

Title	百寿者における未知の有用な腸内細菌種の単離とMALDI-TOF MSのデータベース構築
Sub Title	Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with healthy longevity using MALDI-TOF MS analysis
Author	杉田, 香代子(Sugita, Kayoko)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>腸内細菌叢は多種多様な細菌から構成されているが、抗生物質の使用、食生活、ストレス、宿主の遺伝的背景、感染などの要因によってその多様性が低下し、炎症性腸疾患、糖尿病、大腸がん、肥満などさまざまな疾患の発症に関与していることが示唆されている。このように多様な腸内細菌種を腸内に維持することが健康な生活を送る上で重要だと考えられる。また加齢によっても腸内細菌叢が変化することが知られており、老化と腸内細菌との関係も注目されている。これまで、ある菌種が高齢者に多く検出されるという報告もなされているが、その細菌が加齢の結果なのか原因なのかはよくわかっていない。そこで本研究では、長寿に関与する細菌の単離と同一・系統樹解析を高スループットで行うため、MALDI-TOF MS法のヒト腸内細菌叢データベース構築を行った。</p> <p>糞便中の細菌叢の解析の結果、高齢者（平均年齢86.3歳）と比較して百寿者（平均年齢107歳）に有意に多い細菌として<i>Phascolarctobacterium faecium</i>をはじめ42菌種を同定した。このうち7菌種が単離できていなかったため、2年目である今年度も新たに百寿者3名の糞便培養を実施し腸内細菌の単離・同定を追加実施した。その結果、新たに37菌種を単離することに成功した。今回の培養と昨年度までの培養で得られた菌株のうち、長寿に関与すると思われるがMALDI-TOF MS法の既存データベースに登録されていない6菌種 (<i>Akkermansia muciniphila</i>, <i>Phascolarctobacterium faecium</i>, <i>Ruminococcus gnavus</i>, <i>Eisenbergiella</i> sp., <i>Butyricimonas</i> sp., <i>Clostridium symbiosum</i>) を対象として、エタノール・ギ酸抽出法によりタンパク抽出を行った。MALDI-TOF MSで特異的なピークを検出し、菌種同定可能なデータベース登録を実施した。<i>C. symbiosum</i>は他菌種と類似しており識別できなかったが、それ以外の5菌種はデータベース登録ができた。これにより16S rRNA塩基配列解析の前に目的とする菌であるか否かの把握が可能となった。データベース登録に使用した菌株は16SrRNA塩基配列解析では菌種同定が難しいものが多く、今後これらのwhole genomeシーケンス解析を実施予定である。</p> <p>Gut microbiota is composed of many varieties of bacterial species. The bacteria composition is altered by several factors such as antibiotic use, eating habits stress, host genetics, infection. It has been well known that alteration of gut microbiota is associated with the pathogenesis of various diseases such as inflammatory bowel disease, colon cancer, and diabetes. Recently, it has also been suggested that aging affects the relationship between host immunity and gut microbiota and results in the alterations of gut microbiota. However, it remains unclear whether age-related alterations in gut microbiota are cause or consequence of host aging. In this study, we have isolated bacterial strains from the fecal samples of centenarians that are related to healthy longevity and constructed a human gut microbiota database by using MALDI-TOF MS system. MALDI-TOF MS system has been suggested as a fast and cheap method for bacterial identification.</p> <p>Gut microbiome analysis identified 42 species including <i>Phascolarctobacterium faecium</i> as significantly abundant bacteria in the centenarians (average age 107 years old) compared to the elderly (average age 86.3 years old). Because seven species of these could not be isolated last year, we isolated and identified newly 37 species from the fecal culture of new three centenarians in this year. Among the strains obtained from this year and last year culture, the 6-target species (<i>Akkermansia muciniphila</i>, <i>Phascolarctobacterium faecium</i>, <i>Ruminococcus gnavus</i>, <i>Eisenbergiella</i> sp., <i>Butyricimonas</i> sp., <i>Clostridium symbiosum</i>), which have not been registered in the database before but may be involved in longevity, were analyzed using MALDI-TOF MS. Bacterial proteins were extracted by ethanol/formic acid method and some of specific peaks were determined by the MALDI-TOF MS. Although <i>C. symbiosum</i> was not identified due to the close similarity to other species, we could register the rest of five species into the database. Therefore, we can recognize whether target species are present without 16S rRNA gene sequencing. Some strains which have the same 16S rRNA sequence are difficult to identify by 16S rRNA gene sequencing. To identify exact species/strains, we are currently investigating these whole-genome sequencing.</p>
Notes	

Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180032">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180032</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	技術員	補助額	300 (A) 千円
	氏名	杉田 香代子	氏名 (英語)	Kayoko Sugita		
研究課題 (日本語)						
百寿者における未知の有用な腸内細菌種の単離と MALDI-TOF MS のデータベース構築						
研究課題 (英訳)						
Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with healthy longevity using MALDI-TOF MS analysis						
1. 研究成果実績の概要						
<p>腸内細菌叢は多種多様な細菌から構成されているが、抗生物質の使用、食生活、ストレス、宿主の遺伝的背景、感染などの要因によってその多様性が低下し、炎症性腸疾患、糖尿病、大腸がん、肥満などさまざまな疾患の発症に関与していることが示唆されている。このように多様な腸内細菌種を腸内に維持することが健康な生活を送る上で重要だと考えられる。また加齢によっても腸内細菌叢が変化することが知られており、老化と腸内細菌との関係も注目されている。これまで、ある菌種が高齢者に多く検出されるという報告もなされているが、その細菌が加齢の結果なのか原因なのかはよくわかっていない。そこで本研究では、長寿に関与する細菌の単離と同定・系統樹解析を高スループットで行うため、MALDI-TOF MS 法のヒト腸内細菌叢データベース構築を行った。</p> <p>糞便中の細菌叢の解析の結果、高齢者（平均年齢 86.3 歳）と比較して百寿者（平均年齢 107 歳）に有意に多い細菌として <i>Phascolarctobacterium faecium</i> をはじめ 42 菌種を同定した。このうち 7 菌種が単離できていなかったため、2 年目である今年度も新たに百寿者 3 名の糞便培養を実施し腸内細菌の単離・同定を追加実施した。その結果、新たに 37 菌種を単離することに成功した。今回の培養と昨年度までの培養で得られた菌株のうち、長寿に関与すると思われるが MALDI-TOF MS 法の既存データベースに登録されていない 6 菌種 (<i>Akkermansia muciniphila</i>, <i>Phascolarctobacterium faecium</i>, <i>Ruminococcus gnavus</i>, <i>Eisenbergiella</i> sp., <i>Butyricimonas</i> sp., <i>Clostridium symbiosum</i>) を対象として、エタノール・ギ酸抽出法によりタンパク抽出を行った。MALDI-TOF MS で特異的なピークを検出し、菌種同定可能なデータベース登録を実施した。<i>C. symbiosum</i> は他菌種と類似しており識別できなかったが、それ以外の 5 菌種はデータベース登録ができた。これにより 16S rRNA 塩基配列解析の前に目的とする菌であるか否かの把握が可能となった。データベース登録に使用した菌株は 16SrRNA 塩基配列解析では菌種同定が難しいものが多く、今後これらの whole genome シークエンス解析を実施予定である。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Gut microbiota is composed of many varieties of bacterial species. The bacteria composition is altered by several factors such as antibiotic use, eating habits stress, host genetics, infection. It has been well known that alteration of gut microbiota is associated with the pathogenesis of various diseases such as inflammatory bowel disease, colon cancer, and diabetes. Recently, it has also been suggested that aging affects the relationship between host immunity and gut microbiota and results in the alterations of gut microbiota. However, it remains unclear whether age-related alterations in gut microbiota are cause or consequence of host aging. In this study, we have isolated bacterial strains from the fecal samples of centenarians that are related to healthy longevity and constructed a human gut microbiota database by using MALDI-TOF MS system. MALDI-TOF MS system has been suggested as a fast and cheap method for bacterial identification.</p> <p>Gut microbiome analysis identified 42 species including <i>Phascolarctobacterium faecium</i> as significantly abundant bacteria in the centenarians (average age 107 years old) compared to the elderly (average age 86.3 years old). Because seven species of these could not be isolated last year, we isolated and identified newly 37 species from the fecal culture of new three centenarians in this year. Among the strains obtained from this year and last year culture, the 6-target species (<i>Akkermansia muciniphila</i>, <i>Phascolarctobacterium faecium</i>, <i>Ruminococcus gnavus</i>, <i>Eisenbergiella</i> sp., <i>Butyricimonas</i> sp., <i>Clostridium symbiosum</i>), which have not been registered in the database before but may be involved in longevity, were analyzed using MALDI-TOF MS. Bacterial proteins were extracted by ethanol/formic acid method and some of specific peaks were determined by the MALDI-TOF MS. Although <i>C. symbiosum</i> was not identified due to the close similarity to other species, we could register the rest of five species into the database. Therefore, we can recognize whether target species are present without 16S rRNA gene sequencing. Some strains which have the same 16S rRNA sequence are difficult to identify by 16S rRNA gene sequencing. To identify exact species/strains, we are currently investigating these whole-genome sequencing.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			