

短鎖脂肪酸（SCFA）産生性細菌の探索②
～菌の分離・同定

山口 仁孝・松本 楓

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第63号抜刷）

短鎖脂肪酸 (SCFA) 産生性細菌の探索② ～菌の分離・同定

Research for the Environmental Bacteria that Produce Short-Chain Fatty acid (SCFA) ②
~ Separation and Identification of SCFA- Producing *Clostridia*

山口 仁孝^{1)†}・松本 楓²⁾

キーワード：短鎖脂肪酸、Clostridium 属菌、real-time PCR、ヤセ菌、デブ菌

はじめに

短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFA) 産生性細菌の多彩な生理作用^{1) 2)}に注目し、既報²⁾ではそのスクリーニング法について、主にPCR法によるスクリーニングを検討した。今回は実際にボランティアの協力のもとにヒト糞便から新規短鎖脂肪酸産生性細菌の分離・同定を検討した結果と、とくに今回は腸内に存在するSCFA産生性細菌 (腸内細菌) の中で、肥満に関係すると考えられている菌のスクリーニングを試みたので報告する。

腸内細菌には大きく善玉菌や悪玉菌、日和見菌に分けられるが、そのうち70%を占める日和見菌の中には、近年肥満・痩身に関わる腸内細菌として、いわゆるヤセ菌 (バクテロイデス属) やデブ菌 (ファーミキューテス属) があり、この2つの菌のバランスが痩身や肥満に関係していると報告されている⁴⁾。

実際に肥満傾向と痩身傾向とがある一卵性双生児についての調査では、肥満ではファーミキューテス属の菌の割合が高く、痩身ではバクテロイデス属の菌の割合が高いと報告^{6) 7)}されている。また、痩身者の糞便の細菌叢では、肥満者と比較して菌種が多様化する傾向があることも報告されている^{4) 5)}。

一方、本邦における同様の研究報告⁸⁾は少なく、

西洋人と比較して食物繊維や魚介類・発酵食品を多く摂取する日本人特有の食生活・腸内細菌叢が肥満や痩身にどう関係しているか不明な点が多い。

そこで今回は、肥満・痩身に関わると報告されている特定の菌種に注目し、ボランティア糞便よりその菌の占有率を把握し、実際に肥満や痩身に関係があるのかについて、比較・検討することを目的とし研究を行った。

材料と方法

(1) 標準菌株の選定・入手

文献⁵⁾を参考に肥満者と痩身者間でその占有率に有意差があると報告されている6菌種を選定し、理研JCMより標準菌株を入手した (表1)。

(2) 菌種特異的primerの設計・入手

選定した6菌種のPCR法による菌数定量を目的として、遺伝子データベース (NCBI Nucleotide) からtuf遺伝子 (タンパク質伸長因子の一つで、1つの細菌につき、ゲノム上に1または2コピー存在する遺伝子) 配列を参照し、遺伝子解析ソフトウェア Genetyx (ゼネティックス Ver.6) を用いて種特異的Primer setを設計し、入手した (表2)。

(3) 標準菌株の培養

6菌種の各標準菌株についてABCMBPイオン培地 (栄研化学株式会社E-MG22) を用いて、培養 (24

†責任著者

¹⁾ 美作大学生活科学部食物学科

²⁾ 同学生

表 1. 今回検討した標準菌株 (略号、JCM No.)

Strain	Abbreviation	JCM No.
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Bv	5826
<i>Anaerostipes caccae</i>	Ac	13470
<i>Faecalicatena fissicatena</i>	Ff	31501
<i>Anaerostipes butyraticus</i>	Ab	17466
<i>Butyricoccus faeihominis</i>	Bf	31056
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Fp	31915

表 2. 各菌種の *tuf* 遺伝子の特異的に認識するPrimer set sequenceおよび増幅遺伝子断片長

Target species	Primer set sequence	Amplicon size (bp)
Bv	Bv-s : 5'-ggt.....tgg-3' Bv-as : 5'-cgt.....agg-3'	136
Ac	Ac-s : 5'-ctg.....tgg-3' Ac-as : 5'-gcc.....cgg-3'	139
Ff	Ff-s : 5'-tct.....ggg-3' Ff-as : 5'-tct.....tgg-3'	93

～72時間) 後、その培養液を、ABCМ寒天培地 (栄研化学株式会社E-MG19) に約30 μ lを画線塗抹し、AnaeroPack・ケンキ (三菱ガス化学株式会社) を用い、嫌気培養 (48～72時間) した。得られた単離コロニーについて再度ABCМブイヨン培地で純培養 (24～72時間) し、各標準菌株の培養液とした。

(4) 菌数確認

各標準菌株の培養液について、SPC法により菌数を計測し、平均値を算出した。

(5) 各標準菌株からのDNA抽出

① 各菌の培養液1mlを1.5ml tubeに入れ、boil

(5min) した。

②boil後急冷し、遠心分離 (12,000 rpm、3min) にかけて、上清液をDNAサンプルとした。

(6) 検出感度試験 (RT-PCR法)

RT-PCR試薬は、FastStart SYBR Green Master (REF#04 673 484 001、Roche Diagnostics) を使用し、PikoReal 96 Real-Time PCR System (REF# TCR0096、Thermo Fisher Scientific) にて、メーカー指示書に従い行った。

今回のPCRでは1検体当たり1 μ lのTemplate DNAを使用するため、1 mlあたり 10^3 個 (=copy)

表 3. 試薬調製 (SYBR Green) および RT-PCR条件

SYBR Green Master	7.5 μ l	Heat activation	95°C	15 min	
Primer-s (20pmol)	0.2 μ l	Denaturation	94°C	15 sec	40 cycles
Primer-as (20pmol)	0.2 μ l	Annealing	55°C	30 sec	
Distilled Water	6.1 μ l	Extension	72°C	30 sec	
Template DNA	1.0 μ l				

表 4. Guanidine Thiocyanate buffer (GTC buffer) 組成

Tris-HCl (pH 9.0)	100 mM
EDTA (pH 8.0)	40 mM
Guanidine Thiocyanate	4 M
BTB	0.1 %

の菌濃度が最低限必要と考えられるため、菌数が既知の各菌株のDNA Templateの10倍段階希釈液 (Tris-EDTA pH 8.0で希釈) を用い、 10^3 copy/mlまで段階希釈し、RT-PCR法により検出感度を確認した。一方PCRの非特異反応は35 cycleを超えると増大することが知られていることから、とくに今回は菌濃度が 10^3 cfu/mlのDNA Template 1 μ lを用いたPCRでCq (Quantification Cycle: 陽性と判定されたときのサイクル数) 値が35 サイクル以下になるかを確認した。同様の実験を3回繰り返した (表 3)。

(7) 検量線の作成

選定した 6 菌株のうち、標準菌株の培養および RT-PCR法でのtuf遺伝子定量が可能であったBv・Ac・Ffの 3つの菌について検量線を作成した。

菌数が既知の各標準菌株のDNA templateについて、10倍段階希釈液を作成しRT-PCRを行い、各菌量 (=copy数) におけるCq値の平均値±標準偏差

を求め、菌量とCq値について検量線 (回帰式・回帰直線) を作成した。

(8) ボランティアからの便サンプル採取及びアンケート・体組成測定

美作大学女子学生36名を調査対象とした。調査対象者には、サンプリングに関する倫理委員会承認(受付番号29-04)を受け、インフォームドコンセントおよび個人情報保護に留意したサンプリングについて説明し、本研究におけるボランティア協力の承諾を書面で受領した後、便のサンプリング、アンケート調査及び体組成の測定を行った。

①便のサンプリング及びTemplate DNAの精製方法

Guanidine Thiocyanate液 (表 4) を 1ml入れた採便容器に当日の朝の便を直接採取し、2時間以内に提出してもらい冷蔵保存後、当日中に採取後のGuanidine Thiocyanate液を1.5ml tubeに取り出し、boil (5min) 後冷凍し、便DNAサンプルとした。便DNAサンプルからの精製はキッ

ト (illustra™ bacteria genomic Prep Mini Spin kit, GE healthcare) を用いて行い、PCR Templateとした。

②アンケート

アンケートについては、以下の項目について調査した。

①個人情報等 ・年齢、性別、身長、体重、体脂肪率
②食事習慣について ・普段の食事で多く摂取している栄養素 ・欠食回数 ・間食・間食内容
③運動習慣について ・運動状況・運動内容
④便通・便質について

③体組成測定

体組成測定はInBody 430 (株式会社タクミ) を用いて行った。

④RT-PCR法での菌定量

各ボランティアの糞便から精製したDNA Templateについて、(表3)と同様にRT-PCR法によるDNA増幅を行い、得られた各菌のCq値を方法(7)の検量線にあてはめて菌数を定量し解析を行った。

(9) 統計解析

菌の定量結果とともに体組成測定結果(体脂肪

率、BMI)及びアンケート項目(食事量、間食、運動量、便通・便質)について、GraphPad Prism、SPSSを用いて以下の統計学的解析を行った。

①肥満群および痩身群間の各菌の相対占有率比較

サンプルを肥満群(Obese (BMI \geq 25、体脂肪率 \geq 30))と痩身群(Lean (BMI $<$ 18、体脂肪率 $<$ 20))の2グループ(表5)に分けて、それぞれのグループにおける3つの菌の占有率を比較した(等分散を確認後Student's t test)。

②菌組成の異なる3グループ(多様性、中間、単純群)での体脂肪率・BMI比較

菌の組成からサンプルを、ほぼBvのみの単純な組成のグループ(simple: N=21)、3種類の菌が一定量含まれる多様性のあるグループ(diverse: N=6)とその中間のグループ(intermediate: N=3)に分け(図1)、体脂肪率とBMIについて解析を行った(One-Way Factorial ANOVA)。

③その他の解析

体組成およびアンケート項目と菌量(占有率)と多変量解析、主成分分析を行った。

結果

○短鎖脂肪酸産生性細菌の分離・同定

既報で新たに試みたRT-PCR法による酪酸産生性乳酸菌のスクリーニングでは、菌分離に至らなかった。

○肥満に関わる腸内細菌のスクリーニング

(1) ボランティア年齢及び体組成測定結果について示す(表6)。

(2) 検出感度試験(RT-PCR法)

表5. 肥満・痩せグループ分け

Group	BMI	Body fat conc.
Obese (N=5)	$\geq 25 \text{ kg/m}^2$	$\geq 30 \%$
Lean (N=4)	$< 18 \text{ kg/m}^2$	$< 20 \%$

RT-PCR 法による検出感度試験結果から、Bv、Ac、Ffの各菌液 (103 copy/ml (=cfu/ml)) のCq値はいずれも35以下であったため、 10^3 copy/ml (=cfu/ml) が有効な検出感度であることを確認した (表7)。

(3) 検量線 (Cq値-菌数の回帰式・回帰直線)

各菌量 (cfu/ml) から抽出したDNA template を用いたRT-PCRのCq値均值±標準偏差) から

Cq値-菌数の回帰式・回帰直線を得た (図2)。

(4) 統計学的解析

①肥満群および痩身群間の各菌の相対占有率比較

Bv、Ac、Ffの全ての菌種において肥満群 (Obese) と痩身群 (Lean) の間に有意差が認められた (図3)。

②菌組成の異なる3グループ (多様性 (diverse)、

中間 (intermediate)、単純群 (simple)) での体

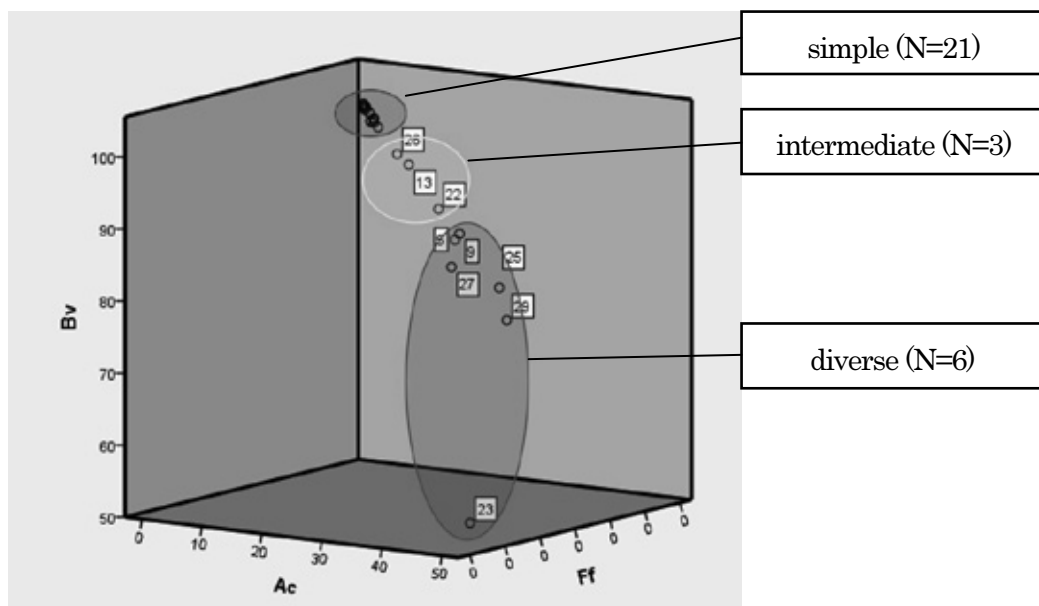


図1. 各菌占有率 (菌組成) によるグループ分け

表6. ボランティア年齢及び体組成測定結果 (n=36: Female)

項目	最小値	最大値	平均値±標準偏差
年齢 (歳)	19	22	19.9 ± 0.98
身長 (cm)	143.3	167.0	156.4 ± 4.72
体重 (kg)	38.1	99.6	51.9 ± 10.36
BMI	16.1	40.3	21.2 ± 4.11
体脂肪率 (%)	10.6	50.1	25.6 ± 7.16

脂肪率・BMI比較

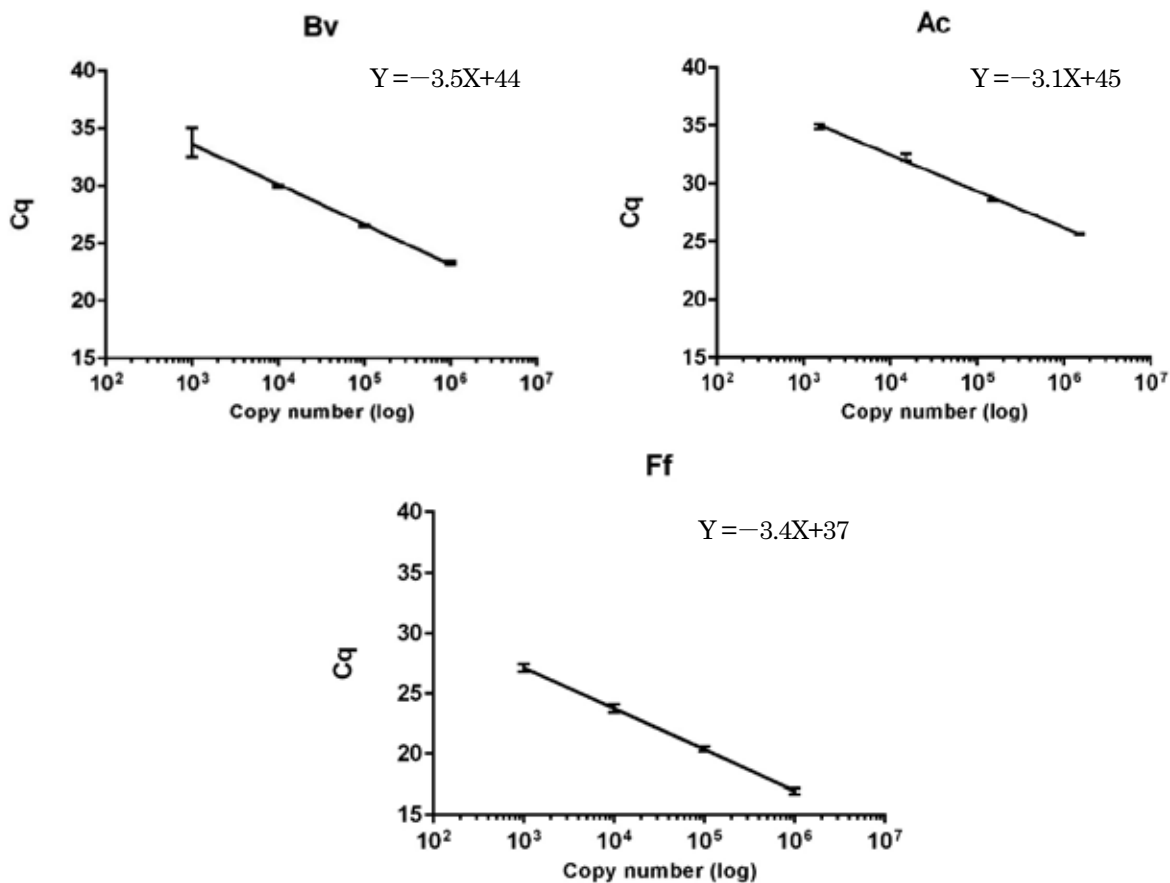
菌の組成が異なる3グループ間では、体脂肪率、BMIにおいて有意な差はみられなかった(図4)。

③その他の解析

体組成およびアンケート項目と菌量(占有率)について多変量解析・主成分を行ったが、有意な関連性はみられなかった。

表7. 検出感度試験の結果

Target species	Conc. (cfu/ml)	Cq
Bv	10^3	34
Ac	10^3	35
Ff	10^3	27



Y = Cq 値、X = log 菌数 (=copy)

図2. 検量線(回帰直線・回帰式)

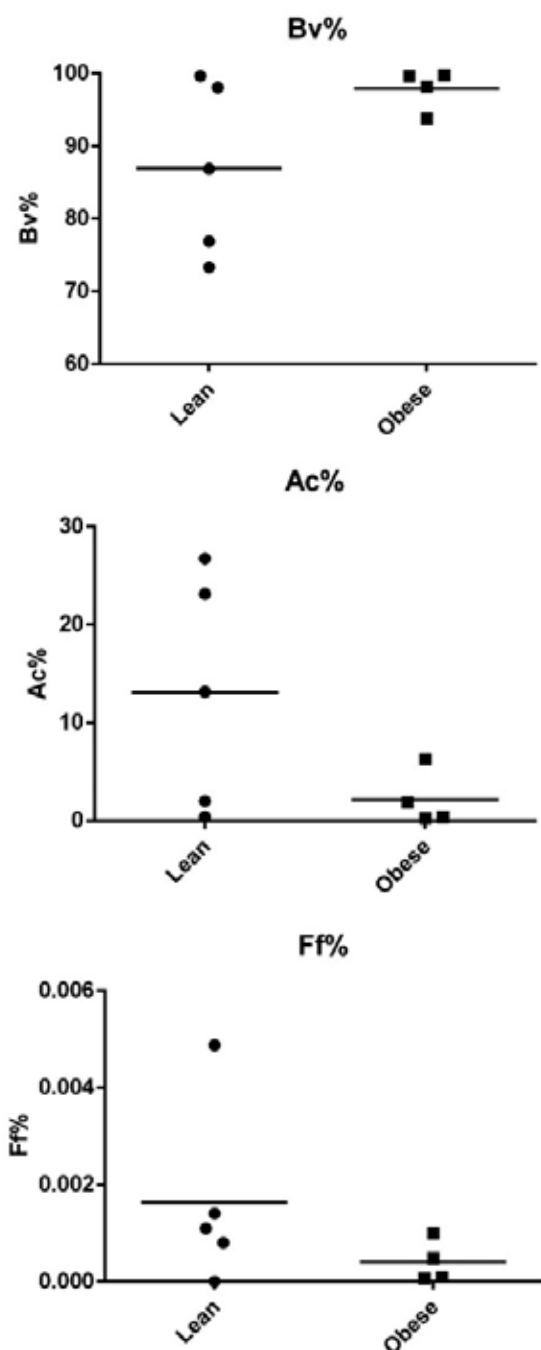


図 3. Obese・Leanグループでの各菌の占有率の比較

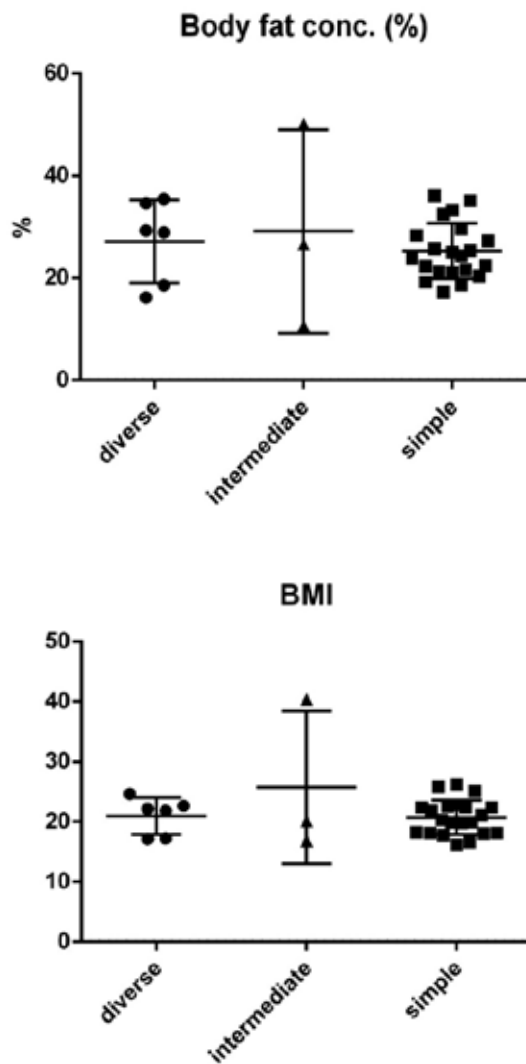


図 4. 菌組成からみた体脂肪率・BMI

考 察

○短鎖脂肪酸産生性細菌の分離・同定

原因として、PCRスクリーニングが不安定でうまくスクリーニングがかけられなかった。おそらく保存していたPrimer setの劣化していたものと考えられたので、今後機会があれば是非再検討したいと考えている。

○肥満に関わる腸内細菌のスクリーニング

今回の研究では、当初6菌種を選定していたが、実際の培養やRT-PCR法が可能であった3菌種のみで

の解析となったため、指標菌種が少なくなり、各サンプルの菌叢の多様性を十分に反映していないデータになった可能性も考えられる。

とくに今回取り扱った嫌気性菌は菌種によって培養の条件が大きく異なり、標準菌株の培養がうまくできないものがあったことから、事前に培地の選択や培養条件の確認が重要であると感じた。

また、採取サンプル36のうち、有効なサンプルが30となり、サンプリングや解析作業時にDNAが変性したものと考えられたことから、サンプリング時や解析において、DNAサンプルの取り扱いには十分な注意が必要だと思われた。

統計解析においては、肥満と痩せのグループ間での菌の相対占有率の比較で、Bv・Ac・Ffのすべての菌種で有意差が認められた。過去の報告では、BvはObeseのグループで占有率が高く、FfはLeanのグループで占有率が高い菌であったが、今回の結果でも同様の結果であった。

一方、AcはObeseで占有率が高い菌と類縁菌であるため、Obeseでの占有率が高くなっていると推察していたが、Leanグループでの占有率が高い結果であった。

また、過去の報告と同様に今回の研究でも、肥満グループではBvの占有率が非常に高く偏り菌叢の多様性に乏しく、逆に痩せグループではAc、Ffも一定の菌量が存在したことから、菌叢の多様性があることが確認された。

しかしながら、今回菌の組成からグループ分けをした解析では、体脂肪率、BMIについて有意な差はみられなかったことから、さらに調査対象とする菌種を増やすことや特定の菌種についてより精査することで、新たな関連性を見つけることができるのではないかと考えられた。

肥満は食事や運動習慣等の生活習慣が大きく関わっていると考えられる。本研究結果を取り掛かりとして、アンケート調査項目や内容の再検討、肥満に関わる腸内細菌叢についての有効なデータ取得およびそれらの関連性の解析および有用菌の発見等がなされ

ば、将来的にデブ菌の割合を減少させるあるいは痩せ菌の割合を増やす食品の発見・開発や有用な新食習慣改善法の確立などに寄与するものと考えられた。

参考文献

- 1) Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. Tanoue, T. et al, Nat Rev Immunol 16, 295-309 (2016)
- 2) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. Atarashi, K. et al, Science 331, 337-41 (2011)
- 3) 山口仁孝. 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. 美作大学紀要. 62, 123-6 (2017)
- 4) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Ley et al, Nature 444 (7122), 1022-3 (2006)
- 5) Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. Andoh A et al, J Clin Biochem Nutr 59 (1), 65-70 (2016)
- 6) Human Genetics Shape the Gut Microbiome. Goodrich et al, Cell 159, 789-799 (2014)
- 7) Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. Million et al, Inter Jour Obesity 36, 817-825 (2012)
- 8) Comparison of Fructooligosaccharide Utilization by Lactobacillus and Bacteroides Species. Endo et al, Biosci Biotechnol Biochem 76 (1), 176-179 (2012)