

# 16S rRNA 遺伝子から見る腸内細菌叢の魅力

佐々木建吾<sup>1\*</sup>・星 奈美子<sup>2</sup>

ヒトの腸内には、地球上において細菌がもっとも高密度に生息している。さらに腸内細菌叢は宿主であるヒトの健康や疾病に密接に関与している、と聞くと自分の腸内細菌叢にご興味をわく方が多いのではないのでしょうか。昨今、注目を集めている腸内細菌は英語で gut flora, gut microbiota などと呼ばれている。Flora は、flower つまり花と語源が同じであり、ローマ神話の花の女神 flora からきている。これは多種多様な植物相を表しており、100兆個、数百種に及ぶ細菌が生息しているヒト腸内を形容している。腸内は高度に嫌気的な状態であるため、腸内常在菌の大部分が偏性嫌気性菌である。近年、分離培養法によらない手法、すなわちメタゲノム解析の発展により、腸内細菌叢の構成に年齢や地域の差による大きな違いがあることが明らかとなってきている。メタゲノム解析はメタ 16S 解析（：細菌叢の菌種を同定し、その組成を解析する）とフルゲノム解析（：遺伝子組成解析）に分けられるが、本稿では前者について主に概説しながら、同時に腸内細菌叢の魅力を紹介する。

## 腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子解析

腸内細菌は大腸では内容物 1 g あたり  $10^{11}$ – $10^{12}$  個<sup>1)</sup>に達する。ヒトが摂取する食餌成分は腸内細菌により消化されて、短鎖脂肪酸やビタミンなどに変換され、宿主が利用できる形になる。すなわち我々は余計な遺伝子を持たずに仕事を腸内細菌にお任せしているため、腸内細菌が持つ遺伝子は一人当たり数百万と、ヒト一人が持つ遺伝子数約 2.2 万を大きく上回っている<sup>2)</sup>。このような腸内細菌叢を調べるためには糞便から DNA を抽出することから始まるが、筆者らは糞便と界面活性剤を混ぜて化学的に溶菌させ、さらにガラス Beads を添加して Beating する物理的な破碎を併用している<sup>3)</sup>。その後フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出、イソプロパノール沈殿を経て DNA を精製する。当初は化学的な溶菌だけで DNA を抽出していたが、抽出効率が悪かったために物理的な破碎法を加えた経緯がある。

抽出した DNA より 16S rRNA 遺伝子を実験的に PCR 増幅して、Illumina 社の次世代シーケンサーを用いて遺伝子配列を読む。プロトコルについては Illumina 社を参

照し<sup>4)</sup>、プライマーは全細菌を対象とするために 16S rRNA 遺伝子（：保存領域と可変領域が分散する構造を取っている）の保存領域を増幅するプライマーを使用している。PCR プロダクトをさらにサンプルごとに異なるインデックス(バーコード)配列を付加したプライマーで増幅することで、シーケンシングで処理される複数のサンプル内での区別が可能となる。シーケンサーからのデータは QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)<sup>5)</sup> を使用してクオリティ値の低いリードやキメラ配列を除き、配列相同性をもとに operational taxonomic units (OTUs) を作成して菌種ごとに分類する(図 1)。

## 菌叢の構造と疾患

腸内細菌叢のゲノム配列については、過去に進められてきた大規模なプロジェクトにより理解が深められた。2007 年より日本で Human Metagenome Consortium Japan が、2008 年より米国で Human Microbiome Project が、欧州で Metagenomics of the Human が開始されてきた。その結果、解析技術の進歩とともに、腸内細菌叢が宿主の健康に大きく関与していることが明らかとなってきている。近年になって、ヒト疾患である炎症性腸疾患、大

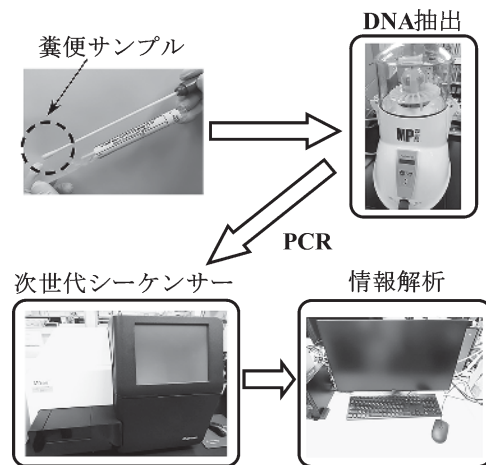


図 1. 糞便サンプルからの 16S rRNA 遺伝子解析の大まかな流れ。糞便はスワブにて採取する。DNA 抽出：ビーズ式破碎装置 FastPrep 24 Instrument (MPB 製)。次世代シーケンサー：MiSeq (Illumina 社)。

著者紹介 <sup>1\*</sup> 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 (特命准教授) E-mail: sikengo@people.kobe-u.ac.jp  
<sup>2</sup> 神戸大学大学院医学研究科 (助教) E-mail: nhoshi@med.kobe-u.ac.jp

腸がん、肥満、高血圧、糖尿病などに腸内最菌叢の構成異常が影響していることが知られてきた<sup>6)</sup>。このような腸内菌叢の構成異常はdysbiosisと呼ばれている。これを裏付ける基礎研究の代表として、食欲を抑制するレプチン遺伝子に変異がある肥満マウスの糞便を、野生型(普通の体型)の無菌マウスに移植すると、そのマウスが肥満化した報告が有名である<sup>7)</sup>。

それでは、疾患患者の糞便サンプルに基づいて腸内細菌叢についてメタ16S解析を行うことにより、どのようなことが分かってくるだろうか?以下に健常人と潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢を比較解析した結果を紹介する。潰瘍性大腸炎は炎症性腸疾患に含まれ、大腸に炎症状態が引き起こされる病気である(炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎とクローン病を含む。クローン病では大腸を含んだ全消化管に炎症が起こる)。安倍晋三総理も潰瘍性大腸炎を患っており、1回目の総理を辞めた理由として知られている。炎症性腸疾患患者は欧米のような先進国で非常に多い病気であるが、日本でもこの数十年に罹患者数は急増している。筆者らが解析した結果では、健常人の腸内細菌叢は99%以上がFirmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria門に属する菌で占められていた(図2)。一方、潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢においてはProteobacteria門が顕著に増加しており、Proteobacteria門の中でもEnterobacteriaceae科(大腸菌*Escherichia coli*を含む)が増加していた。過去の知見においても大腸菌が潰瘍性大腸炎患者において顕著に増加していることが報告されており、特に粘膜に接着してくる大腸菌が増加することが知られている<sup>8)</sup>。

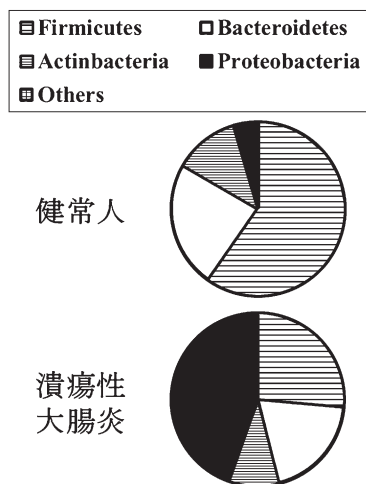


図2. 健常人と潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢構造。糞便サンプルより細菌の16S rRNA 遺伝子解析を行い、門Phylumレベルでの違いを示している。潰瘍性大腸炎患者においてdysbiosisが起こっている。

先述の通り、腸内細菌は食餌成分を分解して宿主に必要となるビタミン類・短鎖脂肪酸などの栄養素を供給している。そのため、dysbiosisにより腸内菌叢と宿主との共生関係が崩れ、腸管内の恒常性が破綻し炎症状態が惹起されたと推測でき、非常に興味深い。

### 腸内細菌叢のタイプ

ヒト腸内細菌叢は主に4門(Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria)で占められており、これは成人間で変わらない。しかし、属レベルで見ると三つのタイプに分類されることが報告されている<sup>9)</sup>。すなわち、*Bacteroides*属に富んでいるエンテロタイプ1、*Prevotella*属に富んでいるエンテロタイプ2、*Ruminococcus*属に富んでいるエンテロタイプ3、に分類できる。実際に筆者らが健常人8人の腸内細菌叢を調べた結果(図3)、5人は*Bacteroidetes*属が優先するエンテロタイプ1に、3人は*Prevotella*属が優先するエンテロタイプ2に分類された。このようにヒト腸内細菌叢に多様性が認められるのは、食習慣が影響していると考えられている。エンテロタイプ1、すなわち*Bacteroides*属はタンパク質や動物脂肪が豊富な食事を長期間にわたって食べると優先し、エンテロタイプ2、すなわち*Prevotella*属は炭水化物が豊富な食事を摂ると優先すると考えられている<sup>10)</sup>。しかし、食習慣と腸内細菌叢の関連については不明な点も多く、今後の解明が待たれる(さて、ということは、前者の5人はタンパク質や動物脂肪を好み、後者の3人は炭水化物を好むと考えられる。なお、後者の3人の中に筆頭著者が含まれるが、たしかに炭水化物を好んで食べている…)

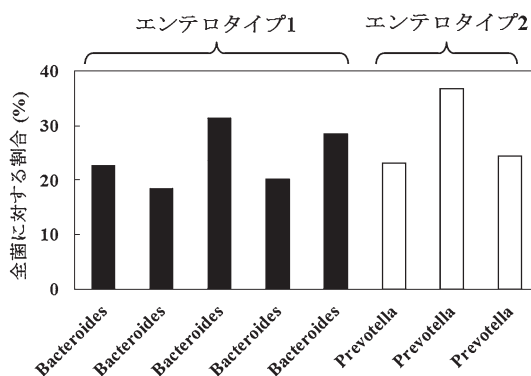


図3. 健常人8人の腸内細菌叢について、もっとも優先した属の全菌に対する割合(%)を示している。左の5人は*Bacteroides*属が、右の3人は*Prevotella*属が優先していた。

機能性食品

食品の中でも「体調調節機能」を有している機能性食品があることが明らかとなってきた。「体調調節機能」としては、アレルギー低減や免疫賦活などの生体防御、疾病予防、神経系調節や消化機能調節などの体調調節、老化抑制などがあげられる。機能性食品はその作用機構により、プロバイオティクス (probiotics)・プレバイオティクス (prebiotics)・バイोजェニックス (biogenics) に分けられる。プロバイオティクスは「腸内微生物のバランスを改善することによって宿主動物に有益に働く生菌添加物」<sup>11)</sup>、プレバイオティクスは「結腸内の有用菌だけの増殖を促し宿主に有利に作用する難消化性食品成分」と定義されている<sup>12)</sup> (プロバイオティクスとプレバイオティクスの両方を含めてシンバイオティクス (synbiotics) と呼ぶ)。バイोजェニックスは、生理活性ペプチドなどで生体に直接作用する<sup>13)</sup>。一方、国の定めるルールに基づき機能性を食品に表示する制度が2015年より消費者庁により始められ<sup>14)</sup>、成人病を予防するために腸内細菌の中でもビフィズス菌のような有用菌を増やすなどの効果を有する機能性食品が登場してきている。

筆者らの研究室でも機能性食品成分を評価するために *in vitro* 腸内細菌叢モデル (後述) を製作して、既報のプレバイオティクス (0.5% w/v) を試験してきた。その結果、24時間の培養後にビフィズス菌が特異的に増加したことを観察している (図4)<sup>3)</sup>。なお、本結果は培養液よりDNA抽出後にビフィズス菌に特異的なプライマーを使用して定量PCRを行って得られたものである。

プレバイオティクスは、難消化性オリゴ糖および多糖、ある種のペプチドおよびタンパク質、脂質が含まれる。これらの成分は唾液、胃液、唾液などや他の腸内細菌に

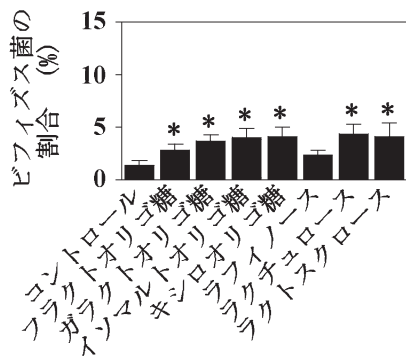


図4. プレバイオティクス (0.5% w/v) を *in vitro* 腸内細菌モデルに添加して糞便を植菌した24時間後のビフィズス菌の全菌に対する割合 (%)

は消化されずに結腸まで達し、プレバイオティクスを分解する酵素活性を有する腸内常在有用菌の基質として利用される。一方、resistant starch, ヘミセルロース, ペクチンなどは選択的に腸内有用菌の増殖を促進する性質はないためプレバイオティクスに含められないが、摂取した結果、宿主の健康改善に役立つことが知られている。

*In vitro* 腸内細菌叢モデル

最後に筆者らの研究室で進めている *in vitro* 腸内細菌叢モデルについて紹介したい。一般的に、食品成分の機能性評価は動物給餌試験やヒト介入試験にて行われるが、前者は腸内細菌叢や消化物の腸内滞留時間がヒトと異なること、後者は倫理的ハードルが高くコストが掛かる、といった問題も存在する。培養槽を使用した *in vitro* 腸内細菌叢モデルは、腸内細菌叢の代謝状態・細菌の動態や相互関係・食品成分などの外部環境要因の影響を評価するのに役立つ。ベルギーのGent大学ではSHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem) を用いて、ヒト消化管すなわち胃、小腸、大腸を擬似したシステムを利用して評価を行っている<sup>15)</sup>。筆者らのKUHIM (Kobe University Human Intestinal Model) は実際のヒト大腸内の菌種や菌の多様性をより高度に維持した条件にて、腸内細菌叢の構成や代謝状態の評価を行っている (図5)。このような *in vitro* モデルが動物給餌試験やヒト介入試験のプレ評価系として機能することで予測が立てやすくなり全体の評価が進み機能性食品の開発に寄与することを期待している。

おわりに

近年における次世代シーケンサーの登場により、健康人や疾患患者の腸内細菌叢についての知見は増加している。しかし同時に、潰瘍性大腸炎など患者数が増加の一途をたどっている原因不明の腸疾患も複数ある。このよ



図5. KUHIM (Kobe University Human Intestinal Model)

うな疾患に対しては薬剤などを使用した治療が施されるが、再発は日常茶飯事であり難治性とされている。最近では、健康な他人の腸内細菌叢を丸ごと注入する糞便移植治療が注目を集めてきており、クロストリディウム・デフィシル腸炎（原因菌がわかっている疾患）には有効とされているが<sup>16)</sup>、それ以外の疾患に対しての明らかな有効性は不明である。潰瘍性大腸炎の原因として遺伝的要因、環境因子が影響しているとされている。やはり、食生活の欧米化に伴い潰瘍性大腸炎の患者数が増加していることを考えれば、食事の変化による腸内細菌叢の変化が発症に大きく関与していると考えられる。筆頭著者自身もアレルギーに苦しむ日々を過ごしているが、食生活を日本食中心にして（食品添加物も極力、取らない）気を付ければ一時的に改善した経験を持つ（飲み会があるたびに悪化するが…）。先述の通り、わが国でも難治性腸疾患患者の数は増加しており、なかなか治療の効果が見られないケースも多く、心が苦しい限りである。食事療法が確立され、国民の健康寿命が延びれば、筆者らにとっても望外の喜びである。

## 文 献

- 1) O'Hara, A. M. *et al.*: *EMBO Rep.*, **7**, 688 (2006).
- 2) Qin, J. *et al.*: *Nature*, **464**, 59 (2010).
- 3) Takagi, R. *et al.*: *PLoS ONE*, **11**, e0160533 (2016).
- 4) Illumina 社 : [http://jp.support.illumina.com/downloads/16s\\_metagenomic\\_sequencing\\_library\\_preparation.html](http://jp.support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html) (2017/04/07)
- 5) Caporaso, J. G. *et al.*: *Nat. Methods*, **7**, 335 (2004).
- 6) Nagpal, R. *et al.*: *Front Med. (Lausanne)*, **1**, 15 (2014).
- 7) Turnbaugh, P. J. *et al.*: *Nature*, **444**, 1027 (2006).
- 8) Gjaffer, M. H. *et al.*: *Gut*, **33**, 646 (1992).
- 9) Arumugam, M. *et al.*: *Nature*, **473**, 174 (2011).
- 10) Wu, G. D. *et al.*: *Science*, **334**, 105 (2011).
- 11) Fuller, R.: *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365 (1989).
- 12) Gibson, G. R. *et al.*: *J. Nutr.*, **125**, 1401 (1995).
- 13) 光岡知足ら：腸内フローラとプロバイオティクス, p. 2, 学会出版センター (1998).
- 14) 消費者庁 : <http://www.caa.go.jp/foods/index23.html> (2017/4/07)
- 15) Van den Abbeele, P. *et al.*: *ISME J.*, **7**, 949 (2013).
- 16) Rossen, N. G. *et al.*: *World J. Gastroenterol.*, **21**, 5359 (2015).