

Clostridium butyricum スクリーニング法の検討

山口 仁孝・尹 載宇

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第64号抜刷）

Clostridium butyricum スクリーニング法の検討

Study on the a Screening Method for *Clostridium butyricum*

山口 仁孝¹⁾†・尹 載宇²⁾

キーワード：*Clostridium* 属菌、免疫抑制細胞 (regulatory T cell, Treg)、real-time PCR

はじめに

従来より、大腸内の未消化物質を腸内細菌が発酵して生じる酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFA) は、食物の消化・吸収に係る様々な大腸機能の維持や宿主の免疫機能に対し、多彩な生理作用がある¹⁾と報告されている。特に最近これらSCFAの中で、アレルギー反応を抑制する免疫抑制細胞 (regulatory T cell, Treg) を活性化作用が酪酸にあり²⁾、腸内細菌の中で特にTregの賦活化に係る17種の*Clostridium*属菌があることが報告され、注目されている³⁾。

著者らはこの17種の中で特に酪酸産生能が高い*Clostridium*属4菌種についての定量的PCRスクリーニング方法の開発を既報で報告した⁴⁾。しかしながら、腸内や環境中に広く存在する*Clostridium*属菌の中には、本来ボツリヌス菌が保有する致死的な神経毒であるボツリヌス毒素 (Botulinum neurotoxins, BoNTs) 遺伝子をゲノム上やプラスミドとして保有する株があることが知られており⁵⁻⁹⁾、実際にボツリヌス菌以外の*Clostridium*属菌によるボツリヌス中毒事件も発生している¹⁰⁾ことから、これらの菌株の取り扱いには注意が必要である。

そこで今回はとくに、酪酸産生性*Clostridium*属菌

の中で、酪酸産生能が高く、probioticsとしても古くから利用されてきたが、ボツリヌス毒素保有株が存在することが知られている*Clostridium butyricum*に注目し、そのスクリーニングとボツリヌス毒素遺伝子のcheckを同時に行う、multiplex PCR法を検討したので報告する。

材料と方法

(1) *Clostridium butyricum*標準菌株の入手

Clostridium butyricum (NBRC 13949) 1株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。

(2) *Clostridium butyricum*遺伝子特異primerの設計

遺伝子データベース (NCBI GenBank Gene, Nucleotide) に登録された*C. butyricum* 10株 (表1) のDNA topoisomerase IV (DNA gyrase) subunit Bの塩基配列について、市販遺伝子解析ソフト (Genetyx[®] ver.6) を用いてalignmentを行い、1塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) 部位を確認した (図1)。また、同様に登録されている*C. botulinum* 4株 (表2) のDNA gyrase subunit Bについてもalignmentを行いSNPsの確認を行った後、*C. butyricum*との種間alignmentを行い、配列が大きく異なることを確認した後、*C. butyricum*特異primerを検討した。

† 責任著者

¹⁾ 美作大学生生活科学部食物学科

²⁾ College of Pharmacy, Keimyung University 1095 Dalgubeoldaero, Dalseo-Gu, Daegu, Korea 42601

(3) ボツリヌス毒素関連遺伝子primerの設計

*C. butyricum*における保有が確認されているボツリヌス毒素はtype E型である^{11, 12)}ことから、報告されているBoNT E gene cluster^{13, 14)} (図2)を参考に、ボツリヌス毒素複合体遺伝子(毒素と結合した無毒成分で、消化器内部で毒素を保護する) ntnh 配列(*C. botulinum* 4株、*C. butyricum* 4株)およびtype E型毒素遺伝子(*C. botulinum* 12株、*C. butyricum* 15株)(表2)について、(2)同様に種内および種間alignmentを行い(図3)、共通する配列をもとに、primer setを設計した。

(4) 標準菌株の培養

表1 比較した*C. butyricum*株

NCBI Accession No.	Source	Length(bp)
AGYK01000021	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
CP013252	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
CP014704	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
CP016332	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
JXBT01000001	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
NZ_AQQF01000189	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
NZ_ASPQ01000107	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
NZ_KB851134	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
NZ_KV823324	<i>Clostridium butyricum</i>	1914
NZ_QRUG01000044	<i>Clostridium butyricum</i>	1914

AGYK01000021	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
CP013252	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
CP014704	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
CP016332	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
JXBT01000001	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
NZ_AQQF01000189	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
NZ_ASPQ01000107	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
NZ_KB851134	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
NZ_KV823324	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
NZ_QRUG01000044	1261	BAATCTATATAGTGAAGGAGATTTCGCCG	BSCTCAGCTAAACAGCGAAGATGAAAGTCCAG	1330
AGYK01000021	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
CP013252	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
CP014704	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
CP016332	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
JXBT01000001	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
NZ_AQQF01000189	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
NZ_ASPQ01000107	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
NZ_KB851134	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
NZ_KV823324	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
NZ_QRUG01000044	1331	CAATTTTCCATTAGAGAGTAAATATTAATATGTTGAAAACAAAGATTAGATGAAT	TTAAATGTTG	1400
AGYK01000021	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
CP013252	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
CP014704	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
CP016332	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
JXBT01000001	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
NZ_AQQF01000189	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
NZ_ASPQ01000107	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
NZ_KB851134	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
NZ_KV823324	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470
NZ_QRUG01000044	1401	FACATAGAGATCAATGTTACTGCTTTTGGTGC	BSGATTTGGAATGATTTTGGATTTGAAGGATAGG	1470

図1 *C. butyricum gyrB*配列のalignment (一部)



図2 *bontE* gene cluster

*C. butyricum*標準菌株についてABCMBiyon培地(栄研化学株式会社E-MG22)を用いて、培養(24~72時間)後、その培養液を、ABCMBiyon培地(栄研化学株式会社E-MG19)に約30μl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ABCMBiyon培地で純培養(24~72時間)し、標準菌株の培養液とした。

(5) 標準菌株からのtemplate DNA抽出

① 簡易法:

ABCMBiyon培養液1mlを1.5ml tubeに入れ、boil (5min)したのち急冷し、遠心分離(12,000 rpm、3min)にかけ、上清液をtemplate DNAサンプルとした。

② キットによる抽出:

bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (illustraTM, GE Healthcare)を用いて指示書に従いtemplate DNAを抽出した。

(6) RT-PCR法

RT-PCR: 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(表3)。

表2 比較したntnhおよびbontE遺伝子のNCBI Accession No. (*: 種間alignmentに使用した株)

<ntnh>	botulinum	butyrium	<bontE>	botulinum	butyrium
1	AM695752*	ABDT01000090*	1	AB082519*	AB037704*
2	AM695753*	ACOM01000005*	2	AM695755	AB037705
3	AM695754	CP013239	3	AM695756	AB037706
4	AM941719	D12739	4	AM695757	AB037707
			5	AM695758	AB037708
			6	AM695759	AB037709
			7	EF028403	AB037710
			8	EF028404	AB037711
			9	GQ294552	AB037712
			10	KF179319	AB037713
			11	KF19448	AB037714
			12	KM370319*	AB039264*
			13	AB088207	AB088207
			14	AB039264*	KP455988
			15	X62088	X62088

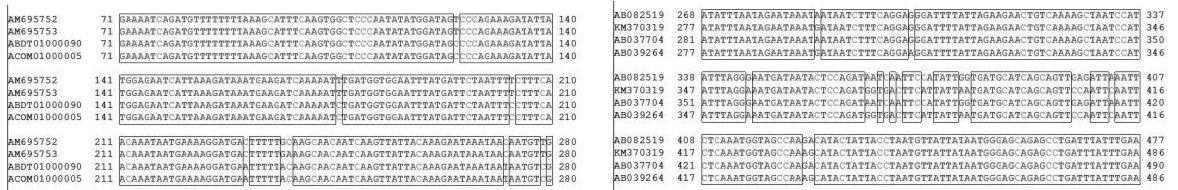


図3 *ntnh* (左)、*bontE*遺伝子 (右) の種間alignment (一部)

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
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			40 cycles

表4 Primer set sequence (一部配列) および増幅遺伝子断片長

Target gene	Primer set sequence	Amplicon size (bp)
<i>C. butyricum. gyrB</i>	BbgrB-s : 5' -cag.....cgg-3'	132
	BbgrB-as : 5' -tat.....cgg-3'	
<i>ntnh</i>	ntnh/E-s : 5' -cta.....agc-3'	331
	ntnh/E-as : 5' -ttc.....gcc-3'	
<i>bont/E</i>	Bont/E-s : 5' -aat.....cag-3'	176
	Bont/E-as : 5' -tat.....gtg-3'	

(7) 増幅遺伝子の確認

PikoReal 96 Real-Time PCR System 上でSYBR Green RFU値の上昇により確認した。

結果

(1) primer sets

C. butyricum 特異primer (BbgyrB-a・-as)、type E *ntnh* 特異primer (ntnh/E-s・-as)、*bont/E* 特異primer (Bont/E-s・-as) をそれぞれ設計し、オリゴ合成を業者に委託し入手した (表4)。

(2) 増幅遺伝子の確認

各primer set を用いたRT-PCRでは、標準菌 template DNA (材料と方法 (5) ①、②) のCq値はいずれも35以上であったため、有効な増幅感度を得られなかった。

考察

今回の研究で、*Clostridium butyricum* 特異検出用 primer setとしてBbgrB-s・-as、botulinum neurotoxin type E特異検出用primer setとして、ntnh/E-s・-as およびBont/E-s・-asを設計したが、その有効性の確認は不十分な結果であった。その原因の一つとして、今回は、嫌気性菌で増殖に時間がかかったため、菌濃度がごく薄い標準菌液からgenomic DNAを抽出し、RT-PCR検出系では、サンプルあたり1 μ lのtemplate DNA液しか使用しなかったため、PCRで用いたtemplate DNA液中のgenomic DNAの絶対量が不足したため、PCRで増幅しなかったことが予想された。したがって今後は、標準菌溶液の菌量を十分に示して、再度確認が必要と考える。また、特にbotulinus neurotoxin関連のprimer setの有効性の確認には、ボツリヌス毒素の遺伝子 (毒素産生性ボツリヌス菌のDNA) が必要と考えられるため、当該株を

保有する関係部局との研究協力が必要と考えられる。

Clostridium butyricum は、とくにアジア圏では古くから整腸作用・免疫賦活作用などの有効性がある probiotics として知られてきた。本邦でも宮入近治により1933年に発見された宮入菌（ミヤイリサン）が有名であった¹⁵⁾が、免疫学や腸内細菌に関する近年の新しい知見から、その価値が再認識され、戦略的生物資源としても注目されている。一方、botulinum neurotoxin E産生性の*C. butyricum* による中毒事件が世界各地で報告され、本邦でも2014年宮崎県で発生している¹⁰⁾ことから、その取り扱いには十分な注意が必要と考える。

本邦で発生した、*Clostridium butyricum*中毒事件株の遺伝子解析の詳細は不明であるが、近年、plasmidを介した水平伝播等が指摘されている⁷⁾ので、特に*Clostridium*属菌内でのbotulinum neurotoxin の伝播について、今後の研究が注目される。

参考文献

- 1) Atarashi, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337-41 (2011).
- 2) Furusawa, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446-50 (2014).
- 3) Narushima, S. et al. Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived *Clostridia*. *Gut Microbes* 5, 333-9 (2014).
- 4) 山口仁孝ら.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, 123-126 (2017)
- 5) 小崎俊司、幸田知子、梅田 薫. ボツリヌス症. 日獣会誌67, 275-282 (2014).
- 6) Dover, N., Barash, J. R., Hill, K. K., Xie, G. & Arnon, S. S. Molecular Characterization of a Novel Botulinum Neurotoxin Type H Gene. *The Journal of Infectious Diseases* 209, 192-202 (2014).
- 7) Nawrocki, E. M., Bradshaw, M. & Johnson, E. A. Botulinum neurotoxin E encoding plasmids can be conjugatively transferred to diverse clostridial strains. *Scientific Reports* 8, 3100 (2018).
- 8) Dykes, J. K., Luquez, C., Raphael, B. H., McCroskey, L. & Maslanka, S. E. in *Journal of Clinical Microbiology* (ed. Patel, R.) 53, 3363-3365 (2015).
- 9) Hill, K. K. et al. Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *Journal of bacteriology* 189, 818-832 (2007).
- 10) NIID (国立感染症研究所) : IASR (病原微生物検出情報) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/botulinum-m/botulinum-iasrd/4719-kj4123.html>
- 11) Hill, K. K., Xie, G., Foley, B. T. & Smith, T. J. Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins. *Toxicon. Highlights of the TOXINS 2015 Meeting* 107, 2-8 (2015).
- 12) Hutson, R. A., Thompson, D. E. & Collins, M. D. Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Letters* 108, 103-110 (1993).
- 13) Williamson, C. H. D. et al. Comparative genomic analyses reveal broad diversity in botulinum-toxin-producing *Clostridia*. *BMC genomics* 17, 180 (2016).
- 14) Zhang, S. et al. Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nature Communications* 8, 14130 (2017).
- 15) ミヤイリサン製薬株式会社
<http://www.miyarisan.com/index.htm>