

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 難培養微生物の分離培養と微生物間共生機構の解明
(英語) Isolation of yet-uncultured microorganisms and elucidation of symbiosis mechanism between microbes

研究開発担当者 (日本語) バイオリソースセンター 微生物材料開発室 研究員 坂本 光央
所属 役職 氏名： (英語) Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center, Research Scientist, Mitsuo Sakamoto

実施期間： 平成28年10月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

和文

平成 28 年度の研究開発成果を以下に示す。

1. 難培養微生物の分離培養

- ・ メンブランフィルター法などによる難培養微生物の分離

健康成人 4 名の糞便から種々の血液寒天培地などを用いて菌株を分離した。また、メンブランフィルター法 (Tanaka & Benno, Microbiol. Immunol., 2015) の適用も試みた。分離された菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、その配列の比較から既知種あるいは新菌種であるかを判定した。4 名から 1341 株を分離した。*Bacteroides* 属や *Bifidobacterium* 属に属する菌種も数多く分離されたが、近年、制御性 T 細胞を誘導すると報告されてる菌群の一菌種 *Flavonifractor plautii* のような既知種ではあるがユニークな菌種も分離された。該当菌株は理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (JCM) に寄託し、バイオリソースの整備を行った。また、16S rRNA 遺伝子配列の類似度の比較から新菌種であると考えられる菌株も分離された。

- ・ セルソーターによる微生物の単離培養

糞便希釈液を一度液体培地で培養後、セルソーターに供した。既知種であるが *Anaerostipes caccae* のような酪酸産生菌を単離することに成功した。現在、セルソーターで微生物株を単離する条件をさらに検討している。

- ・ シングルセルゲノミクス

セルソーターで単離された単一細胞を用いてゲノム増幅後、その 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列の比較によりゲノム解析するサンプルを選抜した。既知種が数多く単離された中で、2 種の新菌種候補のゲノムがこれまでに得られている (ゲノム解析準備中)。現在、シングルセルゲノミクスの条件をさらに検討している。

2. 微生物間共生機構の解明

- ・ 分離株の特性解析

これまでに分離された新菌種候補の中で、中心がくぼんだ特徴的なコロニー形態を示す菌株 2 株は、16S rRNA 遺伝子および *hsp60* 遺伝子配列の解析結果、主要な菌体脂肪酸などから既知種とは異なっていることが明らかとなり、これら分離株を新属・新菌種 *Faecalimonas umbilicata* として命名提案した (Sakamoto *et al.* 印刷中)。現在、その他の新種候補株に対しても詳細な検討を行っている。

英文

The results of R & D in FY2016 are shown below.

1. Isolation of yet-uncultured microorganisms by the membrane filter method etc.

• Strains were isolated from feces of 4 healthy adults by using various blood agar media. We also tried to apply the membrane filter method (Tanaka & Benno, Microbiol. Immunol., 2015). The partial nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of the isolates were determined, and from the comparison of the sequences, it was judged whether it was a known species or a novel bacterial species. Totally 1341 strains were isolated from 4 individuals. Although a number of bacterial species belonging to

the genera *Bacteroides* and *Bifidobacterium* have been isolated, a unique bacterial species such as *Flavonifractor plautii*, which has been reported to induce regulatory T cells, was also isolated. The strains were deposited in Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN BioResource Center. In addition, strains considered to be a novel bacterial strain were also isolated.

- ・ Isolation of microorganisms by cell sorter

After cultivation using a liquid medium, it was applied to a cell sorter. We succeeded the isolation of butyrate-producing bacteria such as *Anaerostipes caccae*. Currently we are further investigating conditions for isolating microbial strains with cell sorter.

- ・ Single cell genomics

After genomic amplification using a single cell isolated by a cell sorter, a sample to be genome analyzed was selected by comparing partial base sequences of the 16S rRNA gene. Among the many known species isolated, genomes of two candidate species of new bacteria have been obtained so far (under preparation for genome analysis). Currently we are considering the conditions of single cell genomics further.

2. Elucidation of symbiosis mechanism between microbes

- ・ Characterization of isolates

Among the newly isolated bacterial species candidates, the two strains showed characteristic colony morphology (umbilicated colony). Based upon the data, such as cell and colony morphologies, cellular fatty acids profiles and phylogenetic position based on 16S rRNA gene and *hsp60* gene sequence analyses, two strains represent a novel species of a novel genus, for which the name *Faecalimonas umbilicata* gen. nov., sp. nov., is proposed (Sakamoto *et al.*, in press). Currently, we are conducting detailed studies on other new candidate strains.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 1件）

1. 坂本光央, 大熊盛也. (服部正平／編). 細菌の分類. “実験医学別冊 NGS アプリケーション 今すぐ始める！メタゲノム解析 実験プロトコール” (羊土社). 2016, pp. 22-26.
2. Sakamoto M, Iino T, Ohkuma M. *Faecalimonas umbilicata* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, and reclassification of *Eubacterium contortum*, *Eubacterium fissicatena* and *Clostridium oroticum* as *Faecalicatena contorta* gen. nov., comb. nov., *Faecalicatena fissicatena* comb. nov. and *Faecalicatena orotica* com. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2017, 67, doi: 10.1099/ijsem.0.001790

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト腸内からの新規微生物の分離とバイオリソース整備, 口頭, 坂本光央, 飯野隆夫, 大熊盛也, 日本農芸化学会 2017 年度京都大会, 2017/3/19, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
記載事項なし

(4) 特許出願
記載事項なし