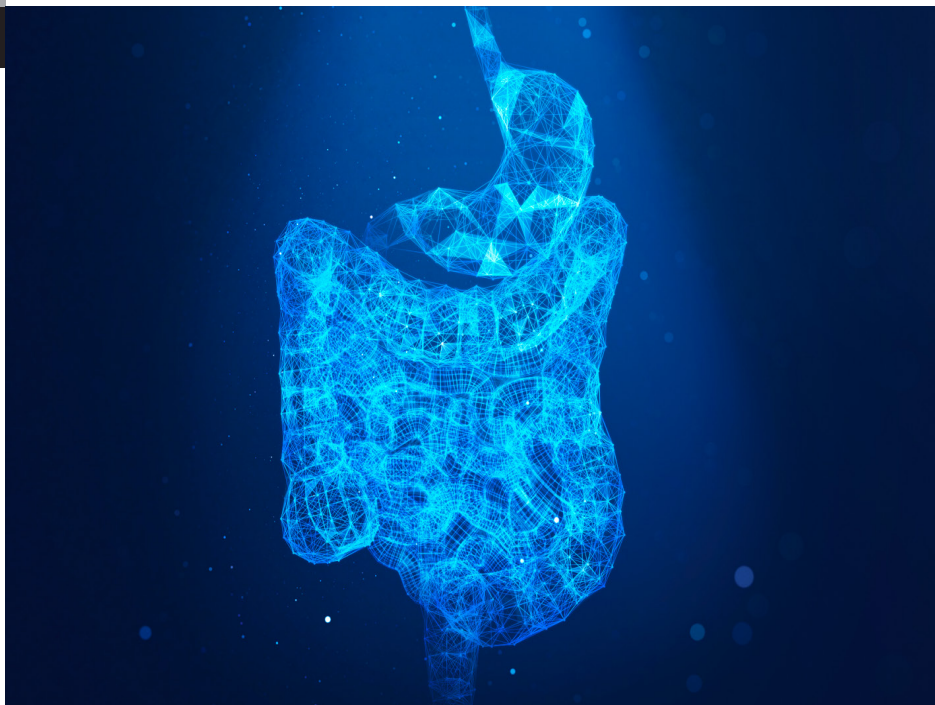


次世代シーケンサーとGC/MSによる腸内細菌叢と代謝物と香気成分のマルチオミクス解析

中川 裕貴¹、舟橋 和毅²、山重 リえ³、村上 慎之介²



Life Science

■ 要旨

次世代シーケンサーとガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ™8040 NX）を用いてヒト便試料を分析し、腸内細菌叢（約250種の微生物）、代謝物（約500成分）と香気成分（約500成分）を検出しました。検出された約800の項目を基にマルチオミクス解析パッケージにより主成分分析とボルケーノプロットをそれぞれ代謝経路解析と組み合わせて統合解析に供しました。本稿では、性別や時系列に分けたマルチオミクス解析の事例についてご紹介します。

1. はじめに

ヒトの腸管には約1000種類、40兆個にも及ぶ腸内細菌が生息しています¹⁾。これらの細菌は、ヒトの健康に重要な役割を果たしています。例えば、腸内細菌は食物を消化し、栄養素を吸収するのに役立ちます。また、免疫システムの正常な機能にも関与しています。腸内細菌のバランスが崩れると、消化不良や免疫機能の低下などの健康問題が発生する可能性があります。

現代の生活スタイルや食事の変化によって、腸内細菌叢のバランスが崩れることがあります。例えば、過度なストレスや偏った食生活は、腸内細菌叢に悪影響を与える可能性があります。そのため、腸内環境の健康を維持するためには、バランスの取れた食事やストレス管理が重要です。

腸内細菌叢が消化や免疫機能の調節などに重要な役割を果たす一方で、代謝物は食物の消化や代謝によって生成される物質であり、体内の生理機能にも影響を与えます。腸内細菌叢と代謝物の相関を調査することは、慢性疾患の予防や治療にも役立ちます。例えば、炎症性腸疾患の患者では、腸内細菌叢のバランスが崩れ、特定の代謝物の異常が認められることが知られています。質量分析計を用いて、腸内細菌叢と代謝物の変化を追跡することで、炎症性腸疾患の予防や治療に役立つ可能性があります。

一方、腸内細菌叢と代謝物の相関を調査する際には、個人の生活習慣や食事内容なども考慮する必要があります。人の腸内細菌叢は個人差があり、食事や環境によっても変化するため、一概には言えない場合もあります。

そのため本報では、被験者A（男性）の便を毎月採取し9カ月にわたる細菌叢と代謝物と香気成分の経時変化を観察しました。また他の被験者7名（女性2名、男性5名）の便は1回のみ採取し、被験者Aの比較対象としました。測定には次世代シーケンサー（MiSeqシステム、イルミナ株式会社）とガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ8040 NX）を用いて、解析はマルチオミクス解析パッケージにより実施しました。



図1 GCMS-TQ™8040 NX（左）とMiSeqシステム（右）

1 株式会社島津製作所
2 株式会社メタジェン
3 イルミナ株式会社

注）本研究において、島津製作所とイルミナ社は当該データによる被験者の観察に参画しておらず、被験者への説明と検体の採取、NGS分析、分析結果の考察などはメタジェン社で実施されています。

2. 測定方法

腸内環境を多角的に評価するために、以下2つの装置を用いて合計1223の化合物と細菌種を測定しました。

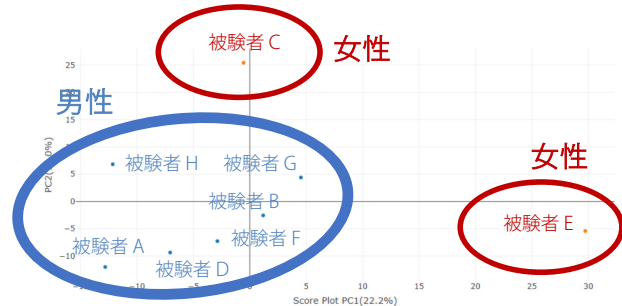
・ガスクロマトグラフ質量分析計

GCMS-TQ8040 NXとSmart Metabolites Database™ Ver.2を用いて有機酸、糖、核酸、脂肪酸、アミノ酸などの一次代謝物488成分を測定しました。面積値は内部標準物質である2-インプロピルリンゴ酸で補正しました。また香気成分に関しては、Smart Aroma Database™を用いてSPME Arrowにより40℃での香気成分484成分を測定しました。各検体で約280成分の一次代謝物と約110成分の香気成分が検出されました。

・次世代シーケンサー

試料をVD-800R凍結乾燥機（タイテック）を用いて24時間凍結乾燥しました。ビーズ法によるDNA抽出後、16S rRNA遺伝子のV1-V2可変領域を細菌ユニバーサルプライマー27F-mod (5'-AGRGT TTGATYMTGGCTCAG-3') および338R (5'-TGCTGCTCCC GTAGGAGT-3') を用いてTks Gflex DNAポリメラーゼ（タカラバイオ）で増幅しました。illumina社のプロトコルに従ってMiSeqを用いてAmplicon DNAの配列を決定しました。251菌種を測定し、各被験者で約150菌種が同定され、相対定量値を算出しました。

これは男性ではリジン分解が促進されていることを示唆し、リジンを基質とする腸内細菌による代謝の促進が考えられます。リジンは大腸で腸内細菌によって代謝され、イミダゾールプロピオン酸やピペコール酸（それぞれ哺乳類の代謝経路には存在しない代謝物が腸内細菌が特異的に生成する代謝物）を生成することが知られています²⁾³⁾。また男性ではピリミジン代謝経路の化合物が多く検出（代謝経路の抑制）されました。ピリミジンは異化された後、糖や脂質代謝経路につながるため健康を維持するために重要な役割を果たします。ピリミジン代謝の律速酵素であるジヒドロピリミジン脱水素酵素が性別により異なる可能性が示唆されました。



3. 主成分分析を応用した代謝経路解析

被験者8名の代謝物、香気成分および腸内細菌叢の測定結果をマルチオミクス解析パッケージにより主成分分析で解析しました。被験者Aに関しては9カ月の経時変化でも主成分分析に影響が出ないことを確認したうえで、任意の1検体のみを採用しました（後出、図7）。

主成分分析では累積寄与率40%にも関わらず、女性2名が男性6名から離れる結果となりました（図2上）。そこで、ローディングプロット（図2下）の左下（PC1<0かつPC2<0の検査項目）を男性で特徴的に検出される群（紫色）、右上（PC1>0かつPC2>0の検査項目）を女性で特徴的に検出される群（黄色）として代謝経路に投影しました（図3）。

女性（黄色）ではリジン分解経路の代謝物が蓄積されていました。

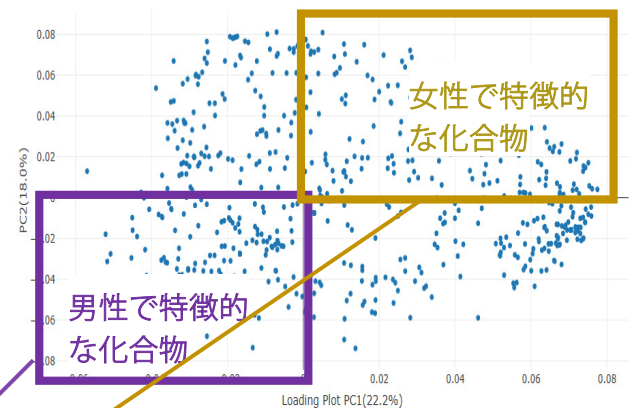


図2 被験者8名の主成分分析（代謝物、香気成分、菌種）

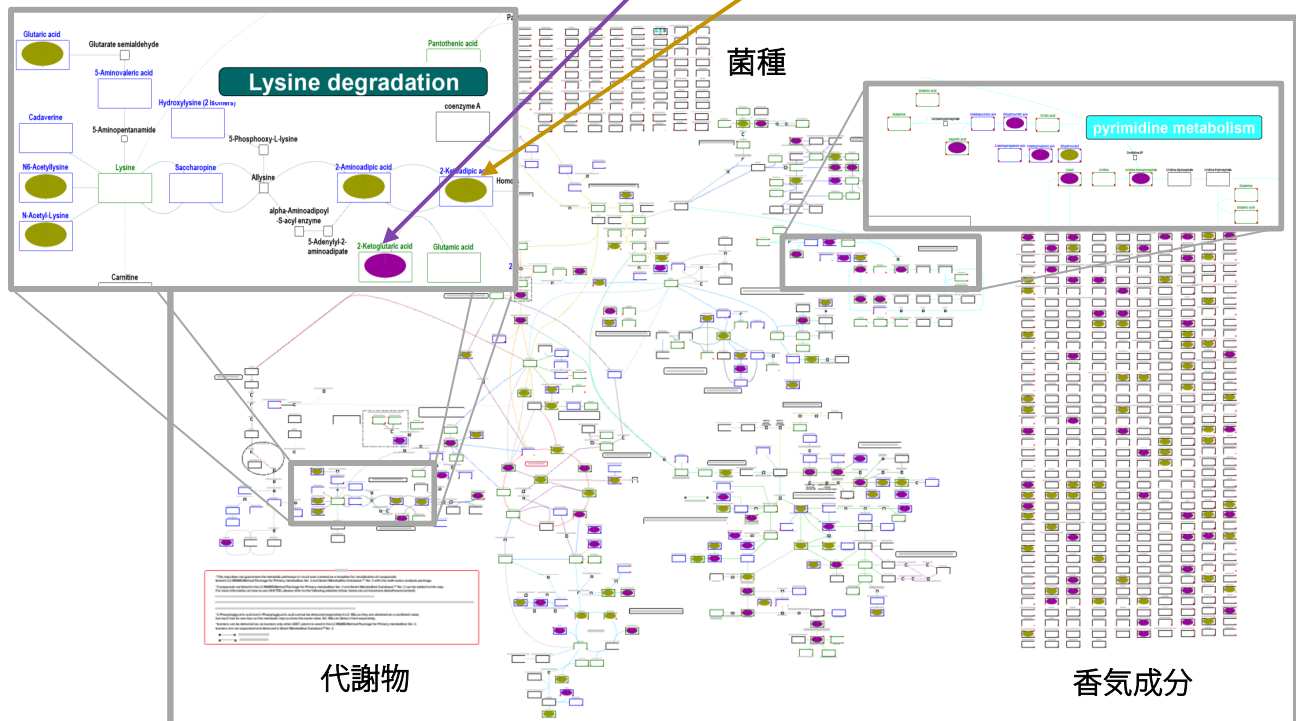


図3 主成分分析のローディングプロットを基にした代謝経路解析（紫色は男性で特異的に検出される化合物、黄色は女性で特異的に検出される化合物）

項目	p値
Dihydroxyacetone	0.003
2-Hydroxyglutaric acid	0.003
Lachnospiraceae UCG-004	0.01
Octanoic acid	0.01
Desulfovibrio	0.01
4-Coumaric acid	0.02
2,5-Dimethylpyrazine	0.03
Lachnospira	0.03
2-Hydroxybutyric acid	0.03
Guanine	0.03
Lachnospiraceae NK4A136 group	0.03
Succinic acid	0.03
Ruminococcaceae UCG-004	0.04

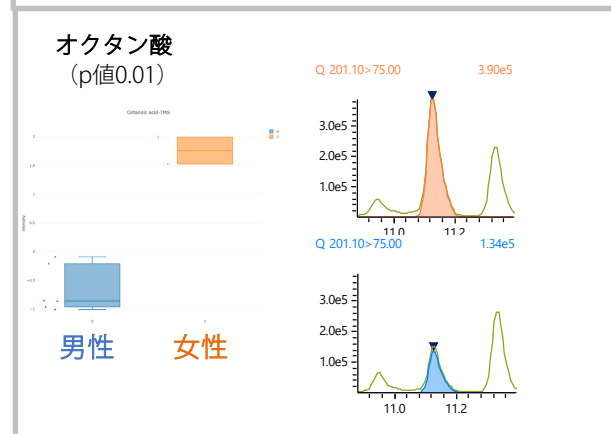
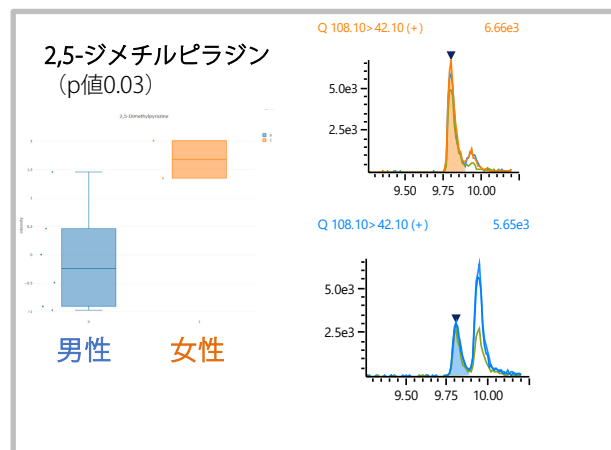
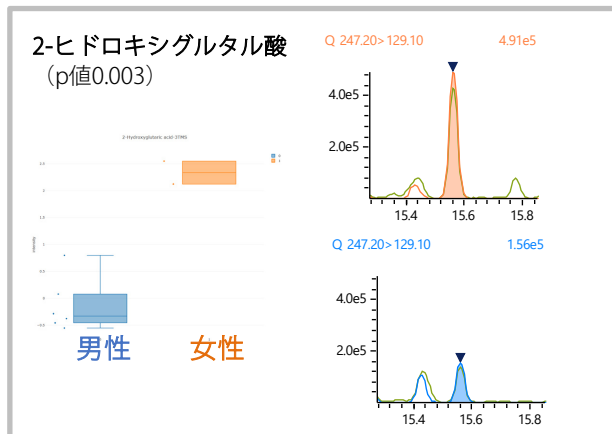
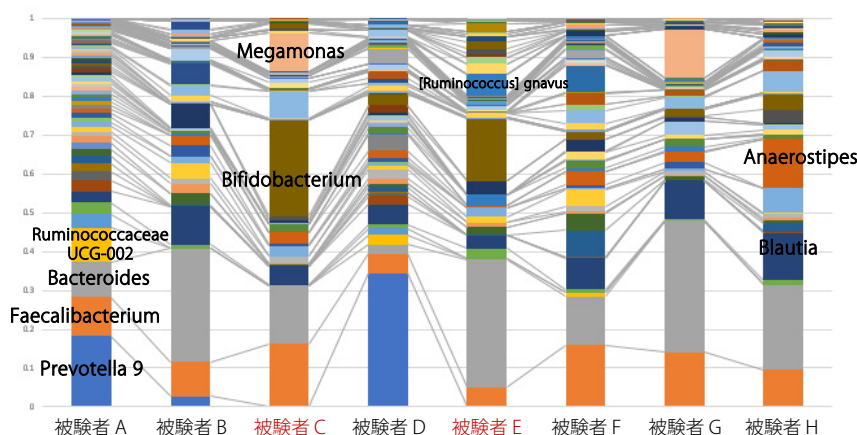


図4 性別により有意な差が確認された化合物

図5 次世代シーケンサー結果とエンテロタイプ⁴⁾ (黒文字: 男性、赤字: 女性)**Type B バクテロイデス属が多い**

発酵食品や食物繊維の摂取頻度が高い

- ・ 被験者B (32歳男性)
- ・ 被験者G (28歳男性)
- ・ 被験者H (35歳男性)

Type D ビフィド属が多い

睡眠不足の人が多い

- ・ 被験者C (34歳女性)
- ・ 被験者E (34歳女性)

Type E プレボテラ属が多い

健康者が最も多い

- ・ 被験者A (45歳男性)
- ・ 被験者D (34歳男性)

他に性別差が認められた化合物として2-ヒドロキシグルタル酸、オクタン酸、2,5-ジメチルピラジンなどがあります。2-ヒドロキシグルタル酸は免疫機能に影響する化合物であり、高濃度ではオンコメタボライト（がん特有代謝物）としても知られています。オクタン酸（カプリル酸）は中鎖脂肪酸で腸内環境を改善することが知られておりサプリメントとしても販売されています。2,5-ジメチルピラジン（スレオニン代謝により生成されるアミノアセトンが前駆体）は枯草菌により生成されます。

4. 腸内細菌種と代謝物の相関解析

腸内細菌叢には個人差があり、その個人差は遺伝子や生活環境、食事などの要因によって影響を受けます。腸内細菌叢の個人差はヒトの健康にも大きな影響を与えるため、そのバランスを保つことが重要です。

次世代シーケンサーで細菌叢を測定した結果を棒グラフで可視化しました（図5）。被験者A（45歳男性）や被験者D（34歳男性）ではルミノコッカス属菌 UCG-002が他の被験者よりも多く検出された一方で、バクテロイデス属菌の

相対存在比は低いことが分かりました。

ルミノコッカス属菌は難消化性デキストリンなどの食物繊維成分を分解する能力を持ち、草食動物の胃などにも生息しています。またルミノコッカス属菌は菌種によって健康促進に寄与する種や疾患の発病に関与する種がいることも知られています。

また被験者C（30代女性）と被験者G（20代男性）では、ヒト腸内常在性のグラム陰性嫌気性菌であるメガモナス属菌が多く検出されました。被験者Cと被験者Eではグラム陽性嫌気性桿菌でグルコースから乳酸と酢酸を産生するビフィドバクテリウム（ビフィズス菌）属菌が多く検出されました。ビフィズス菌のヒトへの生理作用については、免疫調節作用や、アレルギー抑制作用、感染防御作用の報告があります⁴⁾⁵⁾。

被験者H（30代男性）では、大腸まで届いた食物繊維やオリゴ糖などを代謝し酪酸を産生するアナエロスティペスが多く検出されました。酪酸には食物アレルギーや炎症の原因となる過剰な免疫反応が起こらないように調節する働きがある一方で、口から摂取しても、胃や小腸で吸収され

てしまい、大腸にはほとんど届かないため、アナエロスティペスのように腸内で酪酸を生成する菌が存在することは健康を保つために重要です⁶⁾。

腸内細菌叢は、個人差だけでなく、特定の個人でも生活環境や食生活、健康状態などによって組成が変化することが知られています。例えば、ストレスや抗生物質の使用、食事の変化などは、腸内細菌叢の組成に変化をもたらす可能性があります。また、年齢や季節の変化も腸内細菌叢に影響を与える要素として考えられています。

そこで被験者Aの2022年12月から2023年9月までの細菌叢組成の時系列変化を棒グラフで可視化しました(図6)。主成分分析により、時系列変化(食生活、健康状態)は個人差(遺伝、環境)よりも小さくなることが分かりました(図7)。また、主成分分析により被験者Aで特徴的に検出される菌種を特定し、代謝物や香気成分との相関関係を解析しました(図8)。クリステンセネラ属菌は痩せた人で存在量が高く、動物試験では体重増加を抑制することが報告されています⁷⁾。相関解析を実施すると、クリステンセネラ属菌はタウリン代謝経路とリジン分解代謝経路に関連することが分かりました。タウリンは非タンパク質性のアミノ酸で、抱合型胆汁の解毒作用、抗酸化作用および神経伝達物質様作用など、その生理機能は多岐にわたり、健康維持に重要な代謝物です。

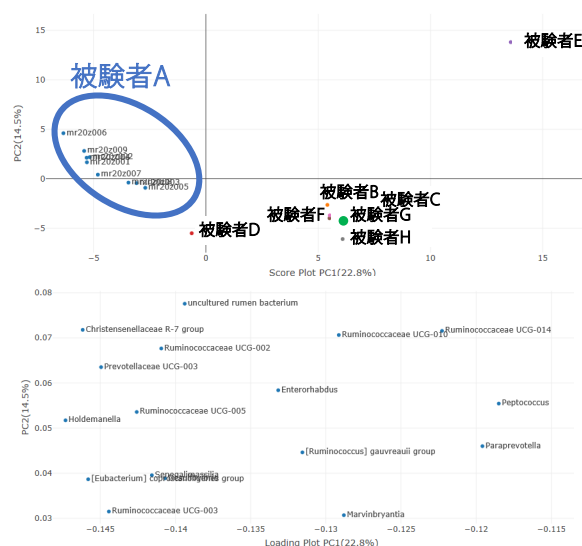


図7 次世代シーケンサー結果
(主成分分析による被験者Aの時系列変化と他被験者の比較)

* ローディングプロットは被験者Aで特徴的に検出される部分(PC1>0, PC2<0を拡大表示しています)

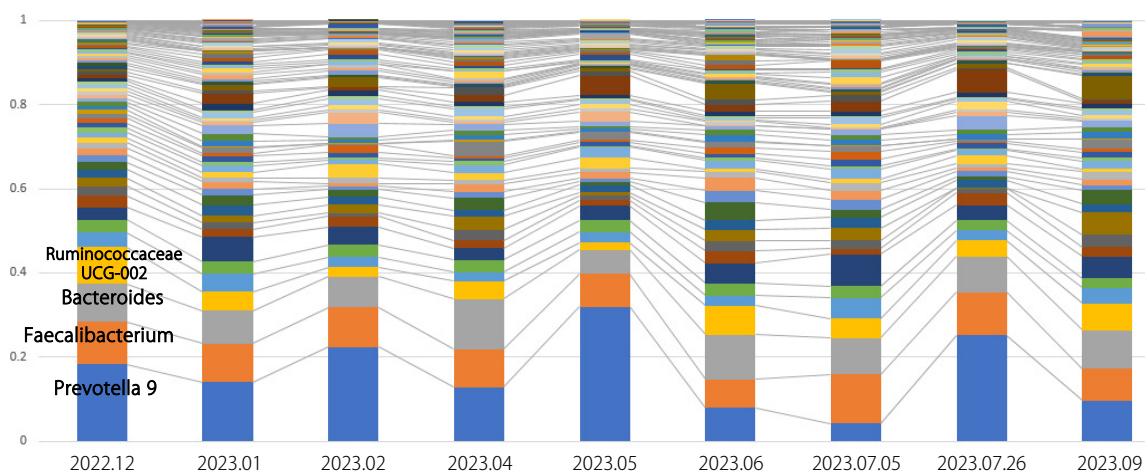


図6 次世代シーケンサー結果(被験者Aの時系列変化)

Christensenellaceae R-7

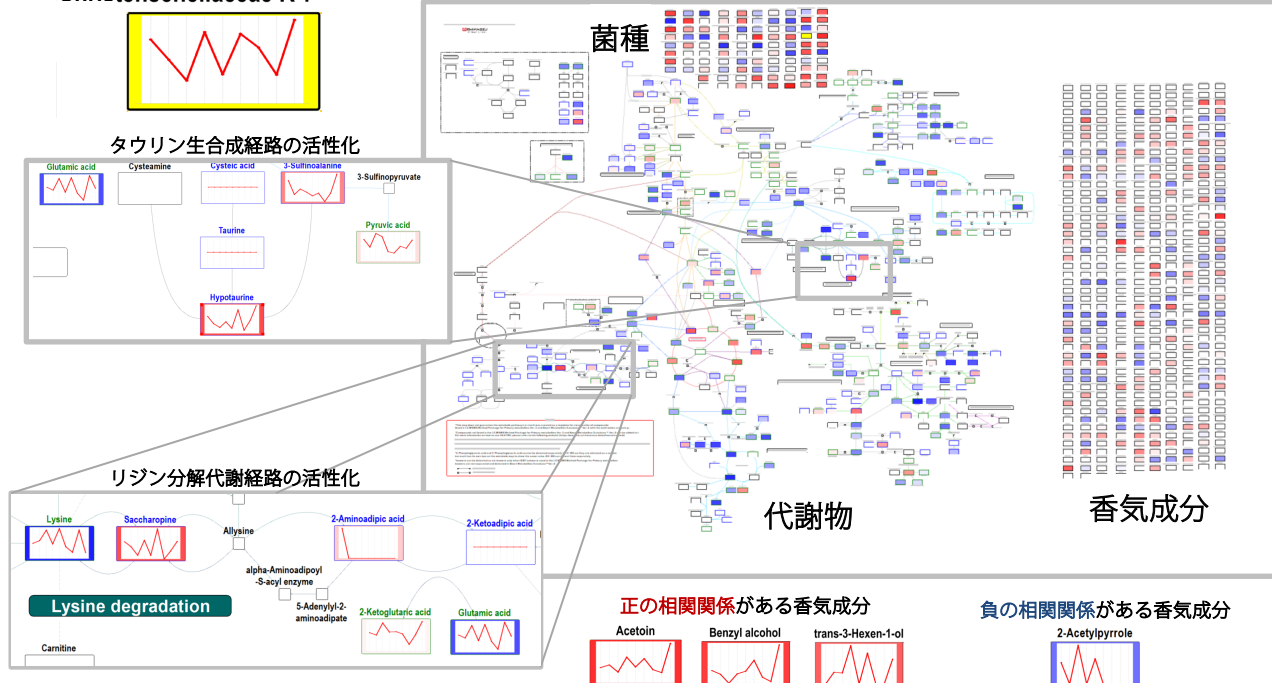


図8 クリステンセネラ菌の増減と正負の相関がある代謝物や香気成分の探索(マルチオミクス解析パッケージの白地図機能)

ルミノコッカス属菌UCG-003が増加するとパラアミノ安息香酸生成代謝経路の生成物量が増加し、プリン代謝経路の中間代謝物が蓄積することが分かりました。またルミノコッカス属菌UCG-003が減少すると、便臭であるスカトールが高濃度となることが分かりました。スカトールはトリプロファンがインドール-3-酢酸となり、その後、脱炭酸反応されることにより生成される化合物です。腸管上皮にダメージを与える化合物であることから、ルミノコッカス属菌UCG-003の存在量を維持することが重要であることが示唆されました¹²⁾。

またボルケーノプロットにより、ルミノコッカス属菌UCG-003とバルネシエラ属菌には負の相関関係があることが分かりました。バルネシエラ属菌はヒトの認知機能や身体機能に影響を及ぼす可能性が示唆されている腸内細菌です¹³⁾¹⁴⁾。

ルミノコッカス属菌UCG-003のみのボルケーノプロットを代謝経路に投影することに加え、被験者Aに特徴的であったマービンブリアンシア、ホールデマニア、ルーメン細菌についても同様にボルケーノプロットで解析し、結果をすべてひとつの代謝経路図に投影しました(図10)。

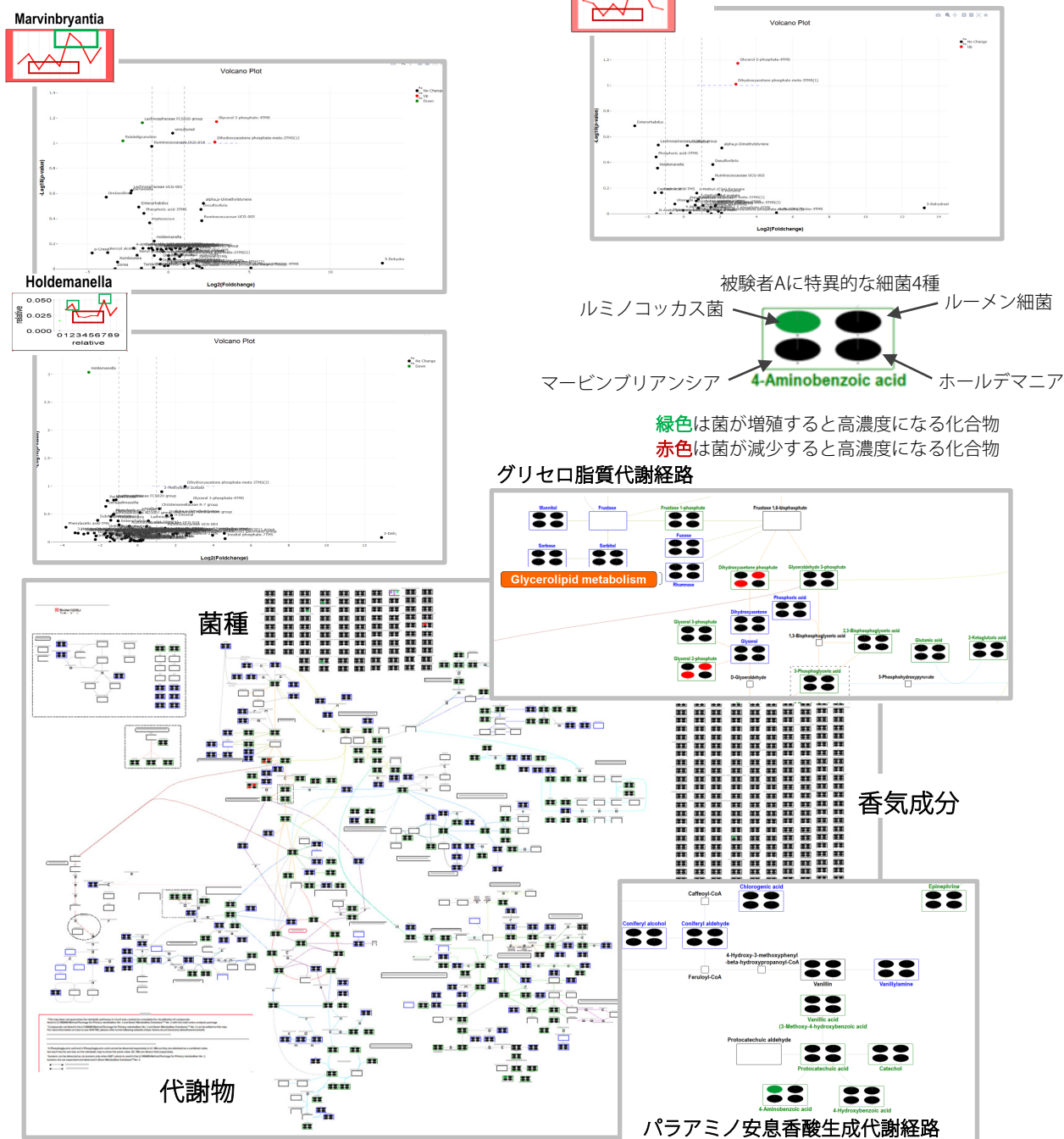


図10 4つの菌種(ルミノコッカス菌UCG-003、マービンブリアンシア、ホールデマニア、ルーメン細菌)の増減と正負の相関がある代謝物や香気成分の探索(マルチオミクス解析パッケージの白地図機能)

6. まとめ

16個のヒト便試料を次世代シーケンサーとガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ8040 NX）を用いて測定し、腸内細菌叢（約250種の微生物）と代謝物（約500成分）と香気成分（約500成分）を検出しました。検出された約800の項目を基にマルチオミクス解析パッケージにより主成分分析とボルケーノプロットをそれぞれ代謝経路解析と組み合わせで統合解析に供しました。

時系列解析や主成分分析により、食事や健康状態に関わらずエンテロタイプは一定であることが分かりました。また細菌の増減と代謝物や香気成分の相関解析を実施することで、影響を受ける代謝経路や香気成分を特定することができました。

<参考文献>

- 1) [Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body](#)、Sender et al.、2024年1月9日参照
- 2) [Evolution of nutritional management of acute malnutrition](#)、Antener et al.、2024年1月9日参照
- 3) [Sensitivity and specificity of salivary pipecolic acid in head and neck squamous cell carcinoma](#)、Fujita et al.、2024年1月9日参照
- 4) [Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate](#)、Fukuda et al.、2024年1月9日参照
- 5) [A serpin from the gut bacterium Bifidobacterium longum inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases](#)、Ivanov et al.、2024年1月9日参照
- 6) [Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells](#)、Furusawa et al.、2024年1月9日参照
- 7) [Human genetics shape the gut microbiome](#)、Goodrich et al. 2014、2024年1月9日参照
- 8) [Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid](#)、James et al.、2024年1月9日参照
- 9) [ベンジルアルコール](#)、環境省、2024年1月9日参照
- 10) [The mucin-degradation strategy of Ruminococcus gnavus: The importance of intramolecular trans-sialidases](#)、Crosthwaite et al.、2024年1月9日参照
- 11) [Unique Sugar Metabolic Pathways of Bifidobacteria](#)、Larson et al.、2024年1月9日参照
- 12) [Modulating AHR function offers exciting therapeutic potential in gut immunity and inflammation](#)、Kurata et al.、2024年1月9日参照
- 13) [Association of the Gut Microbiota With Cognitive Function in Midlife](#)、Meyer et al.、2024年1月9日参照
- 14) [Muscle strength is increased in mice that are colonized with microbiota from high-functioning older adults](#)、Fielding et al.、2024年1月9日参照

注）本研究において、島津製作所とイルミナ社は当該データによる被験者の観察に参画しておらず、被験者への説明と検体の採取、NGS分析、分析結果の考察などはメタジェン社で実施されています。

GCMS-TQ、Smart Metabolites Database、Smart Aroma Databaseは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2024年3月

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。