

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19846

研究課題名（和文）数理解析とメタゲノミクスでマイクロバイオーーム攪乱後の回復を予測する

研究課題名（英文）Prediction of recovery of microbiome after perturbation by the combination of mathematical analysis and metagenomics

研究代表者

高見 英人（TAKAMI, Hideto）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・地球環境部門（海洋生物環境影響研究センター）・上席研究員

研究者番号：70359165

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：一卵性双生児の腸内細菌叢メタゲノム配列から得られたribosomeタンパク質に基づく抗生剤投与前後の乳児の腸内細菌組成は、16S rRNAとは異なり、顕微鏡観察の所見とよく一致した。そこで、この菌叢組成を用いて微生物-ヒト間、微生物間の協力度や競争度、菌叢に対するreactivity(摂動の増幅度)を解析した。

その結果、抗生剤投与による攪乱から菌叢が回復した生後99日目は、reactivityが高く協力度や競争度が低下した非常に不安定な菌叢であることが示され、抗生剤が再投与されると菌叢攪乱の度合いがより大きいと予想された。この結果は、抗生剤連続投与の処方への提言へ向けた第一歩となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常な腸内細菌を安定的に維持し腸内環境を整えることは、健康維持に重要である。特に生後間もない乳児は、成人と比べ抗生剤を投与される機会が多いため腸内細菌叢が攪乱され、これが乳幼児の様々な疾患発症の要因となることが知られている。

本研究は、ribosomeタンパク質を用いた菌叢解析および細菌叢の機能解析データを用いた数理解析によって腸内細菌の動態を正確に把握し、腸内細菌へのダメージの軽減、早期回復へ向けた処方の提言に必要な基礎データと有効な方法論を示した。腸内細菌を主眼におき開発された本方法論は、様々な環境微生物叢の動態把握にも応用可能であることから、社会学的にも学術的にも意義深いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Unlike 16S rRNA, intestinal bacterial composition before and after administration of antibiotics based on the ribosome protein obtained from the intestinal flora metagenomic sequence of monozygotic twins was in good agreement with the microscopic findings. Therefore, using this intestinal flora composition, the degree of cooperation and competition between microorganisms and humans, between microorganisms, and the reactivity (amplification degree of perturbation) to the intestinal flora were analyzed. As a result, on the 99th day after birth when the flora was recovered from the disturbance caused by the administration of antibiotics, it was shown that the flora was very unstable with high reactivity and low degree of cooperation and competition. It was expected that the degree of flora disruption would be greater. This result was the first step toward the recommendation of prescription of continuous administration of antibiotics.

研究分野：ゲノム微生物学、環境微生物学、バイオインフォマティクス

キーワード：乳児 メタゲノム解析 腸内細菌叢 数理解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

誕生したばかりの子供の腸内は無菌であるが、生育とともに腸内細菌叢が形成されていく。正常な腸内細菌叢を安定的に維持することが重要であるが、乳児は、成人と比べ抗菌剤を投与される機会が多い。抗菌剤は腸内細菌叢の乱れを引き起こし、乳幼児期の様々な疾患発症の要因となることが近年明らかとなってきた[1]。これまでに発表された論文では、腸内細菌叢の変化を、その簡便さから 16S rDNA の特定領域をメタゲノム(腸内細菌群から抽出した網羅的ゲノム)DNA から PCR にて増幅した遺伝子断片配列の由来生物組成に基づき議論を展開している。しかし、細菌によって 16S rDNA のコピー数に大きな違いがあること、PCR 増幅に使われるプライマーによって、大きなバイアスがかかることが公知であるため、これらの問題が未解決の現状の方法による結果が、真の菌叢組成を反映しているとは考えにくい。抗菌剤は、症状に応じて作用機作が異なるものが投与されるが、その種類によって腸内細菌叢に与える影響が大きく異なると考えられる。したがって、腸内細菌叢の変化が及ぼす健康への影響を議論するには菌叢変化を正しく知ることが大前提であるが、腸内細菌叢の機能的な変化を捉えることなしに健康に与える影響や腸内細菌叢回復までのプロセスや時間を計り知ることが困難である。そこで、我々は、これらの問題を解決すべく、細菌ゲノム中に一定数存在するリボソームタンパク質を用いた菌叢解析とKEGG機能モジュールの充足率やアバンダンスに基づき生理・代謝機能を評価する MAPLE (現 Genomable™)システム [2]の開発を行い、これまでに海洋メタゲノムの菌叢や機能的違いをハイライトしてきた経緯がある。腸内細菌叢は、自然環境の微生物叢と比べればシンプルで、乳幼児期の腸内細菌叢は成人と比べさらにシンプルである。したがって、Genomable™ を用いれば、細菌叢の乱れを菌叢組成と機能的変化から正しく把握でき、攪乱からの回復過程予測が可能になると考えたことが本研究の背景である。

### 2. 研究の目的

先に述べたように、腸内細菌叢の変化が及ぼす健康への影響を議論するには菌叢変化を正しく知ることのみならず、腸内細菌叢の機能的な変化を捉えることなく健康に与える影響や腸内細菌叢回復までのプロセスや時間を計り知ることができない。そこで本研究は、16S rDNA に代わりリボソームタンパク質による菌叢解析に加え、最新の機能メタゲノミクスと複数の数理統計解析手法を組み合わせることで腸内細菌叢の動態を正確に把握し、攪乱からの腸内細菌叢の早期回復へ向けた処方提言を可能とする方法論の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) **基礎データサンプル** 本研究では、香川大学医学部の倫理委員会でその使用が承認された一卵性双生児の腸内細菌メタゲノム配列データ、顕微鏡写真に基づく菌叢所見、単位糞便当たりの抽出 DNA 量などを基礎データとして用いた。双子の乳児 1 名のみ抗菌剤が 3 回投与されており、投与前のメタゲノム配列 1 サンプル(生後 27 日)、1 回目投与後の経時的 2 サンプル(生後 75, 99 日)、2 回目投与後の経時的 2 サンプル(生後 110, 124)、3 回目投与後の経時的 2 サンプル (151, 171 日)計 7 サンプルとこれに対応する抗菌剤未投与の乳児の経時的 7 サンプルを用いた (表 1)。

(2) **腸内細菌叢の菌叢組成と機能ポテンシャルの数値データセットの作成** まず、腸内細菌叢のメタゲノム配列データ中に含まれるリボソームタンパク質遺伝子(細菌種を問わずゲノム中に 52 遺伝子)の由来生物種情報をもとに各腸内細菌叢の生物種組成を数値化した。次に、腸内細菌叢が有する様々な機能ポテンシャル(分解、合成、輸送等)を機能モジュール単位で数値化し、腸内細菌叢の組成と機能ポテンシャルを評価するデータセットとした。香川大学から提供された腸内細菌叢のメタゲノム配列

表1. 本研究で使用したサンプル

生後(抗菌剤)	双子I	双子II	糞便採取
27	-	-	○
70-74(amoxicillin)	-	+	
75	-	-	○
99	-	-	○
103-105(amoxicillin)	-	+	
110	-	-	○
124	-	-	○
134-137(amoxicillin)	-	+	
151	-	-	○
171	-	-	○

+ 抗菌剤投与, - 抗菌剤無, ○ 糞便採取 (双子I及びII)

データ、各 300 万配列から予測された遺伝子配列をアミノ酸配列に変換後 Genomape に共試した[3]。

(3) 腸内細菌叢の組成と機能ポテンシャルを用いた数理統計解析 2 で作成したデータセットを用いてまず PCA 解析を行った。PCA 解析で抗生剤投与乳児の生後 99 日目の菌叢に大きな変化の予兆が見られたため、さらに以下の手法を用いて詳細に解析した。

① 菌種の相対アバンダンスパターンの解析 菌叢の構成種の相対アバンダンスパターンは、1943 年に Fisher らによって開発された方法[4]を用いて行い、各腸内細菌サンプルの Fisher's  $\alpha$  (多様性指数)を算出した。この値は、生態系における種の相対頻度が log-series distribution に従うことに基づく分布パラメータに対応した指標である。

② Reactivity (摂動の増幅のしやすさ)解析 Reactivity の解析は、2014 年の Tang & Allesina による方法[5]を用いて行った。

③ 協力度と競争度の解析 協力度と競争度の計算は Freilich らの方法[6]に従ったが、個体群の違いを考慮するため、個体群における質量作用の法則を仮定した重みづけ指標も用いて行った[7]。

#### 4. 研究成果

(1) リボソームタンパク質を用いた腸内細菌叢の解析 抗生剤未投与の双子乳児 I についてリボソームタンパク質に基づく菌叢組成を解析し、すでに得られている 16S rRNA 遺伝子の PCR アンプリコンに基づく菌叢組成解析結果と比較した。その結果、リボソームタンパク質の場合は、ワクチン投与された後の生後 102 日を除けば菌叢の約 70~80%を *Actinobacteria* 門が占め、その殆どが *Bifidobacteria* 属のバクテリアであった。これに対し 16S rRNA 遺伝子では、*Actinobacteria* 門の割合が 10~50%程度と低いのにに対し *Clostridia* を主体とした *Firmicutes* 門の割合が高く、特に生後 116 日では、70%以上を占めていた。両者の菌叢組成に非常に大きな差が見られるため、DNA を抽出した糞便サンプルの顕微鏡観察の所見と見比べたところ、全てのサンプルで分岐した細胞が特徴的である *Bifidobacterium* が優占種であったことから、リボソームタンパク質に基づく菌叢組成とよく一致していることがわかった。今回比較に用いた 16S rRNA 遺伝子の PCR アンプリコンによる菌叢組成は、各菌種が持つ 16S rRNA のコピー数で補正した結果であるにも関わらず顕微鏡の所見と大きく異なっていた。これは、PCR 反応自体のバイアスに加え、今回用いた PCR 用の universal primer によるバイアスのため *Bifidobacteria* が過小評価されたものと考えられる。そこで、抗生剤が投与された双子乳児 II のリボソームタンパク質に基づく菌叢解析を同様に行ったところ、抗生剤投与前後の菌叢は、顕微鏡による所見とよく一致していた。図 1 に示したように抗生剤投与前の生後 27 日や抗生剤投与による攪乱から回復した生後 171

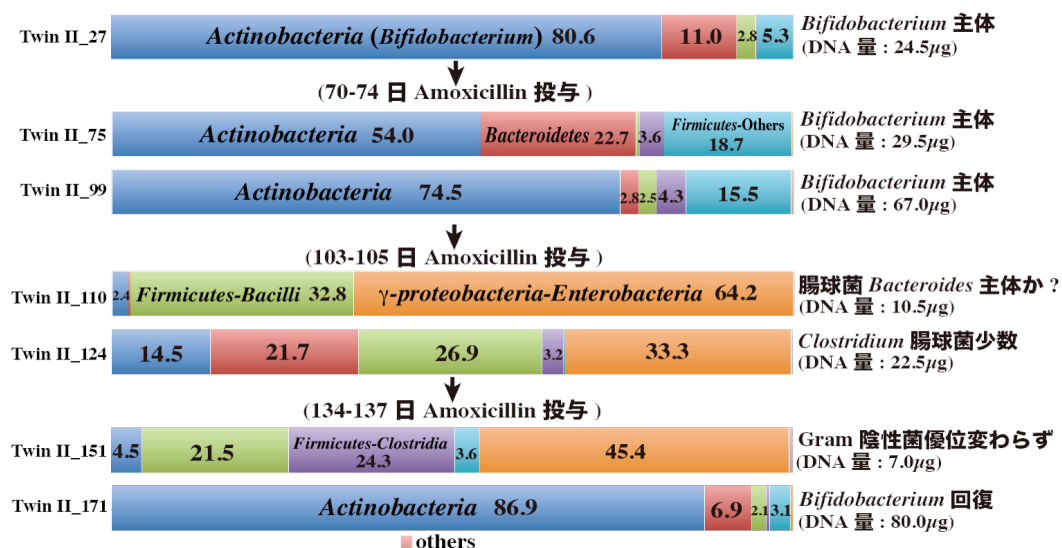


図 1. 抗生剤未投与の双子乳児 I の 16S rRNA 遺伝子とリボソームタンパク質に基づく菌叢解析

日の腸内細菌叢組成は、双子乳児 I と極めて類似していたが、2 回目投与以降は *Bifidobacteria* がほぼ消滅したことで菌数自体も激減し、腸内細菌科の  $\gamma$ -*proteobacteria* や *Firmicutes* 門のバクテリアなどが大勢を占めていた。

(2) 腸内細菌叢の組成を用いた数理統計解析 4(1)でリボソームタンパク質に基づく菌叢組成が 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンとは異なり、菌叢組成を正しく反映していることが示されたので、こ

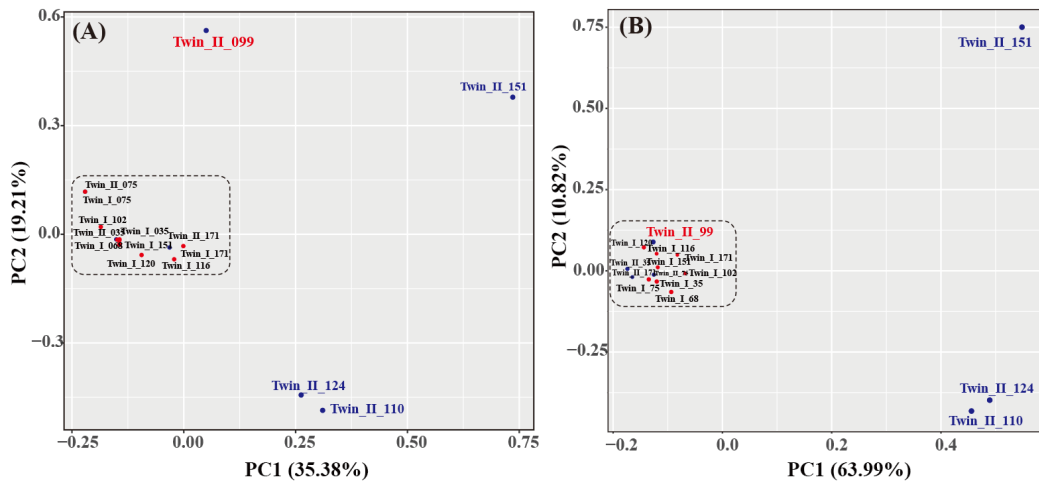


図 2. リボソームタンパク質に基づく菌叢組成と相対モジュール機能アブundanceによる PCA (A) 菌叢組成 (ITR: phylum/class/order level) (B) 相対モジュール機能アブundance

の菌叢組成を用いて抗生剤投与の有無が異なる双子乳児の腸内細菌叢を比較するため、PCA 解析を行った。その結果、抗生剤投与後の双子乳児 II の菌叢が投与前の生後 27 日と近くなった生後 99 日目の

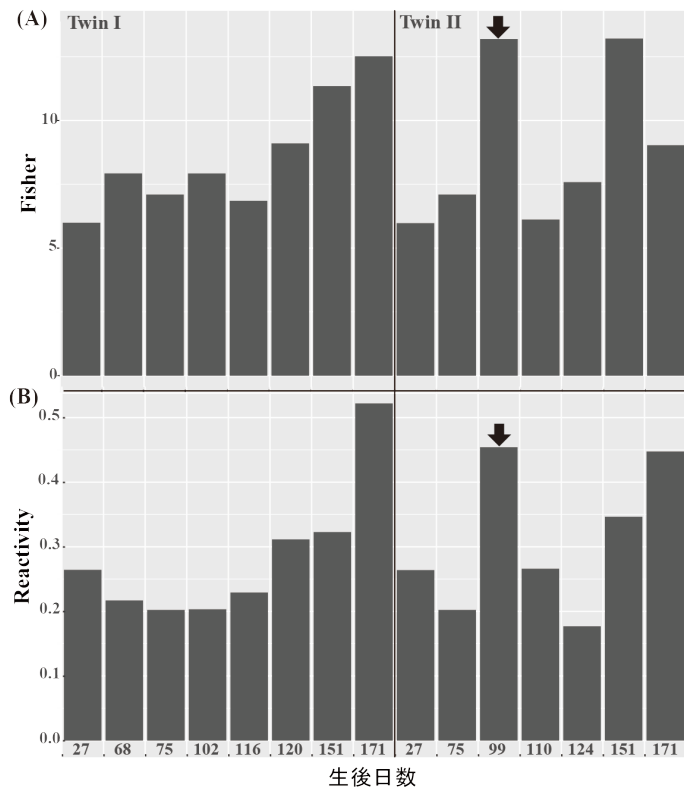


図 3. リボソームタンパク質に基づく菌叢組成の Fisher (A) と reactivity (B)

腸内細菌叢は、2 回目以降の抗生剤投与によって攪乱された生後 110 日～151 日の細菌叢と同様に多くのプロットが集約された一群とはかけ離れた位置にプロットされた(図 2A)。この結果、1 回目の抗生剤投与から回復したと思われた生後 99 日目の菌叢には、明らかな変化が生じていることが示唆された。そこで、微生物多様性の指標となる  $\alpha$  多様性指数を調べたところ、99 日目の  $\alpha$  指数が明らかに高く、菌叢の多様性が高いことが示された(図 3A)。また生後 99 日目は、摂動の増幅のしやすさの指標である reactivity も高く、2 回目以降の抗生剤投与による影響を非常に受けやすくなっていることが示唆された(図 3B)。実際、103～105 日目の抗生

剤投与によって菌数が激減し、*Bifidobacteria* がほぼ消滅したことから考えても 99 日目の菌叢が非常に不安定であったと考えられる。次に、腸内細菌叢を構成する微生物間および微生物の宿主であるヒト間の協力度と競争度を調べたところ、生後 99 日目は微生物間、また、ヒトから微生物、微生物からヒトへの競争度や協力度が低くなっていることがわかった。これは、99 日目の生態系が不安定なため、微生物間、微生物-ヒト間の相互作用が脆弱化しているためと考えられる。

(3) **腸内細菌叢の機能ポテンシャルを用いた数理統計解析** 抗生剤投与後の生後 99 日目の双子乳児 II の菌叢組成は、一見すると投与前と比べ大差ないが(図 1)、4(2)の解析から生態系が不安定な状態であり、大きな変化が生じる予兆を示していた。そこで、菌叢が持つ機能ポテンシャルにも変化の予兆が検出されるかを調べるため、各サンプル中で充足率が 100%となった各機能モジュールの相対アバンダンス値に基づく PCA 解析を行った。その結果、菌叢組成の場合とは異なり、生後 99 日目の機能ポテンシャルは、抗生剤未投与のサンプルが集約された近傍にプロットされ、機能的には未投与の腸内細菌叢に近いことがわかった(図 2B)。これは、菌叢組成の PCA では、優占種以外の割合としては少ない菌種の多様性の高さが反映されたのに対し、module アバンダンスの PCA では同一機能を持つ他菌種のアバンダンスの寄与が非常に少ないため、PCA の結果に反映されなかったのではないかと考えられる。

一方、抗生剤未投与の双子乳児 I と投与後の双子乳児 II 間の比較で module アバンダンスに差が見られた 14 module のうち、最も顕著な変化が見られた module は raffinose/stachyose/melibiose 等のビフィズス菌の生育に有効なオリゴ糖の取り込み輸送体であった。この module 機能は 2 回目の投与以降消失したが、菌叢が完全に回復した双子乳児 II の生後 171 日では未投与時と同様に復活した。しかし、171 日目のビフィズス菌の菌叢組成は投与前と比べ様変わりし、投与前の優占種 *Bifidobacterium kashiwanohense* が消失したのに対し、*Bifidobacterium dentium* が優占種となっていた。これは *B. kashiwanohense* と *B. dentium* のこれらオリゴ糖の取り込み能に違いがあるためと推測されるが、今後実験による検証が必要である。

(4) **総括** リボソームタンパク質に基づく菌叢組成の数理統計解析によって、抗生剤投与直後ではなく、3 週間程度経過後(生後 99 日)に菌叢の多様性が増加し、微生物間、ヒト-微生物間の競争度や協力度の低下と共に摂動に対する増幅度が大きくなり、非常に不安定な生態系であることが示唆された。つまり、この時期に再度抗生剤を投与すれば、腸内細菌叢への影響が大きく、回復までに長時間を要すると考えられるが、実際、今回用いたサンプルでは、生後 103~105 日に 2 回目の抗生剤投与がなされ、これにより *Bifidobacterium* の消滅と共に菌数自体 1/100 にまで激減している。したがって、これらの知見の蓄積が今後の腸内細菌へのダメージの軽減、早期回復へ向けた処方提言に繋がっていくと考えられる。残念ながら、香川大学から提供される予定のサンプル採取が予想外に遅れたため、本研究にける結果の検証、回復モデルの構築はできなかったが、今後の個別化医療を意識した新しい治療支援への大きな一歩となった。

<引用文献>

- ① Nobel YR. *et al.* Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nat. Com.* 30 (2015) 7486.
- ② Arai W. *et al.* MAPLE 2.3.0: an improved system for evaluating the functionomes of genomes and metagenomes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 82 (2018) 1515-1517.
- ③ Takami H. MAPLE enables functional assessment of microbiota in various environments. In: *Marine metagenomics-Technological aspects and applications.* (2019) Springer, pp85-119.
- ④ Fisher, RA, Corbet, AS, Williams, CB. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *J. Animal Ecol.* 12 (1943) 42-58.
- ⑤ Tang, S, Allesina, S. Reactivity and stability of large ecosystems. *Front. Ecol. Evol.* 2 (2014) 21.
- ⑥ Freilich, S. *et al.* Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat. Com.* 2 (2011) 589.
- ⑦ Takemoto K. ECOSMOS. <http://takemoto08.bio.kyutech.ac.jp/ecosmos-lite/overview.html#interaction>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高見英人、中川剛史、荒井渉、吉村健二
2. 発表標題 高速且つ利便性が向上した最新版生理・代謝機構評価システム -MAPLE 2.3.1-
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高見英人、中川剛史、荒井渉、木田洋祐、青野圭祐、吉村健二
2. 発表標題 生理・代謝機能評価のための最新版統合型高速解析システム -MAPLE 2.3.1-
3. 学会等名 第13回 日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今大路 治之, 田中 彩, 下野 隆一, 豊田 敦, 高見 英人, 桑原 知巳
2. 発表標題 抗菌薬暴露後に変動する乳幼児腸内フローラの代謝機能
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Hideto Takami	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 699
3. 書名 Molecular tools in microbial diversity: Functional assessment tool for genomes and metagenomes, MAPLE system	

1. 著者名 Hideto Takami	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 699
3. 書名 Functional Microbial Diversity: Functional genomics and metagenomics using MAPLE	

1. 著者名 Hideto Takami	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 271
3. 書名 MAPLE enables functional assessment of microbiota in various environments	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹本 和広 (Takemoto Kazuhiro)  (40512356)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授  (17104)	
研究分担者	大久保 卓 (Okubo Takashi)  (70749275)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・地球環境部門(海洋生物環境影響研究センター)・ポスドクトラル研究員  (82706)	
研究分担者	桑原 知巳 (Kawahara Tomomi)  (60263810)	香川大学・医学部・教授  (16201)	