

# 各種分子生物学的手法による乳幼児腸内細菌叢の解析

中山 二郎<sup>1</sup>、Prapa Songjinda<sup>2</sup>、田中 重光<sup>2</sup>、立山 敦<sup>2</sup>、坪内 美樹<sup>3</sup>、清原千香子<sup>4</sup>、白川 太郎<sup>3</sup>、園元 謙二<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門、<sup>2</sup>九州大学大学院生物資源環境科学府生物機能科学専攻、<sup>3</sup>京都大学大学院医学研究科社会健康医学専攻、<sup>4</sup>九州大学大学院医学研究院予防医学専攻、<sup>5</sup>九州大学大学院農学研究院バイオアーキテクチャーセンター

## 【背景・目的】

乳酸菌を始めとするプロバイオティクスのアレルギー改善や抑制効果は、近年多くの研究で示されている。しかし、非介入の疫学調査によりアレルギー発症者と非発症者の腸内細菌叢の差を綿密に調査した研究はあまり多くない。そして、日本においても近年急増するアレルギー罹患者の腸内にどのような異変が起きているかを詳細に調査する必要性は高いと考えられる。小児アレルギーに関しては、地域格差を含め約 10%から 20%の新生児が生後 2 年間に食物アレルギー、喘息、アトピー性皮膚炎などのアレルギーを発症する。これらのアレルギー罹患幼児と健常幼児との間に生後すぐに始まる腸内細菌による免疫系への刺激になんらかの差があることは想定されるが、アレルギー発症要因にはその他先天的要因や生活要因なども関係し、大規模な疫学調査が必要である。そのためには多数の糞便サンプルの菌叢を迅速・簡便かつ高精度に解析するシステムの確立が先決である。本講演では、演者らのグループでこれまでに試みた一連の分子生物学的手法について、それぞれの長所・短所を再考し、乳幼児を対象としたアレルギーと腸内細菌叢に関する疫学調査研究に相応しい腸内細菌叢解析法を考えてみたい。

## 【方法・結果】

### 1 . 16S rRNA 遺伝子(rDNA)ライブラリーのランダムシーケンシング

糞便より抽出した細菌トータル DNA を鋳型に全細菌種 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) をターゲットにしたユニバーサルプライマーにより PCR を行う。得られた増幅産物を大腸菌にクローニングし、16S rDNA ライブラリーを構築する。ライブラリー中のクローンをランダムにシーケンスし、各シーケンスをデータベースに対してホモロジー解析し、細菌種情報を得る。複数のクローンを解析することにより各種細菌のおよそのポピュレーションを知ることができる。演者らのグループでは、9 名の乳幼児ボランティアより計約 500 クローンのシーケンス解析を行い、約 50 種のリボタイプのシーケンスを得ている。大部分がすでに培養されている細菌種の配列に 97%以上の相同性を示した。本手法の長所は、細菌種の同定が 16S rRNA 遺伝子配列によるものであり、DNA シーケンスを行なえる設備・技術があれば信頼度の高い同定が行え、実験誤差や研究者によるデータの個人差なども少ない点である。短所はシーケンスに時間とコストがかかることで、機器・技術が進歩した現在でも数百円/クローン、一糞便サンプルにつき 100 クローンをシーケンスするとして、数万円/糞便サンプルの費用が必要である。

### 2 . DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)

糞便より抽出した細菌トータル DNA を鋳型に GC クランプを付与したプライマーを片方に用いて PCR を行なう。当研究室では、V2-V3 領域を増幅するための HDA1-GC および HDA2 プライマーを用いている。電気泳動はホルムアミドと尿素のグラジエントを付与したポリアクリルアミゲルで行う。分離された各バンドの移動度と各菌種マーカーの移動度を比較することにより菌種同定

を行う。しかし一般的にすべての菌種マーカーを用意することはできないので、未知のバンドに対してはゲルから DNA 断片を抽出しシーケンス解析を行ないデータベースサーチにより各バンドの示す細菌種情報を得ることになる。演者らは、DGGE 法により 9 名の新生児ボランティアの生後 2 ヶ月の細菌叢成熟過程をモニターし、上記ランダムシーケンシングで得られた結果と矛盾しない結果を得ている。DGGE 法は操作に熟練を要する点が難点であるが、実験に成功すれば同一ゲル内において 10 サンプル前後の細菌群集構造を視覚的に捉えることができる。細菌叢の経時変化の解析や、サンプル間の細菌叢の比較などに有力な情報を得ることができる。

### 3 . T-RFLP(terminal restriction fragment length polymorphism)

糞便より抽出した細菌トータル DNA を鋳型に蛍光ラベル修飾をしたプライマーを片方に用いて PCR を行なった後に、増幅断片の混合物を制限酵素消化し、DNA シーケンサーのゲルにおいて蛍光標識末端の長さを正確に測定する。演者らのグループでは V1-V3 領域を増幅させ、3 種類の制限酵素 *HhaI*, *RsaI*, *MspI* で消化している。この複数種類の制限酵素断片長のデータより、もとの増幅断片混合物に含まれていた細菌種 16S rDNA を演繹する。DGGE 法に比べて操作ステップが少なくハイスループット解析が可能である。また各菌種マーカーを保有しなくても、16S rRNA 配列データベースを使用した属あるいは種レベルでの同定が可能である。しかし、異属の菌同士が同一長の制限酵素断片を有するケースは多々あり、一義的な同定ができない点に注意を有する。演者らのグループでは 28 名の新生児ボランティアの生後 2 ヶ月間の菌叢解析を行い、各人の細菌叢プロフィールデータを得ている。

### 4 . 定量リアルタイム PCR

種々細菌の特異的プライマーセットを用いて、糞便より抽出したトータル DNA を鋳型に PCR を行い、リアルタイムで増幅 DNA を定量し、トータル DNA 中の標的細菌種の DNA 量を逆定量する。演者らのグループでは、全細菌種、ビフィズス菌、大腸菌群、バクテロイデス、ラクトバチラスを標的とした定量法を確立している。長所は条件の最適化を慎重に行なえば他の方法に比べて信頼度の高い定量性が得られる点である。短所は、検出対象の細菌ごとにプライマーの選択や条件設定を行なわなくてはならず、ハイスループット化が困難な点である。

#### 【考察】

疫学調査や医療診断などで糞便細菌叢検査を行なう場合には、DGGE や T-RFLP はハイスループット化が困難であり不向きと思われる。リアルタイム PCR 法や本報では触れなかった FISH 法やフローサイトメトリー法などは標的細菌を限定した調査には適当と思われる。しかし、演者らの研究目的は標的細菌を限定せずに細菌叢とアレルギーの関連性を評価することであり、上記 4 手法あるいは本報では触れなかった DNA マイクロアレイ法、フローサイトメトリー法などの可能性をさらに追求する必要があると考察される。

#### 【参考文献】

- 1) P. Songjinda, J. Nakayama, Y. Kuroki, S. Tanaka, S. Fukuda, C. Kiyohara, T. Yamamoto, K. Izuchi, T. Shirakawa and K. Sonomoto, "Molecular monitoring of the developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants" *Biosci. Biochem. Biotechnol.*, 2005, 69, 638-641.
- 2) 中山二郎, 福井学, Prapa Songjinda, 田中重光, 久貫良子, 園元謙二, "腸内フローラの構造解析: DGGE/TGGE 法による腸内細菌叢解析" *腸内細菌学雑誌*, 2004, 18, 147-153.

# Analysis of Infant Intestinal Microbiota by Culture-independent Molecular Approaches

Jiro Nakayama<sup>1</sup>, Prapa Songjinda<sup>2</sup>, Shigemitsu Tanaka<sup>2</sup>, Atsushi Tateyama<sup>2</sup>, Mina Tsubouchi<sup>3</sup>, Chikako Kiyohara<sup>4</sup>, Taro Shirakawa<sup>3</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., <sup>2</sup>Dept. of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Bioresource and Environmental Sciences, Kyushu Univ., <sup>3</sup>Dept. of Health Promotion and Human Behavior, Kyoto University Graduate School of Public Health, <sup>4</sup>Dept. of Preventive Medicine, Division of Social Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu Univ., <sup>5</sup>Bio-architecture Centre, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.

## [Background and Objective]

A number of studies have demonstrated benefits of probiotics to improve or prevent allergy disease. However, not many studies have been performed to investigate differences in bacterial composition between allergy and non-allergy humans without probiotic intervention. It should be important to inquire into changes in intestinal microbiota of recently increasing allergy patients. In Japan, 10% to 20% population develop allergy disease e.g., food allergy, asthma, and atopy dermatitis within two years after birth. There is considerable evidence that the development of intestinal microbiota in early life has great influence on the development of immune system. However, since life style or genetic factor also affect allergy development, large scale of epidemiological investigation is required to realize the precise correlation between allergy and intestinal microbiota. To realize it, it is indispensable to establish high-throughput analytical system for fecal microbial composition. In this presentation, various kinds of molecular methods will be compared with regards to fitness to the epidemiological investigation.

## [Methods and Results]

### 1. Random sequencing of 16S rRNA gene library

16S rRNA gene (rDNA) fragments are amplified from total bacterial DNA extracted from fecal sample by PCR with a set of universal primers. The amplified products are cloned into *E. coli* to construct 16S rDNA library. A number of clones are randomly sequenced and homology search is performed against database. The results allow highly reliable species identification and rough estimation of microbial composition. Nothing special technique and instrument other than DNA sequencing facilities are necessary. We have obtained about 500 sequences corresponding to about 50 ribotypes from 9 infants. Most ribotypes obtained showed more than 97% identity to those of known cultured bacteria, suggesting that majority of bacterial community in neonatal intestine corresponds to cultured bacteria, which is different from adult's intestine.

### 2. DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)

PCR amplification is performed by using total DNA extracted from feces as a template and a set of primers one of which contains GC-clamp. We use HDA1-GC and HDA2 primers to amplify V2-V3 region. Electrophoresis is performed in 8% polyacrylamide gel with a denaturant gradient of 30-65%, where 100% corresponds to 7M urea and 40% formamide. Bands separated in the DGGE gel are assigned by comparing band positions with those of reference markers or sequencing of DNA fragments excised from the gel. We monitored succession of intestinal microbial composition in 9 newborn subjects. Seven subjects except for

two treated by antibiotics showed a common pattern representing development from aerobic to anaerobic microbial ecosystem. As obtained in our experiment, DGGE is useful for rapid diversity assessment and comparative analysis even though it requires skilled technique.

### 3. T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)

PCR amplification is performed by using total bacterial DNA extracted from fecal sample as a template and a set of universal primers one of which is labeled by fluorescence. The mixture of amplicons is digested by several short cut restriction enzymes and the lengths of labeled-end fragments are determined in DNA sequencing gel. Microbial composition is deduced by combining the set of the data of restriction fragment lengths. We use 8UA and 519B primers to amplify V1-V3 region and digest amplicons by *HhaI*, *RsaI*, and *MspI*. The advantage of this method is that instead of reference markers, sequence database can be used for bacterial identification and that this method can be applied to high-throughput analysis by using multi-capillary DNA sequencer. The drawback is that the bacterial identification is sometime ambiguous because in some cases even different genus bacteria yield same length of restriction fragment. We have analyzed bacterial compositions of 28 infant subjects by T-RFLP and gained individual profile of intestinal bacterial composition.

### 4. Quantitative real-time PCR

PCR amplification is performed by using total bacteria DNA extracted from fecal sample as a template and a set of species-specific or group-specific primers and the amplified DNA is quantified in real time. The target 16S rDNA in the sample is estimated from the amplification profile in comparison with those of serial dilutions of standard DNA. This method allows accurate quantification of target bacteria in the complex ecosystem. However, a set of specific primers and optimization of PCR condition are necessary for each target. We have already established protocols of the real-time PCR quantification for total bacteria, bifidobacterial group, enterobacteriaceae group, bacteroides group and lactobacillus group.

### [Discussion]

DGGE and T-RFLP are not appropriate for epidemiological study or clinical diagnosis because they are difficult to be applied to high-throughput system. Real-time PCR, FISH (fluorescence in situ hybridization), and flowcytometry are promising for high-throughput analysis if we target certain specific bacteria. However, in order to look into global bacterial community under the epidemiological project, we should look into further possibility of the above four methods and also DNA microarray and flowcytometry.

### [References]

- 1) P. Songjinda, J. Nakayama, Y. Kuroki, S. Tanaka, S. Fukuda, C. Kiyohara, T. Yamamoto, K. Izuchi, T. Shirakawa and K. Sonomoto, "Molecular monitoring of the developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants" *Biosci. Biochem. Biotechnol.*, 2005, 69, 638-641.
- 2) J. Nakayama, M. Fukui, P. Songjinda, S. Tanaka, R. Kunugi, K. Sonomoto, "Analysis of the composition of the intestinal flora: Analysis of intestinal bacterial community by DGGE/TGGE" *J. Intestinal Microbiol.*, 2004, 18, 147-153.