

腸内細菌モニタリングのための 16SrDNA 標的プローブの開発に関する研究

学位論文内容の要旨

ヒトの腸内菌叢形成には多くの要因が影響している。“プレバイオティクス”は、“結腸内に住みついている有用菌だけの増殖を促進、あるいは、その活性を高めることによって宿主の健康に有利に作用する難消化性食品成分”として定義される。プレバイオティクスとして将来有望なダイフラクトース・アンハイドライド(DFA)は難消化性で難吸収性のオリゴ糖である。このようなオリゴ糖がヒトの腸内細菌の数や種類に与える影響を研究するために、迅速で正確、なおかつ扱いやすい検出方法が必要となり、16S rDNA 遺伝子を標的とした蛍光プローブを用いたハイブリダイゼーションの技術を腸内細菌のモニタリングに応用した。

1. ドットプロット・コロニーハイブリダイゼーションによる 16S rDNA 遺伝子標的プローブの開発

16S rDNA を標的とするオリゴヌクレオチドプローブを利用して、DFA の投与によって変化することがわかっている *Bifidobacterium* 5 種、*Bacteroides* 5 種、*Lactobacillus* 4 種について、特異的検出法を開発した。既知の 11 プローブに加えて、新たに作成した 7 プローブの特異性を蛍光ドットプロット・ハイブリダイゼーションによって調べた。条件を最適化した後、*Bacteroides fragilis* グループの検出にプローブ Bfr408 と Bfr595、*Bifidobacterium breve* に PBR2、*Bacteroides thetaiotaomicron* に Bthe、*Lactobacillus acidophilus* に Lacid1020、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. に Ldel860、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* には Llac75 をそれぞれ作成し、検出試験を行った。

その結果、プローブ Bfr408 はグループレベルで、またプローブ PBR2、Bthe、Lacid1020、Ldel860 および、Llac75 は、種あるいは亜種レベルの検出において高い特異性を示した。*B. breve* に対するプローブ PBR2 はすでに報告されているが、GC 含量が高く、類縁株とミスマッチの可能性が高い。またプローブ Bthe と Lacid1020 は、*B. thetaiotaomicron* と *L. acidophilus* の検出に用いられた PCR プライマーより効率がよかった。糞便中の典型的な株ではないが、ヒトの便中に見出された報告がある *L. delbrueckii* subsp. *lactis* のために作成したプローブ

Llac75 は、本研究での新設計である。*B. fragilis* グループ特異的なプローブは既知のものを使用し、他のグループに特異的プローブ Bfr408 と Bfr595 を新たに作成した。プローブ Bfr408 は、*B. distasonis* に反応せず、明瞭に区別できた。GC 含量が 3% 異なる類縁株を区別できたことになる。一方、プローブ Bfr595 は標的菌株に対して弱いシグナルしか示さなかった。

Bifidobacterium、*Bacteroides*、*Lactobacillus* の代表株のコロニーハイブリダイゼーションは容易であった。この方法で特異性が高いプローブを全て調べたところ、大部分のプローブでポジティブコントロールとほぼ同数のシグナルを検出できた。近接する 2 つのシグナルの重複を識別しやすくするため、プレート 1 枚あたりのコロニーの数を 30~40 個以下に抑えた。この方法では、属あるいは種レベルでの細菌の検出に対して正確で、かつ、必要な道具も少なく簡便である一方で、嫌気性選択培地を使うことの繁雑さがあり、時間もかかる。

2. 腸内細菌モニタリングへの蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) の応用

FISH は、微生物をモニタリングするのに有効で迅速な技術である。菌体中の rRNA は、蛍光ラベルした rDNA プローブで特異的に検出できる。FISH で使われるプローブは一般的に 15~30b で、カルボシアニン色素 (Cy3 や Cy5) のような蛍光色素が 1 分子、5'-末端側に共有結合している。今回新しく Cy3 をラベルしたプローブと既知プローブで調べた。各プローブの FISH 条件 (melting curve) を様々なホルムアミド濃度 (10~60%) を用いて設定した。プローブを付着しやすくするヘルパーは *E. coli* の 16S rDNA の標的配列の上流と下流の情報に基づいて作成した。

IPLab と Adobe Photoshop 5.5™ を使って測定したハイブリダイゼーションの最適条件は、理論値やドットプロットの結果とよく一致した。著者が作ったプローブ PBR2、Bthe、Lacid1020 は、いずれの試験結果からも特異性の高いプローブであることがわかった。プローブ Bfr408、Bfr595 と Llac75 については、さらなる改良が必要なものもある。*Bacteroides* spp. 用プローブや Bfr408、Bfr595 は、ヘルパーを加えてもハイブリダイゼーションの特異性は向上せず、これはヘルパーが標的領域を開くことができないか、*E. coli* の 16S rDNA の 2 次構造情報が *Bacteroides* グループの場合は適用されないことによると考えられた。

飼料組成の相違によるラット盲腸内細菌叢をモニタリングしたところ、我々のシステムは *Bifidobacteria* と *Lactobacilli* を明確に検出できることがわかった。ラット盲腸内容物の大部分を占める細菌群であると予想される *B. fragilis* グループの検出の最適条件はまだ検討中である。プローブ Bfr408+595 の特異性は低く、ラット盲腸内容物中に対し非特異的発色を起こした。このため、*Bacteroides* グループの検出に対して、プローブ Bthe と Bvul といった種特異的プローブの両方もしくはどちらか一方を使うか、あるいは新しいプローブをさがすことが必要と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 助 教 授 浅 野 行 蔵

学 位 論 文 題 名

腸内細菌モニタリングのための 16SrDNA 標的プローブの開発に関する研究

本論文は4章からなり、図23、表16、引用文献77を含む総項数111の英文論文である。別に参考論文2編が付されている。

プロバイオティクスやプレバイオティクスが腸内細菌叢に与える影響を研究するため、迅速、正確、かつ扱いやすい検出方法が必要である。そこで16S rDNA遺伝子を標的としたドットプロット・コロニーハイブリダイゼーション及び蛍光プローブを用いたハイブリダイゼーションの技術による腸内細菌のモニタリング方法の開発を試みた。

1.ドットプロット・コロニーハイブリダイゼーションによる16SrDNA遺伝子標的プローブの開発

16S rDNAを標的とするプローブを利用して、DFAの投与によって変化することがわかっている *Bifidobacterium* 5種、*Bacteroides* 5種、*Lactobacillus* 4種について、特異的検出法を開発した。また既知の11プローブに加えて、新たに作成した7プローブの特異性を蛍光ドットプロット・ハイブリダイゼーションによって調べた結果、プローブ Bfr408 はグループレベルで、またプローブ PBR2、Bthe、Lacid1020、Ldel1860 及び Llac75 は、種あるいは亜種レベルの検出において高い特異性を示した。*B. breve* に対するプローブ PBR2 は GC 含量が高く、類縁株とミスマッチの可能性が高い。またプローブ Bthe と Lacid1020 は、*B. thetaiotaomicron* と *L. acidophilus* の検出に用いられた PCR プライマーより効率が良かった。*L. delbrueckii* subsp. *lactis* のために作成したプローブ Llac75 は、本研究での新設計である。*B. fragilis* グループ特異的なプローブは既知のものを使用し、他のグループに特異的プローブ Bfr408 と Bfr595 を新たに作成した。プローブ Bfr408 は、*B. distasonis* に反応せず、明瞭に区別できた。GC 含量が 3% 異なる類縁株を区別できたことになるが、プローブ Bfr595 は標的菌株に対して弱いシグナルしか示さなかった。

Bifidobacterium、*Bacteroides*、*Lactobacillus* の代表株のコロニーハイブリダイゼーションで特異性が高いプローブを全て調べたところ、大部分のプローブでポジ

タイプコントロールとほぼ同数のシグナルが検出された。この方法では、属あるいは種レベルでの細菌の検出に対して正確で、かつ、必要な道具も少なく簡便である一方で、嫌気性選択培地を使うことの繁雑さがあり、時間もかかる。

2. 腸内細菌モニタリングへの蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)の応用

FISH は、微生物をモニタリングするのに有効で迅速な技術で、菌体中の rRNA を蛍光ラベルした rDNA プローブで特異的に検出できる。FISH のプローブは一般的に 15~30b で、カルボシアニン色素 (Cy3 や Cy5) のような蛍光色素が 1 分子、5'-末端側に共有結合している。今回新しく Cy3 をラベルしたプローブと既知プローブで調べた。プローブを付着しやすくするヘルパーは *E. coli* の 16S rDNA の標的配列の上流と下流の情報に基づいて作成した。

IPLab と Adobe Photoshop 5.5™ を使って測定したハイブリダイゼーションの最適条件は、理論値やドットプロットの結果とよく一致した。著者が作ったプローブ PBR2、Bthe、Lacid1020 は、特異性の高いプローブであることがわかった。プローブ Bfr408、Bfr595 と Llac75 については、さらなる改良が必要なものもある。*Bacteroides* spp.用プローブや Bfr408、Bfr595 は、ヘルパーを加えてもハイブリダイゼーションの特異性は向上せず、*Bacteroides* グループの場合は適用されないことによると考えられた。

飼料組成の相違によるラット盲腸内細菌叢をモニタリングしたところ、我々のシステムは *Bifidobacteria* と *Lactobacilli* を明確に検出できることがわかった。ラット盲腸内容物の大部分を占める細菌群であると予想される *B. fragilis* グループの検出の最適条件は検討中である。プローブ Bfr408+595 の特異性は低く、ラット盲腸内容物中に対し非特異的発色を起こした。このため、*Bacteroides* グループの検出に対して、プローブ Bthe と Bvul といった種特異的プローブの両方もしくはどちらか一方を使うか、あるいは新しいプローブをさがすことが必要と考えられる。

以上のように本研究は腸内菌叢の実用的なモニタリング法を開発研究に関するもので、実用的にも基礎的にも重要な貢献を成すものである。

よって審査員一同は、北大農学博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。