

## 分子生物学的手法によるヒトの大腸内細菌叢の解析

理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室 / 微生物系統保存施設

林 秀謙

ヒトの腸内には 500 種以上、乾燥糞便 1g 当たり  $10^{12}$  個近い多種多様な細菌が棲息している。これらの細菌がヒトの栄養、薬効、生理機能、老化、発ガン、免疫、感染などに極めて大きな影響を及ぼすことが培養法により明らかにされてきた。しかしながら、腸内の環境は複雑な栄養成分および嫌気性であるが故に分離、同定できる菌種に限りがあり、腸内細菌の約 60 ~ 80% が培養が困難とされている。近年、培養を介さない手法により、培養困難な細菌を含む腸内細菌の多様性解析が可能になった。腸内細菌と健康、疾病の関係を明らかとする研究の一環として、成人男性(3 例)、高齢者(6 例)、菜食主義者(1 例)の 16S rRNA 遺伝子ライブラリーおよび T-RFLP により解析を行った。得られた約 1800 クロンの解析を行ったところ、個体差はあるが 55~75% のクロンが未同定な菌種の配列に分類され、未同定な細菌が多数存在することが明らかとなった。系統解析の結果、成人男性の腸内には *Clostridium leptum* サブグループ、*Clostridium coccoides* グループ、*Bacteroides* グループが主要な構成菌種として常在していた。一方、高齢者では *C. coccoides* グループの検出率が低く、“*Gammaproteobacteria*” に属するクロンが高頻度に検出されることを明らかにした。菜食主義者では *C. leptum* サブグループ、*C. coccoides* グループ、*Bacteroides* グループ、*Clostridium* rRNA クラスタ XVIII (*Clostridium ramosum*) に含まれる菌種由来の配列を検出した。特に *Clostridium* rRNA クラスタ XVIII に属するクロンが高頻度で検出された。これらの解析によりヒト腸内細菌の構成の全容が明らかとなった。さらに、ヒトの腸内細菌の構成には著しい個体差があることも認めた。その要因を食事、年齢、栄養、腸管免疫など様々な要因の影響により個体差が生じていると推定した。

消化管各部位における腸内細菌の生態を明らかにするために、老人の消化管各部位における腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子ライブラリーと T-RFLP より解析を行った。その結果、空腸、回腸においては“*Gammaproteobacteria*”、*Lactobacillus*、*Streptococcus*、*Enterococcus* グループ、*Bacteroides* グループが高頻度に検出し、盲腸、直腸では *C. coccoides* グループ、*C. leptum* サブグループ、*Bacteroides* グループ、“*Gammaproteobacteria*” に属する菌種を検出した。消化管各部位において細菌叢が異なることを認めた。

現在、腸内細菌の機能解析の一環として、食物繊維分解に関与している考えられる新規キシラーゼ遺伝子を行っている。培養を介すことなく、eDNA-PCRより遺伝子の取得を行い、酵素の性質を明らかにした。また、得られたキシラーゼ遺伝子を SOM(Self-Organizing Map)により解析を行ったところ、*Bacteroides* 由来の遺伝子であることが推定された。これらのキシラーゼ遺伝子が食物繊維分解に関与していると推定される。

今後、難培養性細菌を含む腸内細菌の迅速な解析を行うために、これまでに得られたクローンを基に菌種または菌群に特異的プライマー、DNA チップ等の設計を行うと共に、メタゲノムライブラリー等の構築により腸内細菌の機能も明らかにする予定である。

## Analysis of human intestinal microbiota using molecular-biological techniques

Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center

Hidenori Hayashi

A variety of bacteria live in the human intestinal tract. The composition and activity of indigenous gut microbiota are of paramount importance in human immunology, nutrition, and pathological processes and hence the health of the individual. It has been documented that more than  $10^{12}$  bacteria cell per g of content (dry matter) and more than 500 species inhabit the human gut. Culture-based approaches have been used for analysis of human gut microbiota. However, the number of bacteria that can be isolated and identified from the human large intestine is limited due to the anaerobic and complex environment. In fact, it is difficult to culture 60 to 80% of the bacteria in the human gut. Recently, the application of molecular-biological techniques has allowed the phylogenetic analysis of bacterial 16S rRNA genes in the human gut. As part of this study to clarify the relation among gut microbiota, health, and disease, the gut microbiota in adult, elderly, and strictly vegetarian individuals were analyzed by the 16S rRNA gene library and T-RFLP. Among a total of about 1,800 clones obtained, approximately 55 to 75% of the clones were phlotypes (yet-unexploited bacteria). A large number of species that have not yet been identified exist in human gut. As a result of phylogenetic analysis, the *Clostridium leptum* subgroup, the *Clostridium coccooides* group, and the *Bacteroides* group were considered the predominant bacteria in adult individuals. The *C. leptum* subgroup, the *C. coccooides* group, the *Bacteroides* group, and “*Gammaproteobacteria*” were detected at high frequency from elderly individuals. In addition, the proportion of the *C. coccooides* group was lower than that in younger adults. The *C. leptum* subgroup, *C. coccooides* group, *Clostridium* rRNA cluster XVIII, and *Bacteroides* group were detected from strictly vegetarian individuals. The *Clostridium* rRNA cluster XVIII was especially detected at high frequency. The composition of human gut microbiota were proven by these analyses. In addition, there were major differences between individuals in the composition of gut microbiota. These differences may be due to interindividual differences (e.g., daily diet, age, nutrition, and intestinal immunity).

Microbiota in jejunum, ileum, cecum and recto-sigmoid colon obtained from elderly individuals at autopsy were analyzed using 16S rRNA gene libraries and T-RFLP. The jejunal and ileal microbiota consisted of simple microbial communities that contain streptococci, lactobacilli “*Gammaproteobacteria*”, the *Enterococcus* group, and the *Bacteroides* group. The cecal and recto-sigmoidal colonic microbiota consisted of complex microbial communities with numerous species (OTUs) that belonged to the *C. coccoides* group, the *C. leptum* subgroup, the *Bacteroides* group and “*Gammaproteobacteria*”. Similarities and dissimilarities were demonstrated among four different parts of the human gut.

Recently, functional genes were cloned from environmental samples without cultivation of microbes. Novel 1,4- $\beta$ -xylanase genes, which may contribute to the breakdown of xylan which contains dietary fiber, were obtained directly from mixed genome DNA of fecal microbiota without cultivation. SOM (Self-Organizing Map) analysis demonstrated that the xylanase gene was classified to *Bacteroidetes*.

Further studies are necessary to design various species (phylotype)-specific primers to be used for the rapid detection of gut microbiota. Furthermore, the function of gut microbiota will be proven by metagenome analysis.