

学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 土田 さやか

題目： Characteristics of intestinal microbiota of western lowland gorillas
(*Gorilla gorilla gorilla*).
(腸内細菌叢から見たニシローランドゴリラの特徴)

本研究は、ニシローランドゴリラから単離した各種の新規乳酸菌の系統解析と腸内細菌叢の網羅的解析によって、腸内細菌とヒトの共進化機構を解明するための基盤を提供する研究である。

Chapter 1: General Introduction. (緒言)

哺乳類の腸内細菌叢は、非常に複雑な生態系であり、ヒトでは少なくとも 1,000 種におよぶ系統的に異なった腸内細菌から構成される。その生態系は消化機能や、食性によって宿主特異的に共進化を遂げてきたと考えられる。そのため、ヒトはもちろんのこと、実験動物や家畜・ペットなど人間の生活に恩恵をもたらす哺乳類を対象にして腸内細菌の研究がおこなわれてきた。

腸内細菌のうち乳酸桿菌やビフィズス菌などの乳酸菌は、生体防御的に働く腸内細菌叢の中心メンバーと考えられており、ヒトを宿主とする乳酸菌研究が数多く行われてきた。乳酸桿菌およびビフィズス菌は、その商業的利用価値から、様々な動物から単離されており、多様な腸内細菌の中では比較的、動物種間での菌種の違いが明らかとなっている。しかしこれらの研究は、臨床効果にかかわる機能分析など応用的な研究にとどまっており、動物種によって乳酸菌構成種や構成種数が大きく異なる理由などは検討されてこなかった。

そこで本研究では、霊長類一人進化系に着目し、人類との共通祖先からおおよそ 900 万年前に分岐したと考えられているゴリラの腸内細菌叢を特徴づける乳酸菌を単離し、ヒト型乳酸菌と比較検討を行うことにより、乳酸菌と霊長類の共進化機構の一端を明らかにすることを目的とした。さらに、環境が腸内細菌叢にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、ガボン共和国ムカラバ・ドゥドゥ国立公園に同所的に生息しており、摂取している食物が大きく重複している、ニシローランドゴリラ、チュウオウチンパンジーおよびシンリンゾウの腸内細菌叢の網羅解析を行った。

Chapter 2: *Bifidobacterium moukalabense* sp. nov. isolated from the feces of wild western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) in Gabon.

(ガボン共和国に生息する野生ニシローランドゴリラの糞便から単離された新菌種 *Bifidobacterium moukalabense*)

ガボン共和国ムカラバ・ドゥドゥ国立公園に生息する野生ニシローランドゴリラおよびチュウオウチンパンジー (*Pan troglodytes troglodytes*)、シンリンゾウ (*Loxodonta africana cyclotis*)の糞便からグラム陽性偏性嫌気性桿菌を単離し、基準菌株 GG01 および類縁 16 株の分類学研究をおこなった。16S rRNA 遺伝子配列および *hsp60* 遺伝子配列を用いた系統分類解析で、本菌株を含む 13 株が既知の菌種から明瞭に分離した単一系統のクラスターを形成したことから、系統的に *Bifidobacterium* 属に属する新菌種であることが示された。そこで、これらの単離株を *Bifidobacterium* 属に属する新菌種 *B. moukalabense* (基準株 GG01^T=JCM 18751^T)と命名し、新菌種提唱をおこなった。

本菌種は、ゴリラから優勢に単離されるビフィズス菌で、ヒト型ビフィズス菌である *B. adolescentis* グループに属し、*B. catenulatum* および *B. dentium* に近縁であることが明らかとなった。

Chapter 3: *Lactobacillus gorillae* sp. nov. isolated from the feces of captive and wild western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*).

(飼育および野生ニシローランドゴリラの糞便から単離された新菌種 *Lactobacillus gorillae*)

飼育および野生ニシローランドゴリラの糞便から 15 株のグラム陽性通性嫌気性桿菌を単離した。16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統分類解析の結果から、これらの 15 株は単一系統のクラスターを形成し、既存種から区分されたので、新菌種と推測された。さらに *pheS* 遺伝子配列を用いた系統分類解析によってもこれらの *Lactobacillus* は既存菌種とは別の単一クラスターを形成した。既存種との DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果から既存種と区分される新菌種であることが明らかとなった。そこで、これらの単離株を *Lactobacillus* 属に属する新菌種 *L. gorillae* (基準株 KZ01^T=JCM 19575^T)として新菌種提唱をおこなった。現在まで、この菌群の検出は配列だけの登録も含め、ゴリラに限られていることから、ゴリラに特異的な *Lactobacillus* 属細菌であると予想される。

Chapter 4: Characterization of intestinal bacterial communities of western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*), central chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*) and a forest elephant (*Loxodonta africana cyclotis*) living in Moukalaba-Doudou National Park in Gabon.

(ガボン共和国ムカラバ・ドゥドゥ国立公園に生息するニシローランドゴリラ、

チュウオウチンパンジーおよびシンリンゾウの腸内細菌叢の特徴)

ガボン共和国ムカラバ・ドウドゥ国立公園に同所的に生息し、食性も近似するニシローランドゴリラ、チュウオウチンパンジーおよびシンリンゾウの腸内細菌叢の特徴を明らかにするために、糞便中の細菌 16S rRNA 遺伝子のメタ解析を行い、これらの動物種間の腸内細菌叢を比較した。その結果、すべての動物種で *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae* および *Lachnospiraceae* が腸内細菌叢の科レベルの主要メンバーであることが明らかになった。しかし Unifrac 解析の結果、各動物種の腸内細菌叢は動物種ごとに異なったクラスターを形成し、相互に分離された。これらの動物の腸内細菌叢を特徴づけた細菌種は、配列だけの登録種も含めて検索しても多くが既知の細菌(および配列)には分類されず、完全に未知の細菌であることが示唆された。特にシンリンゾウ試料では、70%あまりの配列が未知の細菌種に属していた。このように食性が近似しても腸内細菌構成が大きく異なることが明らかになったが、具体的に何が異なっているのかを知るためには、次世代シーケンス技術に加えて未知種の分離と同定が必須であることが強く示唆された。

Chapter 5: General discussion and Conclusion. (総括)

本研究では、「ヒトと腸内細菌の共進化機構」を解明するために、古典的培養法および分子生態学的手法を用いてヒト上科に属するニシローランドゴリラの腸内細菌叢の特徴を解明することを目的とした研究を行った。

古典的培養法を用いたアプローチでは、ニシローランドゴリラの糞便から、新菌種 *L. gorillae* および *B. moukalabense* を発見した。*B. moukalabense* に近縁な *B. adolescentis* グループは、ほとんどの菌種がヒト型ビフィズス菌であると考えられており、それらはデンプン分解性を有していることが明らかとなっている。人類進化の過程で、食事が果実食・葉食から狩猟採集に移行することで肉食の割合が増加したのち、農耕の発明によりデンプン摂取量が増加し相対的に肉食の比率が低下した。おそらくデンプン食へ移行したことによって、野生霊長類型のビフィズス菌が、ヒト型のビフィズス菌へと共進化し、種分化が起こったのではないかと推察された。*B. moukalabense* は、野生個体からのみ単離されており、野生環境下でニシローランドゴリラと共生関係を築いてきたビフィズス菌であることが示唆された。一方、*L. gorillae* は、飼育および野生個体の糞便から単離されており、環境依存ではなく、宿主特異的に共生関係を築いてきた菌種であることが示唆された。さらに、野生ゴリラから単離された野生株と同一のリボタイプを持つ菌株が飼育個体からも単離された。この菌株は、植物細胞壁に含まれる難消化性糖質の分解活性やフェノール性の配糖体分解活性を持っており、飼育ゴリラからのみ分離された株ではこうした活性が失われていた。

このように食事の変化によって、同一種でも株によって表現形質およびリボタイプが変化する可能性が示唆された。

次世代シーケンス技術を用いた野生ニシローランドゴリラ・チュウオウチンパンジー・シンリンゾウの腸内細菌叢の分子生態学的比較解析によって、同所的にはほぼ同じ食物に依存する動物でも腸内細菌叢が異なることが明らかにできた。しかし、検出された塩基配列のなかには未同定菌種由来の OTU が 30%~70% も含まれており、どの菌種によってそれぞれの動物種の腸内細菌叢が特徴づけられるのかという問いには答えを見出すことはできず、メタ解析の限界も明らかとなった。以上のことから、宿主と腸内細菌叢の共進化系を理解するためには、次世代シーケンス技術に加えて、古典的培養法を用いて腸内細菌をさらに単離していくことが必須であると考えられた。