

豆類の摂取による腸内放線菌の役割

～糞便微生物移植治療により見出せた難治性疾患の予防への応用～

北里大学 医学部 微生物学

阪口 義彦

私たちの食生活と健康は密接に関係しており、腸内の細菌を構成する集団（細菌叢）が重要な働きを担っている。そのため、細菌叢の乱れと様々な疾患との関連するデータが多く報告されている（1）。最近、我々は、細菌叢の乱れによる *Clostridioides difficile* 感染症（CDI）について報告した（2）。CDIは、高齢者に多い難治性の下痢症・腸炎で、*C. difficile* が原因で発症する。その治療法として、申請者らは糞便微生物移植（FMT）を行い CDI 治癒に成功したが、糞便中の何が効果を示しているのか明らかでなかった。大変興味深いことに、我々は、CDI 症例の治癒に伴って多種多様な放線菌が検出されることを見出した（2）。放線菌は、通常好気的な環境（土壌、農作物）に生息しており（3,4）、ヒト腸内に常在することは驚くべき発見である。また、放線菌は、様々な農作物由来の物質を代謝することで、多種多様な生理活性物質を生産することが知られている（5,6,7）。これらの一連の事象から、申請者は、豆類由来の物質を介して腸内細菌叢の再構築に放線菌が重要な役割を担っていると推察し、豆類による放線菌を利用した CDI 予防への応用に着目した。本研究課題では、健常人の糞便において、どのような放線菌が腸内に生息しているかを調べた。また、豆類による腸由来放線菌の病原細菌（*C. difficile* など）に対する活性評価を行った。

実験方法

本研究課題は、北里大学医学部倫理委員会および北里大学バイオセイフティ委員会の承認を得て行った。

1. ヒト糞便検体の細菌叢解析

種々のヒト糞便検体を DNA 精製キットにより、細菌 DNA を精製した。精製した DNA について、次世代シーケンサー（Illumina）を用いて、DNA の塩基配列を網羅的かつ定量的に調べ、放線菌の種類を解析した。また、異なる食生活による腸内における放線菌の構成を調べた。

2. 放線菌の分離・同定

1 で得られた細菌叢データに基づいて、健常人の糞便検体から放線菌の分離を行った。ヒト糞便検体を選択抗生物質（ナリジクス酸、ベンレート）含有放線菌用分離寒天培地に混釈して 1~4 週間培養後、生育したコロニーを同組成寒天培地へ釣菌した。生育した放線菌は、Yeast extract-starch（YS）培地に継代・純化し放線菌分離株とした。分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し、basic local alignment search tool（BLAST）を用いてデータベースと比較し、分離株との相同性を算出した。推定された菌種と分離株の塩基配列について近隣結合法（neighbor joining method）による分子系統解析を行い、菌種を同定した。

3. 放線菌代謝産物の生物活性評価

2 で分離した放線菌をきな粉デンプン培地（きな粉、可溶性デンプン、グルコース、炭酸カルシウム）、放線菌用一般生産培地（小麦デンプン、グルコース、ペプトン、カツオエキス、酵母抽出物、炭酸カルシウム）および脱脂小麦胚芽培地（可溶性デンプン、グリセリン、脱脂小麦胚芽、カツオエキス、乾燥酵母、炭酸カルシウム）でそれぞれ 1 週間培養し、エタノールを加え振盪抽出した後、遠心により菌体を除去した。その上清（代謝産物）について、各種菌株に対して生物活性評

価を行った。検定菌として、*Clostridioides difficile* 4 株 (JCM 1296^T, ATCC BAA-1870, ATCC 43598, ATCC 43593)、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) ATCC 25923、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床分離株、枯草菌臨床分離株、緑膿菌 PAO-1 を使用した。放線菌培養液をペーパーディスクに浸漬し、各種菌株を塗布したミュラーヒントン寒天培地に載せて一晚培養した。ディスクの周囲について、対象菌株が生育していない範囲を阻止円とし、その大きさにより活性の有無および強さを判定した。

4. 放線菌分離株の代謝産物解析

3 で生理活性を示した代謝産物については、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS) を用いて分析した。LC には Agilent 1200 series (Agilent Technologies) を、MS には QSTAR Elite ESI quadruple time-of-flight (Q-TOF) MS instrument (AB Sciex) をそれぞれ使用した。LC は、カラム: Inertsil[®] ODS-4 (3.0φ×250 mm, GL Sciences Inc.)、流速: 0.5 mL/min、カラム温度: 40°C および検出: UV333 nm の条件にて行い、移動相は、H₂O/0.1% formic acid (A); MeOH/0.1% formic acid (B); B = 50–100% 0–15 min gradient、100% 5 min を使用した。MS は、*m/z* region: 100–2000 Da、ion spray voltage: 5,500 V、source gas: 50 L/V、focusing potential: 250 V、temperature: 450°C、detector voltage: 2,300 V、cone voltage: 20、35、50 V の条件で行い、calibration control として、reserpine ([M+H]⁺ = 609.28066 および cesium iodide ([M+H]⁺ = 132.90488) を使用した。得られた分析データのうち溶出時間と分子量から化合物を推定した。

5. 放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの解析

分離株 DNA を Puregene[®] Yeast/Bact. Kit (QIAGEN) により精製した。精製した DNA を次世代シーケンサー (MiSeq) により分離株の全ゲノム塩基配列を決定した。本塩基配列上の個々の遺伝子から推定するアミノ酸配列の相同性解析を行い、各遺伝子の機能を推定した。また、web サイト AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) を用いて、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを予想し、その菌株が生産できる化合物を推定した。

実験結果

1. ヒト糞便のメタゲノム解析

異なる年齢および食生活 (肉食系、草食系) の健常人 50 名の糞便 DNA を精製した。本 DNA を次世代シーケンサーにより、DNA の塩基配列を網羅的かつ定量的に調べ、放線菌の構成を調べた。その結果、10 名の糞便から多種多様な放線菌 DNA が検出されたが、肉食系と草食系では放線菌 DNA の検出率において差が認められなかった。

2. ヒト糞便からの放線菌の分離

ヒト糞便の細菌叢解析データに基づいて、肉食系健康人10名の糞便から放線菌の分離を試みた。腸内での環境（嫌氣的）を再現するため、嫌気チャンバー装置を利用して独自の嫌氣的培養法を行ったが（8,9,10）、放線菌を分離することができなかった。そこで、従来の好氣的培養法にて分離することにした（3）。ヒト糞便を抗生物質含有分離寒天培地に混釈して1~4週間培養したところ、4名のヒト糞便検体から20株の放線菌を分離することに成功した（表1）。種々の分離株のDNAを精製し、PCRにより16S rRNA 遺伝子を増幅した。得られたPCR産物の塩基配列を決定し、DNAデータベースとの相同性解析を行うことにより、6属14種に分類された。また、分離株の16S rRNA 遺伝子塩基配列を近隣結合法（neighbor joining method）により分子系統解析を行ったところ、多様性が高く新種と推定される放線菌も含まれていた（図1）。

表 1. ヒト糞便から分離した放線菌

BLAST Top hit Genus	Human No.				Total
	A	B	C	D	
<i>Actinomadura</i>	3(3)	-	-	-	3(3)
<i>Gordonia</i>	2(1)	1(1)	-	-	3(2)
<i>Micromonospora</i>	2(2)	-	-	-	2(2)
<i>Nonomuraea</i>	5(3)	1(1)	-	-	6(3)
<i>Sphaerisporangium</i>	1(1)	-	-	-	1(1)
<i>Streptomyces</i>	2(2)	-	1(1)	-	3(3)
Unknown	1	-	-	1	2
Total	16(12)	2(2)	1(1)	1	20(14)

数値は分離株数、カッコ内は菌種の数を表している。

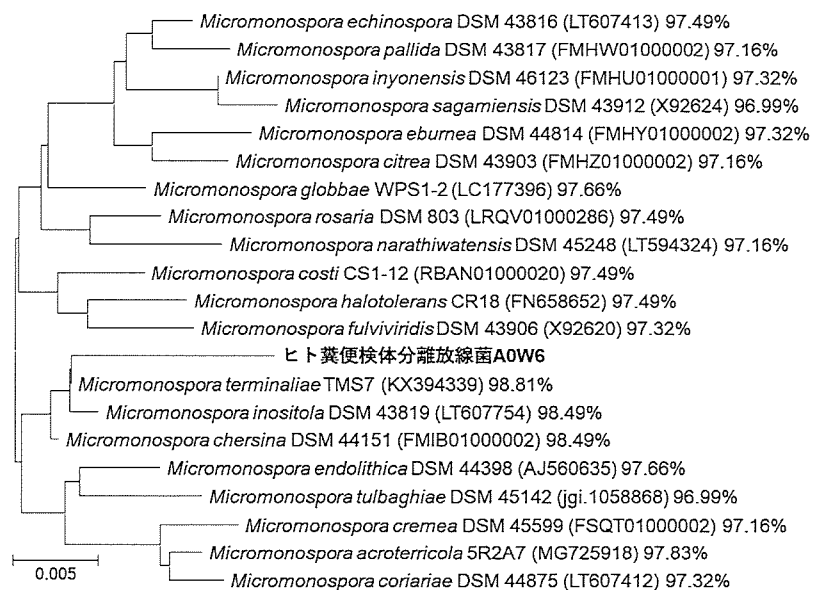


図 1. 分離放線菌の系統樹

3. 分離放線菌の代謝産物の解析

分離株 14 種を個別に種々の生産培地で培養し、各種生理活性試験を行ったところ、3 種が一般生産培地、2 種が脱脂小麦胚芽培地、1 種がきな粉デンプン培地においていずれかの菌種において活性が認められた（表 2）。一般生産培地では、*Nonomuraea bangladeshensis* の培養液でメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）に、*Streptomyces thermocarboxydus* および *Streptomyces thinghirensis* の培養液で *Clostridioides difficile* に対して活性を示した。脱脂小麦胚芽培地では、*N. bangladeshensis* の培養液で MRSA に、*S. thinghirensis* の培養液で *C. difficile* に対して活性が認められた。一方、きな粉デンプン培地では、*N. kuesteri* の培養液で緑膿菌に対して活性を示した。各培養液の液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）を行ったところ、*S. thinghirensis* から deferroxamine 類、*N. bangladeshensis* から kitasetaline 類、*N. kuesteri* から venturicidin 類が検出された。また、*N. kuesteri* および *S. thermocarboxydus* から未同定である多種の

物質が検出された。

表 2. 放線菌培養液の病原細菌に対する生理活性評価

推定種	生産培地	<i>Clostridioides difficile</i>				MSSA	MRSA	<i>B. sub</i>	PAO-1
		001	027	017	No				
<i>Nonomuraea bangladeshensis</i>	一般	-	-	-	-	11	18	-	-
	小麦胚芽	-	-	-	-	-	11	-	-
<i>Nonomuraea kuesteri</i>	きな粉	-	-	-	-	-	-	-	16
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	一般	-	9	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces thinghirensis</i>	一般	24	20	20	20	-	-	11	-
	小麦胚芽	24	25	22	26	-	-	-	-

001: JCM 1296^T (Type strain), 027: ATCC BAA-1870 (Virulent strain), 017: ATCC 43598 (Attenuated strain), No: ATCC 43593 (Nontoxic strain), MSSA: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA: *S. aureus* (clinical isolates), *B. sub*: *Bacillus subtilis* (clinical isolates), PAO-1: *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1.

本表の数値は阻止円の大きさ (mm) を示している。

4. 放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの解析

分離株 *Nonomuraea kuesteri* の全ゲノム塩基配列の決定を行い、Anti-SMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) により二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを解析した。*N. kuesteri* において、24 の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが予想され、生理活性を有するポリケチド合成酵素 (PKS) 5 種類、非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) 3 種類がゲノム上に存在することが示唆された。8 種類の中で化合物の合成に必須な遺伝子が保存されている遺伝子クラスターを図に示した (図 2)。これは、NRPS に分類され、本クラスターは 7 つモジュール (化合物合成の構成単位) から構成される巨大な遺伝子クラスターであり、既知のものとは異なっていた。

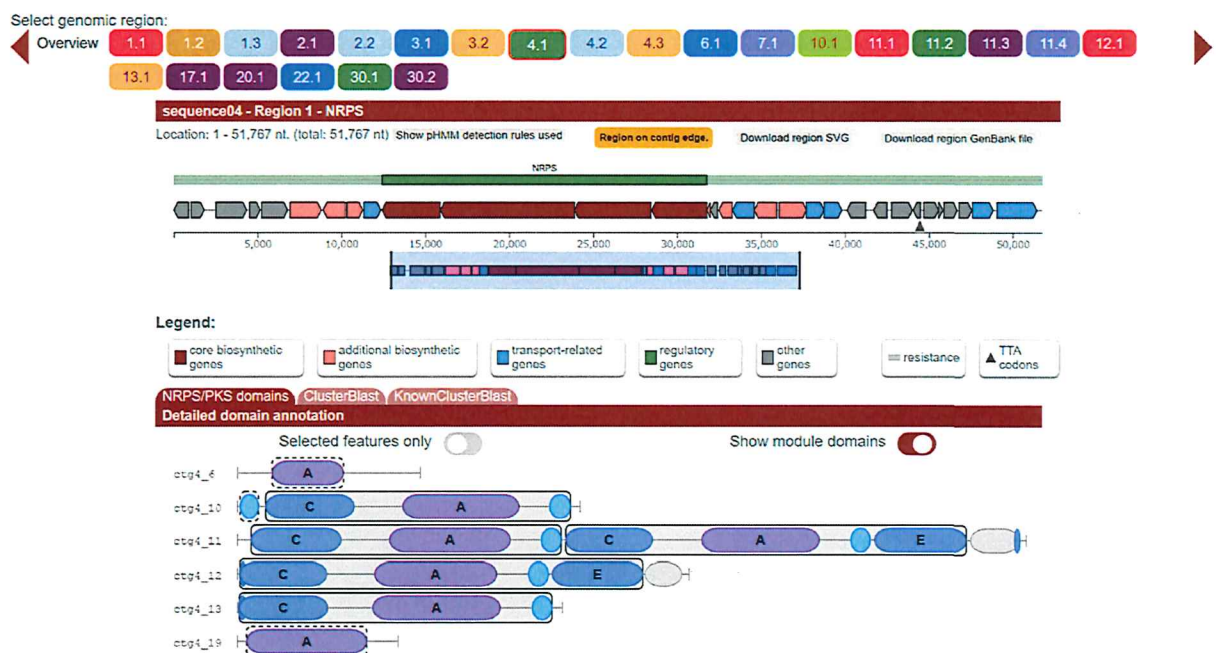


図 2. 分離放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子クラスター

考察

1. ヒト糞便検体の腸内における細菌を構成する集団(細菌叢)の解析を行ったところ、放線菌 DNA の検出率が低かった。これは、糞便中では細菌の中で放線菌が相対的に少ないことが推察される。また、肉食系と草食系において、放線菌の検出率に差が認められなかったことについては、今後、ヒト糞便検体数を増やし有意差を検証する必要がある。
2. 今回、ヒト糞便検体から 20 株の放線菌を分離した。本分離株において 6 属 14 種と多様性がみられた。通常、環境中に生息する放線菌門においては、このような多様性はみられない。従って、放線菌は、ヒトの腸内では自然環境と比べて多様化していると推察される。今後、異なる年齢・食生活のヒト糞便から放線菌を分離することで、より多くの種類の放線菌が得られると考えられる。
3. *Clostridioides difficile* に対する抗菌活性試験において、14 種中 2 種が活性物質生産能を有していた。分離放線菌 *Streptomyces thinghirensis* の生産物質には、鉄イオンを吸収することで活性を示す deferoxamine が含まれていた。本物質は、デンプンとアミノ酸を含む一般生産培地にて生産されていることから、食事により腸内で deferoxamine が合成されると推論できる。
4. 放線菌の培養に大豆の粉末のきな粉を用いることで、分離放線菌 *Nonomuraea kuesteri* から緑膿菌に活性が認められる未知物質が検出された。緑膿菌は、一般的に多種の薬剤耐性を獲得しており、緑膿菌にのみ活性を示す化合物は非常に珍しい。また、本培養液から検出された ventricidin は抗菌活性を示さないが、gentamicin 類の活性増強作用を有する。本増強作用は、緑膿菌およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に認められることから (11)、今回の結果から ventricidin 以外の物質が関与していることが推察される。そこで、分離株の全ゲノム塩基配列を解読し、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを解析した。通常、放線菌は、約 20 の遺伝子クラスターを有しているが、本分離株では 24 の遺伝子クラスターを有していたことから、他の放線菌と比べ多様な物質生産能を有していると推察される。
5. 24 の遺伝子クラスターの中で、7つのモジュールから構成される非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) を有することから、未知のペプチド化合物を生産する能力を有していると推察された。今後、本物質を単離・構造解析し、各種生理活性評価を行うことで、病原細菌感染症の治療および予防への貢献が期待される。

要約

私たちの食生活と健康・疾患には、腸内の細菌を構成する集団(細菌叢)が深く関与している。特に豆類は腸内環境の改善に重要である。最近、腸内細菌叢の乱れと疾患 (*Clostridioides difficile* 感染症: CDI) の関連を示す論文が多く報告されている。CDI は、*C. difficile* により引き起こされる再発率の高い難治性の下痢症・腸炎である。我々は、その治療として糞便微生物移植 (FMT) を行い寛解に成功し、その寛解因子が放線菌である可能性を見出した。そこで、本研究課題では、健常人の腸内における放線菌の検出頻度および豆類による放線菌の生理活性を調べた。健常人 50 名の糞便のメタゲノム解析を行ったところ、10 名から放線菌 DNA が検出された。そこで、まずは肉食系健常人 4 名の糞便から放線菌の分離を試みたところ、合計 20 株の放線菌を得ることができた。これらの分離株は、6 属 14 種に分類され、多様性に富んでおり新種の放線菌も含まれていた。さら

に、豆類を含む培地にて1種の放線菌が緑膿菌に対して生理活性を示したことから、食事（豆類など）により体内で代謝された物質を腸内の放線菌が利用し、生理活性物質を生産すると思われる。今後、活性物質の詳細な解析を進めることで、各種感染症の治療および予防に貢献できると期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 タカノ農芸科学研究助成財団に厚くお礼申し上げます。また、共同で実験を行って頂きました北里大学医学部微生物学の武 晃 助教、岡山大学学術研究院医歯薬学域病原細菌学分野の後藤和義 助教、藤田医科大学先端光学診療学講座の大宮直木 教授に深く感謝申し上げます。

文献

1. Fan, Y., Pedersen, O., Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.*, 19(1), 55-71, 2021.
2. Gotoh, K., Sakaguchi, Y., Kato, H., Osaki, H., Jodai, Y., Wakuda, M., Také, A., Hayashi, S., Morita, E., Sugie, T., Ito, Y., Ohmiya, N., Fecal microbiota transplantation as therapy for recurrent *Clostridioides difficile* infection is associated with amelioration of delirium and accompanied by changes in fecal microbiota and the metabolome. *Anaerobe*, 73, 102502, 2022.
3. Také, A., Inahashi, Y., Ōmura, S., Takahashi, Y., Matsumoto, A., *Streptomyces boninensis* sp. nov., isolated from soil from a limestone cave in the Ogasawara Islands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 68(5), 1795–1799, 2018.
4. Phạm, H. T. T., Suwannapan, W., Koomsiri, W., Inahashi, Y., Také, A., Matsumoto, A., Thamchaipenet, A., *Fodinicola acaciae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of *Acacia mangium* willd. and its genome analysis. *Microorganisms*, 8(4), 467, 2020.
5. Matsuo, H., Noguchi, Y., Také, A., Nakanishi, J., Shigemura, K., Sunazuka, T., Takahashi, Y., Ōmura, S., Nakashima, T., Nanaomycin I and J: New nanaomycins generated by mycothiol-mediated compounds from "*Streptomyces rosa* subsp. *notoensis*" OS-3966. *J. Biosci. Bioeng.*, 127(5), 549–553, 2019.
6. Suga, T., Kimura, T., Inahashi, Y., Iwatsuki, M., Nonaka, K., Také, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Ōmura, S., Nakashima, T., Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12-0794. *J. Antibiot.*, 71(7), 619–625, 2018.
7. Inahashi, Y., Shiraishi, T., Také, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Ōmura, S., Kuzuyama, T., Nakashima, T., Identification and heterologous expression of the actinoallolide biosynthetic gene cluster. *J. Antibiot.*, 71(8), 749–752, 2018.
8. Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., Ogma, K., The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(48), 17472–17477, 2005.
9. Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Sakaguchi, Y., Andreu, J. M., Tubulin homolog TubZ in a phage-

- encoded partition system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(20), 7711–7716, 2012.
10. Sakaguchi, Y., Uchiyama, J., Také, A., Gotoh, K., Sakaguchi, M., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Hosomi, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S., Hayashi, S., Oguma, K., Analysis of a plasmid encoding botulinum neurotoxin type G gene in *Clostridium argentinense*. *Anaerobe*, 66, 102281, 2020.
 11. Yarlagadda, V., Medina, R., Wright, G. D., Venturicidin A, a membrane-active natural product inhibitor of ATP synthase potentiates aminoglycoside antibiotics. *Sci. Rep.*, 10(1), 8134, 2020.