

短鎖脂肪酸（SCFA）産生性細菌の探索 ①
～SCFA 産生性 *Clostridium* 属菌 PCR スクリーニング法の開発

山 口 仁 孝

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第62号抜刷）

短鎖脂肪酸 (SCFA) 産生性細菌の探索 ① ～SCFA 産生性 *Clostridium* 属菌 PCR スクリーニング法の開発

Research on environmental bacteria that produce short-chain fatty acid (SCFA) 1
-Development of a PCR screening method for SCFA-producing *Clostridia*-

山口 仁孝^{1)†}

キーワード：短鎖脂肪酸、*Clostridium* 属菌、real-time PCR

はじめに

短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFA) は大腸内の未消化糖質を腸内細菌が発酵して生じる、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の生成物で、従来より大腸機能の維持や宿主免疫機能に対し多彩な生理作用があることが報告されていた¹⁾。さらに近年では、日本人研究者らによって、大腸内の短鎖脂肪酸のなかで、特に酪酸による免疫賦活メカニズムについての報告が相次いでなされ、世界的に注目されている²⁻⁵⁾。

しかしながら、微生物が行う大腸内での酪酸発酵については、細菌叢を構成する多数の細菌が複雑に関与していると想像され、酪酸生成に係る主要な菌種の特定や菌種間の相互作用など、全貌の究明は困難なものとなっている。また、酪酸産生菌として従来から知られる、*Clostridium butyricum* については、一部野生株にボツリヌス毒素を含むことが知られており、*Clostridium botulinum* の毒素遺伝子をコードするファージやプラスミドが近縁種に伝播したものと考えられており、野生株を扱う場合は注意が必要である。さらに、大腸内の短鎖脂肪酸産生能が高いこれらの細菌群の多くは嫌気性細菌であることから、その培養や定量・同定作業が煩雑で多くの手間と時間が必要であることが研究が進展しない要因のひとつと考えられる。

近年明らかにされた酪酸の免疫賦活メカニズムに関する論文では、大腸内の *Clostridium* 属菌が産生す

る酪酸は、腸粘膜下の naive T 細胞をアレルギーや慢性炎症など過剰な免疫反応を抑制するはたらきのあるリンパ球である制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) へと分化促進する作用がある²⁻⁵⁾ こと。また、大腸に認められる *Clostridium* 属菌のなかで、Treg 賦活化には、特に 17 種の *Clostridium* 属菌が重要な働きがある⁶⁾ ことが報告されている。

そこで本研究では、環境中や動物糞便をサンプルとして、既に報告されている *Clostridium* 属菌以外で、動物に対し毒性がなく安全で酪酸産生能が高い菌株の探索を最終的な目標とし、本年度は *Clostridium* 属菌の PCR スクリーニング法の開発を行っている。そこで今回は、報告された 17 種の *Clostridium* 属菌の中で、とくに酪酸産生能が高い 4 菌種に注目し、これらの菌種について、簡便に短時間で定量スクリーニングすることを目的に、real-time PCR 法を用いたスクリーニング法についての検討を行ったので、その一部について報告する。

材料と方法

(1) 環境 (土壌) および猫糞便サンプルおよび DNA 抽出 (フェノール・クロロホルム抽出法)
津山市内の河川より土壌サンプル (10) ・兵庫県 K 市動物病院より提供を受けた猫糞便 (5) (表 1) について、0.85% 滅菌生理食塩水 900 ul (1:9 (w/v)) 浸漬後、その 500 ul を 1.5 mL 滅菌 tube に分取し、

† 責任著者、1) 美作大学生活科学部食物学科

Proteinase K 添加 Tail buffer (1 mg/mL Proteinase K、1% SDS、0.1 M NaCl、0.1 M EDTA、50 mM Tris-HCL(pH 8.0)、up to 500 mL by DW) を 500 uL 加え (35°C O/N)、上清を新しい tube に移し、フェノール・クロロホルム抽出法による抽出を行った。残りの 500 ul の生食サンプルについては -30°C で凍結保存した。

表 1 DNA サンプル

Sample No.	由来	場所	採取日
1	土壌	市内河川	2016.9.10
2	土壌	市内河川	2016.9.10
3	土壌	市内河川	2016.9.12
4	土壌	市内河川	2016.9.12
5	土壌	市内河川	2016.9.12
6	土壌	市内河川	2016.9.15
7	土壌	市内河川	2016.9.15
8	土壌	市内河川	2016.9.17
9	土壌	市内河川	2016.9.17
10	土壌	市内河川	2016.9.19
11	猫糞便	K市	2016.9.10
12	猫糞便	K市	2016.9.10
13	猫糞便	K市	2016.9.11
14	猫糞便	K市	2016.9.13
15	猫糞便	K市	2016.9.14

(2) コントロール菌株

文献 6 を参考に酪酸産生能が高い 4 菌種、*Clostridium indolis*、*Clostridium sp.* 7_3_54 FAA、*Lachnospiraceae* 3_1_57FAA_CT 1、*Anaerotruncus colihominis* を対象に選定した。これらの菌については、市販の標準菌株が入手できなかった。そこで *Clostridium* 属の比較菌株として、非病原性で酪酸産生性がある *Clostridium butyricum* (NBRC 13949) を独立行政法人製品評価技術基盤機構 (nite) バイオテクノロジーセンターより購入した。

(3) PCR スクリーニング法の検討

プライマー設計

上記 4 菌種ならびに比較標準菌株 (*Clostridium butyricum*) について、NCBI GenBank Gene データベースから、遺伝子定量に適した elongation factor Tu (*Tuf*) 遺伝子について、塩基配列の検索をおこない、市販遺伝子解析ソフト (Genetyx[®]) を用いて、alignment を行った後に特異プライマーおよびプローブを設計した。

結果

(1) DNA サンプル

抽出した DNA および生食サンプルは、-30°C ディープフリーザーに保管した。

(2) real-time PCR スクリーニング法の検討

プライマー設計および合成委託

4 菌種 (*Clostridium indolis*、*Clostridium sp.* 7_3_54 FAA、*Lachnospiraceae* 3_1_57 FAA_CT 1、*Anaerotruncus colihominis*) および標準株 (*Clostridium butyricum*) の *tuf* 遺伝子配列の alignment

Genetyx 上の *tuf* 配列では、5 種菌株は同じ *Clostridium* 属であることから、保存領域 (同一の塩基配列) が多くを占めて、特に *Clostridium indolis*、*Clostridium sp.* 7_3_54 FAA、*Lachnospiraceae* 3_1_57 FAA_CT 1 の 3 株については、*tuf* 遺伝子塩基配列の相同性が 83% 以上と高かった (表 2)。そこで、各菌種の塩基配列が異なる可変領域に注目して alignment を行い (図 1)、各菌種特異 primer プライマーおよびプローブを設計 (表 3) し、合成委託した。

考察

Clostridium 属菌は腸内細菌以外に偏性好気性でタンパク質や糖質などを分解する、芽胞形成性の土壤細菌として広く知られていることから、今回は河川土壌からサンプリングを行った。また、ヒトと食性が異なり、アレルギー症状が少ない動物における酪酸産生性 *Clostridium* 属菌の保有状況にも興味を持たれたため、今回は猫糞便サンプルについても採取した。さらに今後 PCR スクリーニング法を確立した後は多くの DNA サンプルについて検査を検討したいと考える。

PCR 条件の検討については、比較標準菌株 (*Clostridium butyricum*) から抽出した DNA を用いて、PCR 条件 (サーマルサイクラーのサイクル数、アニーリング時間・温度) を検討し、特異性および検出限界の確認を行った後、文献 7 と同様に特異性・検出限界を確認する。そして、標準プレートカウント法による菌量測定を行った、菌量が既知の Template

DNA を作成し、real-time PCR 法による Cq (Quantification Cycle : 陽性と判定されたときの サイクル数) 値を用いて、菌量—Cq 値の検量線を作成する。

なお、4 菌種の *tuf* 遺伝子のスクリーニング陽性サンプルが見つかった場合は、それぞれの菌種を培養し、単離コロニーを分離した後は、16 S r RNA のシーケンスにより、4 菌種を同定確認した上で、標準菌株

(*Clostridium butyricum*) について行ったものと同様の実験を行い、各菌種の PCR 定量スクリーニング法を確立することができる。

現在までのところ実際の PCR 反応の確認には至っていないが、順次実験を進めスクリーニング法の確立をしたうえで、環境中や動物糞便などの多くのサンプルについて早急に調査を進めていく。

表 2 *tuf* 遺伝子配列 (1194-1203 bp) の相同性

No.	Strain	NBRC No.	NCBI Accession No.	<i>tuf</i> (bp)	Sequence homology (%)					
1	<i>Clostridium indolis</i>		NZ_AZUI01000001	1194	100.0					
2	<i>Clostridium</i> sp. 7_3_54FAA、		ACWK01000070	1194	85.1	100.0				
3	<i>Lachnospiraceae</i> 3_1_57FAA_CT1		ACTP02000009	1194	83.3	82.5	100.0			
4	<i>Anaerotruncus colihominis</i>		NZ_DS544168	1203	69.1	69.6	70.6	100.0		
5	<i>Clostridium butyricum</i>	13949	NZ_CP013252	1194	70.1	69.8	69.0	63.7	100.0	

図 1 Genetyx による各菌株の alignment

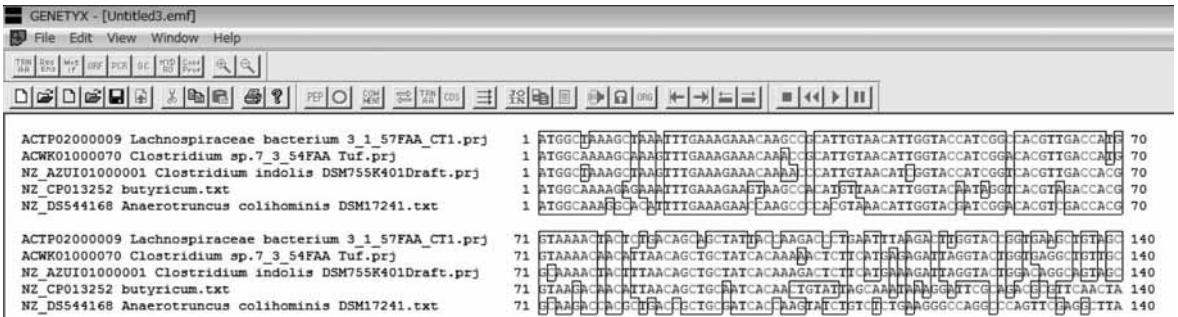


表 3 今回設計した primer および probe

Target	Primers Probes	Sequence (5'→3') : partial	bp	5'mod.	3'mod.	PCR amplicon size(bp)
<i>Lachnospiraceae</i> 3_1_57FAA_CT1	Lb-s	gta-----	24			128
	Lb-as	tca-----	27			
	Lb-Taq	caa-----	28	FAM	BHQ1	
<i>Clostridium</i> sp. 7_3_54FAA	Csp-s	gta-----	26			128
	Csp-as	tca-----	26			
	Csp-Taq	ctc-----	28	HEX	BHQ1	
<i>Clostridium indolis</i>	Ci-s	gta-----	26			128
	Ci-as	tca-----	27			
	Ci-Taq	tca-----	28	Texas Red	BHQ2	
<i>Clostridium butyricum</i>	Cb-s	gtt-----	26			128
	Cb-as	tct-----	27			
	Cb-Taq	att-----	30	FAM	BHQ1	
<i>Anaerotruncus colihominis</i>	Ac-s	gtt-----	26			128
	Ac-as	tcg-----	27			
	Ac-Taq	ctg-----	28	Cy5	BHQ3	

参考文献

- 1) Tanoue, T. et al. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 16, 295- 309 (2016).
- 2) Atarashi, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337-41 (2011).
- 3) Atarashi, K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232-6 (2013).
- 4) Furusawa, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446-50 (2014).
- 5) Saito, T. et al. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med* 22, 679-84 (2016).
- 6) Narushima, S. et al. Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived *Clostridia*. *Gut Microbes* 5, 333-9 (2014).
- 7) 山口仁孝ら. リアルタイム PCR 法を用いた手指細菌叢の解析. *美作大学紀要*. 61, 57-66 (2016).