

UC モデルマウス病態増悪能を示す *Paraclostridium bifermentans* の新規亜種の提案

○久綱 僚¹、林 将大^{2,3}、富田純子¹、森田雄二⁴、田中香お里^{2,3,5}、河村好章¹

¹愛知学院大学大学院薬学研究科微生物学研究室、²岐阜大学科学研究基盤センター嫌気性菌研究分野、³岐阜大学微生物遺伝資源保存センター、⁴明治薬科大学薬学部感染制御学講座、⁵岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科医療情報学分野

【概要】

2018年8月、城西国際大学にて開催された「第30回微生物シンポジウム」に参加し、以下の研究内容を口頭発表した。

【緒言】

ラット糞便から分離された *Paraclostridium* sp. PAGU1678 株は、16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的解析により *Paraclostridium bifermentans* (2016年に *Clostridium* より属名変更) との高い相同性を示した。我々は、生体にとって有益な菌種として知られる同属の *Clostridium butyricum* PAGU 1417^T 株を比較対照とした潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC) モデルマウスへの菌液投与により、マウス病態の軽減に作用した *C. butyricum* PAGU 1417^T 株に対して *P. bifermentans* PAGU 1678 株の顕著なマウス病態悪化能力を見出した [1]。

P. bifermentans PAGU 1678 株の正確な分類学的位置を確認することを目的として、*P. bifermentans* PAGU2008^T 株および類縁菌種 *P. benzoelyticum* PAGU 2068^T 株を用いて分類学的手法による比較を実施した。菌株間の各種生化学性状、ゲノム配列の類似度、菌体由来タンパク質解析の結果、*P. bifermentans* PAGU 1678 株がそれら基準株とは異なり、新規亜種である可能性を示唆した。我々は *P. bifermentans* の新規亜種として *P. bifermentans* subsp. *muricolitidis* subsp. nov. (PAGU 1678^T) を提案する。

【方法】

①マウス病態への影響の確認

5週齢の C57BL/6J マウスを健常対照群、Dextran sulfate sodium (DSS)対照群、DSS+PAGU 1678 処理群、DSS+PAGU 1417 処理群に無作為に分け、常法通りに

UC モデルマウスを作製、1日1回マウスへ滅菌 PBS または各種菌液を経口投与した。1週間毎に Disease Activity Index (DAI)に基づく病態評価、糞便試料の Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)解析による構成菌種の比較、大腸組織 Hematoxylin-Eosin (HE) 染色による Histological score (HIS)の算出、Real-time qPCR 解析による各種炎症関連因子 mRNA 遺伝子転写量の定量、HPLC を用いた腸管内短鎖脂肪酸濃度の解析および ELISA 解析による腸管内 Myeloperoxidase (MPO)活性を測定した。

②*P. bifermentans* PAGU 1678 株の分類学的位置の確認

P. bifermentans PAGU 1678 株、*P. bifermentans* PAGU 2008^T 株および *P. benzoelyticum* PAGU 2068^T 株は Reinforced clostridial liquid medium にて嫌気的培養を行った。以前の報告をもとに、各菌株の表現型および各種生化学性状の比較解析を実施した [2]。さらに Average Nucleotide Identity (ANI)法および DNA-DNA hybridization (DDH)法を用いた菌株間のゲノム配列の比較、菌体由来のタンパク質解析として SDS-PAGE、MALDI-TOF MS を行いクラスター解析を実施した。

【結果・考察】

マウス病態評価の結果、21日目に DSS 対照群に比して DSS+1678 処理群における有意な体重減少、DAI スコアの上昇が観察された。また、DSS+1678 処理群において糞便構成菌種および大腸伸長率は顕著な減少傾向を示し、大腸 HIS に有意な上昇が認められた。さらに、腸管内における炎症関連因子・サイトカイン mRNA 遺伝子発現量の増加と炎症抑制因子 mRNA 遺伝子発現量の減少、腸管内酢酸濃度の低下、および MPO 活性の顕著な上昇がみられた。各種解析結果は

P. bifermentans 2008^Tが UC モデルマウス病態軽減作用を示した一方で、*P. bifermentans* PAGU 1678 株が顕著な病態増悪能を有することを示唆した。

P. bifermentans PAGU 1678 株および類縁菌種間での表現型について、各種解析結果に明確な差はみられなかった。しかし、生化学性状における Valine 利用能、硫化水素産生能および一部の抗菌薬に対する感受性について基準株との違いが示された。また、*P. bifermentans* PAGU 1678 株および *P. bifermentans* 2008^T 株間での ANI 値は 96.17%、DDH の結果は 60.03% を示し、異なるゲノム配列を有することが示された。さらに、SDS-PAGE、MALDI-TOF MS 解析では *P. bifermentans* PAGU 1678 株は基準株とは異なるクラスターへと分けられた。

解析結果を踏まえ、我々は UC モデルマウス病態悪化能力を有する *P. bifermentans* の新規亜種として *P.*

bifermentans subsp. *muricolitidis* subsp. nov. (PAGU 1678^T)を提案する。

【参考文献】

1. Kutsuna R, Tomida J, Morita Y, Kawamura Y. (2018) PLoS One. 13: e0197668.
2. Sasi Jyothsna TS, Tushar L, Sasikala C, Ramana CV. (2016) Int J Syst Evol Microbiol. 66: 1268-1274.

【感想】

発表後の質疑応答、懇親会を通じて多くの質問、コメントを頂き、これまで自身では気付かなかった点を把握することが出来た。本学会で学んだことを活かし、今後の研究において異なる視点からのアプローチも試みる予定である。本学会への参加にご支援いただいた愛知学院大学薬学会に深く感謝します。