

ヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A が 通常飼育マウス腸内に定着可能な飼育試験系の確立と RNA-Seq 法による腸内遺伝子発現プロファイル解明への応用

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 胃腸内圏微生物学 嶋田 みな

1. 背景と目的

ビフィズス菌はヒト腸内などに生息し、宿主に様々な健康増進効果を与えることが知られている。しかし、ビフィズス菌の腸内における生存や、宿主との相互作用に関する分子機構は未だ不明な点が多い。そこで我々は、腸内特異的に働くビフィズス菌遺伝子を明らかにすることを目的としている。そのためには、他の腸内細菌との相互作用が観察可能な通常飼育マウスを用いることが望ましいが、ヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A (以下 105-A 株) は通常飼育マウス腸内へ十分量定着せず、遺伝子解析が困難であるという問題点があった。そこで本研究では、105-A 株の資化性が高い糖質をマウスの飼料に添加することで、105-A 株がマウス腸内に定着可能であり、かつマウスの腸内環境が大きく変化しない飼育試験系を確立し、RNA-Seq 解析により 105-A 株の腸内での遺伝子発現プロファイルを解明することを目的とした。

2. 方法

これまでに、105-A 株は 1-kestose (Kes), ラフィノース (Raf), およびラクトースの資化性が高いことが報告されている。1) 5 週齢の BALB/c 雌性マウスを 2 週間予備飼育した後、通常食 (AIN-93G 準拠食) 群および上記の 3 糖のいずれかを 3%または 6%添加した飼料を与える群の計 7 群に分け、2 週間飼育した。1, 2, 3 日目において、 1×10^9 cfu 相当のクロラムフェニコール耐性 105-A 株を 1 日 1 回経口投与した。24 時間ごとに糞便を回収し、クロラムフェニコール含有 1/2MRS 寒天培地へ塗抹後、生育したコロニー数から糞便中の 105-A 株の生菌数を算出した。2) 105-A 株の腸内定着率が向上した Kes または Raf 6%添加食群について、本飼育 14 日目に糞便を採取し、HPLC を用いた有機酸分析に供した。また、盲腸内容物を用いて Illumina MiSeq による 16S rRNA 遺伝子を標的とした菌叢解析を行った。有機酸分析および腸内菌叢解析の結果から、通常食群と比較してマウスの腸内環境が大きく変化していない糖質を選抜した。3) より腸内環境の変化が少なかった Kes 6%添加食群の本飼育 5 日目に採取した盲腸内容物、および 105-A 株の培養菌体から全 RNA を抽出し、riboPOOL により rRNA を除去後、Illumina MiSeq による RNA-Seq 解析を行った。

3. 結果と考察

1) Kes または Raf を 6%飼料に添加することで、105-A 株の腸内の生菌数は目標値とした 10^6 cfu/g 糞便を上回る $10^8 \sim 10^{11}$ cfu/g 糞便で 2 週間維持された。2) Raf 6%添加食群では、糞便中の短鎖脂肪酸の有意な増加が観察された。また、メタ 16S 菌叢解析の結果、Raf 6%添加食群の一部の個体においてマウス内在性ビフィズス菌 *Bifidobacterium pseudolongum* の顕著な増加が見られた。以上の結果から、Raf 6%添加食はマウスの腸内環境を大きく変化させることが示唆されたため、本飼育試験系には Kes 6%添加食が適していることが明らかとなった。3) RNA-Seq 解析の結果から、105-A 株の rRNA 以外のゲノム領域にマッピングされたリードの割合は培養菌体由来 RNA では 90%程度であり、riboPOOL により rRNA が除去可能であることが確認された。一方で、盲腸内容物中に占める 105-A 株の相対存在比率は 4~12%であったにもかかわらず、盲腸内容物由来 RNA を用いたマッピングの結果は 0.1%程度であり、サンプルの調製方法などの再検討が必要であることが示唆された。