

環境中の酪酸産生菌の分離同定

山 口 仁 孝

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第65号抜刷）

環境中の酪酸産生菌の分離同定

Isolation and Identification of the Environmental Butyrate-producing Bacteria

山口 仁 孝^{1)†}

キーワード：酪酸産生性*Clostridium*属菌、*Clostridium butyricum*、免疫抑制細胞 (regulatory T cell, Treg)

はじめに

酪酸は、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知られている¹⁾。特に近年は、免疫分野の研究の著しい発展に伴い、アレルギーなどの過剰な免疫反応を抑制する免疫抑制細胞 (regulatory T cell, Treg) を活性化作用があることが報告され^{2,3)}、注目されている。

大腸粘膜内への適量の酪酸供給は、それを産生する微生物 (酪酸産生菌) の定着が必須となり、特に酪酸産生能が高い*Clostridium*属菌4種について、著者らは定量的PCRスクリーニング方法の開発を既報で報告した⁴⁾。そして、これらの酪酸産生性*Clostridium*属菌の中でも、とくに酪酸産生能が高くprobioticsとして古くから利用され、安全性が高い*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法について既報で報告した⁵⁾。

今回は、*C. butyricum*のPCRおよび培養法によるスクリーニングの改良と環境サンプルを用いてのスクリーニング (分離・同定) について検討したので概要を報告する。

材料と方法

(1) *Clostridium butyricum*標準菌株

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*Clostridium butyricum* (NBRC 13949)株を標準株として用いた。

(2) 標準菌株の培養

*C. butyricum*標準菌株についてABCMBuyon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、ABCMBuyon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ABCMBuyon培地で純培養 (24~72時間) し、各標準菌株の培養液とした。

(3) *Clostridium butyricum*遺伝子特異primer(*Cb16S-s-as*) の設計

既報⁵⁾で報告した、遺伝子データベース (NCBI GenBank Gene, Nucleotide) に登録された*C. butyricum* 7株 (表1) について、16SrRNA遺伝子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。また、同様に登録されている*C. botulinum* 5株 (表1) の16SrDNA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 (そ

† 責任著者

¹⁾ 美作大学生生活科学部食物学科

表1 比較した*ntnh*、*bontE*、*16SrRNA*遺伝子のNCBI Accession No.
(* : 種間alignmentに使用した株)

Gene		botulinum	butyricum
<i>ntnh</i>	1	AM695752*	ABDT01000090*
	2	AM695753*	ACOM01000005*
<i>bontE</i>	1	AB082519*	AB037704*
	2	KM370319*	AB039264*
<i>16SrRNA</i>	1	AP019716	NZ_ACSC01000002
	2	CP013239	CP013705
	3	CP013252	CP001078*
	4	CP013352	CP001056
	5	CP014704	CP000727
	6	CP039702*	
	7	CP039705	

それぞれ1株)を行い、両種間で配列が大きく異なることを確認した後、*C. butyricum*特異primer (*Cb16S-s*・*-as*)を設計し、オリゴを株) FASMACに合成委託した。

(4) ボツリヌス毒素関連遺伝子primerの確認

既報で報告したボツリヌス毒素type Eに対するprimer setについて、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*配列およびtype E型毒素遺伝子配列を参考に、(3)同様に種内および種間alignmentを行い、共通する配列をもとにprimer setの配列情報・増幅断片長を再確認した(*ntnh* /*E-s*・*-as*、*BontE*/*E-s*・*-as*)。

(5) 薬剤感受性試験

メーカー指示書(センシディスク:BD)に従い、標準菌液をマクファーランドNo. 0.5に調整し、ABCM寒天培地に均一に塗布後、12薬剤について、ディスクをディスペンサーで配置し、薬剤感受性試験を行った。

(6) 標準菌株からのTemplate DNA抽出

ABCM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)後、上清液をTemplate DNAサンプルとした。

(7) PCR法

PCR: Takara Ex Taq® Hot Start Version (Takara) 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PCRを行った(表2)。また、*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus* (NBRC15305)、*Escherichia coli* (NBRC 102203^T)について、煮沸法により抽出したgenomic DNAをコントロールTemplateとして用いた。

(8) 増幅遺伝子の確認

常法に従い、エチジウムブロマイド加2%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った後、UVトランスイルミネーター(TFML-20E、UVP)により302nm蛍光増幅バンドを確認しデジタルカメラ(CanonG7X)にて撮影した。

(9) 環境サンプルのスクリーニング

市販食品を中心とした47種76検体のサンプルについて、今回設計した*Clostridium butyricum*遺伝子特異primer *Cb16S-s*・*-as*および既報で報告した

表2 試薬調製 (Takara Ex Taq: 1検体あたり) およびPCR条件

×10 Ex buffer	1.5 µl	Heat activation	95°C	5min			
dNTP	1.2µl						
Primers (20pmol)	0.1 µl			Denaturation	94°C	30sec	35 cycles
Primers (20pmol)	0.1 µl						
Distilled Water	13 µl						
Taq	0.125µl			Annealing	58°C	30 sec	
Template DNA	1.0 µl	Extension	72°C			30 sec	

表3 環境サンプル内訳 (食品系)

食品	種類	生産地				合計
		美作産	県内産	県外産	外国産	
穀類	7	13	5	2	—	20
麺類	2	—	—	2	—	2
イモ類	2	3	—	1	—	4
野菜類	21	8	2	19	1	30
きのこ類	2	—	—	2	—	2
果物類	2	2	—	1	1	4
肉類	1	—	—	—	1	1
肉加工品	1	—	—	1	—	1
魚類	2	—	—	1	1	2
水産加工品	1	—	—	1	—	1
種実類	1	—	—	2	—	2
粉末出汁	1	1	—	—	—	1
キムチ	4	—	—	6	—	6
合計	47	27	7	38	4	76

BbgyrB-s・*-as*を用いてPCRスクリーニングを実施した (表3)。

結果

(1) 標準菌の培養性状

Clostridium butyricum (NBRC 13949)株のABCMBイオン培地発育は良好で、35°C18時間培養で菌塊が試験管下層に堆積した。また、35°C18時間培養の

ABCMB寒天培地上のコロニーは直径4~5mmで乳白色表面湿潤で辺縁が凹凸の粘調性が高いコロニーを形成した (図1)。

(2) ボツリヌス毒素関連遺伝子primerの確認

前回検討したtype E *ntnh*特異primer (*ntnh* /*E-s*・*-as*)、*bont* /*E*特異primer (*Bont* /*E-s*・*-as*) それぞれの配列情報・増幅断片長が不正確であったため修正

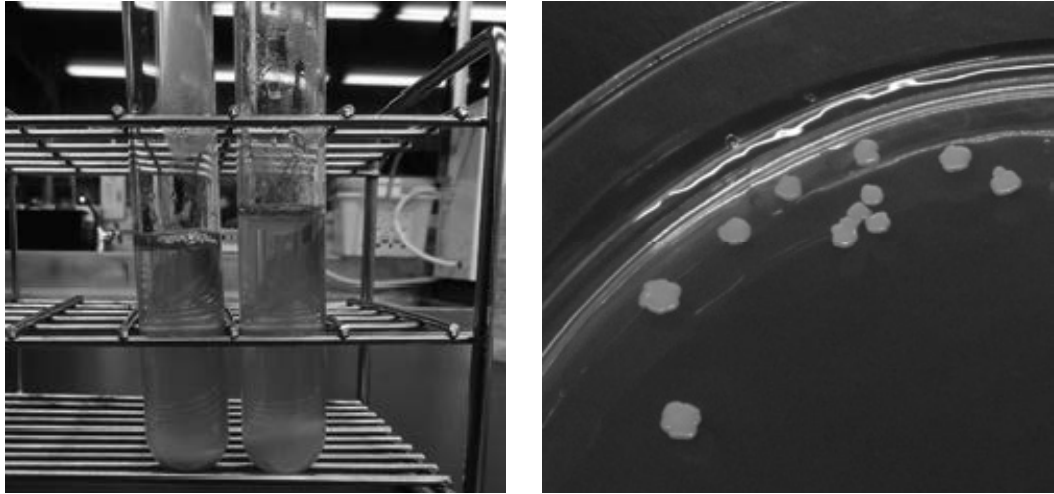
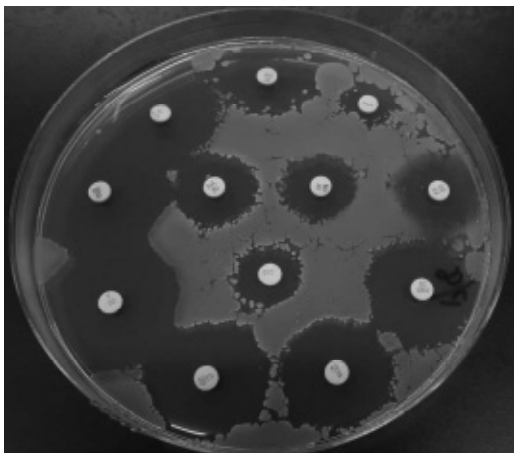


図1 *Clostridium butyricum*標準菌の培養性状

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

Target gene	name	Primer set sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
<i>C.butyricum. gyrB</i>	<i>CbgrB-s</i>	cag.....cgg	132
	<i>CbgrB-as</i>	tat.....cgg	
<i>ntnh</i>	<i>ntnh/E-s</i>	cta.....agc	329
	<i>ntnh/E-as</i>	ttc.....gcc	
<i>bont/E</i>	<i>Bont/E-s</i>	aat.....cag	175
	<i>Bont/E-as</i>	tat.....gtg	
<i>C.butyricum. 16SrDNA</i>	<i>Cb16S-s</i>	tct.....tgg	262
	<i>Cb16S-as</i>	ctc.....cga	



No.	薬剤名	略号	カタログ番号	阻止円(mm)	判定
1	アンピシリン	AM10	296636	29	S
2	アモキシリン25	AMX25	291089	33	S
3	セフトラゾラム75	CFP75	291005	39	S
4	リンコマイシン2	L2	296952	15	R
5	エリスロマイシン15	E15	296639	32	S
6	ドキシサイクリン30	D30	296951	40	S
7	オキシテトラサイクリン30	T30	291044	39	S
8	ナルジクス酸30	NA30	296647	24	S
9	ホスホマイシン50	FF50	291098	23	S
10	ノボピオシン30	NB30	291017	22	S
11	クロラムフェニコール30	C30	296637	31	S
12	ST含材	SXT	296641	16	R

図2 (左) および表5 (右) 薬剤感受性試験結果

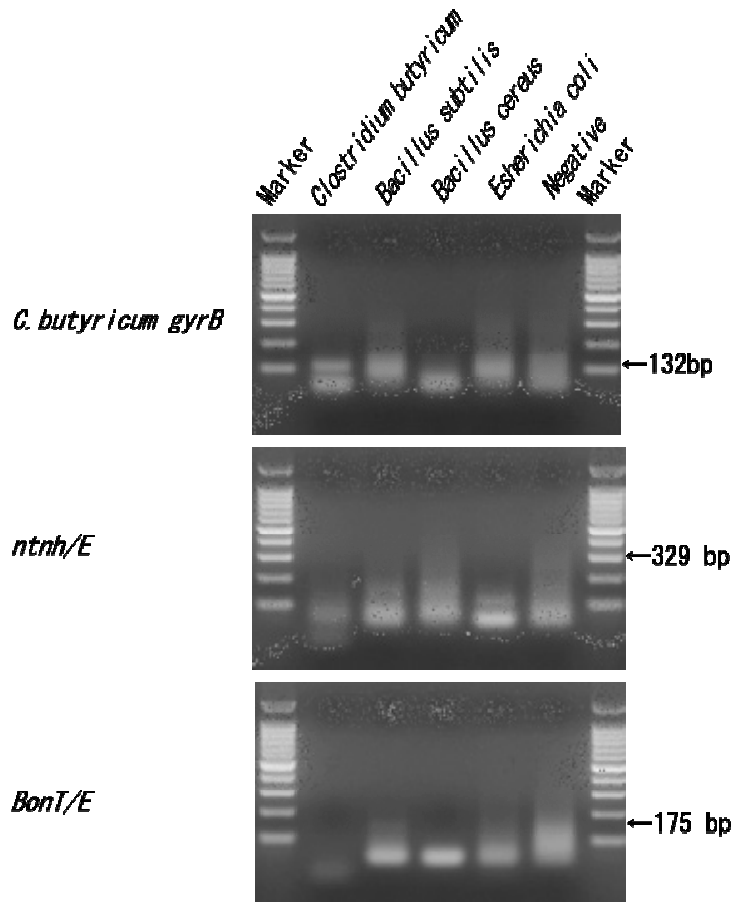


図3 標準株のPCR結果

した(表4)。

(3) 薬剤感受性試験

実施した12薬剤の10薬剤については感受性であったが、リンコマイシン、ST合剤について耐性が認められた(図2および表5)ことから、菌の選択分離に使用する培地組成の検討の際に参考になるものと思われた。

(4) 環境サンプルのスクリーニング

食品を中心にした47種76検体については、いずれのprimerにおいても*Clostridium butyricum*陽性反応は得られず、菌分離に至らなかった。

考 察

今回の研究で、*Clostridium butyricum*特異検出用 primer setとして新たにCb16S-s・-asを設計し、*ntnh/E-s*・-asおよび*Bont/E-s*・-asを再確認したが、*C. botulinum*菌typeE毒素産生株(DNA)の入手ができなかったため、毒素関連遺伝子(type E *ntnh*および *bont/E*)については確認できず、その有効性が明らかにできなかった。

また、今回は標準菌溶液の菌量は十分であったが、菌の粘性が非常に強く、コロニーを釣菌すると、糸を引いていた。そのため、MQ水にて混釈・vortex・遠心操作の洗浄作業を行ったが十分に改善されず、この状態で煮沸しTemplate DNA溶液としたため、PCRがうまく機能していない可能性もあるものと考えら

れた。また、今回のように粘性が高いコロニーやBio-filmを形成した状態から煮沸法にてgenomic DNAを回収する場合は十分に回収できない可能性が考えられる。この点については、洗浄液の組成や回数、遠心操作などの条件を検討する必要があるものと思われた。

ボツリヌス毒素の遺伝子（毒素産生性ボツリヌス菌のDNA）の入手については、今回は不可能であった。引き続き*C. butyricum*の研究においては、実験安全性確保のためには、毒素のcheckが必要と考えられるため、引き続き当該株（またはDNA）を保有する関係部局との研究協力について努力したい。

今回の環境中のPCRスクリーニングでは、*C. butyricum*陽性サンプルは得られず、菌分離に至らなかったが、嫌気状態の土壌・汚泥・糞便等に存在すると考えられることから、今後これらのサンプルについても幅広く数多くスクリーニングを実施したい。

免疫学や腸内細菌に関する近年の新しい知見の蓄積から、*C. butyricum*を中心とした酪酸産生菌は戦略的生物資源として注目されている⁶⁾。簡便なスクリーニング法を早期に確立し、環境中から多くの株を分離し、各株について性状を精査していきたい。

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) 山口仁孝ら. *Clostridium butyricum*スクリーニング法の検討.美作大学紀要. 64, 133-136 (2019)

6) ミヤイリサン製薬株式会社

<http://www.miyarisan.com/index.htm>