色して観察したところ、GF マウスにはトリプシンが多量に存在していた(図 2C)。

以上より、理研・SPF マウスと比較して、GF マウスの盲腸以遠の大腸内容物

中には、トリプシンが活性状態で存在する事が判明した。

2.2 炎症性腸疾患と炎症モデルマウスの便中にはトリプシンが多い

本邦の UC 及び CD に罹患する IBD 患者の便検体について、トリプシンの活性測定及びそのタンパク質量の評価を行った。比較対象として、本邦の健常ボランティアの便検体を評価した。その結果、健常者の便と比較して、UC や CD の患者の便には、有意に多くのトリプシンが認められた(図 3A、図 3B、表 1)。また、IL10^{-/-}マウスの炎症時の便中トリプシン活性を評価したところ、IL10^{+/-}マウスの便中のトリプシン活性と比較して、有意にトリプシン活性が高かった(図 3C)。

腸管の炎症病態下の状態では、消化管通過時間の短縮の影響で、トリプシンを含めた小腸内溶液の大腸への移送や体外への排出が短時間で起こり、その結果として大腸以遠でのトリプシン活性の上昇を認めることが考えられる⁴⁵。しかしながら、本研究で使用した IBD 患者の臨床背景を検討すると、重症度が低く消化管通過時間への影響が少ないと考えられる症例の便検体の中には、便中のトリプシン活性が高い症例も認められた。このように、IBD 患者においては、消化管通過時間が正常な場合であっても、大腸での異常なトリプシン活性の残存が認められていると考えられる。

大腸に残存するトリプシンは、IBD の発症やその病態の増悪への関与の可能性が報告されている¹⁸⁻²²。上述の一連の結果は、既報を支持するものである。

2.3 GF マウスでは盲腸以遠にトリプシンが残存する

消化管内の部位別のトリプシン活性を、理研・SPF マウスと GF マウスについて比較した。小腸では、両者に有意差は認められなかったが、盲腸以遠では、GF マウスの方が有意に高かった(図 4)。また、トリプシンの分泌を主に担う膵臓組織におけるトリプシン前駆体・トリプシノーゲン(PRSS2)の分泌量及び発現量を WB(図 5A、図 5B)及び qRT-PCR(図 5C)で確認したところ、両者に有意差は認められなかった。

無菌動物では、腸内細菌が担う正常な消化管蠕動運動が乏しくなり、内容物の消化管通過時間が長くなることが知られている^{46,47}。消化管通過時間が GF マウスよりも短い SPF マウスにおいて、盲腸以遠のトリプシン活性が圧倒的に低くなる現象は、宿主の消化管運動などの生理学的な現象の影響というよりも、盲腸以遠に定着している腸内細菌の作用による影響と考えられる。

以上から、GF マウスの盲腸以遠におけるトリプシン活性の亢進は、膵臓組織から正常に分泌されたトリプシンの、異常な残存に起因すると考えられる。その要員のひとつとして、盲腸以遠に定着する腸内細菌の関与が考えられる。つま

り、理研・SPF マウスでは、盲腸以遠に定着した腸内細菌がトリプシンを減少させる機能を司り、GF マウスでは、腸内細菌が存在しないためにトリプシンが残存すると考えられる。

2.4 マウスの盲腸以遠の腸内細菌叢がそのトリプシン活性に影響を与える

SPF マウスの腸内細菌叢は、飼育施設毎に特有に維持されている事が知られている。そこで、盲腸以遠に定着した腸内細菌とそのトリプシン活性の関連性を評価するため、異なる飼育施設に由来する SPF マウスについて、盲腸内容物中のトリプシン活性とその菌叢を評価した。理研・SPF マウスと、日本エスエルシー株式会社、日本チャールズ・リバー株式会社、及び日本クレア株式会社で維持された SPF マウス(以下、SLC・SPF マウス、Charles・SPF マウス及び Clea・SPF マウス)を比較した。盲腸内容物中のトリプシン活性については、理研・SPF マウス及び SLC・SPF マウスは同等に低い水準であり、Charles・SPF 及び Clea・SPF マウスは前者 2 施設のマウスと比較して有意に高かった(図 6A)。腸内細菌叢については、理研・SPF マウス及び SLC・SPF マウスの 2 群と、Charles・SPF マウス及び Clea・SPF マウスの 2 群間において、その類似性を比較し視覚化できる UniFrac-PCoA⁴⁸ 上での顕著な差が認められた(図 6B)。

以上から、飼育環境の違いに伴う腸内細菌叢の違いが、盲腸以遠のトリプシン

活性に影響を与える事、さらに、特定の腸内細菌種が、トリプシン活性を低下させる可能性が示唆された。

2.5 健常者の腸内細菌がマウスのトリプシン活性を低下させる

前節 2.1 から 2.4 までの検討から、マウスにおいて、大腸の炎症への関与が疑われる盲腸以遠のトリプシン活性を、特定の腸内細菌種が低下させる可能性が示唆された。この仮説に基づけば、特定の腸内細菌種を盲腸以遠に定着させる事で、大腸の炎症の緩和が期待できる。そこで、将来的な臨床応用を想定し、ヒト由来の腸内細菌を用いて、マウス大腸でのトリプシン活性の低下について検討した。

本邦の健常なヒトの便検体(Donor A~Donor F)を GF マウスに経口的に胃内投与して、Human microbiota-associated mice(以下、ヒト菌叢模倣マウス)(A~F)を作出し、投与後 3 週間後にマウス便中のトリプシン活性を評価した。その結果、ヒト菌叢模倣マウス B を除いて、マウス便中のトリプシン活性は、低い水準であった(図 7)。この事から、マウスの大腸以遠において、トリプシン活性を低下させる、ヒト由来の腸内細菌種が存在する事が判った。

2.6 アンピシリン耐性の腸内細菌がマウスのトリプシン活性を低下させる

前節 2.5 の検討において特に低いトリプシン活性を示した健常者ボランティア C の便について、盲腸以遠のトリプシン活性を低下させる細菌種の探索を行った。健常者ボランティア C の便を GF マウスに経口的に胃内投与し、その 24 時間後から、抗生物質のアンピシリン(Amp)、タイロシン(Tylosin)、あるいはメトロニダゾール(MNZ)を自由飲水により投与した。その結果、抗生物質非投与群及びアンピシリン投与群では、便の投与前と比較して、便中のトリプシン活性が顕著に低下した。一方で、タイロシン投与群及びメトロニダゾール投与群では、便中のトリプシン活性は高く維持された(図 8)。以上の結果から、トリプシン活性を低下させる腸内細菌種はアンピシリンに耐性で、タイロシン及びメトロニダゾールに感受性の菌種と判明した。

2.7 健常者の便由来の 35 菌株は、マウス便中トリプシン活性を低下させる

続いて、アンピシリン投与群の中で最もトリプシン活性が低下した個体の盲腸内容物を、嫌気チャンバー内にて異なる組成の培地中で培養し、計 432 個のコロニーを得た。16S rRNA 解析に基づく菌株照合の結果、Donor C 便に由来するヒト腸内細菌 35 菌株が単離されたことが確認できた(図 9)。

単離した 35 菌株は、Donor C の便の腸内細菌叢を構成する菌種の約 80%を

占めることから、GF マウスに投与する事で、Donor C の腸内に類似する腸内環境が形成されると期待できる。そこで、この 35 菌株を個別培養して混合した菌液(以下、35-mix)を GF マウスに経口的に胃内投与し、盲腸以遠のトリプシン活性を経時的に評価した。35-mix 投与 2 日後には、便中のトリプシン活性値は有意に低下した(図 10A)。投与 9 日目においても、便中のトリプシン活性値とトリプシンのタンパク質量は低い水準で維持されていた(図 10B、図 10C)。

以上の結果から、35-mix を投与すると、マウスの盲腸以遠におけるトリプシン活性が低下すると判った。

2.8 健常者の便検体から単離した 14 菌株は、マウス便中トリプシン活性を低下させる

トリプシン活性を低下させる機能を有する 35 菌株のうち、その機能を司る責任菌の同定を行った。

前節 2.6 の、各種抗生物質を投与しながら健常者ボランティア Donor C の便検体由来の菌を GF マウスに定着させる検討において、抗生物質投与 12 日後の、16S rRNA 解析に基づく腸内細菌の相対占有率と便中トリプシン活性値の Spearman 順位相関解析を行った。その結果、11 菌株が便中のトリプシン活性とその相対占有率が正に相関(Positively correlated with Trypsin activity)し、24 菌

株が負に相関(Negatively correlated with Trypsin activity)していた(図 11)。

本解析に基づけば、便中のトリプシン活性とその相対占有率が負に相関する 24 菌株中に、責任菌が含まれると類推できる。そこで、24 菌株を統計学的に解析し、便中のトリプシン活性とその相対占有率が負に強く相関する 14 菌株($p < 0.3$)に着目した。その 14 菌株を個別培養して混合した菌液(以下、14-mix)及び残りの 21 菌株を個別培養して混合した菌液(以下、21-mix)を、GF マウスに経口的に胃内投与し、便中のトリプシン活性及びそのタンパク質量を評価した。その結果、14-mix 投与群では、便中のトリプシン活性は有意に低下し(図 12)、トリプシンのタンパク質量は WB の検出限界以下に減少していた(図 13)。一方で、21-mix 投与群では、便中のトリプシン活性は有意に上昇していた(図 12)。

以上の結果から、責任菌は該 14 菌株中に含まれる事が示唆された。

2.9 健常者の便検体から単離した 9 菌株は、マウス便中トリプシン活性を低下

させる

前節 2.8 にて示されたトリプシン活性を低下させる 14 菌株から、更に責任菌の絞り込みを行った。前節 2.8 の Spearman 順位相関解析において、便中のトリプシン活性と負の相関を示した 14 菌株のうち、特に相関係数の有意確率が $p < 0.05$ の 9 菌株に着目した(図 11)。該 9 菌株を個別培養して混合した菌液(以

下、9-mix)を、GF マウスに経口的に胃内投与し、便中のトリプシン活性及びそのタンパク質量を評価した。その結果、14-mix 投与の場合と同様に、9-mix 投与群においても、便中のトリプシン活性は有意に低下し(図 13A)、トリプシンのタンパク質量は WB の検出限界以下に減少していた(図 13B)。

以上の結果から、責任菌は該 9 菌株中に含まれる事が示唆された。

2.10 健常者の便検体より単離した 3 菌株はマウス便中トリプシン活性を低下させる

前節 2.9 までに絞り込んだ 9 菌株は、*Bacteroides* 属の 3 菌株を含む群と非 *Bacteroides* 属の 6 菌株に分類できる。トリプシン活性を低下させる機能が系統的に保存されていると仮定する場合、責任菌はいずれか一方の群にのみ含まれると考えられる⁹。そこで、前節 2.9 の検討と同様に、*Bacteroides* 属を投与した群(以下、3-mix 投与群)及び非 *Bacteroides* を投与した群(以下、6-mix 投与群)について評価した(図 14A)。3-mix 投与群では、便中のトリプシン活性は有意に低下し、6-mix 投与群では減少しなかった(図 14B、図 14C)。

以上の結果から、責任菌は該 3 菌株中に含まれる事が示唆された。

2.11 健常者の便検体より単離した *Paraprevotella clara* は、マウス由来の

トリプシン量を低下させる

責任菌の更なる絞り込みを目的として、*in vitro* にてトリプシンと単培養した菌を共存させ、トリプシンのタンパク質量の変化を評価した。

まず、嫌気チャンバー内において、His-tag 修飾されたリコンビナントのマウストリプシンと、前節 2.10 までに責任菌の候補と論じた 9-mix、6-mix あるいは 3-mix を共培養し、12 時間後の培養液中のトリプシンのタンパク質量を評価した(図 15A)。その結果、9-mix あるいは 3-mix との共培養では、トリプシンの減少が認められ、6-mix との共培養では認められなかった(図 15B)。この結果は、前節 2.10 までに実施した、*in vivo* での責任菌の絞り込み検討の結果と合致する。つまり、この *in vitro* の評価法は、責任菌の更なる絞り込みに有効と考えられる。加えて、この *in vitro* の評価の結果が、前節 2.10 までの *in vivo* の評価の結果と合致することは、トリプシン活性の低下の機構には、*P. clara* が関与している事を示唆している。

続いて、9-mix を構成する各菌を単菌毎にトリプシンと共培養し、同様に評価した。その結果、3-mix を構成する *P. clara* 1C4 株と共培養した場合においてのみ、トリプシンのタンパク質量の減少が認められた(図 15B)。

以上、これまでの一連の評価結果から、Donor C の便検体に由来する *P. clara*

1C4 株が、マウスのトリプシンのタンパク質量を減少させる責任菌であることが判った。

2.12 *Paraprevotella clara* は、ヒトのトリプシンのタンパク質量を減少させる健常者の便検体から単離した *P. clara* 1C4 株がマウスのトリプシンのタンパク質量を減少させる事を、*in vitro* で実証した。そこで、前節 2.11 の *in vitro* 実験系をヒトのトリプシンに適用し、その機能の有効性を検証した。嫌気チャンバー内において、単培養した *P. clara* 1C4 株とリコンビナントのヒトトリプシンを共培養し、12 時間後のトリプシン量を WB により評価した。その結果、*P. clara* 1C4 株と共培養した場合にのみ、ヒトトリプシンのタンパク質量の減少が認められた(図 16)。

以上の結果から、健常者の便検体から単離した *P. clara* 1C4 株は、ヒトのトリプシンのタンパク質量を減少させることが判明した。

2.13 *Paraprevotella clara* の腸内への定着には、サポーター菌が必要である責任菌と同定された *P. clara* 1C4 株が、それ単菌のみで、マウスの大腸内のトリプシン活性を低下させる可能性を検討した(図 17A、図 17B)。 *P. clara* 1C4 株単菌の培養液を、前節 2.12 までの検討と同様にして投与し、14 日後の *P. clara*

1C4 株の大腸内への定着量を、qRT-PCR により評価した。その結果、3-mix を投与した場合と比較して、*P. clara* 1C4 株の検出量は有意に低かった(図 17C)。

以上の結果から、*P. clara* 1C4 株は、単菌では、大腸における定着は弱く、便中のトリプシン活性を下げるに至らないことが判明した。

腸内細菌の生育には、特殊な代謝産物や糖などの栄養素が必要となる事が知られている^{49,50}。*P. clara* 1C4 株の in vivo での定着には、宿主の腸内環境だけでは不十分で、共生する *Parabacteroides merdae* (1D4)や *Bacteroides uniformis* (3H3) が産生する何らかの物質が必要であると考ええる。

2.14 トリプシン活性を低下させる細菌カクテル投与により大腸組織の炎症が抑制される

大腸に残存するトリプシンは、前節 2.2 にて述べたように、IBD の発症やその病態の増悪への関与の可能性が報告されている¹⁸⁻²²。そこで、大腸炎モデルマウスを用いて、同定した *P. clara* のトリプシン活性を低下させる効果に基づく、炎症の緩和の可能性を検討した。

大腸炎モデルマウスには、IL10^{-/-}腸炎発症モデルを選択し、IL10^{-/-}マウス個体を無菌化したのち、UC 患者の便中から単離された腸炎誘導菌である *Enterobacter aerogenes* (11E12 株)を感染させたモデルを適用した⁸。

トリプシン活性を低下させる 3-mix、あるいは トリプシン活性の低下に関与しない 6-mix を、IL10^{-/-}GF マウスに経口的に胃内投与し、その 7 日後に 11E12 株単菌の培養液を同様に投与して大腸炎を誘導した(図 18A)。投与は各々1 回のみ行い、投与 3 週間後までに誘導された炎症の程度を、炎症時の組織で、好中球や上皮細胞から産生され、腸管の炎症マーカーとしても知られている便中リポカリン濃度⁵¹と、大腸の組織学的観察に基づく炎症スコア⁸により評価した。その結果、3-mix 投与群では、6-mix 投与群と比較して、便中リポカリン濃度が低い傾向であった。また、組織学的には、3-mix 投与群では、6-mix 投与群や 11E12 単独投与群と比較して、粘膜組織構造は比較的よく保たれ、組織への炎症細胞の浸潤は少なく、組織学的炎症スコアは有意に低かった(図 18E、図 18F、表 2)。

以上の検討結果から、トリプシン活性を低下させる 3-mix 群を投与すると、11E12 に起因した大腸組織の炎症が抑制される事が判った。

2.15 *Paraprevotella clara* は、CD 患者の便中には少ない

前節 2.11 及び 2.12 で実施した実験結果から、*P. clara* は、マウス及びヒトのトリプシンのタンパク質量を減少させる腸内細菌のひとつであることが判った。また、前節 2.14 において、*P. clara* が大腸炎モデルマウスの炎症を緩和する可能性が示唆された。そこで、ヒト便中の細菌叢 DNA シーケンス情報を網羅的に

検出できるメタゲノム解析技術⁵²を利用して、本邦の健常者と IBD 患者の便検体に存在する *P. clara* の相対組成比を検討した。その結果、健常者に比べて、CD 患者の便中には、*P. clara* が有意に減少していることが判明した。これは、CD 患者の便中には、トリプシンが多く残存することを示した前節 2.2 の結果と既報^{18,19}を支持する。

以上の結果から、CD 患者の便中には、トリプシン量の減少に働く *P. clara* の存在量が少ないことが判明した(図 19)。

2.16 *Paraprevotella* 属は、トリプシン量を低下させる

P. clara 1C4 株に認められたトリプシン活性を低下させる機能の、類縁菌株における保存性を評価した。*P. clara* 1C4 株と同様に Donor C から単離され、単離培養工程で別のコロニーに由来した *P. clara* 1F6 株、2C7 株、2D11 株、2G11 株、理化学研究所バイオリソース研究センター(RIKEN BRC)微生物材料開発室より入手した *P. clara* JCM 14859 株(以下、JCM 株)、及び 2019 年 1 月時点の系統樹分類にて *Paraprevotella* 属に属する 2 種のうちのもう一方に該当する *Paraprevotella xylaniphila* (パラプレボテラ キシラニフィラ、以下、*P. xylaniphila*) JCM 14860 株について、*in vitro* でのトリプシン量の低減能を検証した。マウスの盲腸内容物に由来するトリプシン溶液を、各菌の培養液と混合し

て、嫌気条件で12時間インキュベートしたのち、WBによりトリプシンのタンパク質量を評価した。その結果、いずれの *Paraprevotella* 株と混合した場合においても、トリプシンのタンパク質量はWBの検出限界以下であった(図20)。

以上の結果から、2019年1月時点の系統樹分類にて *Paraprevotella* 属に分類される菌種は、マウス由来のトリプシンのタンパク質量を低下させることが判った。

2.17 *Paraprevotella clara* の菌体が、トリプシン量の低減には必要である

P. clara がトリプシンのタンパク質量を減少させる機構を検討した。嫌気チャンバー内で、*P. clara* 1C4株の培養液を0.22 μm 、0.45 μm 及び5.0 μm のフィルターで処置した後、その濾液をトリプシンが含まれるGFマウスの盲腸内容物と混合し、3時間インキュベートした。*P. clara* は、1.0-2.0 μm 径程度の桿菌⁵³であることから、0.22 μm 、0.45 μm のフィルターで処理した場合の濾液には、原理上、菌体は含まれず、トリプシンを含むGFマウスの盲腸内容物の成分、培地成分、及び菌からの分泌成分のみが含まれると考えられる。インキュベートした濾液のトリプシンのタンパク質量をWBで測定したところ、0.22 μm 及び0.45 μm のフィルターで処理した濾液に含まれる量は、菌体と混合していない場合と同等であったのに対して、5.0 μm のフィルター処理した濾液に含まれる

量は、WB の検出限界以下であった(図 21)。

以上から、トリプシン量を減量させる機構は、*P. clara* からの分泌成分のみでは不十分であり、少なくとも *P. clara* の菌体そのものが必要である事が判明した。

2.18 *Paraprevotella clara* 由来のプロテアーゼがトリプシンを分解する

標的タンパク質の量を特異的に減少させる機構の有力な候補として、プロテアーゼによる分解が挙げられる。そこで、プロテアーゼ阻害剤によりトリプシンのタンパク質量の減少が抑制される可能性を検証した。*P. clara* 1C4 株の培養液に、予めプロテアーゼ阻害剤のカクテルを作用させ、トリプシンを含む GF マウスの盲腸内容物と混合したところ、WB におけるタンパク質量の減少は認められなかった(図 22)。また、特に金属プロテアーゼの阻害剤である EDTA を単独で作用させた場合においても、タンパク質量の減少が抑制された(図 23)。以上より、*P. clara* 1C4 株に由来するプロテアーゼがトリプシンのタンパク質量の減少に関与する事が示唆された。

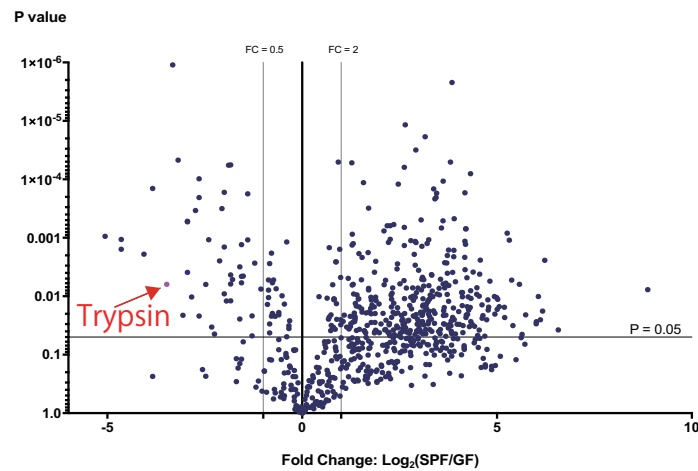
続いて、*P. clara* 1C4 株に由来するプロテアーゼが、直接的にトリプシンを分解する可能性を検証した。*P. clara* 1C4 株の培養液と、トリプシンを含む GF マウスの盲腸内容物と混合し、経時的に混合物中のトリプシンのタンパク質量及

びそのタンパク質の断片を検出した。WB によるトリプシンのタンパク質量の評価では、混合開始から 2~4 時間後において、経時的なトリプシンのタンパク質量の減少が認められた(図 24A)。一方で、ペプチドーム解析によるタンパク質の断片の検出では、同じ時間軸においてトリプシンに由来するペプチド断片の数が増加した(図 24C)。

以上の結果から、トリプシンのタンパク質量の減少は、プロテアーゼによる直接的な分解に起因すると考えられた。

前節 2.16 及び 2.17 で実施した一連の検討結果から、*P. clara* によるトリプシン活性の減少の機構は、*P. clara* が有する非分泌型プロテアーゼによる直接的なトリプシンの分解に基づき、本機構に関与するプロテアーゼの少なくとも一つは、金属プロテアーゼであることが示唆された。

A



B

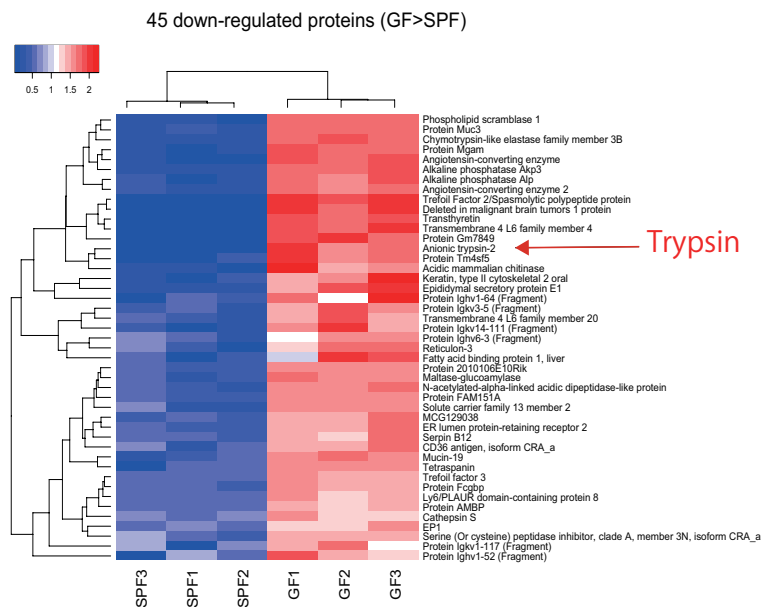


図 1 SPF マウス(n=3)と GF マウス(n=3)の盲腸内容物のプロテオーム解析 (C57BL/6N・12 週齢・雄、n は実験に使用したマウス数を表す)

(A)同定された 713 種の宿主由来タンパク質の発現比の Volcano プロット(横軸：タンパク質発現比、縦軸：統計学的信頼度)。注釈のタンパク質は、Anionic trypsin-2(PRSS2)を示す。

(B)GF マウスの盲腸内容物に顕著に多く検出された 45 種の、各相対定量値のヒートマップ($p < 0.05$ 、Fold Change ≥ 2.0)。タンパク質の系統樹は、プロテオーム解析シグナルの相対検出量の類似性を表す。注釈したタンパク質は、Anionic trypsin-2(PRSS2)を示す。

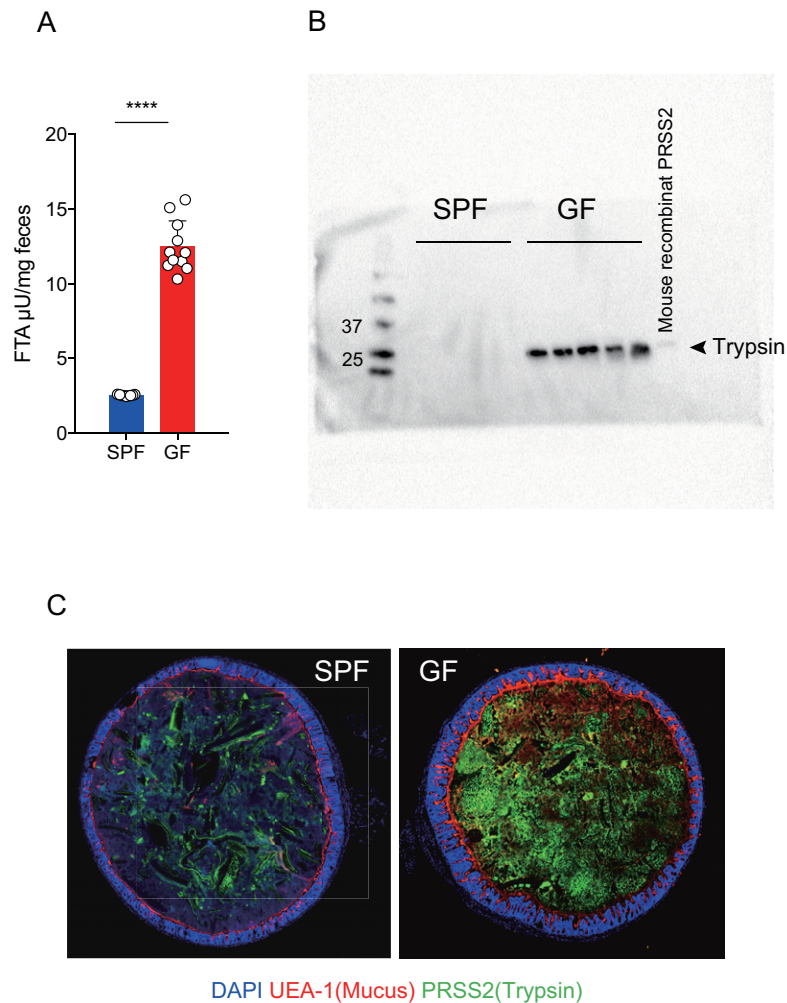


図 2 SPF マウスと GF マウスの便中のトリプシンの活性とそのタンパク質量の比較(n は実験に使用したマウス数を表す)

- (A) SPF マウス(n=9)及び GF マウス(n=11)の便中トリプシン活性値: SPF マウスの便中のトリプシン活性は GF マウスと比較して有意に低かった(**** Mann-Whitney test $p < 0.0001$)。FTA(Fecal trypsin activity)は、糞便中に含まれるトリプシンの活性の程度を表す。 $\mu\text{U/mg feces}$ は、 25°C の状態では 1 分間に基質を切断し、 1.0pmol の p-nitroaniline を生じる糞便 1.0mg に含まれるトリプシン量を示す。
- (B) SPF マウス(n=5)及び GF マウス(n=5)のトリプシンの WB 像: SPF マウスの便中のトリプシン量は検出限界以下であった。
- (C) SPF マウスと GF マウスの遠位大腸の免疫組織化学染色像。青色は DAPI 染色された動物組織の核を、赤色は主に粘膜に存在する UEA-1 レクチンを、緑色はマウスのトリプシンを表す。: GF マウスの大腸内容物には、SPF マウスの場合と比較してトリプシンの量が多かった。

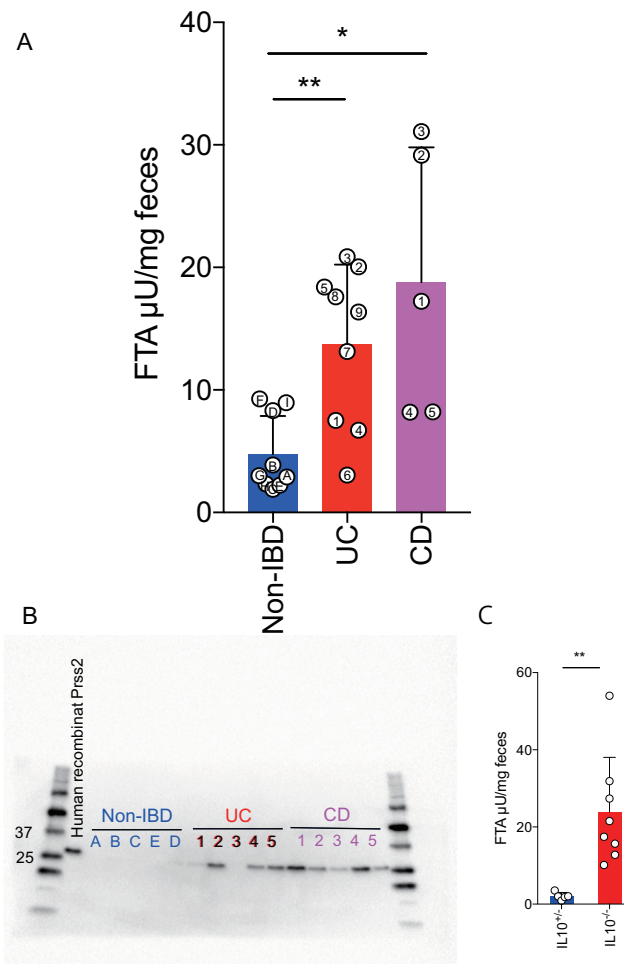


図3 健常者とIBD患者、あるいはIL10遺伝子のヘテロ欠損(IL10^{+/-})マウスとホモ欠損(IL10^{-/-})マウスの便中のトリプシン活性とそのタンパク質量の比較 (nは実験に使用したサンプル数を表す)

- (A) 健常者(Non-IBD: n=9)、UC患者(UC: n=9)及びクローン病患者(Crohn: n=5)の便中のトリプシン活性値: IBD患者の便中のトリプシン活性値は、健常者と比較して有意に高かった(* Mann-Whitney test $p=0.029$ 、** Mann-Whitney test $p=0.0056$)。
- (B) 健常者(Non-IBD: n=5)、UC患者(UC: n=5)及びクローン病患者(Crohn: n=5)の便中のトリプシンのWB像: IBD患者便では、健常者の場合と比較してトリプシンの量が多かった。
- (C) IL10^{+/-}マウス(n=5)とIL10^{-/-}マウス(n=8)のトリプシン活性値: 腸炎炎症モデルであるIL10^{-/-}マウスの便中トリプシン活性値は、IL10^{+/-}マウスと比較して、有意に高かった(** Mann-Whitney test $p=0.016$)。

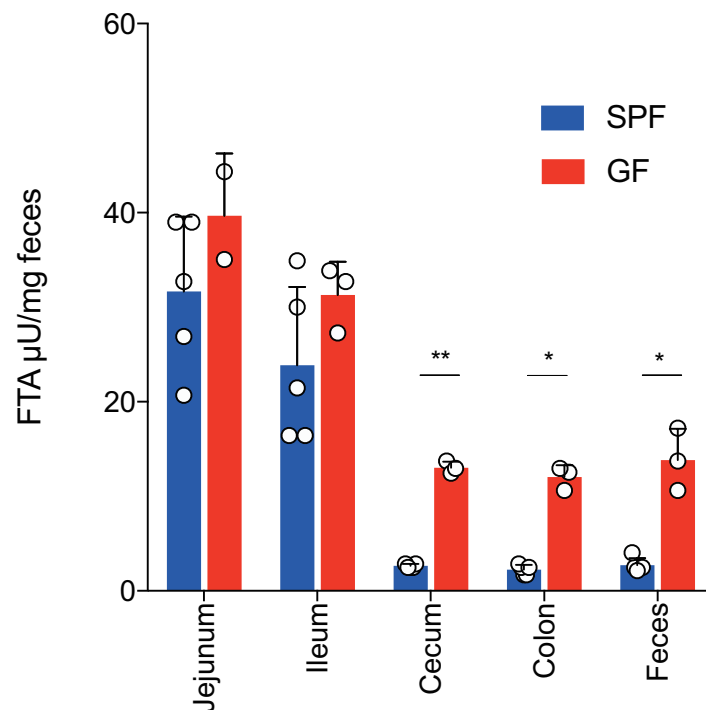


図 4 SPF マウス(n=5)と GF マウス(n=3)の、腸管内の部位別のトリプシン活性値の比較(n は実験に使用したマウス数を表す)
 小腸のトリプシン活性は、同程度であったが、盲腸以遠においては、GF マウスと比較して SPF マウスのトリプシン活性は顕著に低下した(* Mann-Whitney test $p=0.0179$ 、** Mann-Whitney test $p=0.0357$)。

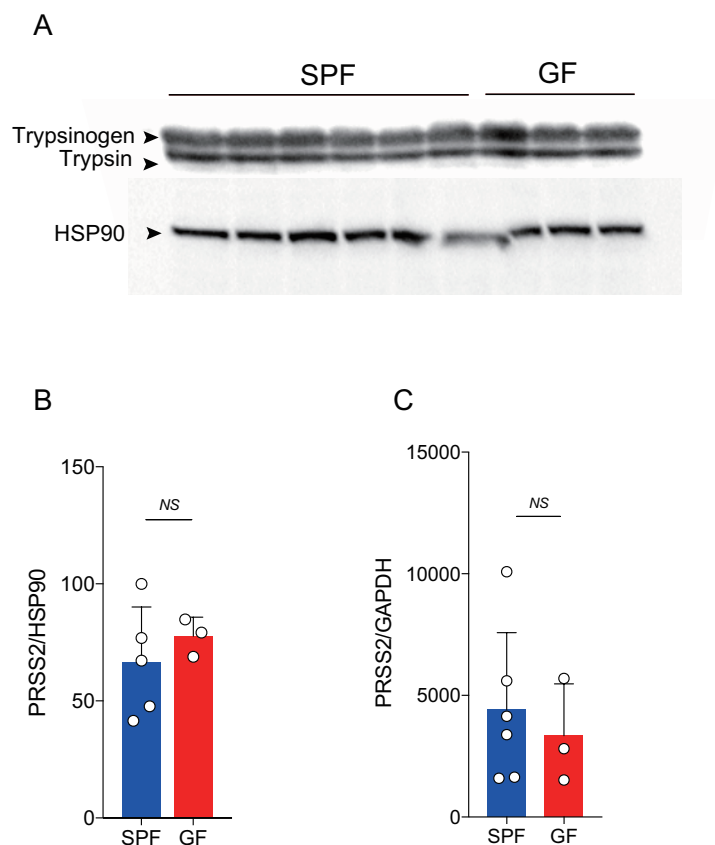


図 5 SPF マウス(n=5)と GF マウス(n=3)の、膵臓組織におけるトリプシンの分泌量と発現量の比較(n は実験に使用したマウス数を表す)

(A) 膵臓組織におけるトリプシン前駆体(トリプシノーゲン)及びトリプシンの WB 像

(B) WB では SPF マウスと GF マウスの膵臓組織のトリプシン分泌量に差は認められなかった。縦軸は Relative protein production。HSP90(Heat shock protein 90)は Loading control。

(C) qRT-PCR 法による膵臓組織中のトリプシン(PRSS2)の相対発現量：SPF マウスと GF マウスの膵臓組織のトリプシン発現量に、差は認められなかった。縦軸は Relative gene expression。GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)は Housekeeping gene。

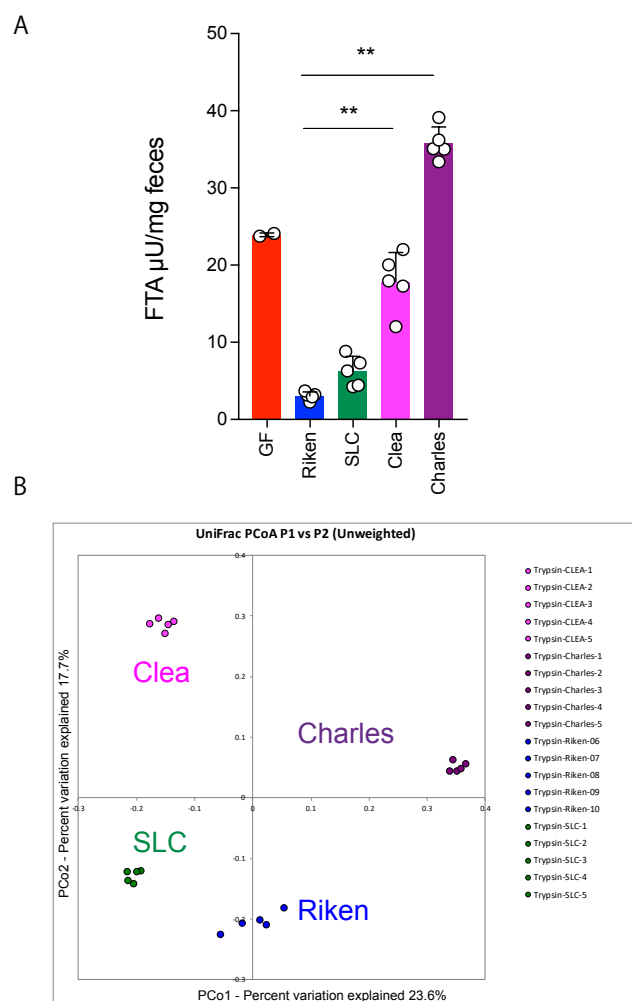


図6 飼育施設別のSPFマウスの盲腸内容物のトリプシン活性値とその腸内細菌叢の比較(nは実験に使用したマウス数を表す)

Riken、SLC、Clea及びCharlesは、それぞれ理化学研究所、日本エスエルシー株式会社、日本クレア株式会社、及び日本チャールズ・リバー株式会社で維持されたSPFマウスを表す。

- (A) トリプシン活性値：理研・SPFマウス(n=5)とSLC・SPFマウス(n=5)のトリプシン活性は低く、Charles・SPF(n=5)とClea・SPFマウス(n=5)のトリプシン活性は、GFマウス(n=2)と同等以上に高かった(** Mann-Whitney test $p=0.0079$)。
- (B) UniFrac PCoA (Unweighted)解析に基づくマウス飼育施設の腸内細菌叢の比較：理研・SPF(n=5)とSLC・SPFマウス(n=5)の2群とCharles・SPF(n=5)とClea・SPFマウス(n=5)の2群において、腸内細菌組成に差が認められた。

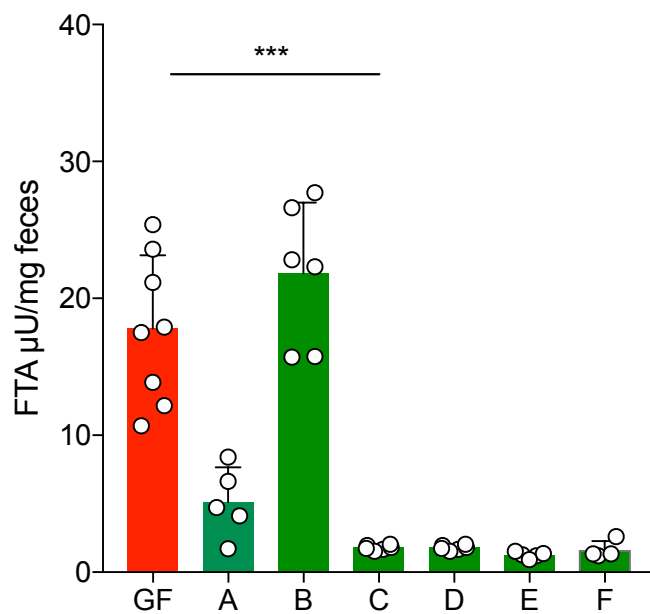


図7 健常者ボランティア Donor A~F の便を投与した GF マウス(A : B : C : D : E : F=5 : 6 : 6 : 6 : 5 : 4)の、便投与後3週間後の便中トリプシン活性値
Donor A、C、D、E 及び F の便を投与したマウスにおいて、便中のトリプシン活性値が有意に低下した(*** Mann-Whitney test $p=0.0007$)。

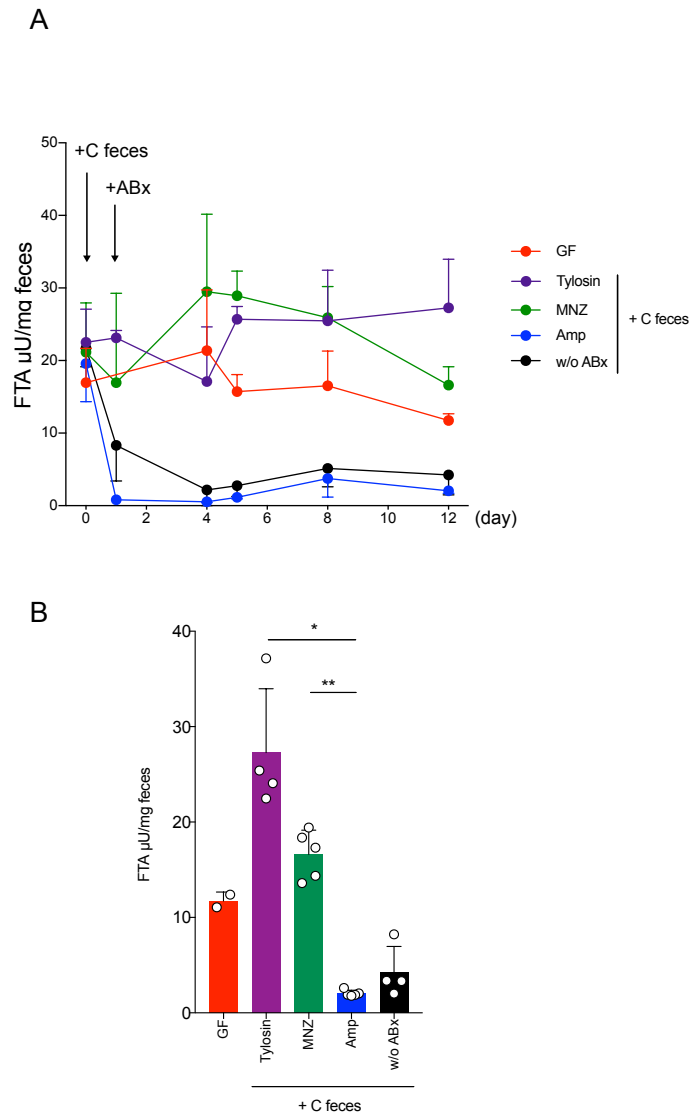


図8 健常者ボランティア Donor C の便を投与した GF マウスの、抗生物質に対する感受性。Tylosin(n=4)、MNZ(n=5)、Amp(n=5)は、それぞれタイロシン、メトロニダゾール、アンピシリンを投与したマウス群を表す。w/o Abx(n=4)は抗生物質を投与しない群を表す。(n は実験に使用したマウス数を表す)

- (A)便中のトリプシン活性値の時間的推移。+C feces は Donor C の便を投与した日(0 日目)を、+ABx は各抗生物質の投与を開始した日(1 日目)を表す。：アンピシリン投与群のトリプシン活性は顕著に低下したが、タイロシンあるいはメトロニダゾール投与群ではトリプシン活性は高く維持された。
- (B)便投与後 12 日目のマウス便中のトリプシン活性値：アンピシリン投与群のトリプシン活性は有意に低下した(** Mann-Whitney test $p=0.0079$ 、* Mann-Whitney test $p=0.0159$)。

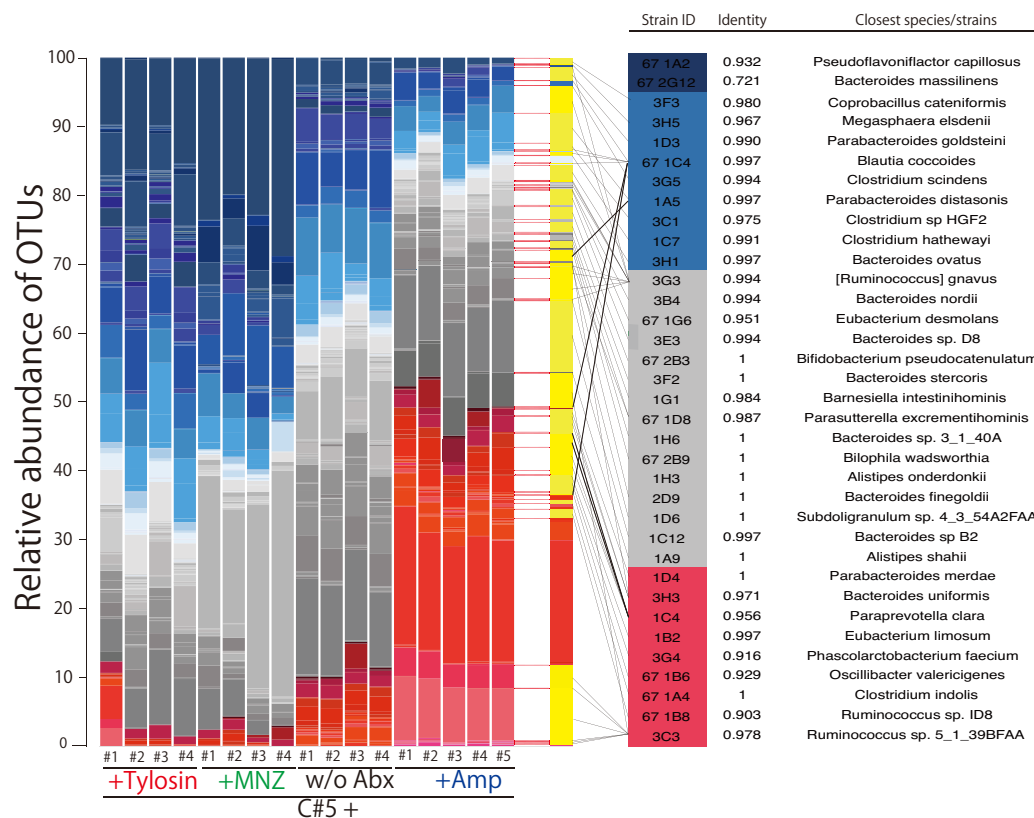


図9 健康者ボランティア Donor C の便から単離・同定した 35 菌株の菌種帰属
菌株表中の Strain ID は、各単離菌に付与した株名であり本研究に独自の認識記
号である。Closest species/strains は、in-house のデータベースにおいて、単離
した菌株と最も類似度の高い 16S rRNA 遺伝子配列を有する菌株名もしくは菌
種名であり、Identity はその類似度である。

表の左図は、抗生物質を投与しながら Donor C 便を投与した GF マウスの、投
与 12 日目の各マウスの腸内細菌叢の相対占有率、及び Donor C 便を投与した
GF マウスの腸内細菌叢の相対占有率を表す。+Tylosin(n=4)、+MNZ(n=4)あ
るいは+Amp(n=5)、タイロシン、メトロニダゾールあるいはアンピシリンの投
与を表し、w/o Abx(n=4)は抗生物質を投与しない事を表す。Donor C の腸内細
菌叢を構成する細菌のうち、単離された 35 菌株を特に黄色で示す(n は実験に
使用したマウス数を表す)。

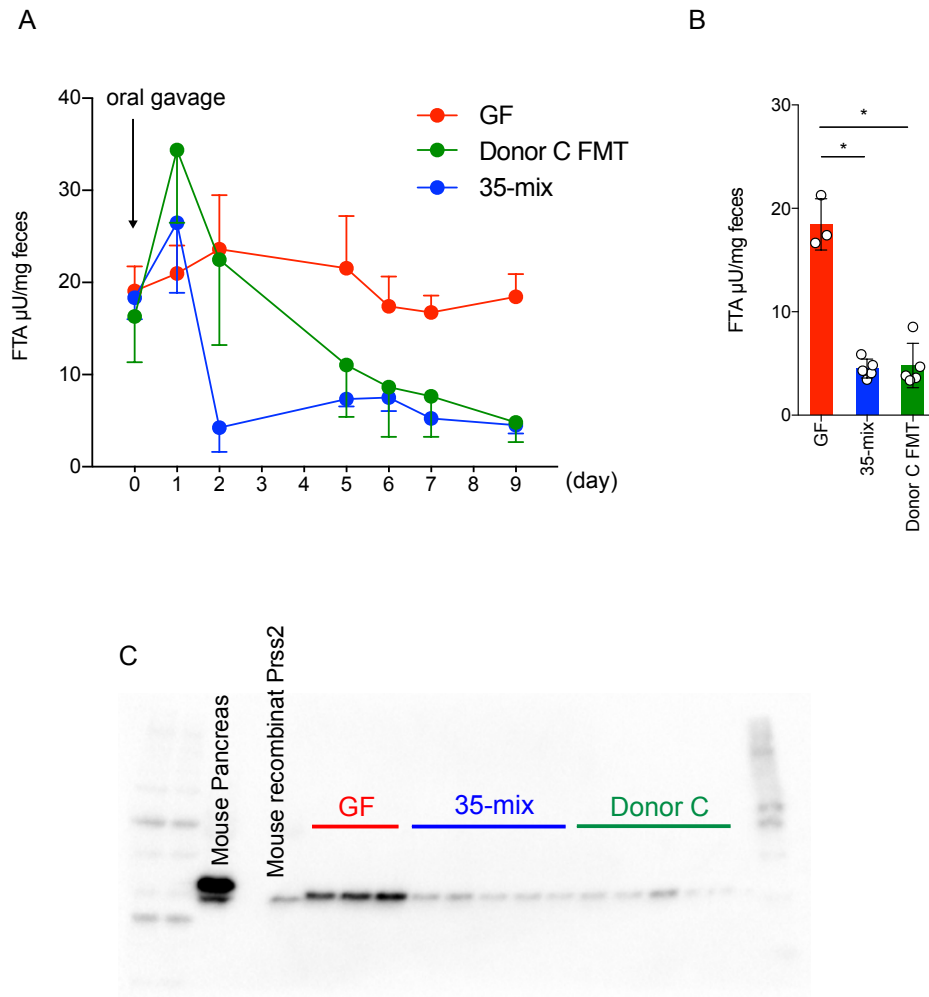


図 10 35-mix を投与した GF マウスの、便中のトリプシン活性及びそのタンパク質量の経時変化

GF は菌を投与しない GF マウス($n=3$)を、Donor C FMT($n=5$)は Donor C 便を経口的に胃内投与した GF マウスを、35-mix($n=5$) は Donor C 由来の 35 菌株を個別培養して混合した培養液を、経口的に胃内投与した GF マウスをそれぞれ表す(n は実験に使用したマウス数を表す)。

(A) トリプシン活性値の時間的推移：35-mix を投与したマウスの便中トリプシン活性は顕著に低下した。

(B) 投与後 9 日目のトリプシン活性値(* Mann-Whitney test $p=0.0357$)

(C) 投与後 9 日目のトリプシンの WB 像

	Strain ID	Identity	Closest species/strains	Spearman correlation	
21 strains	67 1A2	0.932	Pseudoflavonifactor capillosus	35	Positively correlated
	67 2G12	0.721	Bacteroides massiliensis	34	
	3F3	0.980	Coproibacillus cateniformis	33	
	3H5	0.967	Megasphaera elsdonii	32	
	1D3	0.990	Parabacteroides goldsteini	31	
	67 1C4	0.997	Blautia coccoides	30	
	3G5	0.994	Clostridium scindens	29	
	1A5	0.997	Parabacteroides distasonis	28	
	3C1	0.975	Clostridium sp HGF2	27	
	1C7	0.991	Clostridium hathewayi	26	
	3H1	0.997	Bacteroides ovatus	25	Negatively correlated with Trypsin activity
	3G3	0.994	[Ruminococcus] gnavus	24	
	3B4	0.994	Bacteroides nordii	23	
	67 1G6	0.951	Eubacterium desmolans	22	
	3E3	0.994	Bacteroides sp. D8	21	
	67 2B3	1	Bifidobacterium pseudocatenulatum	20	
	3F2	1	Bacteroides stercoris	19	
	1G1	0.984	Barnesiella intestinihominis	18	
	67 1D8	0.987	Parasutterella excrementihominis	17	
	1H6	1	Bacteroides sp. 3_1_40A	16	
14 strains	67 2B9	1	Bilophila wadsworthia	15	$p < -0.3$ $p < -0.5$ $p < 0.05$
	1H3	1	Alistipes onderdonkii	14	
	2D9	1	Bacteroides finegoldii	13	
	1D6	1	Subdoligranulum sp. 4_3_54A2FAA	12	
	1C12	0.997	Bacteroides sp B2	11	
	1A9	1	Alistipes shahii	10	
	1D4	1	Parabacteroides merdae	9	
	3H3	0.971	Bacteroides uniformis	8	
	1C4	0.956	Paraprevotella clara	7	
	1B2	0.997	Eubacterium limosum	6	
	3G4	0.916	Phascolarctobacterium faecium	5	
	67 1B6	0.929	Oscillibacter valericigenes	4	
	67 1A4	1	Clostridium indolis	3	
	67 1B8	0.903	Ruminococcus sp. ID8	2	
	3C3	0.978	Ruminococcus sp. 5_1_39BFAA	1	

図 11 マウスの腸内細菌の相対占有率と便中のトリプシン活性の Spearman 順位相関解析に基づく菌株の分類

図 9 左に示す腸内細菌叢の相対占有率と、便中のトリプシン活性について、Spearman 順位相関解析を行い、単離された 35 菌株の Spearman 順位及び相関係数を導出した。相関係数 $\rho = -0.3$ を境界として、 $\rho \geq -0.3$ の 21 菌株を無相関～正相関する菌群、 $\rho < -0.3$ の 14 菌株を負相関する菌群と定義し、各々色別示した。特に後者について、相関係数 $\rho < -0.5$ の有意確率が $p < 0.05$ である 9 菌株を赤色で示し、*Bacteroides* 群と非 *Bacteroides* 群を明示した。1～35 の番号は単離菌の通し番号。

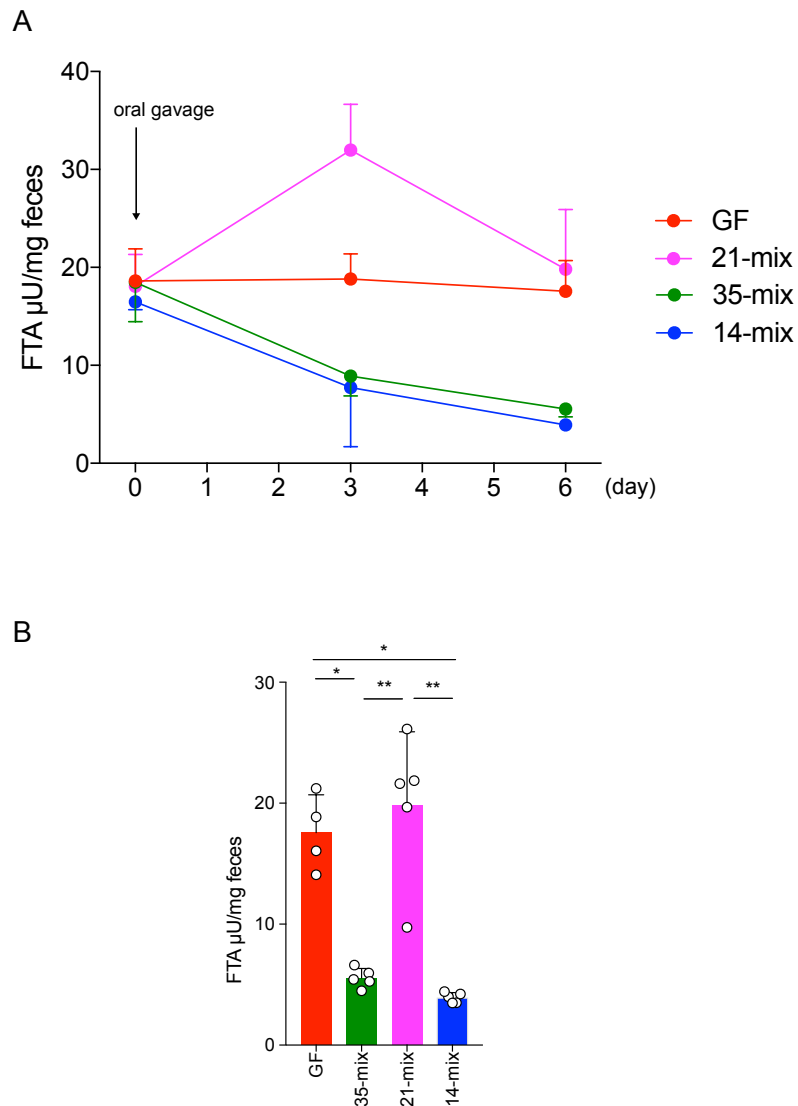
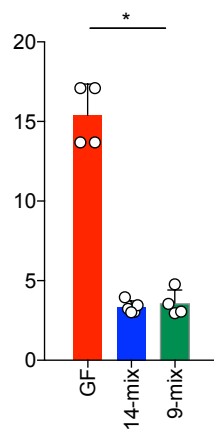


図 12 21-mix(n=5)あるいは 14-mix(n=5)を投与した GF マウスの便中のトリプシン活性の比較 (n は実験に使用したマウス数を表す)

(A) トリプシン活性値の時間的推移：14-mix(n=5)を投与したマウスの便中のトリプシン活性は 35-mix(n=5)の場合と同程度に低下し、21 菌株(n=5)の場合は低下しなかった。

(B) 投与後 6 日目のマウス便中のトリプシン活性値：14-mix を投与したマウスの便中のトリプシン活性は有意に低下した(** Mann-Whitney test $p=0.0079$ 、* Mann-Whitney test $p=0.0159$)。

A



B

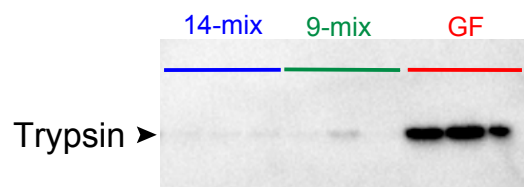


図 13 9-mix を投与した GF マウスの便中のトリプシン活性及びそのタンパク質量の比較(n は実験に使用したマウス数を表す)

(A) 9-mix 投与後 6 日目のトリプシン活性値：9-mix(n=4)を投与したマウスの便中のトリプシン活性は、14-mix(n=5)と同程度に有意に低下した (* Mann-Whitney test $p=0.0159$)。

(B) トリプシンの WB 像：9-mix を(n=3)投与したマウスの便中のトリプシンの量は、14-mix(n=3)と同程度に減少した。

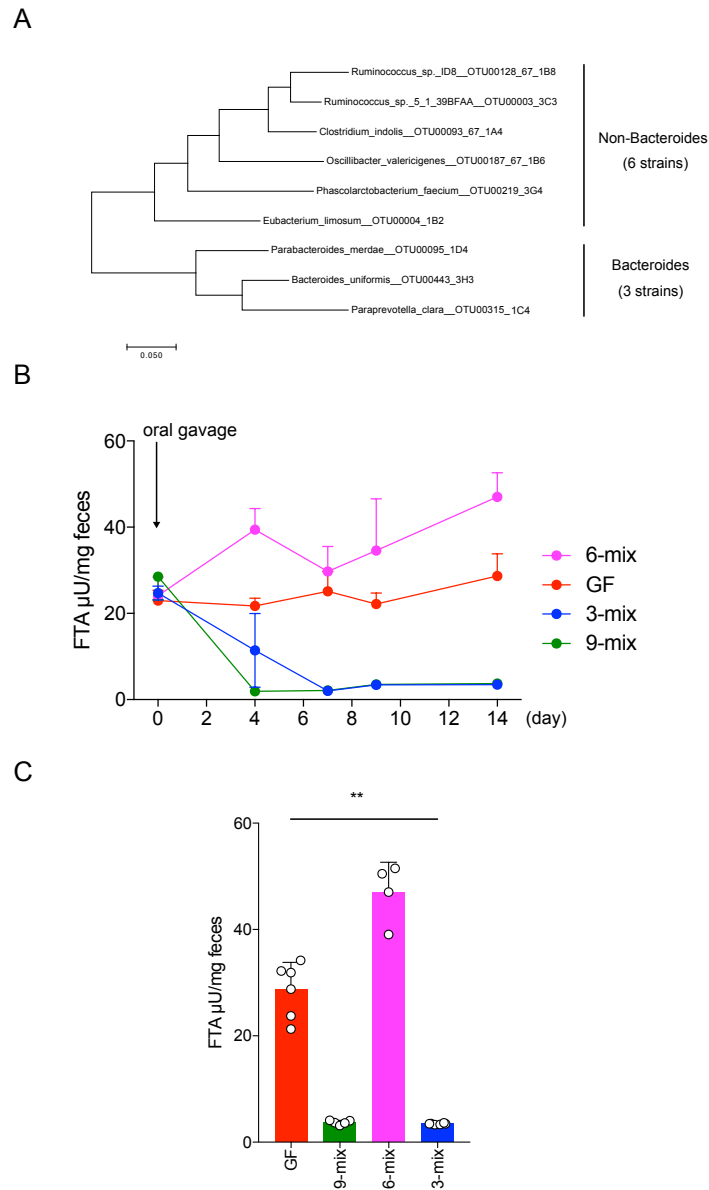
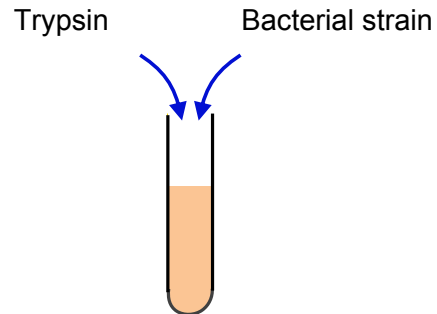


図 14 3-mix あるいは 6-mix を投与した GF マウスの便中のトリプシン活性値の比較(n は実験に使用したマウス数を表す)

- (A) 3-mix 及び 6-mix を構成する菌株の帰属名と 16S rRNA 配列に基づく系統樹
- (B) トリプシン活性値の時間的推移：3-mix(n=6)を投与したマウスの便中のトリプシン活性は、9-mix(n=5)同程度に顕著に低下した。
- (C) 投与後 7 日目のトリプシン活性値：3-mix(n=6)を投与したマウスの便中のトリプシン活性は、9-mix(n=5)同程度に有意に低下した(** Mann-Whitney test $p=0.0022$)。

A



Incubation for 24h at 37°C in anaerobic chamber

B

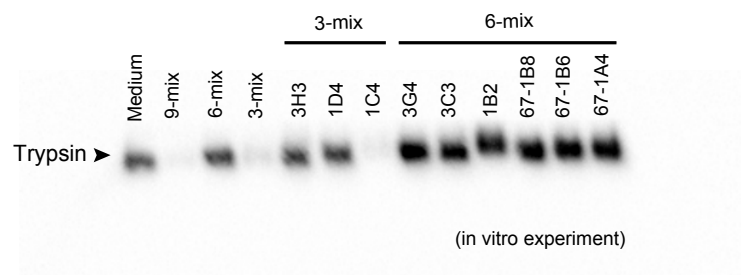
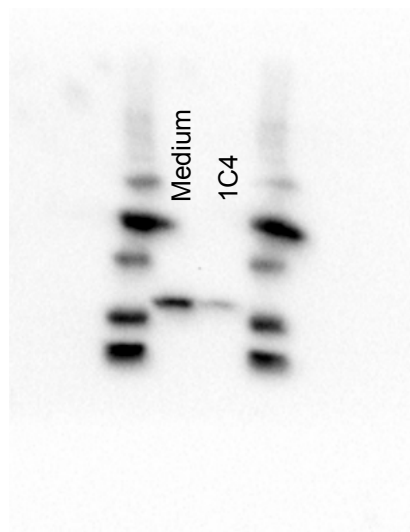


図 15 9-mix を構成する各培養菌液の作用に基づくトリプシンのタンパク質量の変化

- (A) *In vitro* でトリプシンのタンパク質量を評価するサンプルの調製手順
- (B) 各菌液と共培養したリコンビナントトリプシンの WB 像。Medium は菌体を含まない EGEF 培地と共培養したサンプルを表す。3H3, 1D4 及び 1C4 は 3-mix を構成する各単菌の培養液と共培養したサンプルであり、3G4, 3C3, 1B2, 67-1B8, 67-1B6 及び 67-1A4 は 6-mix を構成する各単菌の培養液と共培養したサンプルを表す：*Paraprevotella clara* 1C4 株の単菌の培養液においてのみ、マウストリプシンのタンパク質量が減少した。



(in vitro experiment)

図 16 *Paraprevotella clara* 1C4 株と共培養したリコンビナントのヒトトリプシンの WB 像

Medium は菌を含まない EGEF 培地を、1C4 は *Paraprevotella clara* 1C4 株の培養液を、各々共培養したトリプシンのバンドを表す。

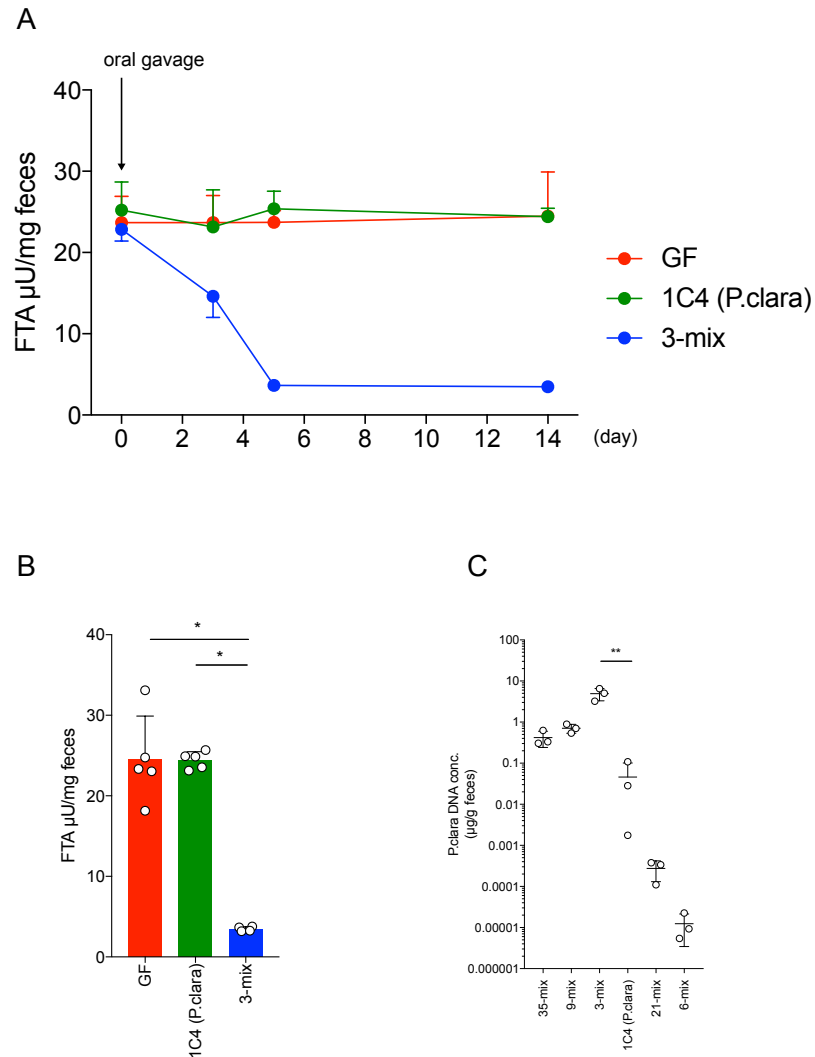


図 17 *Paraprevotella clara* 1C4 株を投与した GF マウスの便中のトリプシン活性及び 1C4 菌株の定着量の比較(n は実験に使用したマウス数を表す)

- (A) トリプシン活性値の時間的推移：1C4 株単菌を投与したマウス(n=5)の便中のトリプシン活性は低下せず、菌を投与しない場合(n=5)と同定度であった。
- (B) 投与後 14 日目のトリプシン活性値：1C4 株単菌を投与したマウス(n=5)の便中のトリプシン活性は、3-mix を投与した場合(n=4)と比較して、有意に高かった(* Mann-Whitney test $p=0.0159$)。
- (C) qRT-PCR 法に基づく投与後 14 日目の 1C4 株の存在量の比較：1C4 株単菌を投与したマウス(n=3)の便からの検出量は、9-mix(n=3)あるいは 3-mix(n=3)の場合と比較して、有意に少なかった(** Unpaired t test $p=0.0068$)。

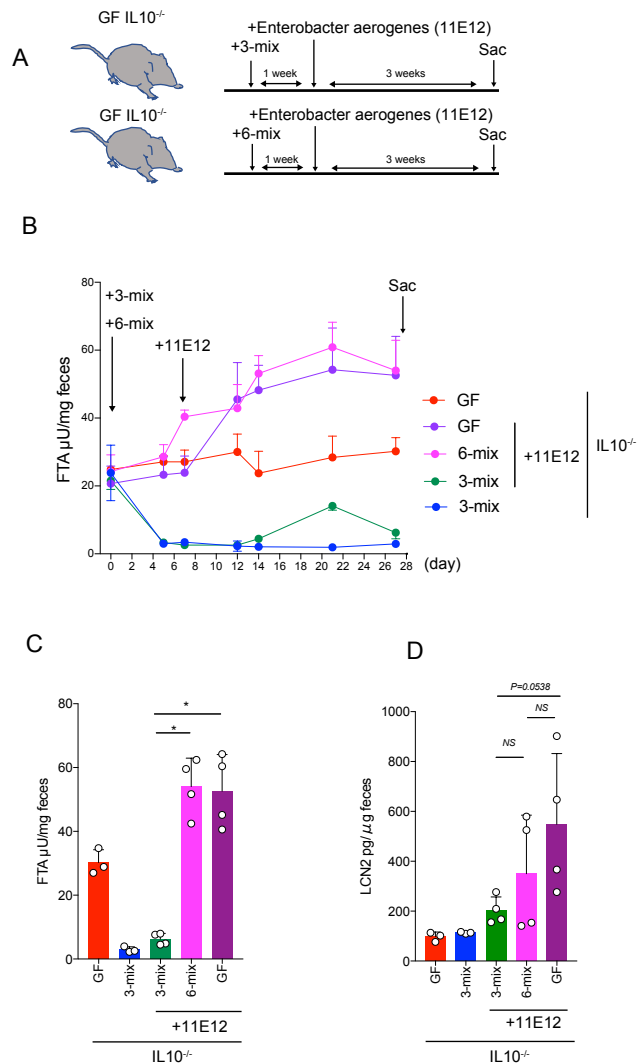


図 18 *Enterobacter aerogenes* 感染 IL10^{-/-}マウスへの細菌カクテルの投与による炎症の緩和(n は実験に使用したマウス数を表す)

- (A) IL10^{-/-}マウスへの 3-mix あるいは 6-mix 及び *Enterobacter aerogenes* の投与順
- (B) トリプシン活性値の時間的推移：3-mix を投与したマウス(n=4)は、*Enterobacter aerogenes* 投与後も低い値を維持した。
- (C) 菌液投与後 27 日目のトリプシン活性値：3-mix を投与したマウス(n=4)の便中のトリプシン活性値は、未投与の場合(GF+11E12: n=4)や 6-mix を投与した場合(n=4)と比較して、有意に低かった(* Mann-Whitney test $p=0.0286$)。
- (D) 菌液投与後 27 日目の便中のリポカリン 2 の濃度(ELISA)：3-mix 投与群(n=4)では低い傾向であった。

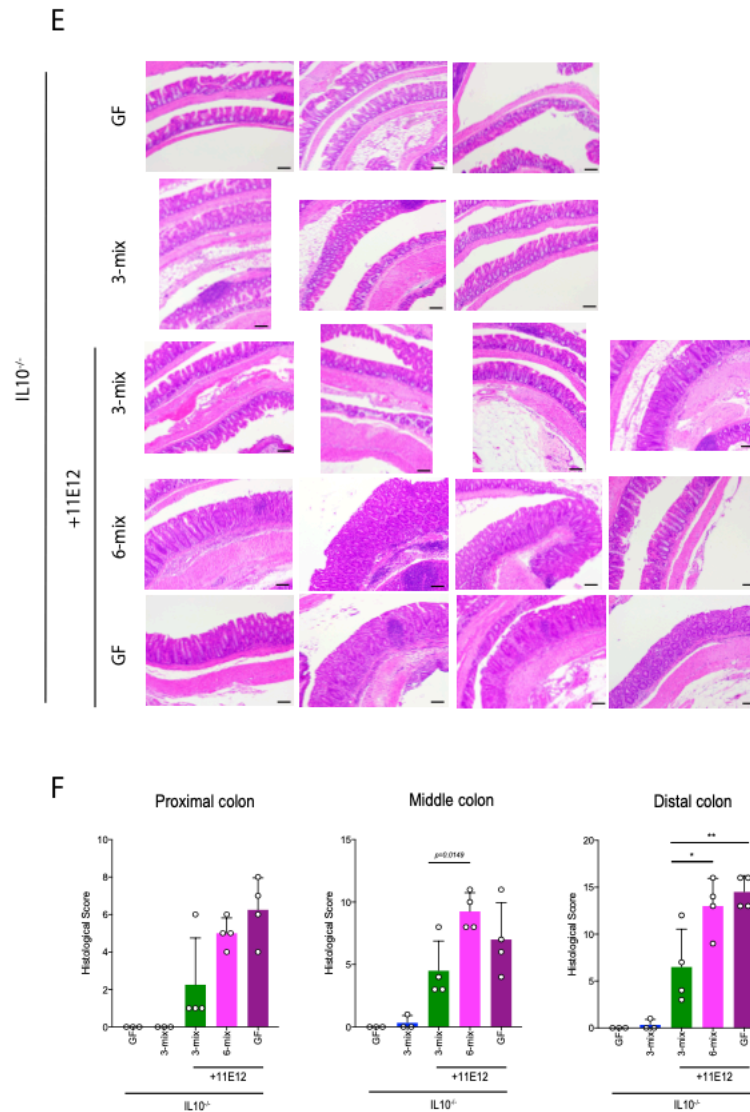


図 18 *Enterobacter aerogenes*(11E12)感染 IL10^{-/-}マウスへの細菌カクテルの投与による炎症の緩和

(E) 菌液投与後 27 日目の遠位大腸(Distal colon)の H.E.染色(x10) : 3-mix 投与群では、6-mix 投与群や単独投与群と比較して、粘膜組織構造と杯細胞数は比較的よく保たれ、組織への炎症細胞の浸潤は少なかった(scale bar 100 μ m)。

(F) 菌液投与後 27 日目の大腸 H.E.染色の Histological score :
遠位大腸では、3-mix 投与群(n=4)の炎症スコアは、未投与の場合(GF+11E12: n=4)や 6-mix 群(n=4)と比較して、有意に低かった(* Unpaired t test $p=0.025$ 、** Unpaired t test $p=0.0097$)

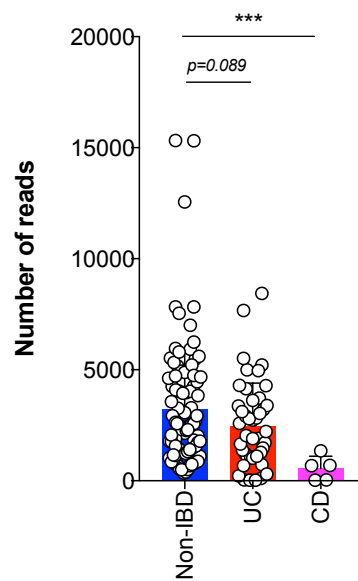


図 19 健常者と IBD 患者のヒト便メタゲノム解析を用いた *Paraprevotella clara* 組成比の比較

健常者(Non-IBD: n=96)、UC 患者(UC: n=46)及びクローン病患者(CD: n=5)のメタゲノムデータ (1,000,000 リード) の *Paraprevotella clara* ゲノムにマッピングしマップされたリード数 (Bowtie2 使用、相同性 95%以上の閾値) をカウントした結果を示した。縦軸は *Paraprevotella clara* にマップされたリード数を表す。CD 患者の便中には、*Paraprevotella clara* が有意に減少していた(*** Mann-Whitney test $p=0.0001$)。

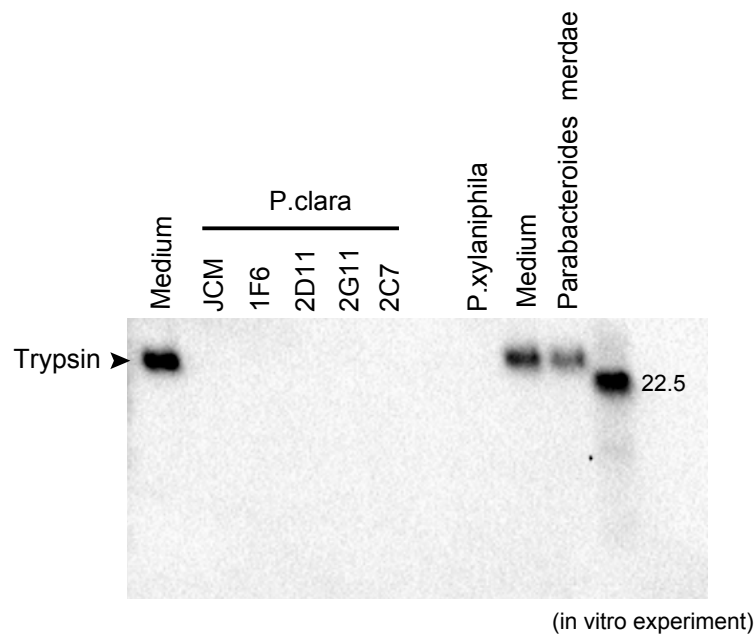


図 20 WB に基づいた *Paraprevotella* 属菌の作用によるトリプシン量の変化の評価

トリプシンを含むマウスの盲腸内容物と各 *Paraprevotella* 属菌の共培養液の WB 像。Medium は菌を含まない EGEF 培地を示す。 *P. clara* 群のうち、JCM は RIKEN BRC で維持された *Paraprevotella clara* JCM 14859 株を、他の ID 群は 1C4 株と同時に単離された別の *Paraprevotella clara* 株をそれぞれ表す。 *P. xylaniphila* は RIKEN BRC で維持された *Paraprevotella xylaniphila* JCM 14860 株を表す。 *Parabacteroides merdae* は 3-mix を構成する *Parabacteroides merdae* 1D4 株を表す。

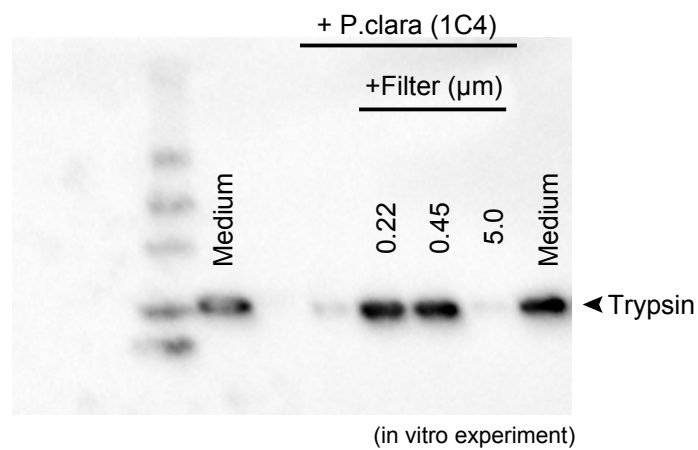


図 21 WB に基づいた *Paraprevotella clara* の作用によるトリプシン量の変化の評価

トリプシンを含むマウスの盲腸内容物と、0.22 μm 、0.45 μm あるいは 5.0 μm 口径のフィルターで処理した各 *Paraprevotella clara*1C4 株の共培養液の WB 像。Medium は菌を含まない EGEF 培地を示す。

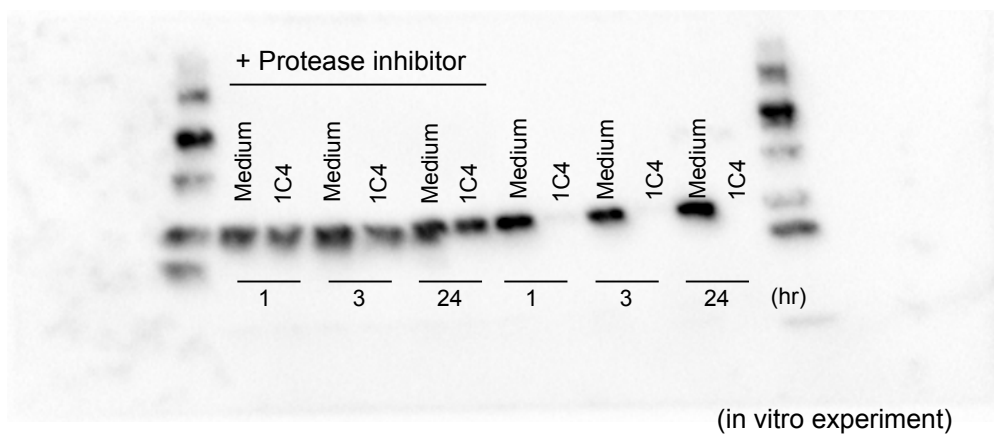


図 22 プロテアーゼ阻害剤を含む *Paraprevotella clara* 1C4 株の菌液と共培養したトリプシンの WB 像
Medium は菌を含まない EGEF 培地を、1C4 は *Paraprevotella clara* 1C4 株の培養液を、各々共培養したトリプシンを表す。トリプシンのバンドの下部は、*Paraprevotella clara* 1C4 株とトリプシンの共培養の時間を表す。

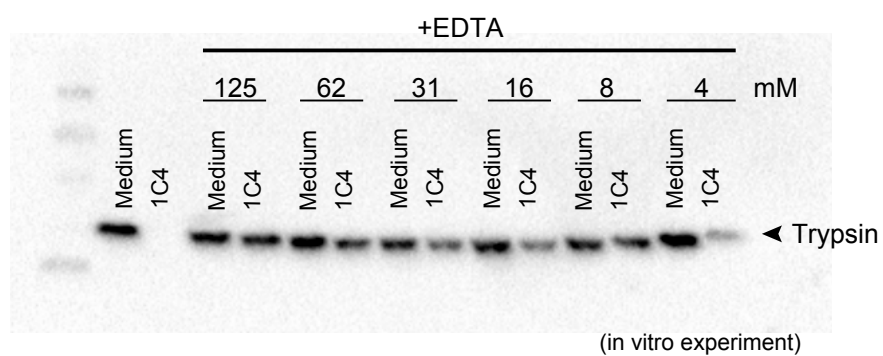


図 23 EDTA を含む *Paraprevotella clara* 1C4 株の菌液と共培養したトリプシンの WB 像

Medium は菌を含まない EGEF 培地を、1C4 は *Paraprevotella clara* 1C4 株の培養液を、各々共培養したトリプシンのバンドを表す。数字は、加えた EDTA の濃度(mM)を表す。

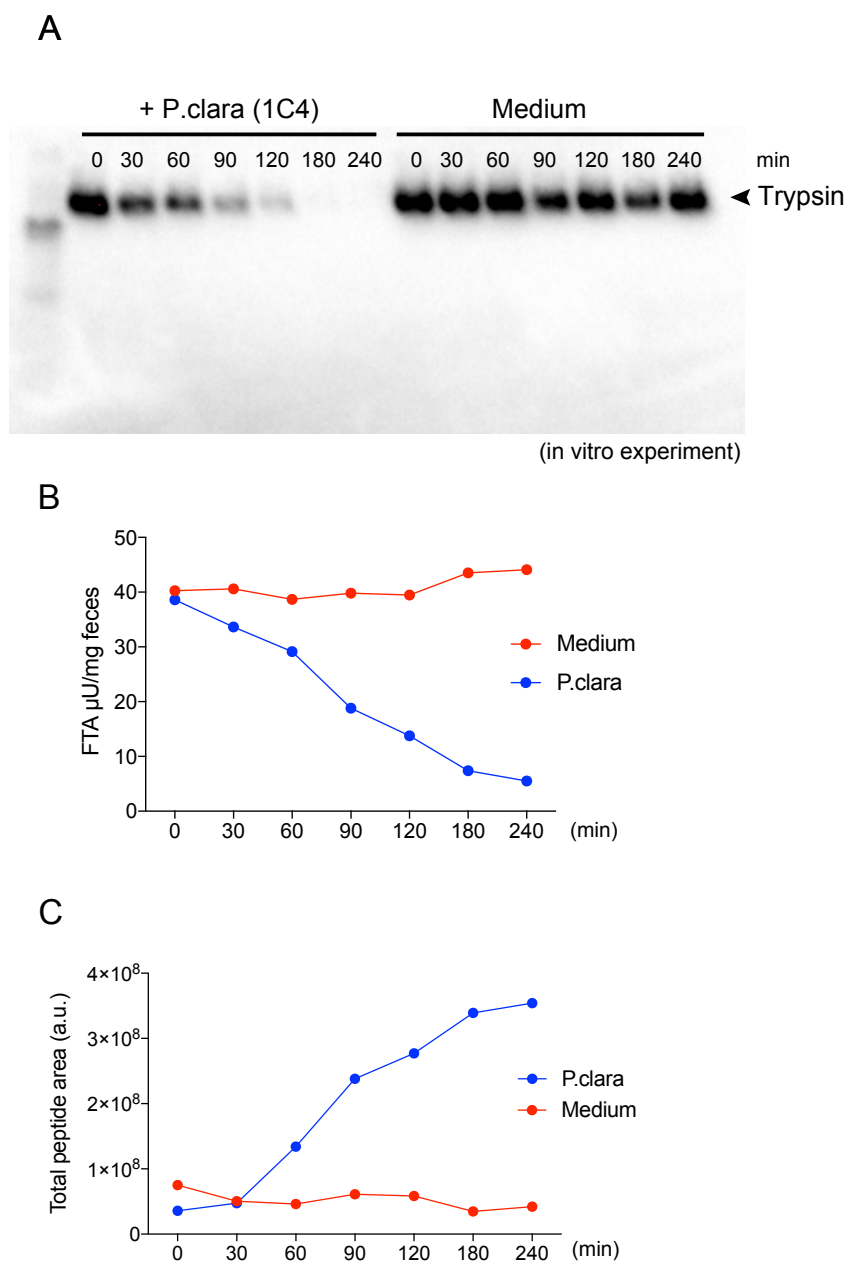


図 24 *Paraprevotella clara* と共培養したトリプシンの分解挙動の評価

(A) *Paraprevotella clara* 1C4 株と共培養したトリプシンの WB 像。Medium は 1C4 株を含まない EGEF 培地を表し、トリプシンのタンパク質を示すバンドの上部は、共培養時間(分)を表す。

(B) トリプシン活性値の時間変化

(C) LC-MS/MS 分析に基づくトリプシン由来のペプチド断片数の時間変化

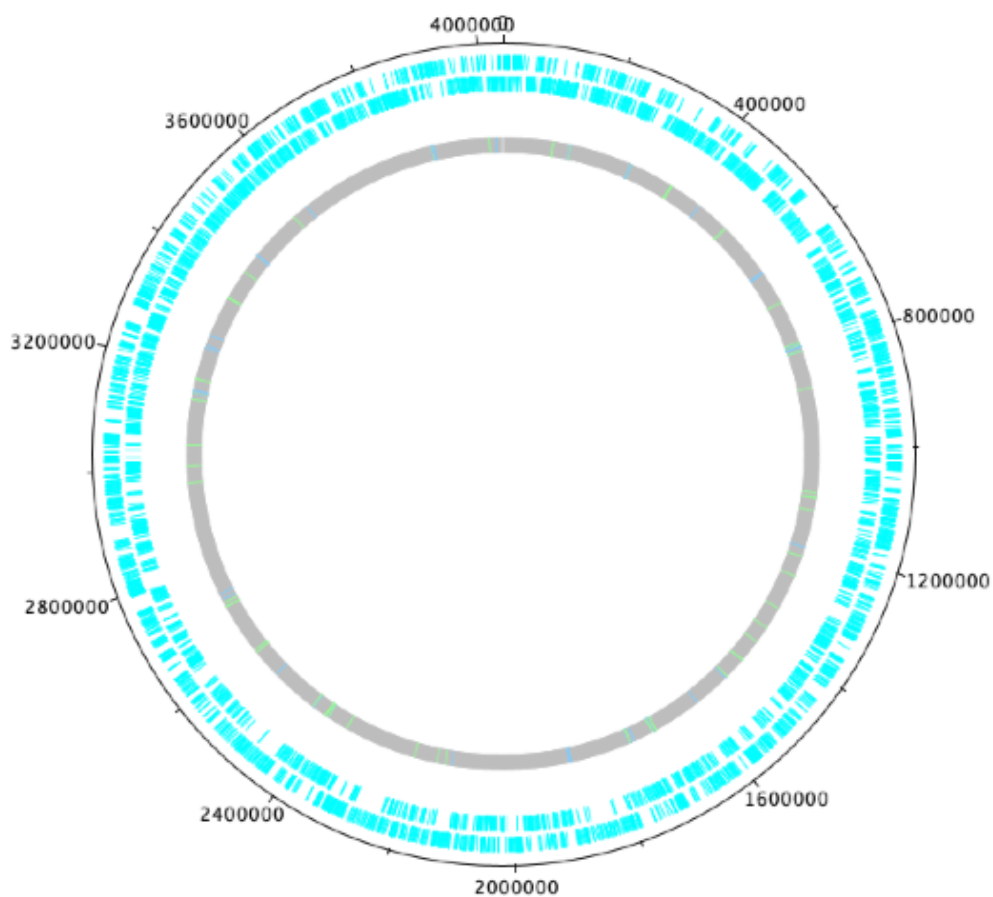


図 25 *Paraprevotella clara* (1C4)のタンパク質コード配列(Coding Sequence feature: CDS feature)

長鎖型次世代シーケンサーPacBio®RS II/Sequel® システム(Pacific Biosciences)を使い *P. clara* 1C4 株のゲノムを解析した結果、4,034,988 塩基のコンプリートゲノム配列が得られた。青色で示す部位がアミノ酸翻訳の対象となる塩基配列の開始コドンから終始コドンまでの位置情報を表す。

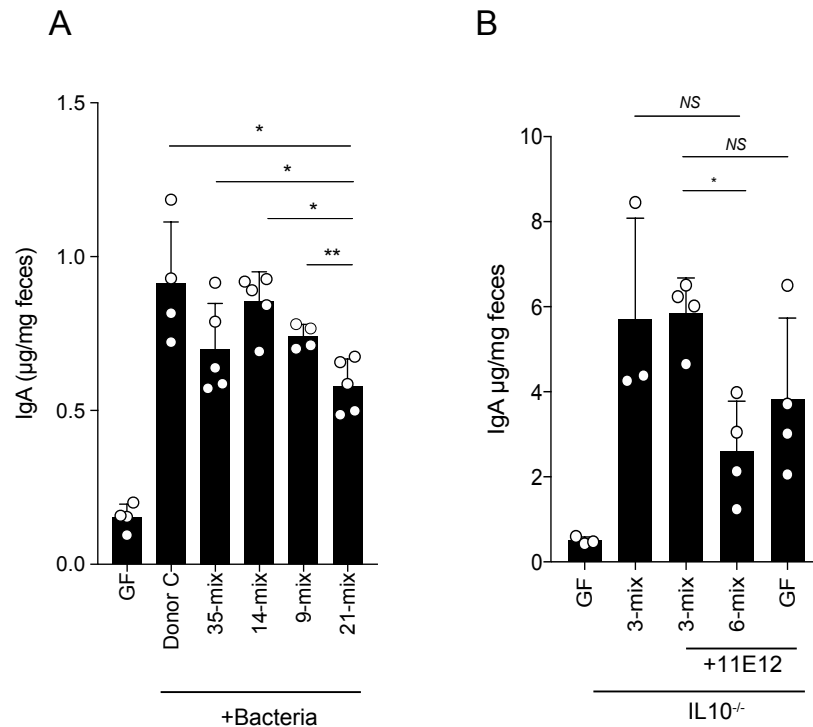


図 26 ヒト便あるいは細菌カクテルの投与に伴うマウスの便中の IgA 量の変動 (n は実験に使用したマウス数を表す)

(A) ELISA 法に基づく GF マウスの便中の IgA 量 :

2.5~2.9 節にて報告した、ヒト便あるいは細菌カクテルを投与した GF マウスの、投与後 21 日目の便中の IgA 量を評価した。トリプシン活性低下群 (Donor C (n=4)、35-mix (n=5)、14-mix (n=5) 及び 9-mix (n=4)) の便中の IgA 濃度は、トリプシン残存群 (21-mix (n=5)) と比較して、有意に高かった (** Mann-Whitney test $p=0.0079$ 、* Mann-Whitney test $p=0.0159$)。

(B) ELISA 法に基づく *Enterobacter aerogenes* 感染 IL10^{-/-} マウスの便中の IgA 量 :

2.14 節にて報告した、細菌カクテルを投与し更に *Enterobacter aerogenes* 11E12 株を感染させた IL10^{-/-} マウスの、投与後 27 日目の便中の IgA 量を評価した。トリプシン活性低下群 (3-mix (n=4)) の便中の IgA 濃度は、トリプシン残存群 (6-mix (n=4)) と比較して、有意に高かった (* Mann-Whitney test $p=0.0286$)。

UC						
ID	年齢	性別	病型	発症年齢	BMI	partial Mayo score
1	34	M	全大腸炎型	27	18.8	0
2	42	M	全大腸炎型	37	20.7	6
3	43	F	全大腸炎型	36	16.8	0
4	37	M	全大腸炎型	33	15.7	0
5	38	M	全大腸炎型	36	20.1	6
6	38	F	全大腸炎型	36	19.3	0
7	22	M	全大腸炎型	19	23.1	1
8	29	M	全大腸炎型	25	24.3	1
9	43	M	全大腸炎型	26	22.1	1

CD						
ID	年齢	性別	病型	発症年齢	BMI	Harvey-Bradshaw index
1	71	M	小腸型	43	21.9	0
2	50	F	小腸型	20	21.6	4
3	46	M	小腸大腸型	26	21.9	3
4	17	M	小腸大腸型	13	22.7	0
5	18	M	小腸大腸型	14	17.3	0

表 1 図 3A 及び図 3B に示す IBD 患者の臨床背景：UC は Ulcerative colitis、CD は Crohn's disease を示す。

Partial Mayo score は、以下の 3 項目の合計値で算出した⁵⁴。Stool Frequency (based on the past 3 days, score, 0-3)、Rectal Bleeding(based on the past 3 days, score, 0-3)、Physician's Global Assessment(score, 0-3)。Remission = 0-1、Mild Disease = 2-4、Moderate Disease = 5-6、Severe Disease = 7-9。

Harvey-Bradshaw index は、以下の 4 項目の合計値で算出した⁵⁵。General Well-being (score, 0-3)、Abdominal pain(score, 0-3)、Number of Liquid or Soft Stools per day、Additional Manifestations(score, 0-8)。Remission = <5、Mild Disease = 5-7、Moderate Disease = 8-16、Severe Disease >16。

<i>Proximal Colon</i>							
		inflammatory cell infiltration	mucosa thickening	goblet cell depletion	crypt abscess	destruction of architecture	total score
GF+11E12	1	3	2	2	0	1	8
	2	2	1	1	0	2	6
	3	3	2	1	0	1	7
	4	1	1	1	0	1	4
6-mix+11E12	5	1	1	1	0	1	4
	6	2	1	1	0	1	5
	7	2	2	1	0	1	6
	8	2	1	1	0	1	5
3-mix+11E12	9	3	1	1	0	1	6
	10	1	0	0	0	0	1
	11	1	0	0	0	0	1
	12	1	0	0	0	0	1
3-mix	13	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0
GF	16	0	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0

<i>Middle Colon</i>							
		inflammatory cell infiltration	mucosa thickening	goblet cell depletion	crypt abscess	destruction of architecture	total score
GF+11E12	1	2	2	2	0	1	7
	2	1	2	1	0	2	6
	3	3	2	2	1	3	11
	4	1	1	1	0	1	4
6-mix+11E12	5	3	2	1	0	2	8
	6	3	2	3	1	2	11
	7	2	2	2	0	2	8
	8	3	3	2	0	2	10
3-mix+11E12	9	3	2	2	0	1	8
	10	1	1	1	0	1	4
	11	1	1	1	0	0	3
	12	1	1	1	0	0	3
3-mix	13	1	0	0	0	0	1
	14	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0
GF	16	0	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0

<i>Distal Colon</i>							
		inflammatory cell infiltration	mucosa thickening	goblet cell depletion	crypt abscess	destruction of architecture	total score
GF+11E12	1	3	2	3	2	3	13
	2	4	4	3	2	3	16
	3	4	3	3	3	3	16
	4	3	1	3	3	3	13
6-mix+11E12	5	3	3	3	2	3	14
	6	2	3	2	1	1	9
	7	3	2	3	2	3	13
	8	4	3	3	3	3	16
3-mix+11E12	9	3	3	2	1	3	12
	10	2	1	1	1	2	7
	11	1	1	1	0	1	4
	12	1	1	1	0	0	3
3-mix	13	0	1	0	0	0	1
	14	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0
GF	16	0	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0

表 2 図 18 の *Enterobacter aerogenes*(11E12)感染 IL10^{-/-}マウスへの細菌カクテルの投与による炎症の緩和に関する近位大腸(Proximal colon)、中間位大腸(Middle colon)、遠位大腸(Distal colon)の炎症スコア(Histological Score) : 以下の 5 項目の合計値で算出した⁸。炎症細胞の組織浸潤(inflammatory cell infiltration, score, 0-4)、粘膜肥厚(mucosa thickening, score, 0-4)、杯細胞数の減少(goblet cell depletion, score, 0-4)、陰窩膿瘍(crypt abscess, score, 0-4)、粘膜組織構造の崩壊(destruction of architecture, score, 0-4)。

	ヒト便A	ヒト便B	ヒト便C	ヒト便D	ヒト便E	ヒト便F
<i>Paraprevotella clara</i>	0	0	744	0	0	0
<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	193	0	0	0	0	0

表3 本研究で使用した健康ヒトボランティア便検体中の *Paraprevotella* 属細菌の割合 (2.5 節) : 次世代シーケンサー (MiSeq) を用いた 16S amplicon 解析を行い、得られた 38,000 リード中の *Paraprevotella* 属細菌に帰属されたリード数を示した。リード数は菌叢全体に占める各菌の相対存在量を反映している。

	Candidate protease
1	>PROKKA_00044 Putative zinc metalloprotease
2	>PROKKA_00070 Protease synthase and sporulation negative regulatory protein PAI 1
3	>PROKKA_00089 ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
4	>PROKKA_00090 ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit
5	>PROKKA_00381 ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC
6	>PROKKA_00529 Rhomboid protease AarA
7	>PROKKA_00608 Protease 4
8	>PROKKA_00667 putative protease YhbU precursor
9	>PROKKA_00862 putative CtpA-like serine protease
10	>PROKKA_00946 Carboxy-terminal processing protease CtpB precursor
11	>PROKKA_00965 CAAX amino terminal protease self- immunity
12	>PROKKA_01154 ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
13	>PROKKA_01259 putative protease YhbU precursor
14	>PROKKA_01264 protease TldD
15	>PROKKA_01613 Rhomboid protease GluP
16	>PROKKA_01802 putative CtpA-like serine protease
17	>PROKKA_01824 Protease 3 precursor
18	>PROKKA_02082 ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC
19	>PROKKA_02212 putative CtpA-like serine protease
20	>PROKKA_02430 Lon protease 2
21	>PROKKA_02529 putative periplasmic serine endoprotease DegP-like precursor
22	>PROKKA_03117 Clp protease
23	>PROKKA_03154 putative protease YdeA

表 4 細菌遺伝子予測ツール PROKKA の解析に基づく *Paraprevotella clara* (1C4)ゲノムに含まれる機能既知遺伝子群中のプロテアーゼ 23 種
1～23 の番号は、(1C4)ゲノムに含まれるプロテアーゼの通し番号。00044～03154 までの番号は(1C4)ゲノムに含まれる遺伝子の通し番号。

	Candidate peptidase
1	>PROKKA_00142 Murein DD-endopeptidase MepM
2	>PROKKA_00164 Murein DD-endopeptidase MepH precursor
3	>PROKKA_00196 Peptidase family M49
4	>PROKKA_00253 Methionine aminopeptidase 1
5	>PROKKA_00308 Xaa-Pro dipeptidase
6	>PROKKA_00374 Murein DD-endopeptidase MepM
7	>PROKKA_00654 Aminopeptidase YwaD precursor
8	>PROKKA_00670 Prolyl tripeptidyl peptidase precursor
9	>PROKKA_00707 Aminopeptidase E
10	>PROKKA_00745 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacC precursor
11	>PROKKA_00809 Signal peptidase I
12	>PROKKA_00810 signal peptidase I
13	>PROKKA_00824 Peptidase M16 inactive domain protein
14	>PROKKA_00841 Peptidase S46
15	>PROKKA_00952 D-alanyl-D-alanine dipeptidase
16	>PROKKA_00996 Peptidase family S41
17	>PROKKA_01167 Cytosol non-specific dipeptidase
18	>PROKKA_01257 Neutral endopeptidase
19	>PROKKA_01373 Aminopeptidase E
20	>PROKKA_01374 Xaa-Pro aminopeptidase
21	>PROKKA_01505 murein L,D-transpeptidase
22	>PROKKA_01804 Oligopeptidase A
23	>PROKKA_01873 Prolyl tripeptidyl peptidase precursor
24	>PROKKA_02002 lipoprotein signal peptidase
25	>PROKKA_02147 Methionine aminopeptidase
26	>PROKKA_02479 Putative neutral zinc metallopeptidase
27	>PROKKA_02495 BlaR1 peptidase M56
28	>PROKKA_02496 BlaR1 peptidase M56
29	>PROKKA_02668 Dipeptidase A
30	>PROKKA_02669 Peptidase family M23
31	>PROKKA_02683 Cytosol non-specific dipeptidase
32	>PROKKA_02733 Signal peptidase I
33	>PROKKA_03196 Prolyl tripeptidyl peptidase precursor
34	>PROKKA_03205 Prolyl tripeptidyl peptidase precursor
35	>PROKKA_03247 Peptidase T

表 5 細菌遺伝子予測ツール PROKKA の解析に基づく *Paraprevotella clara* (1C4)ゲノムに含まれる機能既知遺伝子群中のペプチダーゼ 35 種
1～35 の番号は、(1C4)ゲノムに含まれるペプチダーゼの通し番号。00142～03247 までの番号は(1C4)ゲノムに含まれる遺伝子の通し番号。

3. 考察

IBD 患者、特に CD 患者の便中にはトリプシンが活性状態で残存し、トリプシン自体がタンパク分解酵素であるが故に、便中のトリプシンの残存が、粘膜バリア機構の破綻を介して、IBD の発症や症状の増悪への関与を示唆する報告がある¹⁸⁻²²。一方で、ヒト便由来の *Bacteroides distasonis* が GF ラットや GF マウスの便中において、トリプシン活性の消失に関与することを示した報告がある⁵⁶が、彼らは、分離株を生化学的性状とモノクローナル抗体により *Bacteroides distasonis* と同定しており、詳細な分類学的位置付けは行なっていない。更に、使用された菌株の保存施設への寄託状況が不明であるため、検証することは困難である。加えて、腸炎発症モデルマウス(IL10^{-/-}マウス)を使い、抗生物質投与による Dysbiosis に随伴する大腸のプロテアーゼ活性残存が、大腸の炎症を惹起することを示した報告があるが、トリプシン自体が宿主に与える影響の検討はなされていない²³。

本研究は、理化学研究所内で維持・飼育する SPF マウスと GF マウスの盲腸内容物のプロテオーム解析の結果と、IBD とトリプシンに関連するこれまでの報告を鑑みて¹⁸⁻²²、タンパク分解酵素のトリプシン(Anionic trypsin-2: PRSS2)に着目した(図 1)。そして、マウスにおいては、GF マウスの盲腸以遠においてトリ

プシンが活性状態で残存すること(図 2)、ヒトにおいては、IBD 患者の便中にトリプシンが活性状態で残存する現象(図 3)を踏まえ、ある種の腸内細菌がトリプシン活性の消失に関与すると考え、その責任細菌の同定と単離を試みた。そして遂に、健康なヒト便から単離した *Paraprevotella clara* が、マウス及びヒトトリプシンを分解する現象の発見に至り、腸内細菌によるトリプシン活性消失メカニズムの一端を説明することに成功した。

Paraprevotella clara は、2009 年に *Prevotella* 科から系統学的に分離・提唱された、大きさ $0.4\text{-}1.5 \times 0.9\text{-}2.2 \mu\text{m}$ の偏性嫌気性・グラム陰性桿菌である。また、同時に発見された *P. xylaniphila* が同じ *Paraprevotella* 属で、2019 年 1 月現在では、*Paraprevotella* 属はこれら 2 菌のみで構成されている。*P. clara* に関しては、グルコースからのコハク酸や酢酸生成能を有するが、*P. xylaniphila* と比較するとマルトースからの酸生成能はなく、キシロースからの酸生成能が弱い点異なる⁵³。そして、本研究により、*P. clara* は、マウス及びヒトのトリプシンを分解する機能を有することが新たに判明した(*P. xylaniphila* に関しては、*P. xylaniphila* がマウスのトリプシンは分解できることは確認できたが、ヒトのトリプシンに関しての実験は行っていない)(図 15、図 16)。

本研究は、6 名の健常者の便検体を使って研究を進め、ヒト便の 16S rRNA 解析に基づく菌株照合の結果では、*Paraprevotella* 属を有する健常者は 6 名中 2

名であった。両者の便中トリプシン活性は低く、*P. clara*を有する健常者は、Donor C 1 名のみで、その便中トリプシン活性は極めて低かった。また、他 3 名(D、E、F)は、便中に *Paraprevotella* 属を有しなかったが、便中のトリプシン活性は低かった(図 7、表 3)。以上の結果から、ヒト便中には、*Paraprevotella* 属以外の菌種においてもトリプシン活性消失に関与する腸内細菌が存在すると推測できる。一方で、健常者 B のヒト便中トリプシン活性は低かったが、Donor B のヒト菌叢模倣マウスでは、マウス便中のトリプシン活性値は残存した(図 3、図 7)。これは、ヒト腸内細菌叢を構成する細菌全てをマウスに移植することは難しく⁵⁷、健常者 B の便中に存在するトリプシン活性を消失させる菌が、ヒトからマウスに移植できなかった結果と考える。また、Donor C 由来の 6 菌株投与群(6-mix)の便中トリプシン活性は、GF マウスに比べて高い水準となった(図 14)。これは、6 菌株中に、便中のトリプシン活性を上げる機能をもつ細菌株が存在すると考えられるが、更なる検討が必要である。

本研究では、独自に立ち上げた *in vitro* 実験を使い、*P. clara* が担うトリプシン分解メカニズムを検討した。*P. clara* によるトリプシン分解産物の検出を目的にして、Anti-mouse PRSS2 抗体(LSBio)に加え、マウストリプシンの C 末端(92-107: KIIRHPNYNSWTLDND)、中央付近(139-145:

CLISGWGNTLSNGV NN)、N 末端(233-246: CNYVDWIQNTIADN)領域をそれぞれ認識できる Rabbit anti-mouse RPSS2 抗体を作製した。*P. clara* 培養液を His-tag 付きリコンビナントトリプシンと共培養し、低分子ペプチドでも検出可能な Tricine-PAGE を使い検討したが、*P. clara* によるトリプシン分解後の断片同定には至らなかった。これは、WB に使用した抗体がトリプシン分解産物のエピトープを認識できない可能性や *P. clara* によるトリプシン分解反応が急速であるため、WB では認識できない程度の大きさのペプチド断片へと一気に分解される結果と考えている。最終的には、LC-MS/MS を用いたペプチドーム解析により、*P. clara* によるトリプシン量の減少の過程で、マウストリプシンに由来するペプチド断片数が継時的に増加することから、*P. clara* がトリプシンを分解すると結論付けた(図 24)。また、*P. clara* 培養液の 0.22 μ m 及び 0.45 μ m フィルター濾液は、マウストリプシンを分解できなかった一方で、5.0 μ m フィルター濾液は、トリプシンを分解できた。故に、*P. clara* 由来のトリプシン分解を担う物質は、*P. clara* の菌体外に放出される代謝産物やタンパク質などの分泌物ではなく、菌体自体が重要な役割を担っていると考えている(図 22)。加えて、プロテアーゼ阻害剤カクテルや金属プロテアーゼ阻害剤として知られている EDTA 処理を行なった *P. clara* の培養液では、*P. clara* がもつトリプシン分解の機能が消失または減弱した。故に、*P. clara* によるトリ

プシンの分解には、*P. clara* 菌体膜に存在する何らかの金属プロテアーゼが重要な働きを担うと考えている。

次に、トリプシンの分解機構を *P. clara* のゲノム情報に基づいて議論したい。長鎖型次世代シーケンサーPacBio®RS II/Sequel® システム(Pacific Biosciences)により、単離した *P. clara* 1C4 株のゲノムを解析したところ、4.0 Mbase (4,034,988 塩基)のコンプリートゲノム配列が得られた。細菌遺伝子予測ツールである PROKKA の解析に基づけば、1C4 株の全ゲノムには、機能既知の 2,045 遺伝子と機能未知の 1,133 遺伝子がコードされている(図 25)。前者の機能既知遺伝子群を分類すると、23 種のプロテアーゼ及び 35 種のペプチダーゼをコードした遺伝子が含まれる事が判った(表 4、表 5)。本研究の結果から想定される、マウス及びヒトトリプシンの分解に関与するタンパク質は、これらの計 58 種のいずれかである可能性が高いと考えられる。特に、金属プロテアーゼが直接的にトリプシンを分解すると仮定すればその候補は数種に絞られる。

本研究は、*P. clara* によるトリプシンの分解機構の解明手段として、サイズフィルターによる成分分画(図 21)、阻害剤によるプロテアーゼ系統の推定(図 22、23)など、無数の候補から可能性群を絞り込むトップダウン的なアプローチを採用した。一方で、上述の遺伝子予測解析の結果に基づく数~数十種の候

補に絞ることで、例えば候補のタンパク質遺伝子のクローニングや *P. clara* の候補遺伝子のノックアウト株といった、ボトムアップ的なアプローチも、有効な戦略と考える。

プロテアーゼは、生命維持に欠くことのできないタンパク質で、ヒトゲノムのおよそ 2%、約 500-600 種類が同定されている²²。これまで、トリプシンを分解するヒト由来のプロテアーゼの報告はある^{58,59}が、細菌由来でトリプシンを分解できるプロテアーゼや代謝産物などの存在は知られていない⁶⁰⁻⁷²。それ故に、本研究により発見できた *Paraprevotella* 属が有するトリプシン分解機能は、これまで知られていなかった新しい生命現象であり、このような本論の知見を礎として、今後さらに研究を進展させ、*Paraprevotella* 属菌によるトリプシンの分解機構の解明を進めたい。

消化管酵素のトリプシンは、食物中に含まれるタンパク質の消化に重要な役割を担うタンパク分解酵素である¹⁷。一方で、トリプシンは、その強力なタンパク分解酵素に起因した自己消化作用が原因となり発症する膵炎の原因酵素としても知られている^{73,74}。膵臓の膵外分泌細胞から分泌されたトリプシノーゲンは主膵管から十二指腸へ分泌され、エンテロキナーゼや酵素活性能を獲得したトリプシン自身の作用によってトリプシンへ変化し、タンパク分解酵素としての活性能を獲得する⁷⁵。トリプシンは、主に小腸で食物中のタンパク質の消

化に働くが、消化管上皮は、その構成要素である goblet 細胞が分泌するムチンが形成する粘液バリア(粘液層)によって、保護されている。そのため、健常状態においては、トリプシンが消化管上皮細胞に直接作用することはない⁷⁶。これは、小腸、大腸の分泌型ムチンが、幾重にも重なる糖鎖構造で保護された proline、threonine、serine で構成されたコア蛋白(PTS sequence)からなる MUC2 を主成分とし、トリプシンなどのプロテアーゼが作用しにくいシステムによるためと考えられている⁷⁶。一方で、IBD の慢性炎症による消化管の粘液バリアの破綻は、トリプシンによる自己消化を誘導すると考えられている^{19,77}。さらに、消化管上皮細胞の管腔側には、トリプシンによって活性化される protease activated receptor 1 (PAR1)および protease activated receptor 2 (PAR2)が存在し、活性化された PAR は Gq タンパクを介した細胞内シグナルを誘発し、粘膜組織への好中球誘導や細胞間の tight junction を崩壊させ、炎症を惹起すると考えられている⁷⁷⁻⁸⁰。加えて、IBD の発症は、Dysbiosis が原因のひとつと考えられている^{32,81}。食生活の欧米化や抗生物質の乱用が進む近代文明の中で、健常者が本来もつべき腸内フローラは、トリプシン活性消失機能をもつ腸内細菌が共存しにくい腸内環境へと変化する。そして、大腸にトリプシンが活性状態で残存し、IBD の発症やその症状の増悪へ繋がると考えられる。大腸でのトリプシンの残存は、IBD 発症の原因となるのか、あるいは IBD

発症の結果として生じた現象なのかは議論の余地は残るが、本研究により単離できた *P. clara* の細菌カクテル投与は、大腸から本来不要であったトリプシンを消失させ、IBD の発症や症状増悪への負の連鎖を断ち切ることができる可能性がある。また、便中のトリプシン活性の評価は、これまで存在しなかった Dysbiosis の指標や IBD に代表される大腸炎症疾患の進行や炎症の評価などのバイオマーカーに繋がる可能性もある。

大腸におけるトリプシンの残存は、IgA⁸²⁻⁸⁵ や抗菌ペプチド⁸⁶⁻⁸⁸ など、宿主の生体防御システムにおいて重要な役割を担うタンパク質の分解を導き、宿主の免疫力の低下に繋がる可能性が十分考えられる。実際に、健常者から単離した菌株 mix を GF マウスに投与した本研究の実験結果において、マウス便中のトリプシン残存が、便中の IgA の絶対量を有意に減少させていることが判明している(図 26)。もちろん、便中の分泌型 IgA 量は、腸内細菌による腸管粘膜組織での IgA 産生プラズマ細胞の誘導能の差にもよる⁸² が、大腸に残存するトリプシンが宿主免疫系に与える影響を検討する点においては、重要な知見と考える。また、Reg3 γ ⁸⁶ や Defencin^{87,88} に代表される抗菌ペプチドは、それを構成するアミノ酸に、トリプシンの切断部位となるリジンやアルギニンが多く含まれている。さらに、抗菌ペプチド自体が陽電化を帯びていることを鑑みると、陰イオン性トリプシン(Anionic-trypsin-2: PRSS2)は、抗菌ペプチドに作用しや

すい構造である。このように、トリプシンの残存と宿主免疫に重要な役割を担う便中タンパク質の関係についても、今後の研究が重要となる。

また、トリプシンは、病原性ウイルスを活性化することでも有名なプロテアーゼである。例えば、世界的な流行をもたらすインフルエンザウイルス⁸⁹、乳幼児の重症急性胃腸炎の原因病原体となるロタウイルス⁹⁰、そして重症急性呼吸器症候群の原因病原体のコロナウイルス⁹¹を活性化することの報告がある。近代文明にあっても人類に脅威をもたらすこれらのウイルスを制御することは、人類の課題といえることができる。故に、本研究が発見した *Paraprevotella* 属がもつトリプシン分解メカニズムの解明に向けた研究は、トリプシンが関与するウイルス感染症に対する新しい治療薬の開発にも繋がる可能性がある。

本研究の結果により、健康なヒト便から単離した *P. clara* が、マウスの盲腸以遠に残存するトリプシンを分解し、腸炎発症モデルマウスの炎症を抑制することを実証できた。故に、*P. clara* は、宿主に有益で重要な腸内細菌のひとつであり、IBD に対する新たな治療戦略として、トリプシン活性を消失させる腸内細菌株カクテル療法の開発に繋がることが期待できる。また、便中トリプシン活性の評価が、IBD の早期発見や IBD 患者の病態把握に重要な役割を果たし、ヒト便を用いた非侵襲的な IBD バイオマーカーとして臨床応用に繋がることも期待される。

4. 方法

[人を対象とする研究]

本研究で使用したヒト由来試料(便)は、理化学研究所内の研究倫理委員会の承認(H24-9(16))を得た上で、人を対象とする研究に関する倫理規定細則(平成 15 年細則第 131 号)に基づき採取した。

[マウス]

本研究で使用した SPF の C57BL/6N マウスは、理化学研究所・横浜研究所で維持・繁殖、または、日本クレア株式会社、チャールズ・リバー株式会社、日本 SLC 株式会社、三協ラボサービス株式会社から購入した。IL10^{-/-}マウス (B6.129P2-IL10^{tm1Cgn}/J)は Jackson Laboratories より購入し、理化学研究所・横浜研究所で維持・繁殖した。GF の C57BL/6N マウスは理化学研究所・横浜研究所または三協ラボサービス株式会社において維持・繁殖し、理化学研究所・横浜研究所のビニールアイソレーター及びステンレスアイソレーター内で実験を行った。GF の IL10^{-/-}マウスは理化学研究所・横浜研究所で、固体復元(無菌化)を実施し、理化学研究所・横浜研究所のビニールアイソレーター及びステンレスアイソレーター内で実験を行った。実験マウス飼料はチャールズ・リバー株式会

社から購入した CMF に統一した。実験に使用した GF マウスは、特別な記載がない限り、実験開始日が 8-9 週齢になるよう統一した。マウス実験は、理化学研究所・横浜研究所の動物実験倫理指針を遵守し、動物愛護の観点に基づき行った。

[ヒト及びマウス便中トリプシン活性の評価]

ヒト及びマウス便中トリプシン活性の評価は先行研究に準じたが、若干の変更を加え行った^{56,92}。マウス便及び腸管内容物を秤量し、1/500 倍(w/v)になるように 0.9% NaCl 水溶液で希釈した。ヒト便は 0.9% NaCl 水溶液で 1/200 倍(w/v)に希釈した。希釈液を、卓上小型振盪機(2,000rpm, 20min)で攪拌し、ピペッティング処理を十分に加え、4°Cで 30min インキュベート後に遠心分離(4°C, 10,000×g, 15min)し、その上清を分析用試料とした。トリプシン活性は、Trypsin Activity Assay Kit (Colorimetric) 100 test(ab102531)を使い、アブカム社が提供する標準プロトコルに従い、波長 405nm の吸光度を PerkinElmer 2030 Multilabel Reader kinetic mode で測定した。

[ヒト及びマウス便中トリプシン量の評価：WB]

ヒトまたはマウス便及び腸管内容物を秤量し、1/50 倍(w/v)になるように

Lysis Buffer(50mM Tris-HCl(pH7.4), 150mM NaCl, 1% Triton-X-100, 50mM NaF)で希釈した。希釈液を、卓上小型振盪機(2,000rpm 20min)で攪拌し、ピペッティング処理を十分に加えた。4°Cで 30min インキュベート後に、遠心分離(4°C, 10,000×*g*, 15min)し、等量の Loading Buffer (50mM Tris-HCl(pH7.4), 150mM NaCl, 1% Triton-X-100, 50mM NaF, 3% 2-Mercaptoethanol(nacalaitesque))を加えて、95°Cで 5min 熱処理した。SDS-PAGE、Tricine-PAGE 並びに Membrane への転写は XV PANTERA SYSTEM(DRC)の標準プロトコルに従った。Membrane は PVDF membrane(0.2μm Transfer Membranes Immobilon-P^{SO} Merck Millipore Ltd.)を使用した。Blocking 及び抗体染色は iBind™ Western System(Invitrogen)の標準プロトコルに従った。ヒト由来の PRSS2 の染色については Rabbit anti-human trypsin Antibody (LSBio, 1:400)、マウス由来の PRSS2 の染色については Rabbit anti-mouse trypsin Antibody (LSBio 及び Cosmo Bio Co., Ltd., CPA, Japan, 1:400)、6-His の染色については Rabbit anti-6-His Antibody(Bethyl laboratories, 1:400)、を用いて一次抗体反応を行い、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY, 1:400)を用いて二次抗体反応を行った。発色は Chemi-Lumi One (nacalaitesque)を使用し、イメージングには Molecular imager® ChemiDoc™ XRS+システム(BIO-RAD)を使用した。

[マウス膵臓組織のトリプシン量の評価：WB]

マウスから膵臓を摘出し、直ちに液体窒素で急速凍結した。タンパク質の抽出は、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) を使い、標準プロトコルに従い分離した。BCA assay (Thermo Fisher Scientific)を用いて、タンパク質濃度を $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整し、等量の Loading Buffer (50mM Tris-HCl(pH7.4), 150mM NaCl, 1% Triton-X-100, 50mM NaF, 3% 2-Mercaptoethanol (nacalai tesque))を加え、95°Cで 5min 熱処理した。SDS-PAGE、並びに Membrane への転写は XV PANTERA SYSTEM (DRC)の標準プロトコルに従い行った。Membrane は PVDF membrane(0.2 μm Transfer Membranes Immobilon-PSQ Merck Millipore Ltd.)を使用した。Blocking 及び抗体染色は iBind™ Western System (Invitrogen)の標準プロトコルに従い行った。Rabbit anti-mouse trypsin (LS-C296077, LSBio, 1:400)を用いて一次抗体反応を行い、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY, 1:400)を用いて二次抗体反応を行った。Loading Control は、Rabbit anti-mouse HSP90 antibody (Cell Signaling TECHNOLOGY, 1:400)を使用した。発色は Chemi-Lumi One (nacalai tesque)を使用し、イメージングには Molecular imager® ChemiDoc™ XRS+システム (BIO-RAD)を使用した。

[qRT-PCR]

膵臓及び腸管上皮細胞からの全 RNA の抽出は、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) を使い、標準プロトコルに従って行った。全 RNA からの cDNA の合成は、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を使い、標準プロトコルに従って行った。qRT-PCR 解析には Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 及び Lightcycler480 (Roche) を用いて行った。解析には $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行い、各遺伝子の mRNA 発現量は、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、GAPDH) の mRNA 発現量で補正した。

使用したプライマー配列は以下の通りである。

GAPDH Forward primer: 5'-GTCGTGGAGTCTACTGGTGTCTTC-3'

GAPDH Reverse primer: 5'-GTCATATTTCTCGTGGTTTCACACC-3'

PRSS2 Forward primer: 5'-TGTGACCCTCAATGCCAGAG-3'

PRSS2 Reverse primer: 5'-AGCACTGGGGCATCAACAC-3'

[組織学的解析]

パラフィン切片のヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色は、以下の手順で行った。摘出したマウス大腸を長軸方向に開き、PBS で洗浄後、マウス腸管ロール

を作成した。4%-Paraformaldehyde に 4°Cで一晩浸漬した後、Tissue Processor (Leica MICROSYSTEMS)を使いパラフィン包埋した。作製したパラフィnbロックは、ミクロトームを用いて 5.0 μ m 厚に薄切し、標準プロトコルに従い脱パラフィン処理を行った。Mayer's Hematoxylin Solution(和光純薬工業)及び Eosin Y(和光純薬工業)を使用し、和光純薬工業株式会社が提供するプロトコルに従い染色した。

炎症スコア(Histological Score)は、以下 5 項目の合計値で算出した⁸。炎症細胞の組織浸潤(inflammatory cell infiltration, score, 0-4)、粘膜肥厚(mucosa thickening, score, 0-4)、杯細胞数の減少(goblet cell depletion, score, 0-4)、陰窩膿瘍(crypt abscess, score, 0-4)、粘膜組織構造の崩壊(destruction of architecture, score, 0-4)。炎症スコアの判定は、2 名(SM、EW)が各々独立してブラインド下に評価し、評価の一致しなかった部分については議論の上、意見を統一した。

免疫組織染色は以下の手順で行った。マウスから大腸を摘出後、便塊を含んだ大腸を、メタノールカルノア液(60% methanol, 30% chloroform, 10% glacial acetic acid)に4°Cで一晩浸漬して固定した後、Tissue Processor (Leica MICROSYSTEMS)を使いパラフィン包埋した。作製したパラフィnbロックをミクロトームで5.0 μ m 厚に薄切し、標準プロトコルに従って脱パラフィン処理した。PRSS2染色は、Blocking buffer (1.0% BSA, 2.0% FBS, 0.05%

Tween 20 in PBS)で120 min インキュベートし、Rabbit anti-PRSS2 antibody (LSBio 1:250)を用いて一次抗体反応を行った後、Alexa 488-labeled goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, 1:500) を用いて二次抗体反応を行った。また、DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole、同仁化学研究所)、Rhodamin-labeled UEA1 (Ulex Europaeus Agglutinin 1、Vector Laboratories)を用いて対比染色した。顕微鏡観察及び撮像には、Leica AF600及び共焦点顕微鏡Leica TCS SP5を用いた。

[盲腸内容物からの菌株の分離]

マウスから盲腸を摘出後、COY 社製嫌気性チャンバー(窒素：水素：二酸化炭素=80：10：10)内で、盲腸内容物を glycerol 含有 PBS (最終濃度 20%(v/v))に懸濁し、-80°Cで保存した。保存した検体からの菌株の分離は、以下の手順で行った。嫌気性チャンバーに搬入した検体を、嫌気性 TS (BD) broth を用いて希釈系列とした。EG、ES、M10、NBGT、VS⁹³⁻⁹⁵、TS (BD)、BL (栄研化学)、BBE (極東製薬工業)、Oxoid CM0619 (Thermo scientific)、SR0107 (Thermo scientific)添加 CM0619、SR0108 (Thermo scientific) 添加 CM0619、mGAM (日水製薬)、Schaedler (BD) の各寒天培地に、コンラージ棒を用いて希釈した検体を塗布した。塗布 2 日後に、培地に発育したコロニーから形態の違いに着目して滅菌楊枝で釣菌し、EG 寒天培地で純粋培養した。

それぞれの菌株は EGEF 液体培地で一晩培養後、glycerol を最終濃度 20% (v/v) となるよう添加し、-80°C で保存した。

使用した EG (Eggerth-Gagnon) 寒天培地の組成は以下の通りである。

Proteose peptone No. 3 (10.0g)、Yeast Extract (5.0g)、Na₂HPO₄ (4.0g)、Glucose (1.5g)、Soluble starch (0.5g)、L-cysteine · HCl (0.5g)、L-cystine (0.2g)、Tween 80 (0.5g)、Agar (4.8g)、Meat extract (500ml)、Water up to 1000ml+ Defibrinated Horse blood (50ml)

EGEF 液体培地の組成は、EG 平板培地の組成のうち、馬血液 50ml を Fildes solution に 40ml に変更し、Agar (4.8g) を除外したものである。

菌種の同定は、16S rRNA 解析に基づいて行った。後述の酵素法による細菌ゲノムの抽出に従って、単離菌の gDNA を得た。16S rDNA を KOD plus Neo (TOYOBO) のプロトコルに従って PCR 増幅した後、Eurofins の受託サービスを利用してサンガー法に基づくシーケンスを行った。

データ解析は、NCBI BLAST が提供する 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) を用いて行い、最も相同性の高い菌種名あるいは菌株名を選択した。

Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide

query.https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TY

PE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome/ (accessed 2018-11.12)

サンガーシーケンスに使用したプライマー配列は以下の通りである。

F27 primer: 5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3'

R1492 primer: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

[Human microbiota-associated mice(ヒト菌叢模倣マウス)の作出]

-80°Cに保存したヒト便の 20%(v/v)glycerol 分散液を、嫌気性チャンバー内に搬入し、自然解凍した。試料を 100 μ m のメッシュでろ過した後、試験管に封入して無菌アイソレーターのステリロックに搬入した。エクスポアをステリロック内に噴霧して 2 時間静置し、空間を滅菌処理した後、菌液をアイソレーター内に搬入した。齧歯類用経口ゾンデを使って菌液 200 μ l を GF マウスに経口的に胃内投与した。投与回数は 1 回のみとした。マウス便は経時的に採取して-80°Cで一時保存し、投与から 4 週間後までの試料を解析した。

[マウスへの抗生物質投与]

オートクレーブ処理を加えた水道水で、アンピシリンナトリウム 0.5g/l

(nacalai tesque)、メトロニダゾール 0.5g/l (nacalai tesque)、タイロシン 1.0g/l (SIGMA)の各水溶液を作成し、0.22 μ m フィルターで滅菌処理した。各抗生物質の水溶液を注いだ飲水瓶を、無菌アイソレーターのステリロックに搬入した。エキスポアをステリルロック内に噴霧して 2 時間静置し、空間を滅菌処理した後、アイソレーター内に搬入した。1 週間毎に新しい溶液に交換しながら、各抗生物質の水溶液を自由飲水条件でマウスに投与した。

[ノトバイオートマウスの作出]

嫌気性チャンバー内の 37°C インキュベーターで、単離保存した各菌を EGEF 液体培地で 1-2 晩培養した。ただし *Phasolactobacterium faecium* (3G4 株) は、EGEF 液体培地では難培養であったため、80mM コハク酸を添加した Oxoid CM0619 寒天培地で 2-3 日培養後、生育コロニーを EGEF 液体培地で懸濁したものを菌液とした。菌液の吸光度(O.D. 600nm)に基づいて、 $OD < 0.1$ 、 $0.1 \leq OD < 0.3$ 、 $0.3 \leq OD$ のカテゴリーに菌液を分類し、それぞれ 300 μ l、200 μ l または 50 μ l ずつ分取して混合し、投与菌液とした。嫌気状態を維持しながら、菌液を封入した試験管を無菌アイソレーターステリロックに搬入した。エキスポアをステリルロック内に噴霧して 2 時間静置し、空間を滅菌処理した後、アイソレーター内に搬入した。齧歯類用経口ゾンデを使って菌液 200 μ l を GF マ

ウスに経口的に胃内投与した。投与回数は 1 回のみとした。経時的にマウス便を採取し、投与から 4 週間後までの試料を解析した。

IL-10^{-/-}マウスを用いた検討では、同様に菌液を投与して 1 週間飼育した後、LB (nacalai tesque)液体培地で一晩培養した *Enterobacter aerogenes* (11E12 株) 培養液 200 μ l を同様にして 1 回投与した。マウスの便を経時的に採取し、11E12 株の投与から 3 週後のマウスの遠位大腸組織を観察した。

[ヒト及びマウス便検体からの細菌 DNA 回収(酵素法)と 16S rRNA 解析]

ヒトあるいはマウスの便 20-30mg を、0.22 μ m フィルター処理滅菌した TE10 buffer (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA (pH 8.0)) 1.0 ml に溶解し、卓上小型振盪機を使い 2,000rpm 20 min 攪拌した。ピペッティングを十分行った後、遠心分離(RT 12,000g 3min)し、上清を除去した。Lysozyme (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation ; 最終濃度 15mg/ml) と RNase A (Invitrogen ; 最終濃度 100 μ g/ml) を添加した TE10 を 850 μ l 加えて、shaking incubator (37°C, 120rpm, 60min) でインキュベートした。続いて、アクロモペプチダーゼ (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を 2,000unit を、50 μ l の TE10 溶液として加え、shaking incubator (37°C, 120rpm, 30min) でインキュベートした。更に、SDS 及び Proteinase K (Roche) を各々 1%、1mg/ml になるように、100 μ l の TE10 溶

液として添加し、shaking incubator (55°C, 120rpm, 60min)でインキュベートした。800 μ l の Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1, pH7.9) (nacalai tesque)を加えて十分に振盪した後、5min インキュベートして遠心分離(4°C, 14,000g, 10 min)した。分取した水層に、3M NaOAc pH5.2 (nacalai tesque) 90 μ l 及びイソプロピルアルコール 900 μ lを加えて十分に振盪した後、遠心分離(4°C, 14,000 \times g, 10min)した。上清を除去した後、500 μ l 75% EtOH を加え攪拌し、遠心分離(4°C, 14,000 \times g, 5min)した。再び上清を除去して自然乾燥した後、200 μ l TE buffer を加えて 4°C で一晩インキュベートし、gDNA 溶液を得た。

微量分光光度計 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)及びアガロースゲル電気泳動で抽出した gDNA の純度を確認した。Qubit (Thermo Fisher Scientific)を用いて定量した DNA 濃度を基に、10ng/ μ l DNase RNase Free water (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)で適宜濃度を調整した。16S rDNA の V1-V2 領域を PCR 増幅した。使用したプライマー配列は以下の通りである。

27Fmod:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACxxxxxxxxACACTCTTTCCC
TACACGACGCTCTTCCGATCTAGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3'

338R:

5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATxxxxxxxxGTGACTGGAGTTCAGA

CGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

※xxxxxxxx は Miseq(Illumina)の Index 配列を表す

続いて、以下の手順で PCR 産物を精製した。

50 μ l の PCR 反応液に Agencourt AMPure XP(Beckman Coulter)を 50 μ l 加え、室温で 10min インキュベートした。マグネットラックで 5min 静置し、上清を除去した後、75% EtOH を 500 μ l 加えた。再び上清を除去した後、75% EtOH を 500 μ l 加えた。上清を除去して室温で 10min 風乾した後、TE buffer を 10 μ l 加えて懸濁した。マグネットラックで磁気ビーズを分離し、PCR 産物の TE 溶液を得た。

Kapa library quantification Kit (Kapa Biosystems)の標準プロトコルに従い、ライブラリを調製した。次世代シーケンサー MiSeq を用いて、MiSeq Reagent kit ver3 の標準プロトコルに従い、16S rRNA シークエンスを行った。取得したリードデータを Nishijima らの手法に従って解析し、16S rRNA 配列に基づく菌叢データを得た %。

[*Pareprevotella clara* DNA 定量]

秤量したマウスの便から、前述の酵素法を用いて *P. clara* の gDNA を回収した。Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO)及び Lightcycler480 (Roche)を用

いて qRT-PCR 解析を行った。定量解析には $\Delta\Delta C_t$ 法を採用し、便の質量で補正した。嫌気性チャンバー内で 37°C 1 晩 EGEF 液体培地で培養した *P. clara* の gDNA 抽出液を、定量のスタンダードに用いて定量した。

使用したプライマー配列は以下の通りである。

clara-99 Forward primer: 5'-CGTAGGAGTTTGGACCGTGT-3'

clara-99 Reverse primer: 5'-CATGGGAGCGACAAATAAAGA-3'

[ELISA]

マウス便を秤量し、1/10倍(w/v)になるようにPBS with protease inhibitor cocktail(Roche ; c Mini)に溶解した。卓上小型振盪機で攪拌(RT, 2,000rpm, 20min) し、ピペッティングを十分加え、4°Cで30minインキュベートした。その後、遠心分離(4°C, 15,000×g, 10min)を行い、その上清を分析試料とした。

リポカリン2 (LCN2)は、Lipocalin-2 Mouse DuoSet Kit (R&D systems)の標準プロトコルに従い行った。NUNC-IMMUNO PLATE(Thermo SCIENTIFIC)にCapture Antibody in PBS 100 μ lを加えover night インキュベートした。

Washing Buffer (0.005% Tween 20 in PBS)で洗浄し、Reagent Diluent(1.0% BSA in PBS)300 μ lを加え、60min インキュベートした。1/20,000倍に希釈した分析試料100 μ lを加え、120min インキュベートした。洗浄後にDetection

antibody in Reagent Diluentを加え120min インキュベートした。発色は、Streptavidin-HRPを加え、波長450nmの吸光度から波長570nmの吸光度を差し引き測定した。免疫グロブリンAは、IgA Mouse ELISA Quantitation Set (Bethyl laboratories)の標準プロトコルに従い、LCNNと同様の操作で測定した。分析試料は1/1,000倍に希釈して使用した。各々のELISAシグナルの定量には、BIO-RADのiMarkマイクロプレートリーダーを用いた。

[*In vitro* トリプシン分解実験]

嫌気性チャンバー内の37°Cインキュベーターで、単離保存した各菌をEGEF液体培地で1晩培養し、OD値を測定した。以下に記すトリプシン含有液と、菌液と1:1(v/v)の割合で混合し、37°Cでインキュベートし、トリプシン活性評価、WBあるいはペプチドーム解析を行った。

GFマウスの盲腸内容物をトリプシン含有液に適用する場合は、GFマウスの盲腸内容物を0.9% NaCl水溶液で1/50 (w/v)に希釈した液を用いた。

マウスのリコンビナントトリプシンをトリプシン含有液に適用する場合は、Trypsin2/PRSS2 Mouse Recombinat (His Tag) (Sino Biological Inc: 50383-M08H) を最終濃度10ng/ μ lとなるように菌液と混合した。

ヒトのリコンビナントトリプシンをトリプシン含有液に適用する場合は、

Human PRSS2/Trypsin 2 Protein (Recombinat His +T7) (aa24-241)-LS-

G24349 を最終濃度20ng/ μ lとなるように菌液と混合した。

Protease阻害剤の評価は、以下の手順で行った。cOmplete™ ULTRA Tablet, Mini EASTpack (Roche)あるいはEDTA Buffer Powder, pH8.0 (TaKaRa)を使用し、各々標準プロトコルに従って溶液を調製した。各溶液と菌液を混合し、37°Cで20minインキュベート後に、同様にトリプシン含有溶液と混合して評価した。

[糞便プロテオーム解析：LC-MS/MS]

解析に使用する便及び腸内容物は-80°Cで凍結保存した。凍結保存サンプルは、氷上で自然解凍し、5 倍量(w/w) RIPA Lysis Buffer with protease inhibitor cocktail を加えよく攪拌した。遠心分離(4°C, 3,000×*g*, 10min)した後、その上清をさらに遠心分離(4°C, 15,000×*g*, 20min)した。上清に 30% TCA:supernatant =1:1 の容積比で TCA を加えて攪拌し、4°C 30min インキュベートした。遠心分離(4°C, 15,000×*g*, 20min)し、上清を除去した。Acetone 800 μ lを加え軽く攪拌し、遠心分離(4°C, 15,000×*g*, 5min)した後、上清を除去した。この作業をもう一度繰り返し、沈殿物に 100mM Tris-HCl pH9.0、12mM SDC、12mM SLS の水溶液を加え、超音波破碎装置でタンパク質を抽出した。BCA assay (Thermo

Fisher Scientific) を用いてタンパク質濃度を測定し、タンパク質濃度を $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整して Fecal lysate とした。Fecal lysate $20 \mu\text{l}$ に 100mM DTT 水溶液 $2.0 \mu\text{l}$ を加え、 50°C で 30min インキュベートした。375mM ヨードアセトアミド水溶液 $2.0 \mu\text{l}$ を加えて室温で 30min インキュベートし、400mM cysteine 水溶液 $4.0 \mu\text{l}$ を加え、さらに室温で 10min インキュベートした。50mM 重炭酸アンモニウム水溶液を $80 \mu\text{L}$ 加え、さらに $200\text{ng}/\mu\text{l}$ Lys-C $2.0 \mu\text{l}$ 及び豚膵臓由来 Trypsin ($200\text{ng}/\mu\text{l}$) $2 \mu\text{l}$ を加えて、 37°C で一晩インキュベートした。

酢酸エチル $200 \mu\text{l}$ を加えて攪拌し、続いて 5.0% TFA $30 \mu\text{l}$ を加えて室温で 5min 攪拌した後に、遠心分離(RT, $12,000 \times g$, 5min)した。 -80°C で 15min 静置して下層の水溶性成分を凍結させた後、上層の不凍成分(酢酸エチル層)を完全除去した。わずかに残る酢酸エチルは、遠心エバポレーター(Speed vac)で 30min 処理し、完全に除去した。0.1% TFA を $100 \mu\text{l}$ 加え、遠心分離(RT, $15,000 \times g$, 15min)した。上清を STAGE-Tip (C18)で脱塩処理し、Speed Vac で完全に乾燥させた。3% ACN-0.1% formic acid 水溶液に再溶解し、遠心分離(RT, $15,000 \times g$, 10min)した後、上清を LC-MS/MS システムで分析した。

LC は Eksigent ekspert nanoLC 400 HPLC system (Sciex) を使用し、分析カラムには、内径 $75 \mu\text{m}$ \times 長さ 200 mm の空カラムに CAPCELL CORE MP (大阪ソーダ、粒子タイプ: コアシェル粒子、官能基: C18; 粒子径: $2.7 \mu\text{m}$; 細孔径:

16 nm)の粒子をパッキングして使用した。MS は、TripleTOF 5600+(Sciex)を使用した。

LC-MS/MS 分析で得られたデータを、Protein Pilot software v4.5 (Sciex)を用いて mouse UniProt Swiss-Prot のタンパク質配列データベースと照合してタンパク質を同定した。また、PeakView v.2.2 (Sciex)を用いて、同定されたタンパク質の相対定量値を算出した。

[ペプチドーム解析：LC-MS/MS]

解析に使用するサンプルは-80℃で凍結保存した。凍結保存サンプル 8 μ l に ACN-0.1% TFA 水溶液 400 μ l を加えて軽く攪拌し、Speed Vac で完全乾燥した。乾固物に 100mM Tris-HCl pH9.0、12mM SDC、12mM SLS の水溶液 40 μ l を加え、超音波破碎装置でタンパク質とペプチドを抽出した。100mM DTT 水溶液 4.0 μ l を加え、50℃で 30min インキュベートした。375mM ヨードアセトアミド水溶液 4.0 μ l を加えて室温で 30min インキュベートし、さらに 400mM cysteine 水溶液を 8.0 μ l 加えて室温で 10min インキュベートした。酢酸エチル 800 μ l を加え攪拌し、さらに 5.0% TFA 水溶液 80 μ l を加えて室温で 5min 攪拌した後に、遠心分離(RT, 12,000 $\times g$, 5min)した。5.0% TFA 水溶液 60 μ l を加えて室温で 5min インキュベートした後に、遠心分離(RT, 12,000 $\times g$, 5min)し

た。-80°Cで 15min 静置して下層の水溶性成分を凍結させた後、不凍成分(酢酸エチル層)を完全除去した。わずかに残る酢酸エチルは、Speed vac で 30min 処理して完全に除去した。0.1% TFA 水溶液 100 μ l を加えて遠心分離(RT, 15,000 $\times g$, 15min)した。上清を STAGE-Tip (C18)に通し、30% ACN-0.1% TFA 水溶液で溶出してペプチド溶液を得た。Speed Vac で溶媒を完全に乾燥した。3% ACN-0.1% formic acid 水溶液に再溶解して遠心分離(RT, 15,000 $\times g$, 10min)した後、上清を LC-MS/MS 分析した。

LC は UltiMate 3000 RSLCnano LC System (Thermo Fisher Scientific)を使用し、分析カラムには、内径 75 μ m \times 長さ 200 mm の空カラムに CAPCELL CORE MP (大阪ソーダ, 粒子タイプ: コアシェル粒子, 官能基: C18; 粒子径: 2.7 μ m; 細孔径: 16 nm)の粒子をパッキングして使用した。MS は Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific)を使用した。LC-MS/MS 分析で得られたデータを、Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc.)を用いて mouse UniProt Swiss-Prot のタンパク質配列データベースと照合し、ペプチドを同定した。

[統計処理]

統計処理は、Prism7 for Mac OS X を用いて行い、実験群と対照群の値に有意差があるか否かは、Student の t 検定によって評価した。全てのデータは平均

(mean) ± 標準偏差 (standard deviation, SD) で示した。Spearman 順位相関解析は、Prism7 for Mac OS X を用いて行った。

略語一覽

Amp	Ampicillin
ATG16L1	Autophagy-related, 16-like
BBE	Bacteroides bile esculin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRC	BioResource Research Center
BSA	Bovine serum albumin
CD	Crohn's disease
CD8	Cluster of differentiation 8
cDNA	complementary DNA
CDS	Coding sequence
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EG	Eggerth-Gagnon
EGEF	Eggerth-Gagnon extract fildes
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ES	Eubacterium selective
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
FMT	Fecal microbiome tranplantation
FTA	Fecal trypsin activity
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gDNA	Genomic DNA
GF	Germ-free
GWAS	Genome wide association study
H.E.	Hematoxylin-Eosin stain
HRP	Horseradish peroxidase
HSP90	Heat shock protein 90
IBD	Inflammatory bowel disease

IFN γ	interferon- γ
IL10	Interleukin-10
IL12B	Interleukin-12B
IL23R	Interleukin-23 receptor
JCM	Japan Collection of Microorganisms
LB	Lactobacillus Bifidobacterium
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
LCN2	Lipocalin-2
mGAM	modified Gifu anaerobic broth
MNZ	Metronidazole
MUC2	Mucin-2
NBGT	Neomycin brilliant green taurocolic acid
NCBI	National center for biotechnology information
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain 2
OD	Optical density
<i>P. clara</i>	<i>Paraprevotella clara</i>
<i>P. xylaniphila</i>	<i>Paraprevotella xylaniphila</i>
PAGE	Poly acrylamide gel electrophoresis
PAR	Protease activated receptor
PBS	Phosphate buffered salts
PCoA	Principal coordinates analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PRSS 2	Serine protease 2
PTS	proline, threonine, and serin
PVDF	Polyvinylidene difluoride
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
Reg3 γ	Regenerating islet-derived protein 3-gamma
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
SDC	Sodium deoxycholate
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single nucleotide polymorphism

SPF	Specific pathogen-free
TE	Tris-EDTA
TFA	Trifluoroacetic acid
Th1	T helper 1 cell
Th17	T helper 17 cell
TNF α	Tumor necrosis factor α
TS	Tryptic soy
UC	Ulcerative colitis
UEA1	Ulex europaeus agglutinin 1
WB	Western blotting
$\Delta \Delta Ct$	Delta delta Ct

謝辞

本研究の機会を与えて下さり、初学者の私を辛抱強くご指導くださいました理化学研究所・消化管恒常性研究チーム・チームリーダー及び慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室の本田賢也教授に心より感謝申し上げます。日々の研究生活を共にさせていただきました消化管恒常性研究チーム・副チームリーダー成島聖子先生、Sean Kearney さん、Li Youxian さん、伊東可寛さん、元尾伊織さん、松永崇宏さん、渡部和人さん、永野勇治さん、鳥山直樹さん、武川美穂さん、三枝紗代子さんに深く感謝申し上げます。本研究のスタートラインとなった糞便プロテオーム解析技術と多くのご助言をいただきました小原收先生、川島祐介さん、数々の細菌叢解析とご助言をいただきました服部正平先生、須田亙さん及び服部研究室の皆様、本研究の要となる WB と実験指導をいただきました田中貴志先生に感謝申し上げます。また、東京大学小児外科の岩中督前教授、藤代準准教授、小児外科の皆様にも感謝申し上げます。私を基礎研究に導いてくださいました国立成育医療研究センター外科部長金森豊先生に感謝申し上げます。理化学研究所の皆様、慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室の皆様にも心より感謝申し上げます。また、私生活を支えてくださいましたマザーホームクリニック松山齊久院長とスタッフの皆様にも深く感謝申し上げます。最後になりましたが、5 年間、私を支えてくれました、渡辺享子、笑、幸、成に深く感謝致します。

参考文献

- 1 Hill, D. A. & Artis, D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol* **28**, 623-667, doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101330 (2010).
- 2 Bianconi, E. *et al.* An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* **40**, 463-471, doi:10.3109/03014460.2013.807878 (2013).
- 3 Honda, K. & Littman, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* **535**, 75-84, doi:10.1038/nature18848 (2016).
- 4 Hooper, L. V. & Gordon, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**, 1115-1118 (2001).
- 5 Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**, 1022-1023, doi:10.1038/4441022a (2006).
- 6 Atarashi, K. *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**, 232-236, doi:10.1038/nature12331 (2013).
- 7 Atarashi, K. *et al.* Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* **163**, 367-380, doi:10.1016/j.cell.2015.08.058 (2015).
- 8 Atarashi, K. *et al.* Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science* **358**, 359-365, doi:10.1126/science.aan4526 (2017).
- 9 Tanoue, T. *et al.* A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*, doi:10.1038/s41586-019-0878-z (2019).
- 10 Macfarlane, G. T., Cummings, J. H. & Allison, C. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* **132**, 1647-1656, doi:10.1099/00221287-132-6-1647 (1986).
- 11 Meier, F., Geyer, P. E., Virreira Winter, S., Cox, J. & Mann, M. BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes. *Nat Methods*, doi:10.1038/s41592-018-0003-5 (2018).
- 12 Lichtman, J. S. *et al.* The effect of microbial colonization on the host proteome varies by gastrointestinal location. *ISME J* **10**, 1170-1181, doi:10.1038/ismej.2015.187 (2016).
- 13 Kolmeder, C. A. *et al.* Faecal Metaproteomic Analysis Reveals a Personalized and Stable Functional Microbiome and Limited Effects of a Probiotic Intervention in Adults. *PLoS One* **11**, e0153294, doi:10.1371/journal.pone.0153294 (2016).
- 14 Pinto, E. *et al.* The intestinal proteome of diabetic and control children is enriched with different microbial and host proteins. *Microbiology* **163**, 161-174, doi:10.1099/mic.0.000412 (2017).
- 15 Ang, C. S., Baker, M. S. & Nice, E. C. Mass Spectrometry-Based Analysis for the Discovery and Validation of Potential Colorectal Cancer Stool Biomarkers. *Methods Enzymol* **586**,

- 247-274, doi:10.1016/bs.mie.2016.10.019 (2017).
- 16 Kühne, W. On the behavior of various organized and so-called unformed ferments. **190-198** (1877).
 - 17 Martini, A. The Renaissance of Science: The Story of the Atom and Chemistry. 583 (2014).
 - 18 van de Merwe, J. P. & Mol, G. J. Levels of trypsin and alpha-chymotrypsin in feces from patients with Crohn's disease. *Digestion* **24**, 1-4, doi:10.1159/000198767 (1982).
 - 19 Midtvedt, T. *et al.* Increase of faecal tryptic activity relates to changes in the intestinal microbiome: analysis of Crohn's disease with a multidisciplinary platform. *PLoS One* **8**, e66074, doi:10.1371/journal.pone.0066074 (2013).
 - 20 Benno, P., Leijonmarck, C. E., Monsen, U., Uribe, A. & Midtvedt, T. Functional alterations of the microflora in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* **28**, 839-844 (1993).
 - 21 Steck, N., Mueller, K., Schemann, M. & Haller, D. Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut* **61**, 1610-1618, doi:10.1136/gutjnl-2011-300775 (2012).
 - 22 Vergnolle, N. Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut* **65**, 1215-1224, doi:10.1136/gutjnl-2015-309147 (2016).
 - 23 Yoon, H. *et al.* Increased Pancreatic Protease Activity in Response to Antibiotics Impairs Gut Barrier and Triggers Colitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **6**, 370-388 e373, doi:10.1016/j.jcmgh.2018.05.008 (2018).
 - 24 Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **361**, 2066-2078, doi:10.1056/NEJMr0804647 (2009).
 - 25 Cho, I. & Blaser, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* **13**, 260-270, doi:10.1038/nrg3182 (2012).
 - 26 Kostic, A. D., Xavier, R. J. & Gevers, D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* **146**, 1489-1499, doi:10.1053/j.gastro.2014.02.009 (2014).
 - 27 Cho, J. H. & Weaver, C. T. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **133**, 1327-1339, doi:10.1053/j.gastro.2007.08.032 (2007).
 - 28 Duerr, R. H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461-1463, doi:10.1126/science.1135245 (2006).
 - 29 Hirano, A. *et al.* Association study of 71 European Crohn's disease susceptibility loci in a Japanese population. *Inflamm Bowel Dis* **19**, 526-533, doi:10.1097/MIB.0b013e31828075e7 (2013).
 - 30 Franke, A. *et al.* Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* **40**, 1319-1323, doi:10.1038/ng.221 (2008).
 - 31 Silverberg, M. S. *et al.* Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found

- by genome-wide association study. *Nat Genet* **41**, 216-220, doi:10.1038/ng.275 (2009).
- 32 Hviid, A., Svanstrom, H. & Frisch, M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut* **60**, 49-54, doi:10.1136/gut.2010.219683 (2011).
- 33 Ewaschuk, J. B., Tejpar, Q. Z., Soo, I., Madsen, K. & Fedorak, R. N. The role of antibiotic and probiotic therapies in current and future management of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* **8**, 486-498 (2006).
- 34 Elson, C. O. *et al.* Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* **206**, 260-276, doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00291.x (2005).
- 35 Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-274 (1993).
- 36 Kennedy, R. J. *et al.* Interleukin 10-deficient colitis: new similarities to human inflammatory bowel disease. *Br J Surg* **87**, 1346-1351, doi:10.1046/j.1365-2168.2000.01615.x (2000).
- 37 Rennick, D. M. & Fort, M. M. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G829-833, doi:10.1152/ajpgi.2000.278.6.G829 (2000).
- 38 Eun, C. S. *et al.* Induction of bacterial antigen-specific colitis by a simplified human microbiota consortium in gnotobiotic interleukin-10^{-/-} mice. *Infect Immun* **82**, 2239-2246, doi:10.1128/IAI.01513-13 (2014).
- 39 Rutgeerts, P. J. Review article: the limitations of corticosteroid therapy in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **15**, 1515-1525 (2001).
- 40 Steinhart, A. H., Ewe, K., Griffiths, A. M., Modigliani, R. & Thomsen, O. O. Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000301, doi:10.1002/14651858.CD000301 (2003).
- 41 Targan, S. R. *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* **337**, 1029-1035, doi:10.1056/NEJM199710093371502 (1997).
- 42 Hanauer, S. B. *et al.* Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* **359**, 1541-1549, doi:10.1016/S0140-6736(02)08512-4 (2002).
- 43 Eissner, G., Kolch, W. & Scheurich, P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 353-366, doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.011 (2004).
- 44 Lopez, J. & Grinspan, A. Fecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **12**, 374-379 (2016).
- 45 Suzuki, T. *et al.* Muscularis inflammation and the loss of interstitial cells of Cajal in the

- endothelin ETB receptor null rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol***287**, G638-646, doi:10.1152/ajpgi.00077.2004 (2004).
- 46 Caenepeel, P., Janssens, J., Vantrappen, G., Eyssen, H. & Coremans, G. Interdigestive myoelectric complex in germ-free rats. *Dig Dis Sci***34**, 1180-1184 (1989).
- 47 Husebye, E., Hellstrom, P. M., Sundler, F., Chen, J. & Midtvedt, T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol***280**, G368-380, doi:10.1152/ajpgi.2001.280.3.G368 (2001).
- 48 Hamady, M., Lozupone, C. & Knight, R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J***4**, 17-27, doi:10.1038/ismej.2009.97 (2010).
- 49 Duncan, S. H., Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E. & Flint, H. J. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl Environ Microbiol***68**, 5186-5190 (2002).
- 50 Koropatkin, N. M., Cameron, E. A. & Martens, E. C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol***10**, 323-335, doi:10.1038/nrmicro2746 (2012).
- 51 Chassaing, B. *et al.* Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One* **7**, e44328, doi:10.1371/journal.pone.0044328 (2012).
- 52 Kurokawa, K. *et al.* Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res***14**, 169-181, doi:10.1093/dnares/dsm018 (2007).
- 53 Morotomi, M., Nagai, F., Sakon, H. & Tanaka, R. *Paraprevotella clara* gen. nov., sp. nov. and *Paraprevotella xylaniphila* sp. nov., members of the family 'Prevotellaceae' isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol***59**, 1895-1900, doi:10.1099/ijs.0.008169-0 (2009).
- 54 Lewis, J. D. *et al.* Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* **14**, 1660-1666, doi:10.1002/ibd.20520 (2008).
- 55 Best, W. R. Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 304-310, doi:10.1097/01.MIB.0000215091.77492.2a (2006).
- 56 Ramare, F., Hautefort, I., Verhe, F., Raibaud, P. & Iovanna, J. Inactivation of tryptic activity by a human-derived strain of *Bacteroides distasonis* in the large intestines of gnotobiotic rats and mice. *Appl Environ Microbiol***62**, 1434-1436 (1996).
- 57 Staley, C. *et al.* Stable engraftment of human microbiota into mice with a single oral gavage following antibiotic conditioning. *Microbiome* **5**, 87, doi:10.1186/s40168-017-0306-2 (2017).
- 58 Szmola, R. & Sahin-Toth, M. Chymotrypsin C (caldecrin) promotes degradation of human

- cationic trypsin: identity with Rinderknecht's enzyme Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11227-11232, doi:10.1073/pnas.0703714104 (2007).
- 59 Nemoda, Z. & Sahin-Toth, M. Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen. *J Biol Chem* **281**, 11879-11886, doi:10.1074/jbc.M600124200 (2006).
- 60 Grenier, D. Production of trypsin and chymotrypsin inhibitors by oral bacterial isolates. *J Periodontal Res* **26**, 381-387 (1991).
- 61 Warfel, J. M., Steele, A. D. & D'Agnillo, F. Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction. *Am J Pathol* **166**, 1871-1881, doi:10.1016/S0002-9440(10)62496-0 (2005).
- 62 Wu, S., Rhee, K. J., Zhang, M., Franco, A. & Sears, C. L. Bacteroides fragilis toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage. *J Cell Sci* **120**, 1944-1952, doi:10.1242/jcs.03455 (2007).
- 63 Babbin, B. A., Sasaki, M., Gerner-Schmidt, K. W., Nusrat, A. & Klapproth, J. M. The bacterial virulence factor lymphostatin compromises intestinal epithelial barrier function by modulating rho GTPases. *Am J Pathol* **174**, 1347-1357, doi:10.2353/ajpath.2009.080640 (2009).
- 64 Voth, D. E. & Ballard, J. D. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* **18**, 247-263, doi:10.1128/CMR.18.2.247-263.2005 (2005).
- 65 Pruteanu, M., Hyland, N. P., Clarke, D. J., Kiely, B. & Shanahan, F. Degradation of the extracellular matrix components by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **17**, 1189-1200, doi:10.1002/ibd.21475 (2011).
- 66 Grys, T. E., Siegel, M. B., Lathem, W. W. & Welch, R. A. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 to host cells. *Infect Immun* **73**, 1295-1303, doi:10.1128/IAI.73.3.1295-1303.2005 (2005).
- 67 Hoy, B. *et al.* Helicobacter pylori HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep* **11**, 798-804, doi:10.1038/embor.2010.114 (2010).
- 68 Azghani, A. O., Gray, L. D. & Johnson, A. R. A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture. *Infect Immun* **61**, 2681-2686 (1993).
- 69 Rudack, C., Sachse, F., Albert, N., Becker, K. & von Eiff, C. Immunomodulation of nasal epithelial cells by Staphylococcus aureus-derived serine proteases. *J Immunol* **183**, 7592-7601, doi:10.4049/jimmunol.0803902 (2009).
- 70 Wu, Z., Nybom, P. & Magnusson, K. E. Distinct effects of Vibrio cholerae haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated

- proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol***2**, 11-17 (2000).
- 71 Ohta, Y., Ogura, Y. & Wada, A. Thermostable protease from thermophilic bacteria. I. Thermostability, physicochemical properties, and amino acid composition. *J Biol Chem* **241**, 5919-5925 (1966).
- 72 Guo, C. J. *et al.* Discovery of Reactive Microbiota-Derived Metabolites that Inhibit Host Proteases. *Cell***168**, 517-526 e518, doi:10.1016/j.cell.2016.12.021 (2017).
- 73 Witt, H. *et al.* A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet* **38**, 668-673, doi:10.1038/ng1797 (2006).
- 74 Kukor, Z., Toth, M. & Sahin-Toth, M. Human anionic trypsinogen: properties of autocatalytic activation and degradation and implications in pancreatic diseases. *Eur J Biochem* **270**, 2047-2058 (2003).
- 75 Colomb, E. & Figarella, C. Comparative studies on the mechanism of activation of the two human trypsinogens. *Biochim Biophys Acta* **571**, 343-351 (1979).
- 76 Johansson, M. E., Sjovall, H. & Hansson, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**, 352-361, doi:10.1038/nrgastro.2013.35 (2013).
- 77 Chin, A. C., Lee, W. Y., Nusrat, A., Vergnolle, N. & Parkos, C. A. Neutrophil-mediated activation of epithelial protease-activated receptors-1 and -2 regulates barrier function and transepithelial migration. *J Immunol* **181**, 5702-5710 (2008).
- 78 Hyun, E., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M. & Vergnolle, N. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* **57**, 1222-1229, doi:10.1136/gut.2008.150722 (2008).
- 79 Bueno, L. & Fioramonti, J. Protease-activated receptor 2 and gut permeability: a review. *Neurogastroenterol Motil* **20**, 580-587, doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01139.x (2008).
- 80 Saeed, M. A. *et al.* Protease-activated Receptor 1 Plays a Proinflammatory Role in Colitis by Promoting Th17-related Immunity. *Inflamm Bowel Dis* **23**, 593-602, doi:10.1097/MIB.0000000000001045 (2017).
- 81 Shaw, S. Y., Blanchard, J. F. & Bernstein, C. N. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* **106**, 2133-2142, doi:10.1038/ajg.2011.304 (2011).
- 82 Bunker, J. J. *et al.* Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* **43**, 541-553, doi:10.1016/j.immuni.2015.08.007 (2015).
- 83 Palm, N. W. *et al.* Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* **158**, 1000-1010, doi:10.1016/j.cell.2014.08.006 (2014).
- 84 Kawamoto, S. *et al.* Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate

- diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152-165, doi:10.1016/j.immuni.2014.05.016 (2014).
- 85 Planer, J. D. *et al.* Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature* **534**, 263-266, doi:10.1038/nature17940 (2016).
- 86 Brandl, K. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature* **455**, 804-807, doi:10.1038/nature07250 (2008).
- 87 Ramasundara, M., Leach, S. T., Lemberg, D. A. & Day, A. S. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 202-208, doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05772.x (2009).
- 88 Hayase, E. *et al.* R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J Exp Med* **214**, 3507-3518, doi:10.1084/jem.20170418 (2017).
- 89 Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. & Blodorn, J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **68**, 426-439 (1975).
- 90 Konno, T. *et al.* Proteolytic enhancement of human rotavirus infectivity. *Clin Infect Dis* **16 Suppl 2**, S92-97 (1993).
- 91 Matsuyama, S., Ujike, M., Morikawa, S., Tashiro, M. & Taguchi, F. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12543-12547, doi:10.1073/pnas.0503203102 (2005).
- 92 Midtvedt, T. *et al.* Establishment of a biochemically active intestinal ecosystem in ex-germfree rats. *Appl Environ Microbiol* **53**, 2866-2871 (1987).
- 93 Mitsuoka, T., Segal, T. & Yamamoto, S. [Improved methodology of qualitative and quantitative analysis of the intestinal flora of man and animals]. *Zentralbl Bakteriol Orig* **195**, 455-469 (1965).
- 94 Mitsuoka, T., Ohno, K., Benno, Y., Suzuki, K. & Namba, K. [The fecal flora of man. IV. Communication: Comparison of the newly developed method with the old conventional method for the analysis of intestinal flora (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Orig A* **234**, 219-233 (1976).
- 95 Itoh, K. & Mitsuoka, T. Production of gnotobiotic mice with normal physiological functions. I. Selection of useful bacteria from feces of conventional mice. *Z Versuchstierkd* **22**, 173-178 (1980).
- 96 Nishijima, S. *et al.* The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res* **23**, 125-133, doi:10.1093/dnares/dsw002 (2016).