

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05792

研究課題名(和文)酪酸産生菌 *F. prausnitzii* の糖代謝と機能性物質の産生研究課題名(英文)Oligosaccharide metabolism and functional metabolites in human gut butyrate producing *Faecalibacterium prausnitzii*

研究代表者

遠藤 明仁 (Endo, Akihito)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90445685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は *Faecalibacterium prausnitzii* の分類が重要な問題を抱えており、その問題のためにヒト腸内における本菌の生態が誤って報告されてきたことを明らかにした。そこで本菌の分類を整理し、3種の新種の *Faecalibacterium* 属菌種を報告した。更に、本菌を正確に定量するための手法を新たに開発した。本菌は菌種ごとにそれぞれ異なるオリゴ糖代謝能を有し、その代謝により酪酸を産生した。本菌が産生すると報告されている抗炎症性タンパク質であるMAMは全ての菌株のゲノムに保存されていた。一方で、その一次構造および立体構造は系統群間で大きく異なることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本菌は宿主であるヒトにとって有益な物質を産生するうえに様々な疾病患者の腸内で著しく減少していることから、健康な腸内マイクロバイオータを判定するためのバイオマーカーとしての利用が検討されていた。一方で、我々の研究により、これまでの報告には多くの誤りがあることが確認された。そこで我々は本菌の生態を正しく把握するための手法を開発した。本手法を利用することで本菌の生態を正しく理解することが可能になり、今後の本菌とヒトの健康の関係の理解や本菌の産業利用のための礎となる。

研究成果の概要(英文)：The present study clearly demonstrated that a human gut butyrate producer *Faecalibacterium prausnitzii* contained a significant taxonomic issue. This resulted in production of incorrect reports regarding ecology of the microbe in human gut. The present study addressed about the taxonomic issue and proposed 3 novel species in the genus *Faecalibacterium*. Moreover, a novel tool for a quantification of the microbes in human gut was designed. *Faecalibacterium* spp. had different oligosaccharide metabolic properties among species and produced butyrate from the metabolism. The gene encoding Microbial Anti-inflammatory Molecule (MAM), which was specific to the species, was conserved in genomes of all *Faecalibacterium* spp. tested, while their structures varied among the species.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Faecalibacterium 酪酸産生菌 腸内細菌 分類 定量 抗炎症性タンパク質 ゲノム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Faecalibacterium prausnitzii はヒト腸内で最も主要な酪酸産生菌であり、産生される酪酸は大腸上皮細胞の主要な栄養源の一つであるうえに、上皮細胞の遺伝子発現制御を介した腸管粘膜の炎症予防や結腸癌の予防に関与することが示唆されている。また、本菌は酪酸だけでなく、Microbial Anti-inflammatory Molecule (MAM) と呼ばれる抗炎症性タンパク質を産生することから、健康な腸内環境を判断するためのバイオマーカーとしての利用が検討されている。一方で、本菌は分類学的な不均一性が示唆されている。そのため、本菌のヒト腸内における存在量や MAM の“菌種内”での保存性と機能性について疑問が持たれた。また、その不均一性が“*F. prausnitzii*”の糖代謝能力に及ぼす影響についても明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では *F. prausnitzii* の糖代謝能力と酪酸及び MAM 産生の関係を明らかにすることで、本菌の分類学的問題を明らかにするとともに腸内での生態を理解し、ヒトの健康に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

まず分類学的な問題を明確にするため、NCBI のデータベースに *F. prausnitzii* として登録されている全てのゲノムデータを用いて、ゲノムレベルの相同性解析を行った。その後、その分類学的問題が、これまで報告されている *F. prausnitzii* の生態やその解析手法にどのような影響を及ぼすのか、検討した。次に、分類学的問題 (分類学的多様性) が、産生する MAM の構造や機能性にどのような影響を及ぼすのか検討した。最後に、本菌の生態を正しく把握するための手法の開発を試みた。

4. 研究成果

まず、NCBI のデータベースに登録されている 86 菌株の *F. prausnitzii* のゲノムデータを用いて相同性解析を行ったところ、86 菌株は種レベルで異なる 8 つの系統群に分類された(図 1)。

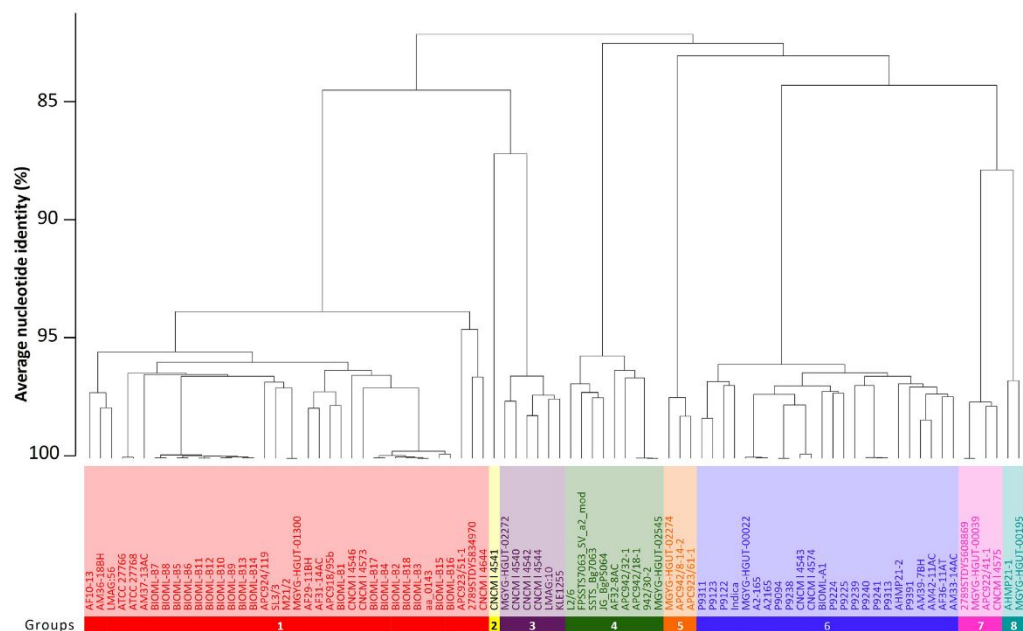


図 1 86 菌株の“*Faecalibacterium prausnitzii*”菌株のゲノムレベルの相同性

また、16S rRNA 遺伝子は *Faecalibacterium* 属菌種のゲノム上に 6 コピー存在しており、そのコピー間の相同性が著しく低い菌株が多数存在することが明らかになった。この理由のため、16S rRNA 遺伝子を基に作成した系統樹は同一菌種・系統群を複数の異なるクラスターに分けたことから、本遺伝子は *Faecalibacterium* 属細菌の分類及び同定には適さないことが明らかとなった (図 2)。

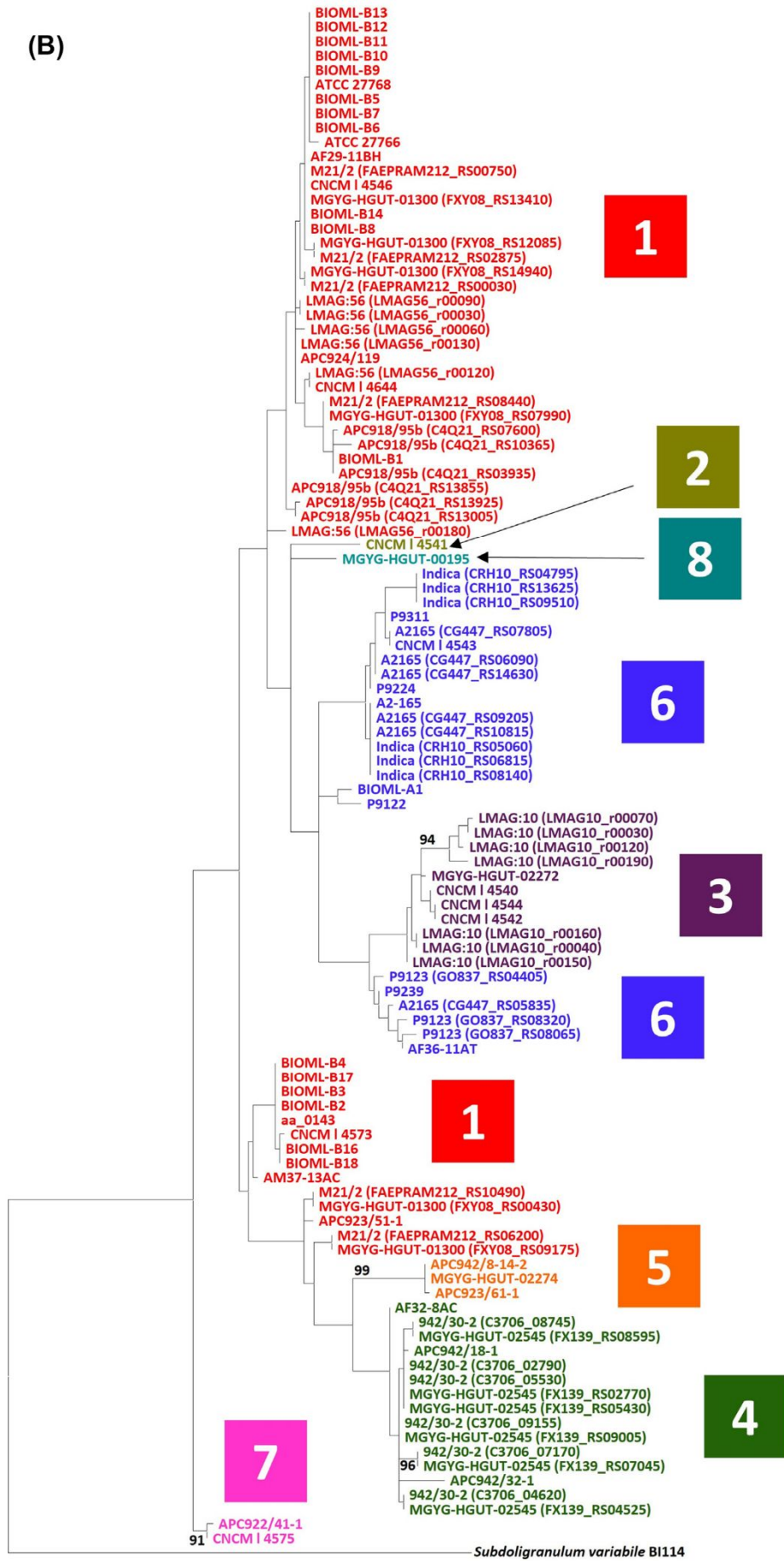


図2 Faecalibacterium 属菌種の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹。各色で 8 個の系統群を示している。

本菌の腸内での存在量を明らかにするため、これまでは定量的 PCR (qPCR) が利用されてきたが、これまで報告されているいずれの手法も本菌の菌種レベルの定量はできない事を明らかにした。更に、上述の 8 個の系統群のうち、公的菌株保存機関で入手可能な菌株を取得して分類学的検討を行い、Faecalibacterium に分類される 3 種の新菌種 (Faecalibacterium duncaniae, Faecalibacterium hattorii, Faecalibacterium gallinarum) を提唱した。これらの菌種はそれぞれ異なるオリゴ糖やムチン代謝能を有していることが in vitro の解析から明らかになり、その結果は概ね in silico での解析結果と一致した。

次に、前述の 86 菌株のゲノムデータから MAM の配列を抽出し、解析を行った。その結果、100 アミノ酸残基程度の MAM が全菌株で保存されていた。一方で、その配列は N 末端側の 6 アミノ酸残基程度が高度に保存されていた一方で、残りの配列は菌種間 (系統群間) で大きく異なることが一次構造解析及び立体構造予測解析により明らかになった。この MAM 遺伝子のうち、配列が大きく異なる 5 菌株 (5 系統群) 由来の MAM を選抜し、大腸菌に異種発現させた。そしてその異種発現タンパク質を用いて培養細胞に対する抗炎症活性評価の予備試験を行った。しかし、本研究遂行中の 2022 年に本研究と同様の目的を持った研究成果が他の研究チームより報告された (引用文献 1)。そこでこの報告を行ったチームと本菌の生態を把握するための共同研究を実施した。前述のように、これまで報告されているいずれの手法も本菌の菌種レベルの定量はできない事から、これについて検討を行った。その結果、MAM をコードする遺伝子は定量のためのマーカー遺伝子としては不相当であるものの、rpoA 遺伝子を用いて Faecalibacterium の各菌種・系統群を正確に定量する手法を開発した (図 3)。本手法は腸内の Faecalibacterium がヒトの健康に与える影響を明らかにするための重要なツールとなる。

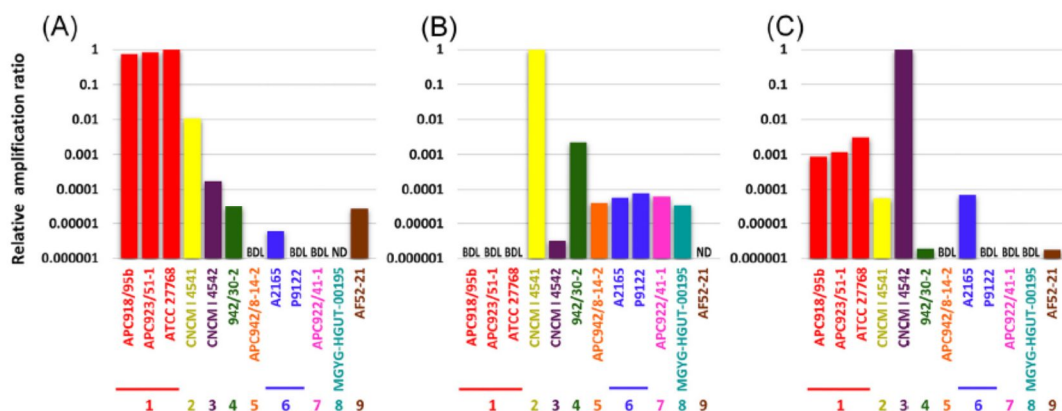


図 3 Faecalibacterium の各菌種・系統群を定量するための qPCR の結果 (結果の一部を抜粋して記載)。系統群 2 を定量するプライマーを使用した結果 (B)、系統群 3 を定量するプライマーを使用した結果 (A)、系統群 1 を定量するプライマーを使用した結果 (C)。

引用文献

(1) Auger S, Kropp C, Borrás-Nogues E, Chanput W, Andre-Leroux G, Gitton-Quent O, Benevides L, Breyner N, Azevedo V, Langella P, Chatel JM. Intraspecific Diversity of Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from Faecalibacterium prausnitzii. Int J Mol Sci. 2022 1;23(3):1705.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Tanno Hiroki, Maeno Shintaro, Salminen Seppo, Gueimonde Miguel, Endo Akihito | 4. 巻 98 |
| 2. 論文標題 16S rRNA gene sequence diversity in <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> complex taxa has marked impacts on quantitative analysis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 FEMS Microbiology Ecology | 6. 最初と最後の頁 fiac004 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsec/fiac004 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Sakamoto Mitsuo, Sakurai Naomi, Tanno Hiroki, Iino Takao, Ohkuma Moriya, Endo Akihito | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 Genome-based, phenotypic and chemotaxonomic classification of Faecalibacterium strains: proposal of three novel species Faecalibacterium duncaniae sp. nov., Faecalibacterium hattorii sp. nov. and Faecalibacterium gallinarum sp. nov. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology | 6. 最初と最後の頁 未定 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005379 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Tanno Hiroki, Chatel Jean-Marc, Martin Rebeca, Mariat Denis, Sakamoto Mitsuo, Yamazaki Masao, Salminen Seppo, Gueimonde Miguel, Endo Akihito | 4. 巻 99 |
| 2. 論文標題 New gene markers for classification and quantification of <i>Faecalibacterium</i> spp. in the human gut | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 FEMS Microbiology Ecology | 6. 最初と最後の頁 fiad035 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsec/fiad035 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 丹野 広貴、遠藤 明仁 |
| 2. 発表標題 Faecalibacterium prausnitzii の多様性と特異的プライマーの評価 |
| 3. 学会等名 腸内細菌学会 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 丹野 広貴、遠藤 明仁 |
| 2. 発表標題 ヒト腸内酪酸産生菌 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> のゲノム及び 16S rRNA 遺伝子の多様性 |
| 3. 学会等名 日本乳酸菌学会 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 丹野 広貴、遠藤 明仁 |
| 2. 発表標題 ヒト腸内酪酸産生菌 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> の多様性と特異的プライマーの評価 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部会 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 丹野広貴, 山崎雅夫, 遠藤明仁 |
| 2. 発表標題 ヒト腸内酪酸産生菌 <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> 類縁菌における16S rRNA遺伝子の多様性と新規分類マーカーの提案 |
| 3. 学会等名 日本乳酸菌学会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

〔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 |
|---------------|---|--------------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 梶川 揚申 (Kajikawa Akinobu) (30646972) | 東京農業大学・応用生物科学部・教授 (32658) | |

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 | | | |
|---------|---------------------|--|--|--|
| フィンランド | University of Turku | | | |
| スペイン | IPLA-CSIC | | | |
| フランス | INRAE | | | |