

一般演題 1

Differential Displayによる腸内細菌 mRNA 解析の試み

Differential Display of mRNAs from Fecal Bacteria

○小森佑奈¹, 佐々木佳織², 日当愛美¹, 鈴木秀幸³, 福島浩平^{1,2,3}

¹東北大学大学院医学系研究科分子病態外科学分野,

²東北大学大学院医工学研究科消化管再建医工学分野,

³東北大学病院胃腸外科

【はじめに】次世代シーケンサーの出現により、腸内細菌の膨大なゲノム情報が集積されつつある。しかし、腸内細菌の有する遺伝子が実際に発現し機能しているかは不明な場合が多い。

【目的】ヒト腸内細菌 mRNA を抽出し、Arbitrary primer を用いた Differential Display 法により mRNA 発現を解析するシステムを検討すること。

【方法】健常成人4例（2例では metronidazole を4日間服用前後での糞便）より得られた糞便検体から腸内細菌 DNA および total RNA を抽出した。ヒト由来 RNA および ribosomal RNA を除去し、最後に DNAase 処理を行い mRNA-enrich 分画とした。各ステップにおけるコンタミネーションを、*Clostridium coccoides*, *Bifidobacterium* の 16S rRNA (DNA) を標的とする (RT)-PCR およびバイオアナライザーにより評価した。Random hexamer を用いて RT 反応を行ったのち、10mer を適宜組み合わせ PCR を行いポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。SYBR Green Gold で染色後、興味あるバンドを切出した。再増幅後、プラスミドに組み込み塩基配列を決定した。BLAST サーチでヒットした遺伝子に対する特異的プライマーを用い、リアルタイム PCR により、DNA および mRNA を定量した。

【結果】糞便から total RNA を抽出し段階的操作により、腸内細菌より mRNA を抽出することが可能であった。PCR を用いた評価では、細菌 ribosomal RNA を完全に取り除くことはできなかった。Display により metronidazole 服用により出現するバンドをクローニングしたところ、薬剤耐性遺伝子と一致した。糞便 DNA あたりの遺伝子 DNA コピー数は metronidazole 服用前後で症例 A は不変、症例 B は 100 倍に増加し、mRNA 発現は A で 10 倍、B で 1000 倍増強していた。

【考察と結語】本法により、腸内細菌の mRNA 構成を解析することが可能であると思われたが、条件の至適化は今後も必要である。また、高価な設備も必要ない簡便な方法ではあるが、実験感度、再現性、定量性などの問題がある。DNA と mRNA の両者を定量することにより、特定の遺伝子を有する細菌（集団）の菌数のみならず、転写状態や mRNA 安定性を評価しうる可能性がある。このことにより、腸内細菌の働きをよりダイナミックに解析できるかもしれない。

一般演題 2

次世代シーケンサーを用いた16S rDNA配列解読による
網羅的且つ定量的な腸内細菌叢解析A Comprehensive and Quantitative 16S rDNA Deep-sequencing Analysis
for Microbial Flora Using Next-generation Sequencer

○関塚剛史, 黒田 誠

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター第三室

【背景】細菌叢解析において、これまでにT-RFLP, DGGE, Real-Time PCR, メタゲノムシーケンス等の手法が用いられてきた。しかし、それらは網羅性若しくは定量性のどちらかに特化した手法となっている。次世代シーケンサーを用いた細菌叢の網羅解析としては、パイロシーケンス法等を用いた手法が用いられているが、コストが高いのが現状である。我々は、illumina GAIIを用いて、より網羅的且つ定量的で比較的簡便且つ安価な細菌叢解析手法を開発した。

【方法】糞便中のDNAを市販のキットのみ、および溶菌酵素にて処理後キットを用いて抽出した。16S rDNAの変領域のPCR増幅断片およびメタゲノムDNAライブラリーをillumina GAIIを用いて網羅解読した。

【結果】16S rDNAの変領域78bpを約300万リード (3.0×10^6) 解析することに成功し、1gの供試糞便 (10^{11} colony-forming units (CFU)) より 10^8 CFU/g以上のmajor groupから約 10^5 CFU/gのminor groupまでの約78菌属の割合を算出した。糞便中でmajor groupおよびminor groupに含まれる、それぞれ4菌属および3菌属のReal-Time PCRおよびメタゲノム解析の結果と16S rDNA網羅解読との相関係数は、 $r^2 = 0.85$ および0.95であった。また、細菌叢中の全体のDNAを効率的に調整する手法の検討も行い、加熱よりも酵素的に細菌を溶菌することで、FirmicutesおよびActinobacteriumの検出感度が45倍および116倍に向上する事が明らかとなった。Bacteroides属の詳細な解析の結果、16S rDNA網羅解読はメタゲノム解析よりも的確に種レベルでの割合を算出する事ができ、今回供試した日本人の糞便内では、*B. plebeius*が最優位であった。

【考察】今回考案した16S rDNA網羅解読は、比較的安価に網羅的かつ定量的に腸内細菌叢の全貌を解析する事ができた。また、日本人の腸内に特徴的に存在すると報告される*B. plebeius*は、健康な日本人の腸管内のBacteroides属内に於いて最優位を占めており、食文化と細菌叢との関連が強く予想される。

一般演題 3

マルチオームクス解析による腸内環境分子間ネットワークの構築

Development of Interactive Molecular Networks in Gut Environment
Based on an Integrated Omics Approach

○加藤 完^{1,2}, 福田真嗣^{1,2}, 伊達康博^{3,4}, 近山英輔⁴, 尾形善之⁴, 中西裕美子^{1,2},
坪井裕理^{4,5}, 守屋繁春^{2,5}, 常田 聡³, 菊地 淳^{2,4}, 大野博司^{1,2}

¹理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター,

²横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科, ³早稲田大学大学院先進理工学研究科,

⁴理化学研究所植物科学研究センター, ⁵理化学研究所基幹研究所

【目的】腸管内には多種多様な腸内細菌が共生しているが、それら細菌同士あるいは細菌と宿主とがどのように相互作用をすることで、腸内環境の恒常性を維持しているのかについての詳細は明らかでない。次世代シーケンサーを始めとする解析機器の開発や技術革新により、網羅的なデータの計測・処理時間の大幅な短縮が可能となりつつあることから、本研究では、われわれが独自に開発したマルチオームクス解析手法を腸内共生環境に適用することで、腸内細菌と宿主細胞により形成される「超有機体 (superorganism)」の理解に向けた基盤データの構築を試みた。

【方法】SPF環境下で飼育したBALB/cマウスに通常食と小麦ふすま由来繊維を5% (w/w) 含む高繊維食を1週間ごと交互に摂食させ、毎日糞便をサンプリングした。腸内フローラ組成の変動、発現遺伝子群の変動、および腸管内代謝物の変動はそれぞれ、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法、cDNAライブラリー法、¹H-NMRプロファイリング法を用いて解析を行った。得られた生物学的情報を数値化し、多変量解析および共相関解析を行った。高繊維食摂食時のマウス腸内細菌叢-発現遺伝子群-代謝物間の変動を3次元マトリックス相関情報として抽出し、相関情報に基づく分子間ネットワークを構築した。

【結果および考察】腸内細菌叢-発現遺伝子群-代謝物間の相関情報から、高繊維食摂食時の腸内環境の変動を抽出したところ、短鎖脂肪酸を含む糖代謝関連因子が腸内環境を構築する中心的なネットワークモジュールを構成することが明らかとなった。分子間ネットワークの少ないモジュールも少数ながら構成されたが、これらは直接糖代謝との関連性が示唆されていないような因子だったことから、腸内環境の変動情報に基づいて構築された分子間ネットワークは、腸内環境を理解する上で重要な基盤データとなりうることを示唆された。

一般演題 4

フラクトオリゴ糖摂食によるヒト腸内環境の代謝動態解析

Evaluation of the Effect of Fructooligosaccharides
on the Intestinal Environment○藤原明美^{1,2}, 福田真嗣^{1,2}, 加藤 完^{1,2}, 菊地 淳^{1,3}, 大野博司^{1,2}¹横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科,²理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター, ³理化学研究所植物科学研究センター

【目的】 腸内細菌叢（腸内フローラ）は宿主の健康維持・増進に寄与したり、あるいは逆に腸管関連疾患の発症にも関与することが知られている。そのため、腸内フローラを含む腸内環境全体の代謝動態を理解し、それらを制御することは、われわれのQuality of Lifeを向上させるという意味でも重要である。腸内フローラの制御方法の一つとして、ビフィズス菌などのいわゆる善玉菌の増殖促進効果を有し、腸内環境の改善効果をもたらすプレバイオティクス的一种であるフラクトオリゴ糖（FOS）摂取があげられる。マウスを用いた試験ではFOSを摂食することで腸管免疫系が賦活化され、アレルギー抑制効果や感染症予防効果があることが報告されているが、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。われわれはFOS摂食時のヒト腸内環境の変動を正しく理解するため、腸内フローラおよび腸管内代謝物の変動を菌叢解析技術とメタボローム解析技術を組み合わせた相関解析手法を用いて、FOS摂食によるヒト腸内環境動態の詳細について解析した。

【方法】 20歳から30歳の健康なボランティア7名（男性4名、女性3名）に一日あたり20gのFOSを一週間摂食してもらい、FOS摂食前後およびFOS摂食中の糞便を採取した。試料は凍結乾燥後にオートミルを用いて物理的に破碎し、代謝物およびDNAを常法に従って抽出した。糞便中代謝物および菌叢の解析はそれぞれ、NMRを用いたメタボローム解析および変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE法）を用いて行った。得られた代謝物および腸内フローラ組成の情報はそれぞれ数値化し、相関解析を行った。

【結果】 腸内フローラ組成は個体ごとに大きな違いがあり、FOS摂食による個体内での変動よりも個体間での違いの方が大きかった。腸管内代謝物に関しても個体ごとに違いはあったが、個体内での変動よりも個体間での違いの方が大きかった。個体内の腸内環境の変動を見出すために腸管内代謝物変動と腸内フローラ変動の相関解析を行ったところ、短鎖脂肪酸を含むいくつかの代謝物の変動は、DGGE解析により得られた菌叢の変動と相関しており、それらの菌群は個体ごとに異なった。以上のことから、FOS摂食によるヒト腸内環境の改善効果の一端は、腸内フローラ代謝物-宿主を介した効果であると考えられるが腸内環境の変動は各個体で異なる菌群が類似の代謝応答をしている可能性が示唆された。