

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15799

研究課題名（和文）フラクトオリゴ糖摂取による細菌叢および真菌叢の変動メカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of changes in microbiome and mycobiome by fructo-oligosaccharide intake

研究代表者

加藤 完 (Kato, Tamotsu)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：20632946

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢の構成はヒトの健康・疾病などと密接な関係があることが知られている。これらをコントロールすることができれば、腸内環境の改善による快便化、各種疾病の改善、肥満の回避など様々な恩恵が受けられることが想像に容易い。本研究では、代表的なプレバイオティクスの1つであるフラクトオリゴ糖（FOS）およびガラクトオリゴ糖（GOS）をマウスに摂取させ、腸内環境を変動させた際の、細菌叢（microbiome）および真菌叢（mycobiome）との変動を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病予防や整腸効果を目的とした商品の需要は増加傾向にあり、社会的にも関心の高い市場と考えられる。本研究は腸内細菌の構築に関わる研究であり、健康管理・機能性食品・化粧品など多岐に渡る商品や研究の基盤情報をもたらすと考えている。

プレバイオティクスは胃腸の健康、免疫力の向上、乳幼児の健康など様々な分野での有効性が期待されている。一方で、腸内環境には細菌のみではなく真菌も共生しており、互いに相互作用することが報告されている。本研究はプレバイオティクス摂取による細菌叢だけでなく真菌叢の両方が食品によって変動すること調べ、今後の細菌-真菌の組み合わせが重要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：It is known that the composition of the intestinal flora is closely related to human health and disease. If these can be controlled, it is easy to imagine that various benefits such as improved intestinal environment, improvement of various diseases, avoidance of obesity, etc. can be obtained. In this study, we fed fructo-oligosaccharides (FOS) and galacto-oligosaccharides (GOS), one of the representative prebiotics, to mice to change the intestinal environment. Fluctuations with microbiome and mycobiome were investigated.

研究分野：腸内細菌

キーワード：腸内細菌 真菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢の構成はヒトの健康・疾病などと密接な関係があることが知られている。これらをコントロールすることができれば、腸内環境の改善による快便化、各種疾病の改善、肥満の回避など様々な恩恵が受けられることが想像に容易い。一方で、腸内環境は多種類の細菌、真菌、ウイルスなどが混在し、さらには各菌の代謝による代謝産物などがそれぞれに影響を及ぼし合う複合微生物系を構築している。そのためこれらの相互ネットワークの詳細は明らかになっておらず、腸内環境を改善するプレバイオティクスの効果を予測することは難しい。本研究では、代表的なプレバイオティクスの1つであるフラクトオリゴ糖(FOS)をマウスに摂食させ、腸内環境を変動させた際の、細菌叢(microbiome)および真菌叢(mycobiome)との相互関係を明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウスにFOSを摂取することで腸内環境の変動を引き起こし、時系列で糞便を回収することで経時的な菌叢構成の変動過程を明らかにする。これによりプレバイオティクスによる細菌叢の変動を段階的に観察することが可能となる。加えて、本研究では、既知であるFOS摂取による腸内細菌叢構成の変動に加えて、真菌叢構成の変動が時系列でどのように変動するかを調べ、FOS摂取による糞便中IgA量の増加との関係および細菌-真菌間の変動モデルを構築し、腸内環境の評価系として利用可能か検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

通常環境条件下で飼育したBALB/cAマウス(日本クレア)の糞便から細菌叢および真菌叢解析のためにDNA抽出を行った。12種類のDNA抽出方法を行い、DNA抽出量や細菌数および真菌数をqPCRを行った。

Balb/cAマウス(、10週齢)に通常食としてAIN93G(オリエンタル酵母)を摂取させ、短期間(摂取開始後60時間後)および長期間(1ヶ月)に糞便を回収した。通常食群および5%FOSを含有した改変AIN93G-5%FOS餌に変更した群の2群を準備し、糞便を回収した。

糞便の測定項目として菌叢構成、菌数、糞便中IgA量の測定を行う。糞便からDNA抽出を行い、細菌を16S rRNA領域、真菌はITS領域をターゲットにして次世代シーケンサーを用いてシーケンシングを行い、菌叢構成を調べた。

### 4. 研究成果

まず細菌叢解析に使用されるDNA抽出方法に加え、これまでに報告されている真菌の抽出方法を含めた12種類のDNA抽出方法からマウス糞便中の真菌に対して効果的なDNA抽出方法の探索を行った。糞便から抽出されたDNAは細菌と真菌を含めたDNAの合算として示される。そこで、抽出した糞便中DNAから細菌および真菌の量を個別に推定するために細菌16S rRNA遺伝子特異的プライマー(515f-806rプライマー)および真菌18S rRNA遺伝子特異的プライマー(FungiQuantプライマー)を用いたqPCRを行った。qPCRを行うにあたり、コロニーカウントよりColony Forming Units(CFUs)を測定した大腸菌(*Escherichia coli* DH5)および酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌液からDNAを抽出し、スタンダードを作成し、菌数を計数した。結果として、全てのDNA抽出手法で細菌16S rRNA遺伝子のコピー数が検出され、中でも酵素法は平均 $3.42 \times 10^8$  copies、MetaHITは $3.28 \times 10^8$  copies、NucleoSpinは $1.70 \times 10^8$  copiesの16S rRNA遺伝子コピー数が測定された。一方で、真菌18S rRNA遺伝子コピー数の検出が可能であった手法は酵素法、Zymolyase、QuickDNA、NucleoSpin、HMPの5手法であり、最も多くのコピー数を検出できたZymolyaseで平均 $1.90 \times 10^5$  copies、次いで酵素法で $2.22 \times 10^4$  copies、NucleoSpinで $1.11 \times 10^4$  copiesであった。この結果から、糞便中の細菌DNAの抽出は酵素法(Achromopeptidase、Lysozyme、Proteinase K)、真菌DNAの抽出ではZymolyaseによるDNA抽出が適した抽出方法であると判断した。

次にマウス(BALB/cA、10週齢、オス)に異なるプレバイオティクス(フラクトオリゴ糖(5% FOS)、ガラクトオリゴ糖(5% GOS))を経口摂取させ、60時間後の糞便を回収した。その結果、コントロールとして摂取させたPBS群と比較してFOS群だけでなくGOS群でも同様に糞便中IgA量が増加することが示された。また細菌数がFOS群およびGOS群で増加することが示されたため、腸内細菌叢構成について次世代シーケンサーMiseqを用いて、アンプリコンシーケンシングを行った。得られた塩基配列情報は、Rソフトウェアに取り込み、DADA2のパイプラインで解析を行った。その結果、PBS群では60時間後で細菌構成は変動しないが、FOS群、GOS群でも変動することが示された。特にFOS群、GOS群どちらでもBacteroidesが大きく増加することが示された。次にマウス糞便中の真菌叢を調べるために複数のプライマー(1391F-EukBr、LF402Fmix-TW13、ITS1fungal-ITS2rev、ITS3ngsmix - ITS4ngs、ITS9MUNngs - ITS2)を用いて次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンシングを行った。特にITS9MUNngs - ITS2プライマーでは、FOS群およびGOS群で真菌構成が異なることが示された。また細菌数は摂取後にFOS群、GOS群どち

らも増加したが、真菌数は FOS 群では変動せず、GOS 群でのみ増加することが示された。次に、長期的なプレバイオティクスによる変動を調べるために、FOS 餌もしくは GOS 餌を用いて、マウスに 4 週間給餌し、1 週間ごとに糞便を回収した。糞便中 IgA 量の測定を行ったところ、短期試験では FOS 群と GOS 群で差が見られなかったが、長期試験では FOS 群 1 週間には増加が見られ、GOS 群では 1 週では増加が見られず 2 週から増加することが示された。以上から、長期的試験により糞便中 IgA 量の増加が FOS 群および GOS 群で異なる経時変動が見られた。また長期試験における細菌叢解析を行った結果、FOS 群、GOS 群どちらでも *Bacteroides* が 1~4 週で増加した。さらに詳細な解析を行い、FOS 群でも GOS 群どちらでも *Bacteroides* が寄与していることがわかったが、FOS 群では *Lachnospiraceae* 科、GOS 群では *Lachnospiraceae* UCG-006 および *Lachnoclostridium* などの菌が寄与していることが示された。

以上から、本研究ではマウス糞便に存在する真菌の DNA 抽出方法の検討を行い、プレバイオティクスによる違いが細菌叢構成だけでなく真菌数などにも影響をすることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------