

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790429

研究課題名(和文) 糞便培地を用いたヒト腸内の難培養細菌の分離培養とゲノム細菌学的解析

研究課題名(英文) Isolation culture of hardly cultivable bacteria from human feces using fecal mediums and bacterial genome and metagenome analysis

研究代表者

関塚 剛史 (Sekizuka, Tsuyoshi)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：40462775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腸管内には、未だ分離されていない未知・難培養細菌が多数存在する。本研究は、未知・難培養細菌を本来生息する環境に近い条件で培養し、それら細菌の特徴をゲノムレベルで理解することを目的としている。本研究により、糞便で作成した培地により、腸管内細菌が増殖することが明らかとなった。また、糞便の滅菌法の違いにより、増殖する細菌が異なることも明らかとなった。16S rRNA遺伝子メタゲノム解析の結果、データベースに登録されている細菌の配列に高い相同性を示さない配列も存在し、未知・難培養細菌が糞便培地により増殖した可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In human intestines, there are many unknown, hardly cultivable and previously uncultivated bacteria. The aim of this study was to cultivate unknown and/or hardly cultivable bacteria in conditions close to the environment of original habitat, followed by to analyze the characteristics of those bacterial genome. This study showed that the bacteria in human gut were able to grow in medium made from human feces. Moreover, the bacteria of different types were detected by the fecal mediums which were sterilized with different methods. The 16S rRNA gene metagenomic analysis revealed that some of DNA sequences, which were isolated from bacteria grown in fecal mediums, did not show high identity to known bacterial rRNA genes in existing databases. These data suggested that unknown and/or hardly cultivable bacteria of human gut might be cultured from human fecal mediums.

研究分野：細菌学、ゲノム生物学、情報生物学

キーワード：難培養細菌 未知培養細菌 腸内細菌叢 メタゲノム解析 ゲノム解析 培地

1. 研究開始当初の背景

国際ヒト常在菌叢ゲノムプロジェクトやメタゲノム解析により、腸内細菌叢の解明が行われている。特に、ヒト腸内細菌は主に3つのエンテロタイプに分かれること (Arumugam *et. al.*, Nature. 473:174-180. 2011)、更に、それらエンテロタイプは長期間の食事に依存すること (Wu *et. al.*, Science. 334:105-108. 2011) が明らかとなってきた。しかし、腸内における細菌の約70%はこれまで分離培養されておらず、新規細菌が多数存在していることも明らかとなっている (Kurokawa *et. al.*, DNA Res. 14:169-181. 2007)。

難培養細菌の重要性の例として、マウス腸管内に存在するセグメント細菌(SFB)があげられる。SFBはマウスのTh17細胞の誘導、IgA産生の増加など、腸粘膜免疫系に影響を与える (Ivanov *et. al.*, Cell. 139:1-14. 2009)。しかし、SFBは現在培地上での培養が不可能であり、SFBを単独定着させたマウスで継代培養を行っている。実験動物の難培養細菌の研究には適しているが、ヒトでは上記手法は困難である。

難培養細菌の解析として、single cell を用いたゲノム解析も行われている (Hongoh *et. al.*, PNAS. 105:5555-5560. 2008, Walker Parkhill *et. al.*, Nat. Rev. Microbiol. 6:176-177. 2008) が、生きた細菌を分離していないため、その後の生物学および細菌学的解析を行うことが困難である。

ヒト腸内の難培養細菌を培養する試みとして、一般的な基礎培地で通常分離可能な細菌のコロニーにサテライトとして増殖する菌を分離し、両者を共培養することで新たな未知細菌を分離する手法が報告されている (Witt *et. al.*, ASM2011. Poster No1262. May 23 2011)。これは、*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) が増殖の際にシデロフォアであるマイコバクチンを必要とするのと同様に、他の細菌由来の物質が分離培養に必須であることを意味する。

しかしながら、上記手法では、実際の腸管内の環境を再現している訳では無く、基礎培地に依存してくる菌種しか分離出来ない。環境中の難培養細菌は、中空糸膜を培養器として利用し、直接環境中で培養する *in situ* 培養法が考案されている (Aoi *et. al.*, Appl. Environ. Microbiol. 75:3826-3833. 2009)。しかし、ヒトおよび動物腸管内では中空糸膜等を応用した *in situ* 培養法は困難である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト腸管内の難培養細菌を培養するための新たな培地を考案し、分離された細菌の特徴をゲノムレベルで理解し、腸内細菌叢内の更なる理解を深める事を目的としている。難培養細菌の増殖には、本来の環境に沿った条件で培養するのが最も効率的であり、増殖に必須の成分も含まれていることが示唆される事から、供試する糞便試

料と同一の糞便で作成した「糞便培地」で分離培養可能な難培養細菌を明らかにし、分離された細菌のゲノム解析を行うこととした。

3. 研究の方法

健常人の糞便を採取し、塩濃度および pH を測定した。糞便は、10、20 および 30 kGy の γ 線照射もしくは 121 20 分のオートクレーブによる滅菌を行った。滅菌されているかの有無は、GAM 寒天培地での培養および LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Life Technologies, Foster City, CA) にて行った。蛍光観察には、Zeiss LSM 7 Live confocal line-scanning microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jene, Germany) を用いた。

糞便培地の作成には、D.W. 1L 中に NaCl 7.8 g、L-スチレン塩酸塩 0.3 g およびチオグルコール酸ナトリウム 0.3 g を溶解した pH7 の基礎溶液を作成後、糞便を同量の基礎溶液で激しく混和し、10,000 x g 30 分遠心分離した後、上清を回収し、糞便液体培地とした。培養前には、糞便液体培地を脱気した。培養は、0.3g の未滅菌糞便を 2 ml の基礎溶液に懸濁し、上記未滅菌糞便懸濁液 50 μ l を 3 ml の糞便液体培地に接種した後、嫌気パックおよび嫌気ジャー (Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc., Tokyo, Japan) を用いた嫌気条件で 37、84 時間にて震盪培養を行った。糞便寒天培地の作成には、Bacto agar (Difco) を使用した。

糞便および培養サンプルからの DNA 抽出は、PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA) にて行った。分離菌株からの DNA 抽出は、Achromopeptidase 及び Lysozyme で溶菌後、フェノールクロロホルムにより DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子のメタゲノム (16S metagenome) には、イルミナ社が推奨および方法を提供している、V3-V4 領域を用いて行った。全 DNA のメタゲノム (whole metagenome) は、Nextera XT DNA library kit (Illumina, San Diego, CA) を用いて作成した。塩基配列決定は、MiSeq (Illumina) を用いて MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) にて行った。16S metagenome 解析には、QIIME および megablast を使用し、データベースは SILVA および NCBI 16S database をそれぞれに使用した。全 DNA メタゲノム解析では、解読リードを IDBA UD にてアセンブルし、Meta Gene Annotator にて ORF 抽出後、RAPsearch2 (ver. 2.23) を用いて nr をデータベースにし、解析を行った。得られたデータは、MEGAN (ver. 5) にて比較解析を行った。

4. 研究成果

ヒト糞便を用いた培地を作成するために、健常人の糞便の塩濃度および pH を測定した。ヒト糞便の塩濃度は、0.78% (w/v) であり、pH は 7 であった。

ヒト糞便の各種滅菌状態を確認するために、10、20 および 30 kGy の γ 線照射もしくは 121 20 分のオートクレーブ (AC) による

滅菌を行い、細菌の形態および生菌の確認を行った(図1)。グラム染色では、AC滅菌は

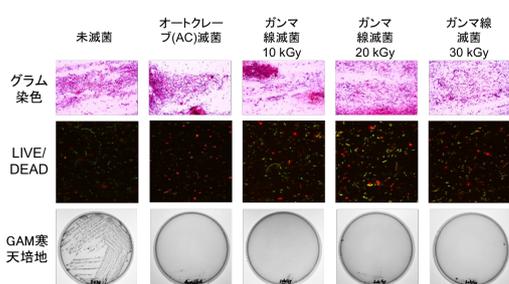


図1 ヒト糞便各種滅菌法の検討

グラム陰性菌の細胞形態が壊れているものが多く認められたが、ガンマ線滅菌ではほぼ全ての細菌の形態が保たれていた。LIVE/DEADの観察では、AC滅菌ではすべての細菌が死滅していたが、ガンマ線滅菌では緑と赤の細菌が混在しており、LIVE/DEADでは生菌が存在している像が得られた。実際にGAM寒天培地にて培養を行ったところ、全ての滅菌法で細菌の増殖は確認されなかった。これは、ガンマ線滅菌により細菌DNAが損傷を受けて滅菌されているが、細菌の形状および生理活性はある程度保たれていることが示唆される。また、 γ 線滅菌は、本解析では10 kGyで十分な滅菌効果があることが示唆された。

次に、AC滅菌および10kGy照射 γ 線滅菌の糞便を用いた液体培地およびGAM液体培地を作成し、未滅菌の糞便を摂取後、37℃、嫌気条件下で84時間培養を行った。培養後、DNAを抽出し、16S metagenome解析を行った。解読リードの約66%でread1とread2が目的増幅断片と同様の約460 bpにアセンブルされ、さらに、それらの73%の配列が、16S rRNAのデータベースSILVAにヒットした(表1)。16S metagenome解析の結果、各種方法

表1 16S metagenome 解読リードの状況

sample name	Number of raw reads (read 1 and 2)	Number of trimmed read (read 1 and 2)	Number of join read	Number of SILVA database hit read
source	924,626	747,766	254,834	188,526
gamma	1,014,840	849,820	289,713	211,698
GAM	732,204	608,760	204,449	145,699
AC	1,332,934	1,021,038	301,691	221,726

で培養を行った際に増殖が認められた細菌の種類に差が認められた(図2)。 γ 線滅菌では、糞便の大元では minor population であった *Enterococcus*, *Lachnospira*, *Parabacteroides*, *Echerichia* 属細菌の増殖が認められ、全体の半分以上の割合が、*Bacteroides*, *Parabacteroides* および *Echerichia* 属などのグラム陰性菌が占めていた。AC滅菌では、糞便の大元では minor population であった *Allisonella*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* 属細菌の増殖が認められ、グラム陽性菌の増殖が多く認められた。GAM液体培地は、 γ 線滅

菌糞便液体培地と類似した細菌の増殖が認められ、*Megasphaera* および *Acidaminococcus* 属が GAM液体培地で特徴的に増殖していた。*Dialister* 属は、AC滅菌および γ 線滅菌糞便液体培地で増殖し、GAM培地では増殖が認められなかった。

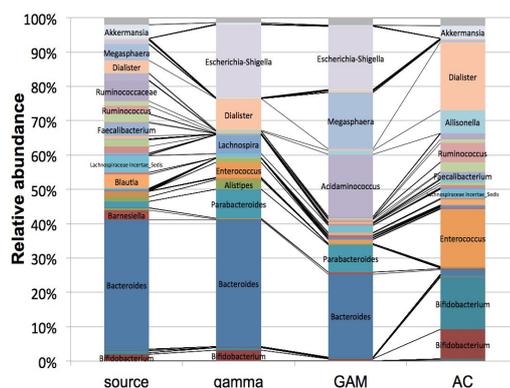


図2 16S metagenome 解析による各種滅菌法で作成した糞便培地で増殖した細菌の存在比率

Whole metagenome での解析も行った。得られた Whole metagenome 解読リードのうち、99.8%がヒト配列にヒットした(表2)。IDBA

表2 whole metagenome 解読リードの状況と metagenome assemble 結果

sample name	source	gamma	GAM	AC
Number of raw reads (read 1 and 2)	1,442,458	1,042,696	1,267,916	566,158
Number of trimmed read (read 1 and 2)	1,426,904	1,032,670	1,255,460	561,260
Number of Human unmapped read (read 1 and 2)	1,424,050	1,030,605	1,254,205	560,137
Number of contigs	48,574	32,307	18,279	13,238
N50 of contigs (bp)	744	1,194	5,200	1,268
Max contig length (bp)	168,608	119,510	115,100	119,852
total contig length (bp)	34,095,232	30,467,685	23,863,358	12,416,286
Number of predicted ORFs	67,358	50,399	33,604	21,329
N50 of ORFs	449	714	1,014	708
Max ORF length (bp)	6,144	8,415	8,052	9,402

UDにて metagenome assemble を行い、ORFを抽出したところ、約2万~6万7千のORFが抽出された(表2)。得られたORFの相同性検索を行い、ヒットした配列を生物種ごとに分類した結果、16S metagenome とほぼ同様の生物種がヒットし、その存在比率でも高い相関を示していた(図3)。この解析により、ヒト糞便液体培地にて細菌が増殖することが明らかとなり、また、糞便の滅菌法の違いにより、異なる細菌が増殖することが明らかとなった。滅菌法の差異で増殖する細菌種が異なる要因として、易熱性物質の変性による影響があることが示唆される。AC滅菌では、熱による変性を受けるが、 γ 線滅菌では熱による変性の影響は無い。従って、AC滅菌糞便培地のみで増殖が認められ、 γ 線滅菌糞便

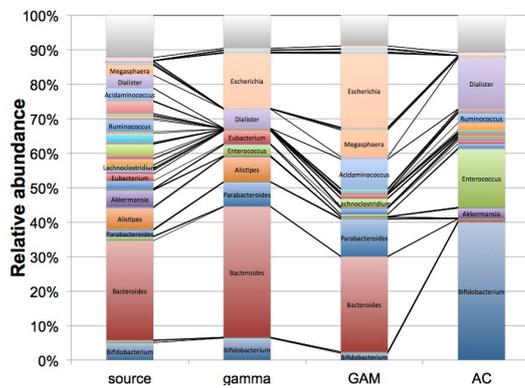


図3 whole metagenome 解析による各種滅菌法で作成した糞便液体培地で増殖した細菌の存在比率

培地では増殖が確認されなかった細菌 (*Allisonella*, *Ruminococcus*, *Feacalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lachnospiraceae Incertae Sedism* および *Akkermansia* 属)は、易熱性物質により増殖が抑制されていることが示唆される。一方、その逆に、易熱性物質が増殖に必要となる細菌は、*Escherichia*, *Lachospira*, *Alistipes*, *Parabacteroides* および *Bacteroides* 属であることが示唆された。GAM 液体培地と線滅菌糞便液体培地では、増殖する細菌種に高い相関があり、人工培地では存在しない糞便中の物質が、増殖に強く関係していることが予測される。*Dialister* 属は、人口培地である GAM 液体培地では増殖が認められなかったことから、本細菌属は、糞便中の耐熱性物質が増殖に必要であることが強く示唆された。

次に、whole metagenome 解析から、各サンプル間で抽出された ORF を KEGG の機能別に分類し、比較を行った。その結果、全体の大枠の分類では大きな差異は認められないが(図4)、詳細な機能分類での比較を行った

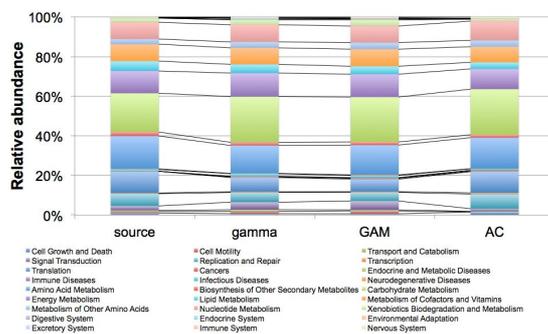


図4 KEGG による各サンプル間の ORF 機能分類

ところ、各培養条件で増殖した細菌が持つ ORF で特徴的に検出されるものが存在した(図5)。線滅菌糞便液体培地および GAM 液体培地で増殖した細菌では、Bacterial secretion system, Two-component system,

Butanoate metabolism, Nitrogen metabolism, Sulfur metabolism および Porphyrin and chlorophyll metabolism に関与する ORF の検出が多く認められた(図5)。一方、AC 滅菌糞便

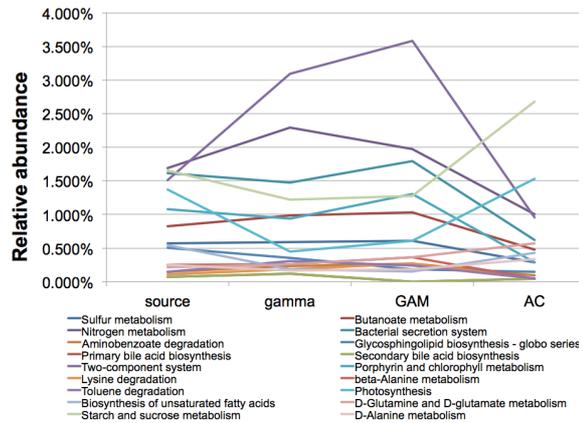


図5 KEGG による各サンプル間の ORF 機能分類で変動が認められたもの

液体培地では、Starch and sucrose metabolism, Photosynthesis, Biosynthesis of unsaturated fatty acids, D-Alanine metabolism および D-Glutamine and D-glutamate metabolism に関与する ORF の検出が多く認められた(図5)。特に、線滅菌糞便液体培地で増殖した細菌は、膜輸送およびシグナル伝達に関与する ORF が AC 滅菌糞便液体培地で増殖した細菌よりも多く存在しており、菌体外に存在する物質の取り込みや、細菌由来物質の分泌に影響していることが予測される。滅菌法と増殖する細菌の違いが、易熱性物質に関与することが考えられたことから、これら膜輸送およびシグナル伝達に関与する ORF が、易熱性物質を分泌し、他の細菌の増殖抑制および増殖促進に影響していることが予測される。

今回糞便培地にて増殖した細菌の中で、未知・難培養細菌を確認するため、QIIME による 16S metagenome 解析と並行し、NCBI の 16S rRNA database を用いた BLAST 解析も行った。上記データベースは、すでに分離された細菌のみを用いたデータベースとなっており、SLIVA 等の uncultured bacterium の 16S rRNA 遺伝子は含まないため、得られた operational taxonomic unit (OTU) の配列が未知・難培養細菌解読配列の可能性があるかの指標となる。得られた解読リードは、99%の相同性を持つ OTU に分類し、NCBI の 16S rRNA database で 95%以下の identity を示す配列を未知・難培養細菌由来の配列と定義した。その結果、線滅菌糞便液体培地、AC 滅菌糞便液体培地および GAM 液体培地それぞれで、少なくとも 1.07%、5.55%および 14.01%の未知・難培養細菌が存在することが予測された。特に、AC 滅菌糞便液体培地では、2.53%および 1.35%の配列が新規 *Ruminococcus* 属細菌であることが予測された。GAM 液体培地では、大部分が新規 *Megasphaera* 属細菌であるこ

とが予測された。未知・難培養細菌の分離培養は、AC 滅菌糞便液体培地が至適であると予測されたため、AC 滅菌糞便寒天培地を作成し、画線培養を行った。84 時間後には colony が得られ、96 colony を AC 滅菌糞便寒天培地にて継代培養し、DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の 341f および 942r universal primer を用いて PCR を行い、サンガーシーケンスにて菌種の同定を行った。その結果、釣菌した 96 colony 中、47 colony で 16S rRNA 遺伝子の増幅が認められ、*Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* および *B. longum* であった。糞便寒天培地に於いても、ヒト腸管内の細菌が分離可能であったが、糞便液体培地で予測された新規 *Ruminococcus* 属細菌の分離には至らなかった。その理由としては、酵素的な溶菌過程で抵抗性があり、DNA 回収が不十分であったこと、寒天培地上では増殖が阻害されている可能性などが挙げられる。特に、寒天培地では、寒天中に含まれるフランカルボン酸がコロニー抑制効果を持つことが報告されており(Hara et. al., PLoS One. 7(7):e41142. 2012)、寒天培地を用いての分離培養に不向きな未知・難培養細菌であった可能性も示唆される。

本研究により、ヒト糞便中の細菌を糞便で作成した培地により、本来の環境に沿った条件で培養することが可能であることが明らかとなった。これまで、糞便を用いた培地で糞便中の細菌を培養したという報告は無かったが、糞便中には細菌が増殖するのに必要な成分が十分含まれていることを示せた。また、滅菌方法の違いで増殖する細菌が大きく異なることが明らかとなった。これは、糞便中に存在する易熱性物質の影響を強く受けていることが示唆され、今後の未知・難培養細菌の分離培養法の開発に於いて重要な知見となると期待される。更に、本手法で、これまで報告のない細菌が検出されたことは、糞便培地が未知・難培養細菌の解析において有効であることを示唆している。未知・難培養細菌には、現在のところ寒天培地による手法よりも、液体培地での培養が、その検出率を向上させると思われるが、未知・難培養細菌を更に単一分離するには、フローサイトメトリー等を用いて細菌を 1 個ずつ分画し、液体培地にて培養することが理想と思われる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関塚 剛史 (SEKIZUKA TSUYOSHI)
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・室長
研究者番号：40462775

(2)研究分担者

(3)連携研究者