

腸内細菌間の相互作用に関する研究

吉田 晴音（筑波大学生物学類）

指導教員：小林 達彦（筑波大学生命環境系）

【背景・目的】

腸内細菌は宿主である我々への様々な影響が示唆されており、栄養管理や生活習慣病の予防・治療、免疫機能や精神疾患との関連性、さらには身体能力の向上といった観点から今日研究が盛んに行われている。その一端として現在健康増進を目的とした食品やサプリメントとして、いわゆる「善玉菌」と呼ばれる乳酸菌や *Bifidobacterium* 属細菌が利用されている。

昨今のメタゲノム解析技術により腸内細菌が構成するフローラ（腸内細菌叢）を解析することができるようになったが、腸内細菌叢を構成する細菌間の相互作用については未だ解明されていない部分が多い。そこで本研究では複数の腸内細菌を共培養した際の発現量変化について解析が行われた。この研究により B 菌との共培養によって、C1 菌と C2 菌において生育阻害が確認され、いくつかの遺伝子において発現量増減がみられた。本研究ではこの発現量変化を誘発する因子の特定を目的として、異なる環境での培養による生育・培養後の様子や発現量について評価した。

【材料・方法】

培養・観察

嫌気性細菌用培地（GAM 培地）のほか、2 種の菌株に対しての生育阻害を示した B 菌の培養上清（以下 Bsup）を 50 %置換した GAM 培地と、Bsup 50 %置換培地と同様の pH となるよう調製した酸性 GAM 培地を用いて C1 菌と C2 菌を培養し、生育への影響や培養後の様子について観察を行った。培養後は生育阻害の程度を定量的に確認するために OD660 測定を行い、培養上清の pH 測定や目視での生育状態の確認も行った。

Total RNA 抽出と解析

前任者による実験で B 菌と共培養した際の C1 菌・C2 菌の RNA から、発現量解析が行われていた。そこで前項の培養菌体から total RNA を抽出し、RNA-seq 解析による単独培養・共培養・Bsup 添加培養・酸性環境培養時の発現量比較を行った。RNA-seq のデータは Geneious prime という解析ソフトを用いて比較した。Geneious prime での発現量比較では鋳型となる DNA が必要となるが、C2 菌については同一菌株のゲノム情報がデータベース上にみられなかったため、単独培養した菌体から DNA を抽出・シーケリングし、鋳型としてマッピングに用いた。

RT-qPCR を用いた発現量解析

生育阻害因子を同定する際の指標として、前項の実験を受け、C1 菌・C2 菌それぞれにおける Bsup 添加培養時に特異的な発現量変化を示す遺伝子を複数選んだ。それらの遺伝子発現量変化を確認するための RT-qPCR に用いるプライマーを設計した。また発現量変化がみられた遺伝子の他、各培地条件で顕著な変化がみられない遺伝子をリファレンス遺伝子として選出した。

【結果・考察】

培養・観察

Bsup 添加培養と酸性環境培養では、GAM 培地で培養した際と比較して OD660 の測定値が低くなっており、生育阻害が起こっていることが確認された。さらに Bsup 添加培養と酸性環境培養を比較すると、Bsup 添加培養時の測定値は酸性環境培養時よりも低かった。

培地の pH は培養前後で全体的に 0.3~0.5 ほど低下しており、培地の違いに依存する pH 変化はみられなかった。

目視での生育状態の確認では培地の違いによる気体産生への影響がみられ、C1 菌では Bsup 添加培養時、C2 菌では Bsup 添加培養時と酸性環境培養時で気体産生量が低下している様子が確認された。

Total RNA 抽出と解析

B 菌と共培養を行った際と Bsup 添加培養時、酸性環境培養時には、C1 菌・C2 菌両菌株ともに異なる遺伝子発現がみられることがわかった。Bsup 添加培養時と酸性環境培養時の比較でも発現量が異なっていたことから、pH 低下以外に Bsup には C 菌への生育阻害作用を示す何らかの因子が含まれていると考えられる。

RT-qPCR を用いた発現量解析

Bsup 添加培養時に顕著に増減する遺伝子各 7 個、リファレンス遺伝子として各 2 個を選定した。現在それぞれの遺伝子について RT-qPCR 用のプライマーを作製中である。

今後は Bsup に加熱処理を施したものやブタノール抽出を行ったもの、さらに共培養時の培養上清を用いて C 菌の培養を行い、Bsup に含まれる C 菌への生育阻害や発現量変化に影響する因子を同定するとともに、その因子の標的遺伝子の特定を試みる。