

令和元年6月10日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19364

研究課題名(和文) 菌叢ネットワークの解明と“マスター”細菌の同定

研究課題名(英文) Identification of microbiome network and "Master" bacteria

研究代表者

城口 克之 (Shiroguchi, Katsuyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00454059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトにおいて細菌は身近な生物であり、ヒトは約100兆個の細菌と共生している。このうちの腸内細菌叢はヒトの健康に大きく影響することが知られており、細菌とヒトの関係を調べる研究は多く行われている。本研究では、細菌同士の関係に着目して、細菌叢のバランス(種類と細菌数)における細菌同士の関係を解析することにチャレンジした。これまでに我々が開発してきた新規の細菌解析法を用いることで、細菌毎に異なる部位での存在量が違うことが分かり、似ている細菌、似ていない細菌が存在するなど、細菌同士の関係が明らかとなってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内の細菌叢のバランス(細菌の種類と数)がヒトの健康に影響を与えていることが分かっている。したがって、このバランスをコントロールすることは、健康を維持するために、もしくは病気を治すために役に立つ可能性がある。本研究において、このバランスを作り出す細菌同士の関係の一部が解析されていることは、バランスのコントロールへ向けた1つの知見を与えることになる。

研究成果の概要(英文)：Human being lives with about 100 trillion bacteria in/on one's body. It is well known that the commensal bacteria in the gut affect one's health, and relationship between the bacteria and human health has been well studied. In this study, we tried to analyze relationship between bacteria which may make distribution (i.e., species and number) of bacteria. Using our own developed method, we measured species and the number of each bacteria in different positions. Some tendencies on the position dependent amount are similar among some bacteria but not others, which may be due to the bacteria interaction.

研究分野：生物物理学、定量オミクス

キーワード：細菌叢 定量解析 腸内細菌 シークエンシング

## 1. 研究開始当初の背景

細菌は、ヒトにおいて身近な生物である。ヒトは約 100 兆個の細菌と共生しており、この細菌叢バランス(種類と細菌数)が、ヒトの健康に大きく影響することが知られている。植物の育成などに重要な土壌の質にも、細菌が寄与している。これらの細菌叢の解析はこれまでも多々行われてきたが、本萌芽研究では、最終的に細菌叢のコントロールを目指したチャレンジを提案した。

細菌叢解析は、世界的な規模で推進され、成果をおさめている。一方で、その成果の限界も見えてきている現状がある。その原因の1つは、現在の細菌叢解析が半定量解析であり、そのため、細菌叢ネットワークの解析や定量的なモデル構築ができないことにある。したがって、どの細菌がどのように作用して細菌叢バランスが維持されているのかの理解が難しい。例えば、細菌叢のバランスを崩した患者の腸内に健常者の糞便を移植し、細菌叢バランスをリセットして疾患を治す糞便移植が行われているが、その効果の予見は簡単ではない。したがって、特定の患者の特定の細菌叢において、そのバランスを立て直すためにどの細菌がどれぐらいの量に必要なのか、などについての理解が進むことが期待される。

細菌叢コントロールに向けた重要なステップの1つは、菌種の同定と菌数の定量を正確に行うことである。しかしながら、これまでの計測方法では、細菌の数を計数しているのではなく、細菌がもつ 16S rRNA の遺伝子のコピー数を、次世代シーケンサを用いて解析している。細菌によっては 16S rRNA をゲノム上に1コピーや15コピーもつものも報告されており、細菌間における菌数比較は難しい。また、細菌の種類は主に 16S rRNA の配列で同定されているが、シーケンサエラーもあるため、ある程度の配列の相同性があるものを同じ細菌と想定して解析がされていることも多い。16S rRNA の配列が似ていながら異なる細菌も存在するが、それらを区別することは簡単ではない。

申請者は、この基礎的であるが重要な問題にアプローチするために、細菌の種類の同定に使われることが多い 16S rRNA の配列をもとに一塩基の違いで細菌を同定し、細菌数を一細胞レベルで定量する、これまでにない革新的な細菌叢解析法を開発してきた。次の課題として、この手法を用い、細菌同士の関係性を理解することが期待される。本研究の挑戦が実れば、細菌叢ネットワークの成り立ちを理解することにつながり、将来的な細菌叢コントロールへの道を拓くと考えられる。

## 2. 研究の目的

本萌芽研究では、これまでに開発してきた技術を用いて細菌叢コントロールというゴールへ向けた一歩を踏み出す。そのためにまず、腸内の場所によって変化する各細菌の増減を定量し、細菌叢バランスがどのように変化するかを解明する。最終的に、細菌叢バランスに強く影響を与える“マスター”となる細菌を同定し、その影響を定量的に解析し、細菌叢ネットワークを解明する。

具体的には腸内細菌を対象にし、異なる位置の細菌叢を定量解析して、各菌種における数変化の相関解析などを行い、どの細菌とどの細菌が同時に増えているのか、もしくは減っているのか、関連の強いまたは弱い菌はどれか、などを解析する。

## 3. 研究の方法

異なる場所(時系列変化に相当するとも考えられる)の細菌叢の違いを解析するため、同じ腸内にあるペレット(最終的に糞便となるもの)を複数個所から採取した。具体的には、盲腸と大腸それぞれにおいて複数のペレットを採取し、さらに、同一ペレットを細かく分画し、ペレットの内側と外側(宿主側)、また腸の軸に沿う方向にも分けた。これらのサンプルについて、まず全体の濃度を ddPCR 法を用いて測定した。その後、先述した新規細菌叢解析法を用いて解析した。これらにより、細菌叢ネットワークの解析に有効な、空間情報に関するデータを得た。

これらのデータをもとにし、異なる菌がどのような連関を保って変化しているのか、例えば、複数の菌の比が一定なのか、もしくは逆相関があるのか、相関がないのか、より多くの細菌と相関がある細菌、そうでない細菌などのタイプはあるのか、などを解析した。データベースに

登録されていない細菌も数多く見つかったため、その時は報告のあるソフトウェアを使って細菌の種類を推定した。

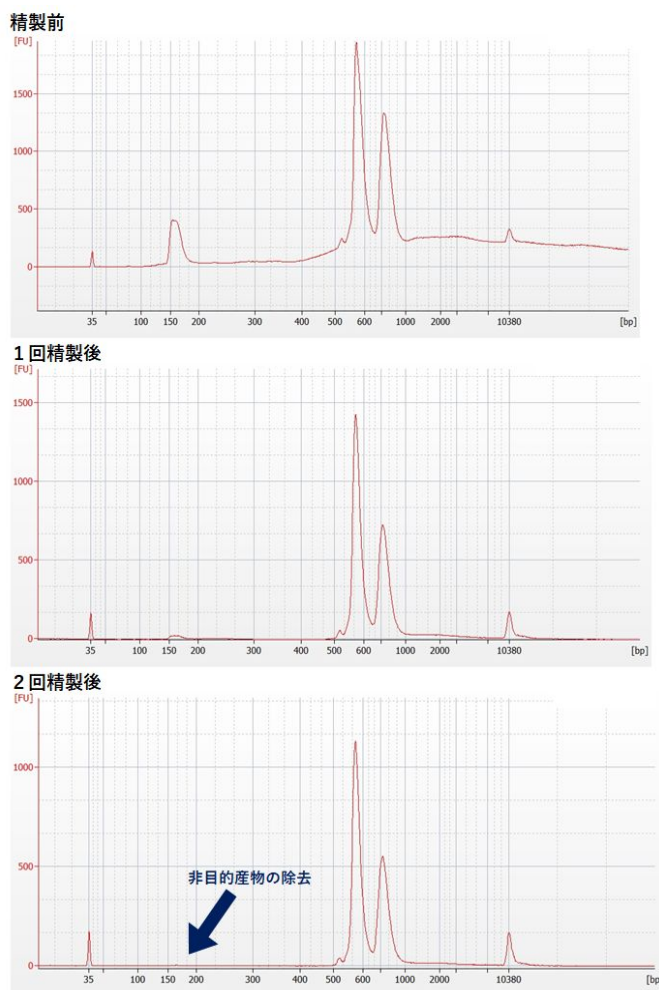
#### 4. 研究成果

##### (1) 手法の改良1

1つのペレット（糞便となるもの）から安定して細かく分画したサンプルを得る手順を工夫し、実現した。3次元ペレットからの分画は、ペレットをゲルに包埋してから切片化することで、小さいサンプルを安定して再現良く等量得ることができた。

##### (2) 手法の改良2

少量のサンプルから細菌のゲノムの一部（16SrRNA）を増幅してシーケンシング用のDNAを調製すると、非目的産物がこれまでより多く増幅されることが確認された。これを解決するためにDNAを精製するステップに改良を加えた結果、非目的産物が増幅されても、目的のDNAを効率よく精製することができるようになった（図）。具体的には、精製用のゲルの種類を検討し、適切な部位を切り出した。この工程を2回繰り返すことで、非目的産物の除去が効率的に出来るようになった。



精製による非目的産物の除去

##### (3) 手法の改良3

DNAの増幅が困難な腸内の部位があり、問題点を検討した。その結果、腸内の溶液が問題である可能性が高いことが分かった。そのため、増幅前に細菌叢周りの溶液を取り除くことを試した。

##### (4) 手法の改良4

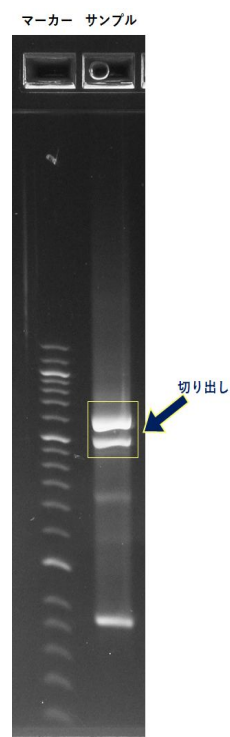
シーケンス解析を行うときに問題となる配列決定のエラー率を低くするため、様々な増幅用の酵素を検討した。また、増幅したDNAの検出効率を上げるために、増幅率をより一定に近づけるための工夫も行い、評価した。

##### (5) 解析1

様々な場所から得たサンプルをシーケンスした結果、300種類以上の細菌の配列を同定することができた。場所に依存した存在量が同じように変化する細菌が見つかり、このようなパターンを解析すると、いくつかの種類に分けられることが判明した。

##### (6) 解析2

上記のパターンについて、すべての細菌のペアに対してどのくらい似ているか解析したところ、ここでも似た性質をもつ種類に分けることができた。より多くの細菌と強い相関を示す細菌もあれば、ほとんどの細菌に対して弱い相関しか示さない細菌があることが分かった。似た性質を持つ細菌は、腸内で相互作用している可能性がある。このパターンについて、別の腸内でも同じパターンに分類される細菌と、別の腸内だと別のパターンに分類される細菌がいることも分かった。これらにより、より静的な細菌



と動的に変化をおこす細菌がいる可能性が示唆された。また、別の解析から、これらの異なる性質をもつ細菌は、その中間の性質をもつと考えられる細菌と相互作用している可能性が示唆された。

#### (7) 成果の意義と今後の発展

萌芽研究として、挑戦的な課題に取り組んだ。少量のサンプルの解析法を確立し、複数の部位を測定することで、細菌叢が異なる部位でダイナミックに変化していることが分かってきた。細菌の数を測定することによりこの結果を得たことは、次のステップに進むうえで重要な知見となると考えられる。今後はより大きなプロジェクトとして、本手法にさらに改良を加え、さらにデータも増やし、細菌同士の関係性に焦点を当て、細菌叢ネットワークを理解していくことが期待される。その先に、定量的に予見できる細菌叢ネットワークの制御への道が拓かれると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

### 〔学会発表〕(計3件)

Katsuyuki Shiroguchi, Janshi Jin, Tadashi Takeuchi, Eiji Miyauchi, Hiroshi Ohno “A novel high-throughput method for quantification of microbiota distribution at the single cell level using high dynamic range DNA barcoding”, IMMUNOLOGY (USA) 2018.

Katsuyuki Shiroguchi “A novel method for the high throughput analysis of bacterial microbiota: bacteria identification with the single-base accuracy and bacteria quantification at the single-cell level” BIT's 8th Annual Congress of Molecular & Cell Biology 2018.

Katsuyuki Shiroguchi “A novel quantification method for bacterial microbiota analysis with high dynamic range cell barcoding” IFPT'10 & IWSC'11 2018.

### 〔その他〕

ホームページ

<http://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/shiroguchi-k/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。