

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510187

研究課題名（和文）ヒト腸内フローラを構成する難培養性細菌集団の解析

研究課題名（英文）Analysis of the unculturable microbial populations in human gut microbiota

研究代表者 桑原 知巳 (KUWAHARA TOMOMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60263810

研究成果の概要（和文）：

ヒトの外界に接する部位には無数の細菌が常在しており、常在菌叢と呼ばれる生態系を形成している。ヒトにおける最大の常在菌叢は腸内菌叢であり、1,000種に近い細菌が約100兆個も存在している。腸内菌叢は食物の消化、ビタミンなどの微量栄養素の合成や病原細菌の腸管への定着阻害など宿主にとって有益な生理作用を及ぼしている。しかしながら腸内菌叢の大部分は難培養性細菌で構成されており、腸内菌叢の持つ宿主への有益作用の分子メカニズムを解明するためにはこれら難培養菌の生物性状を明らかにする必要がある。本研究では segmented filamentous bacteria と呼ばれる腸内難培養性細菌の全ゲノム塩基配列を解読した。

研究成果の概要（英文）：

Human harbors the numerous microbes at environmentally exposed anatomical sites. These microbes constitute the unique ecosystem called resident microflora. Gut microflora is the largest microbial ecosystem in human, which contains over 100 trillions of microbes of nearly 1,000 species. Gut microflora provides beneficial effects to the host through digestion of nutrients, synthesis of essential vitamins, and colonization resistance to enteric pathogens. However, the molecular mechanism of host-microbe symbiosis in the gut is largely unknown due to the fact that the majority of gut microflora is unculturable bacteria. It is important to disclose the biology of the unculturable populations to address the molecular interaction between the host and intestinal microbes. Herein, we determined the whole genome sequence of segmented filamentous bacteria that are representative gut unculturable microbes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：基礎ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：腸内菌叢、難培養菌、ゲノム、Segmented filamentous bacteria、シークエンス代謝経路、腸管免疫、Th17

1. 研究開始当初の背景

ヒトの外界に接する体表面には無数の微生物が常在しており、常在菌叢と呼ばれる独特の生態系を形成している。それぞれの常在菌叢の菌種構成は個々の解剖学的位置における微小環境の特性に依存して異なっている。常在菌叢における微生物間および微生物・宿主間の相互作用の分子メカニズムは感染症の制御やヒトの疾病の予防に関する新たな知見を数多く含んでいることは間違いない。ヒトの常在菌叢において腸内菌叢は最大の微生物叢であり食物の消化、ビタミンなどの微量栄養素の合成や腸管病原性細菌の定着阻害など多くの有益な作用を宿主に与えている。一方でこのような正常な腸内菌叢の代謝機能をはじめとする腸管恒常性維持のための様々な機能の破綻は炎症性腸疾患、大腸がんやアレルギーなどの疾患の誘因および増悪因子となり得る。近年では腸内菌叢の変化が肥満の発症や精神活動に影響することが報告され、益々腸内菌叢の有する生理機能に大きな関心が寄せられている。しかしながら近年の 16S rDNA メタゲノム手法を用いた菌叢解析により明らかになってきた重要な点はヒト腸内菌叢を構成する菌群の大部分は未同定の細菌種であり、またその大部分が現在の培養技術では分離が困難な難培養性細菌であることである。腸内菌叢における代謝ネットワークや医学的に重要な有益作用を理解するためにはこれら難培養菌の生物性状を如何に把握するかが重要なポイントである。細菌の生物性状をうかがい知る有用な手法として全ゲノム塩基配列解読がある。しかしながら全ゲノム塩基配列解読には純培養した細菌からゲノム DNA を抽出する必要があるため、従来の培養法を用いて純培養をすることが困難な難培養性細菌についてはゲノム DNA を得るための手法の開発が必要である。

2. 研究の目的

難培養菌の生物性状の解析には全ゲノム塩基配列解読が有用である。しかしながら難培養菌は従来の分離培養による純化が困難なため、純化したゲノム DNA を得るための新たな開発の手法が必要である。本研究では難培養菌のゲノム DNA を得るための手法としてマイクロマニピュレーターを用いた検体からの難培養菌の選択的回収法の開発およびマウス腸管での *in vivo* cultivation による難培養菌の純化とゲノム DNA の精製を試みる。また、純化したゲノム DNA を用いてショットガンライブラリーを作製し、マウス腸内難培養性細菌として広く知られている segmented filamentous bacteria (SFB) の全ゲノム塩基配列解読を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では腸内難培養菌として広く知られている SFB を研究対象とした。SFB の腸管への定着が腸管 IgA の産生や腸管粘膜固有層における T ヘルパーリンパ球サブセットの Th17 を分化誘導することが知られており近年大きな関心を集めていることから、その生物性状を明らかにすることが重要であると考へ SFB を本研究における解析対象難培養菌とした。

(1) マイクロマニピュレーターを用いた難培養菌の選択的回収とゲノム精製：マイクロマニピュレーターは細胞に核酸を注入するために用いられる機器であるが、我々はこれを SFB を含む検体から選択的に本菌を採取するために使用した。径 20 μm のガラスキャピラリーを装着した eppendorf 社の NK-2 型マイクロマニピュレーターを使用した。まず、8 週齢の雄性 BalB/c マウスの回腸を摘出し、30 mM EDTA 処理後、27G の注射針を用いて回腸粘膜上皮をシート状に剥離した。剥離した回腸粘膜上皮には多数の SFB が附着していることをグラム染色で確認した。この粘膜を 3% のクロロホルムで処理し、SFB 以外の腸内常在菌や宿主粘膜上皮細胞を溶解した後、遊離した DNA を DNase I 処理により除去した。このサンプルを位相差顕微鏡観察下で 1 視野 (20 倍) に 10-20 個程度の SFB が確認できるようにリン酸緩衝液で希釈し、SFB の菌体を 10、50 または 100 個マイクロマニピュレーターを用いて選択的に吸引した後、新たに用意したリン酸緩衝液中に回収した。回収サンプルを再度 DNase I で処理した後、rolling circle amplification 法により SFB ゲノムを増幅した。増幅したゲノムを鋳型に 16S rDNA を増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。また、増幅 DNA を用いてショットガンライブラリーを作製し、392 クローンについてテストシーケンスを行った。

(2) ノトバイオートマウスを用いた難培養菌の *in vivo* cultivation と純化：上記のように処理した BalB/c マウスの回腸粘膜のクロロホルム処理サンプルを無菌の BalB/c マウスに接種し、SFB のノトバイオートマウスを作製した。経時的に糞便を採取し、グラム染色と 16S rDNA の PCR ダイレクトシーケンス法により DNA の純度を評価した。

(3) 難培養菌の全ゲノム塩基配列決定
上記のように作製した SFB ノトバイオートマウスの盲腸内容物から純化された SFB のゲノムを精製し、ショットガンライブラリーを作製した後、Sanger sequencing 法と 454 pyrosequencing 法を組合せることにより SFB の全ゲノム塩基配列を決定した。得られた配列を解析し、SFB の生物学的特徴を調べた。

4. 研究成果

(1) マイクロマニピュレーターを用いた難培

養菌の選択的回収とゲノム精製：腸内難培養菌である SFB は極めて長い連鎖を形態的特徴とするため、顕微鏡観察下で他の菌種との鑑別が可能であり、マイクロマニピュレーターを用いた選択的回収を試みた。8 週齢の雄性 BalB/c マウスの回腸から調整した SFB の浮遊液から径 20 μm のガラスキャピラリーを装着した eppendorf 社の NK-2 型マイクロマニピュレーターを使用して SFB の菌体を 10、50 または 100 個選択的に吸引し、新たに用意したリン酸緩衝液中に回収した (図 1)。

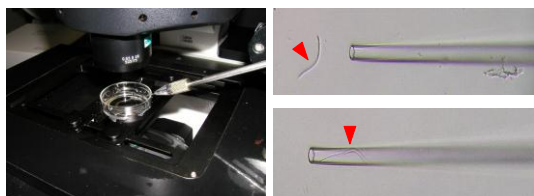


図 1. SFB の選択的回収

回収した SFB の菌体を鋳型として rolling circle amplification 法により SFB ゲノムを増幅した結果、いずれのサンプルからも十分なゲノム DNA を増幅することに成功した (図 2)。

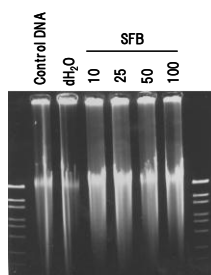


図 2. SFB ゲノムの増幅

増幅したゲノムを鋳型に 16S rDNA を増幅し、ダイレクトシーケンシングを行った結果、クロマトグラムは単一の明確なピークを示し、得られた配列はマウス SFB の 16S rDNA と 99.4% の相同性を示したことから、増幅された DNA は純度の高い SFB 由来のゲノム DNA であると考えられた。また、増幅 DNA を用いてショットガンライブラリーを作製し、392 クローンについてテストシーケンシングを行った。クオリティーの高い 271 本の配列について解析したところ、以下で決定した SFB のゲノム配列に 70% の配列がマッピングされ (図 3)、宿主マウス DNA に由来する配列の混入はわずか 2 本であった。このことから、マイクロマニピュレーターを用いた顕微鏡観察下での選択的回収とゲノム増幅の組合せにより、形態的特徴を有する難培養性細菌のゲノム解析を行うことが可能であり、本手法は難培養性細菌の生物性状に関する情報収集に有用であると考えられる。

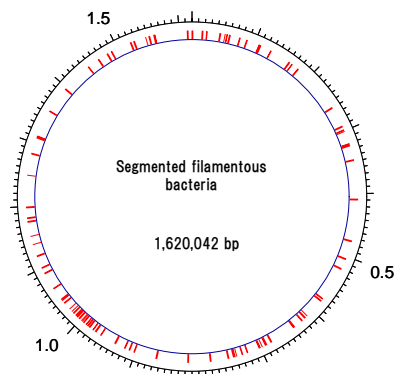


図 3. SFB ゲノムへのリードのマッピング

(2) ノトバイオートマウスを用いた難培養菌の *in vivo* cultivation と純化：BalB/c マウスの回腸粘膜のクロロホルム処理サンプルを無菌の BalB/c マウスに接種し、SFB のノトバイオートマウスを作製した。経時的に糞便を採取し、グラム染色にて純度を確認した結果、SFB のみが腸管に定着したノトバイオートマウスが作製できていると考えられた (図 4)。また、このマウスの盲腸内容物から抽出した DNA を鋳型にして 16S rDNA の PCR ダイレクトシーケンシングを行った結果、クロマトグラムは単一の明確なピークを示し、得られた配列はマウス SFB の 16S rDNA と 99.4% の相同性を示したことから、SFB のノトバイオートマウスが作製できていることを確認した。

(2) ノトバイオートマウスを用いた難培養菌の *in vivo* cultivation と純化：BalB/c マウスの回腸粘膜のクロロホルム処理サンプルを無菌の BalB/c マウスに接種し、SFB のノトバイオートマウスを作製した。経時的に糞便を採取し、グラム染色にて純度を確認した結果、SFB のみが腸管に定着したノトバイオートマウスが作製できていると考えられた (図 4)。また、このマウスの盲腸内容物から抽出した DNA を鋳型にして 16S rDNA の PCR ダイレクトシーケンシングを行った結果、クロマトグラムは単一の明確なピークを示し、得られた配列はマウス SFB の 16S rDNA と 99.4% の相同性を示したことから、SFB のノトバイオートマウスが作製できていることを確認した。

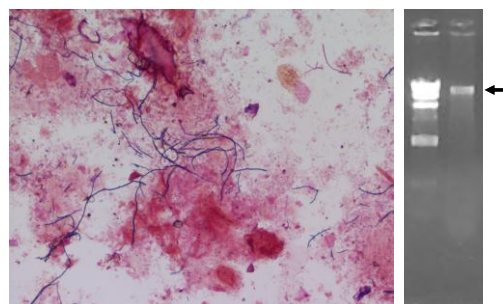


図 4. SFB ノトバイオートマウスの作製

(3) 難培養菌の全ゲノム塩基配列決定
上記のように作製した SFB ノトバイオートマウスの盲腸内容物から純化された SFB のゲノムを精製し、ショットガンライブラリーを作製後、Sanger sequencing 法と 454 pyrosequencing 法を組合せることにより SFB の全ゲノム塩基配列を決定した。SFB のゲノムは 1,600,005 bp より成る 1 本の環状染色体により構成されており、染色体の GC 含量は 28.8% であった (図 5)。染色体上には 1,515 個の遺伝子が同定され、70% は *Clostridiales* 由来の遺伝子産物と最も高い相同性を示すタンパク質をコードしていると考えられた。同定された遺伝子産物を COG 分類に従い機能解析を行った結果、アミノ酸の合成 (E)、ビタミ

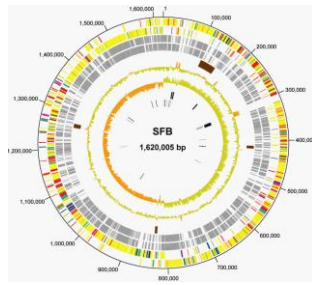


図 5. SFB のゲノムマップ

ンおよび補酵素の合成(H)、核酸の合成(F)に関与する代謝経路を構成する遺伝子の大部分が欠損しており、SFBは多くの栄養素を宿主や腸内環境に依存しており、この事が本菌の難培養性に密接に関与していると考えられた(図6)。

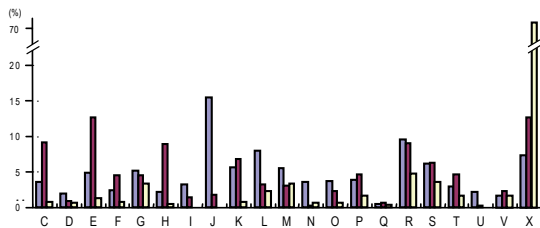


図 6. COG 分類による機能解析

また、SFBのゲノム上には走化性と運動性に関わる遺伝子領域が存在し、鞭毛の構成蛋白であるフラジェリンをコードする遺伝子が4個同定された(Fla1-4)。これらのフラジェリンのうちFla1を除く3つについてはTLR5を介して細胞内にシグナルを伝達し、NF- κ b経路を活性化した(図7)。

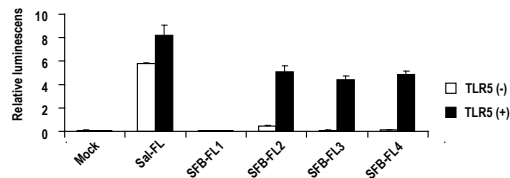


図 7. TLR5 発現細胞におけるレポーター解析

これらの結果から、SFBの栄養要求性に起因する宿主への強固な付着と定着部位への遊走に関わる分子の発現が腸管粘膜固有層におけるTh17の分化誘導に密接に関連していると考えられた。本研究により得られた成果は腸管内難培養性細菌の生物性状に関する新たな知見と難培養性細菌の新たな解析手法に関する情報を提供するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- Atarashi T, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. Science 331: 337-341, 2011. 査読有
- Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. Eur Respir J 2011, in press. 査読有
- Tamagawa K, Nakayama-Imaohji H, Wakimoto S, Ichimura M and Kuwahara T. Utilization of titanium oxide-like compound as an inorganic phosphate adsorbent for the control of serum phosphate level in chronic renal failure. J Med Invest 57: 275-283, 2010. 査読有
- Ogushi Y, Eguchi H, Kuwahara T, Hayabuchi N and Kawabata M. Molecular genetic investigations of contaminated contact lens storage cases as reservoirs for *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. Jpn J Ophthalmol 54: 550-554, 2010. 査読有
- Ichimura M, Nakayama-Imaohji H, Wakimoto S, Morita H, Hayashi T and Kuwahara T. Efficient electrotransformation of *Bacteroides fragilis*. Appl Environ Microbiol 76: 3325-3332, 2010. 査読有
- 稲田耕大、前田郁世、池田欣史、宮崎 大、井上幸次、江口 洋、塩田 洋、桑原知巳：コリネバクテリウムが起炎菌と考えられた感染性角膜炎の1例。あたらしい眼科 26: 1105-1107, 2009. 査読有
- 江口 洋、桑原知巳、大木武夫、塩田 洋、田中真理子、田中 健：ペニシリン耐性肺炎球菌結膜炎の1例。あたらしい眼科 26: 376-378, 2009. 査読有
- Nakayama-Imaohji H, Hirakawa H, Ichimura M, Wakimoto S, Kuhara S, Hayashi T and Kuwahara T. Identification of the site-specific DNA invertase responsible for the phase variation of SusC/SusD family outer membrane proteins in *Bacteroides fragilis*. J Bacteriol 191: 6003-6011, 2009. 査読有
- Arimochi H, Morita K, Nakanishi S, Kataoka K and Kuwahara T. Production of apoptosis-inducing substances from soybean protein by *Clostridium butyricum*: characterization of their

toxic effects on human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 277: 190-198, 2009. 査読有

10. Deguchi A, Miyamoto K, Kuwahara T, Miki Y, Kaneko I, Li J, McClane BA and Akimoto S. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One* 4: e5598, 2009. 査読有
11. Ko KS, Kuwahara T, Lee K and Kook YH. Population structure and distribution of virulence-related genes of *Bacteroides fragilis* isolates from Korea and Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64: 340-343, 2009. 査読有
12. Kataoka K, Ogasa S, Kuwahara T, Bando Y, Hagiwara M, Arimochi H, Nakanishi S, Iwasaki T and Ohnishi Y. Inhibitory effects of fermented brown rice on induction of acute colitis by dextran sulfate sodium in rats. *Dig Dis Sci* 53: 1601-1608, 2008. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Tomomi Kuwahara: Genomic analysis of unculturable gut microbe, 「超高速ゲノム解読時代における細菌学研究」, 第 83 回日本細菌学会総会, 横浜, 3 月 27-29 日, 2010.
2. 脇本 信, 今大路治之, 市村 穰, 桑原知己, 安友康二: 第 83 回日本細菌学会総会, 横浜, 3 月 27-29, 2010.
3. 桑原知己: ヒト常在フローラ研究の最前線, 第 82 回日本感染症学会総会 「ゲノムからみた感染症」, 松江, 4 月 17-18 日, 2008.

[図書] (計 2 件)

1. 桑原知己, 林 哲也: ヒト腸内フローラのメタゲノム解析と肥満・健康. 「難培養微生物研究の最新技術 II」(大熊盛也、工藤俊章 監修)、pp92-105、CMC 出版、東京、2010.
2. 桑原知己: 常在細菌叢. 「医科細菌学 第 4 版」(笹川千尋、林 哲也編)、pp119-120、南江堂、東京、2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原知己 (KUWAHARA TOMOMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 60263810

(2) 研究分担者

中山治之 (NAKAYAMA HARUYUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教)

研究者番号: 80294669