

腸内常在菌叢最優勢種のハイスループット培養系の確立と ポストマイクロビーム時代における培養実験の重要性

栗原 新

石川県立大学生物資源環境学部腸内細菌共生機構学寄附講座 (IFO) 〒921-8836 石川県野々市市末松 1-308

Establishment of a high through-put cultivation system for dominant species of human gut microbes and the importance of experiments including culture of bacteria in the post-microbiome era

Shin Kurihara

Host Microbe Interaction Research Laboratory, Faculty of Bioresearches of Environmental Sciences,
Ishikawa Prefectural University, 1-308, Suematsu, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan

1. はじめに

ヒトはその腸管内に重量にして1 kg, 細胞数にしてヒト細胞の10倍, 数100兆個の腸内細菌を有している。ヒト一人の腸管に存在する腸内細菌種は150以上であり, これらの混合物は「腸内細菌叢」と呼ばれている。腸内細菌叢の個体差は非常に大きく, この個体差は肥満 (Turnbaugh *et al.*, 2006)・糖尿病 (Suez *et al.*, 2014)・自閉症 (Hsiao *et al.*, 2013)などの全身の疾患や健康状態に大きく影響を与えている。このため, 近年, 腸内細菌叢は「もう一つの臓器」と捉えられており, 腸内細菌叢の機能の改善を通じた健康寿命の延伸が期待されている。

2. 宿主健康における腸内細菌の代謝産物の重要性

上部消化管から大腸へと流入した食餌由来のさまざまな物質は, 腸内細菌叢の活動により生化学的に変換され, 「腸内細菌の代謝産物」が生じる。腸内細菌の菌体そのものは大腸の免疫機構に阻まれてごく一部しかヒト組織に接触できない。これとは対照的に腸内細菌の代謝産物は, 腸管上皮を通過して体内に取り込まれ, ヒト健康に対してより直接的な影響を与えることから, 腸内環境の大部分は腸内細菌の代謝産物によって決定されていると考えられる。短鎖脂肪酸やポリアミンは糞便中に mM レベル以上の濃度で含まれ, 重要な腸内細菌の代謝産物である。

腸内細菌叢の組成は食餌・消化管へと取り込まれる菌体・宿主の免疫機構などにより決定されると考えら

れているが, 20日程度の食餌制限で生じる腸内細菌叢組成の変動は個体差を超えるほどではないことが報告されている (David *et al.*, 2014)。一方で, 腸内細菌叢の網羅的な遺伝子発現解析により, その遺伝子発現は食餌に大きく影響を受け, 共通の食餌を取ったヒトでは個体差を超えて類似する場合が多いことが報告された (David *et al.*, 2014)。発現変動を起こした遺伝子の多くをさまざまな代謝産物の生成にかかわる酵素遺伝子および腸内細菌の細胞内外の輸送にかかわるトランスポーター遺伝子が占めていた。このことから, 特定の代謝産物の生産に関与する腸内細菌の酵素・トランスポーターについて, その遺伝子発現やタンパクの活性制御を行うことでその濃度を制御することが可能であり, このアプローチを用いれば宿主における腸内細菌叢の個体差を越えた共通の有益な効果を得られることが予想できる。

3. ポストマイクロビーム時代の腸内細菌学の課題

21世紀に入り隆盛を極めている腸内細菌研究は, 免疫学を中心とした, 宿主側の健康に重点をおいたものを中心に多くの成果を挙げてきた (Atarashi *et al.*, 2015; Furusawa *et al.*, 2013)。その一方で, 腸内細菌側に重点をおいた研究については, 糞便の菌叢・転写産物・代謝産物の解析を中心とした「オーム解析」と呼ばれる「ドライ」な研究が大部分を占める。これらの「オーム解析」は「観測」であるが, 多数の観測データが蓄積されてきた現代は, 「ポストマイクロビーム時代」に入りつつあると考えられ, 腸内細菌研究を実際にヒト健康に役立てるためには, これまでに得ら

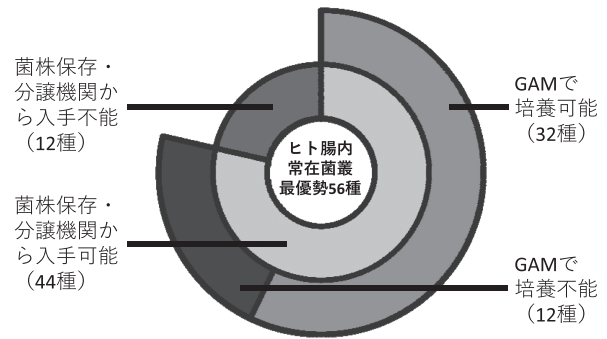
E-mail: kuri711@ishikawa-pu.ac.jp

れた多数の観測データを活用して次のステップに進む必要がある。つまり、腸内細菌叢の機能の「観測」から「制御」へのシフトが必要であると考えられる。前述したように、腸内細菌叢が宿主動物へと及ぼす影響の大きな部分は腸内細菌の代謝産物によって占められていると考えられるため、腸内細菌叢の機能制御には特定の代謝産物の生産に関与する酵素・トランスポーターをコードする遺伝子の発現制御や遺伝子産物の活性制御を行うことが重要であると考えられる。しかしながら、腸内細菌の遺伝子機能についてはその大部分が実験的に解明されておらず（アノテーションが付くものですら 20-30%である）、調節の標的を定めることが困難であるために、腸内細菌の遺伝子産物の活性調節による腸内環境の制御は現状ではほとんど不可能である。

4. ヒト腸内常在菌叢最優勢種のハイスループット解析系の作成

近年、培養を介さないマイクロビーム解析によりヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種が報告された (Qin *et al.*, 2010)。これら 56 菌種のうち 44 菌種についてはその基準株が菌株保存・分譲機関から入手可能であった。われわれはヒト腸内に実際に最優勢に存在する菌種を用いて生理学的なアッセイを行う目的で、これら 44 菌種のコレクションを作成した。この過程で、菌株保存・分譲機関による推奨培地は菌種間でさまざまであるために、ヒト腸内常在菌叢最優勢種同士の生理学的な比較が困難であることが明らかとなった。また、推奨培地の多くはその作成法が煩雑で、牛ルーメン液などの入手困難な材料を必要とするものも多いため、腸内常在菌叢最優勢種の生菌体を用いた研究に対するハードルは依然として高いことも明らかとなった。われわれはこれらの問題を解決するために、腸内細菌培養培地として知られる Gifu Anaerobe Medium (GAM) (Yamamoto-Osaki *et al.*, 1994) における腸内常在菌叢最優勢種の生育の可否を調べた。さらに、ヒト腸内常在菌叢最優勢種の生理機能を比較する際の標準培地としての GAM の実用性を示す目的で、腸内細菌の有代謝産物として知られる短鎖脂肪酸・ポリアミンについての解析を行った。

まず、腸内常在菌叢最優勢 56 種のうち、菌株保存・分譲機関から入手可能な 44 種を推奨培地で培養し、グリセロールストックにて保存した後に GAM での生育の可否を 96 穴ディープウェルプレート上で調べた。生育した菌体から染色体 DNA を抽出し、PCR によ



ヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種のうち本ハイスループット培養系が培養できる菌種の割合。ヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種のうち、菌株保存・分譲機関から入手可能な 44 菌種のうち 32 菌種が GAM 培地で培養可能であり、これはヒト最優勢 56 菌種の 57%、入手可能な 44 種の 79%であった。



ヒト腸内常在菌叢最優勢種のハイスループット培養系のイメージ。GAM で培養した 32 菌種のグリセロールストックを 96 穴プレートに配置し、 -80°C で保存した。使用時に解凍したグリセロールストック（使い捨て）を一定量接種し、前培養液とした。写真は前培養液を 96 穴プレート用植菌スタンプを用いて本培養用の培地に接種しているところである。

図 1 本研究で開発したヒト腸内常在菌叢最優勢種の GAM を用いたハイスループット培養系

り増幅させた 16S rDNA 断片をシーケンスし、培養液中の大部分が目的の菌種であることを示した。この結果、試験を行った 44 菌種のうち 32 種が GAM で培養可能であり、これはヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種の 57%、入手可能な 44 種の 79%であった (Gotoh *et al.*, 2017)。

次に、これらの菌種の培養上清中の短鎖脂肪酸（乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸）を定量した。この結果、6 菌種が乳酸を、22 菌種が酢酸をそれぞれ

10 mM 以上の濃度で生産した。また、試験した *Bacteroides* 属および *Parabacteroides* 属細菌のすべてに相当する 14 菌種がプロピオン酸を、4 菌種 (*Roseburia intestinalis*, *Coprococcus comes*, *Anaerotruncus colihominis*, *Eubacterium ventriosum*) が酪酸を生産した。これらの短鎖脂肪酸が検出された菌種について、その代謝経路を *in silico* 予測したところ、既存の研究結果と合致していた (Gotoh *et al.*, 2017)。

さらに、培養を行った 32 菌種の細胞内および培養上清のポリアミン (プトレッシン, スペルミジン, スペルミン) の変動を定量し、この定量結果と各菌種のゲノム上における既知ポリアミン代謝系・輸送系を構成するタンパクホモログの有無とを突き合わせてみた。この結果、ヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種のうち、新規ポリアミン取り込み系をもつと推定されるものが少なくとも 2 菌種 (*Eubacterium siraeum*, *Collinsella aerofaciens*)、新規ポリアミン放出系をもつと推定されるものが少なくとも 6 菌種 (*Bacteroides dorei*, *Bacteroides stercoris*, *Dorea longicatena*, *Dorea formicigenerans*, *Ruminococcus torques*, *Blautia hansenii*)、新規ポリアミン合成系をもつと推定されるものが少なくとも 3 菌種 (*D. longicatena*, *Parabacteroides merdae*, *E. ventriosum*) 存在した。以上の見積もりは、一つの菌種が重複した機能をもつ遺伝子をもたないと仮定して行われたため (たとえば、ポリアミンの取り込みが観察された菌種の染色体にポリアミン取り込み系のホモログが一つでも存在すれば新規のものはないと仮定して見積もりを行った)、重複した機能をもつ遺伝子の存在の可能性を考慮した場合は、さらに多くの機能未知遺伝子が存在することが考えられる (Sugiyama *et al.*, 2017)。

ヒト腸内常在菌叢最優勢種で多くの未同定のポリアミン関連遺伝子が存在したことは、ヒト腸内常在菌叢最優勢種の染色体上には、さまざまな代謝産物の生産にかかわる多くの全く新規な重要遺伝子が存在することを示唆しており、腸内細菌の代謝産物制御を行うためには、生菌を用いた遺伝学的・生化学的実験により、より多くの腸内細菌遺伝子を新規同定することが必要であると考えられる。

5. ヒト腸内常在菌最優勢種のハイスループット解析系の応用

本研究で開発した 96 穴プレート上の GAM を用いた培養システムは、ヒト腸内常在菌叢最優勢種の増殖の評価や、代謝産物の分析を行う際に再現性の良いプ

ラットフォームとして用いることが可能である。たとえば、特定の機能性成分について、ヒト腸内常在菌叢最優勢種のどの菌種を増殖させるか、また、その機能性成分の添加によってどのような代謝産物が増加するかについて網羅的に解析を行うことが可能である。

近年、かつて「日和見菌」と呼ばれてきた機能未知の腸内細菌の一部がヒト健康に慢性的にストレスを与える原因となっていることが明らかとなってきた。一例として、ヒト腸内常在菌叢最優勢種の一つである *Bacteroides caccae* は、通常は未消化の状態で大腸腸管内に流れ込んだ宿主の食餌由来の繊維質を栄養源としているが、宿主が繊維質を欠いた食餌を取った場合に栄養源の代謝系を構成する酵素遺伝子の発現を変化させ、大腸腸管上皮に存在するムチンを栄養源とすることが明らかとなった (Desai *et al.*, 2016)。腸管上皮のムチンは腸管のバリア機構に重要であるが、この報告では *B. caccae* によるムチンの「食害」による腸管のバリア機構の脆弱化が病原菌の侵入を引き起こすことも同時に示されている (Desai *et al.*, 2016)。この他にも、特定の疾患で特徴的に多く見出される腸内細菌の存在が、これまでにマイクロビーム解析により明らかとされてきている (表 1)。したがって、宿主の消化・吸収を免れて大腸へと流れ込むプレバイオティクス等の機能性成分の個別腸内細菌に対する影響についても、再検討の必要があると考えられる。このような再検討の重要性は最近になって指摘され始めているが (Green *et al.*, 2017)、すべての機能性成分について動物実験と菌叢解析を行うには多大な費用と時間が掛かる。

本研究で開発した腸内常在菌最優勢種の生菌を用いた *in vitro* のハイスループット解析系は、機能がわかりつつある腸内細菌の多くを含むことから (表 1)、一次スクリーニング等に非常に有用な簡便な系であると考えられる。

6. おわりに

本研究を行うにあたって、マイクロビーム解析によって明らかとなったヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種のうち、8 割程度がすでに公的に入手可能であったことは、菌株保存・分譲機関における営々と積み重ねられてきた優れた活動を示している。今後も残り 2 割の未培養のヒト腸内常在菌叢最優勢種の培養をお願いしたい。

また、さまざまな共同研究を通じて、ヒト腸内常在菌叢最優勢 56 種におけるそれぞれの菌種がどのよう

表1 さまざまな疾患において特徴的に見出される腸内常在菌の例

疾患	増加している, または割合の多い菌種	減少している, または割合の少ない菌種	文献
	<u><i>Bacteroides caccae</i></u> ^a	<i>Eubacterium rectale</i>	
	<i>Clostridium hathewayi</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	
2型糖尿病	<i>Clostridium ramosum</i> <i>Clostridium symbiosum</i> <i>Eggerhella lenta</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Akkermansia muciniphila</i>	<i>Roseburia intestinalis</i> <i>Roseburia inulinivorans</i>	(Qin <i>et al.</i> , 2012)
1型糖尿病	<u><i>Bacteroides ovatus</i></u>	<u><i>Bacteroides vulgatus</i></u> <u><i>Bacteroides fragilis</i></u>	(Giongo <i>et al.</i> , 2011)
	<u><i>Ruminococcus torques</i></u> <i>Blautia producta</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> <i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	
肥満	<i>Bacteroides massiliensis</i>	<u><i>Bacteroides vulgatus</i></u> <u><i>Bacteroides caccae</i></u> <u><i>Parabacteroides merdae</i></u>	(Ridaura <i>et al.</i> , 2013)
クローン病	<u><i>Ruminococcus gnavus</i></u>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	(Png <i>et al.</i> , 2010) (Fujimoto <i>et al.</i> , 2013)
肝硬変	<i>Streptococcus salivarius</i> <u><i>Ruminococcus gnavus</i></u> <i>Villonella paravula</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> <u><i>Coprococcus comes</i></u> <u><i>Alistipes putredinis</i></u>	(Qin <i>et al.</i> , 2014)

^a 本研究で開発したハイスループット解析系に含まれる菌種に下線を施した。

な機能をもつかについて最新の知識をもつことが重要であると痛感している。EcoCyc (<https://ecocyc.org/>) という website では、大腸菌の遺伝子についての最新の研究結果が、それぞれの遺伝子ごとに頻りにアップデートされており、大腸菌研究を横断的に行う際に非常に優れた情報源となっている。ヒト腸内常在菌叢最優勢種においても、それぞれの菌種ごとに最新の研究結果がアップデートされるような仕組みが存在すると、今後の腸内細菌学の進展に大きく資するのではないかと考えられる。

謝 辞

本報告は、公益財団法人発酵研究所 (IFO) の寄附講座助成による成果の一部である。

文 献

Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., Ishikawa, E., Shima, T., Hara, T., Kado, S., Jinnohara, T., Ohno, H., Kondo, T., Toyooka, K., Watanabe, E., Yokoyama, S., Tokoro, S., Mori, H., Noguchi, Y., Morita, H.,

Ivanov, I.I., Sugiyama, T., Nuñez, G., Camp, J.G., Hattori, M., Umesaki, Y. & Honda, K. 2015. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell* **163**: 367-380.

David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J. & Turnbaugh, P.J. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**: 559-563.

Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., Pudlo, N.A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V.B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T.S., Núñez, G. & Martens, E.C. 2016. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell* **167**: 1339-1353.e21.

Fujimoto, T., Imaeda, H., Takahashi, K., Kasumi, E., Bamba, S., Fujiyama, Y. & Andoh, A. 2013. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's

- disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**: 613-619.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K. & Ohno, H. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**: 446-450.
- Giongo, A., Gano, K.A., Crabb, D.B., Mukherjee, N., Novelo, L.L., Casella, G., Drew, J.C., Ilonen, J., Knip, M., Hyoty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C.H., Schatz, D., Atkinson, M.A. & Triplett, E.W. 2011. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J* **5**: 82-91.
- Gotoh, A., Nara, M., Sugiyama, Y., Sakanaka, M., Yachi, H., Kitakata, A., Nakagawa, A., Minami, H., Okuda, S., Katoh, T., Katayama, T. & Kurihara, S. 2017. Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**: 2009-2017.
- Green, J.M., Barratt, M.J., Kinch, M. & Gordon, J.I. 2017. Food and microbiota in the FDA regulatory framework. *Science* **357**: 39-40.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., Patterson, P.H. & Mazmanian, S.K. 2013. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* **155**: 1451-1463.
- Png, C.W., Linden, S.K., Gilshenan, K.S., Zoetendal, E.G., McSweeney, C.S., Sly, L.I., McGuckin, M.A. & Florin, T.H. 2010. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* **105**: 2420-2428.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Meta, H.I.T.C., Bork, P., Ehrlich, S.D. & Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59-65.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., Le Chatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, S., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S.D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K. & Wang, J. 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* **490**: 55-60.
- Qin, N., Yang, F., Li, A., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., Guo, J., Le Chatelier, E., Yao, J., Wu, L., Zhou, J., Ni, S., Liu, L., Pons, N., Batto, J.M., Kennedy, S.P., Leonard, P., Yuan, C., Ding, W., Chen, Y., Hu, X., Zheng, B., Qian, G., Xu, W., Ehrlich, S.D., Zheng, S. & Li, L. 2014. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* **513**: 59-64.
- Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C.F., Funai, K., Hayashi, D.K., Lyle, B.J., Martini, M.C., Ursell, L.K., Clemente, J.C., Van Treuren, W., Walters, W.A., Knight, R., Newgard, C.B., Heath, A.C. & Gordon, J.I. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* **341**: 1241-1244.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E.

- & Elinav, E. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* **514**: 181–186.
- Sugiyama, Y., Nara, M., Sakanaka, M., Gotoh, A., Kitakata, A., Okuda, S. & Kurihara, S. 2017. Comprehensive analysis of polyamine transport and biosynthesis in the dominant human gut bacteria: Potential presence of novel polyamine metabolism and transport genes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **93**: 52–61.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. & Gordon, J.I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**: 1027–1031.
- Yamamoto-Osaki, T., Kamiya, S., Sawamura, S., Kai, M. & Ozawa, A. 1994. Growth inhibition of *Clostridium difficile* by intestinal flora of infant faeces in continuous flow culture. *J. Med. Microbiol.* **40**: 179–187.