

博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 牛田 一成 印

副査 渡部 邦彦 印

副査 久保 康之 印

1 氏名： 土田 さやか

2 学位の種類： 博士（農学）

3 学位授与の要件： 学位規程第3条第3項該当

4 学位論文題目

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)

5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載のとおり

【論文目録】

別紙に記載に記載の通り

【審査結果の要旨】

本論文は、ニシローランドゴリラの腸内細菌叢の網羅解析およびゴリラ特異的乳酸菌の発見と同定、それに続く細菌学的検討を骨子とする。得られた新規な知見に基づき、類人猿からヒトへの進化のなかで腸内細菌に起こった変化＝共進化について議論を試みるものである。

第1章では、腸内細菌について、すでに得られている文献上の知見を紹介し、この研究の目的を説明している。

腸内細菌は宿主にとって単なる寄生的な存在ではなく、宿主の消化機構の一端を担うばかりか腸管免疫系との相互作用を通じて宿主の健康維持に対してきわめて重要な役割を担っていることが明らかになってきた。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盛んに行われるようになった。とくに、保健効果が認められる乳酸菌（ビフィズス菌や乳酸桿菌）については、機能性食品の成分として多種多様な菌種が利用されるようになってきている。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、たとえば、ヒトにおいてなぜこれほど多様なビフィズス菌が検出されるのか、どうしてこれほど優勢な菌群を構成しているのか、という根本的な疑問について回答を得ることはできないままである。疑問の解決のためには、系統的にヒトと近いヒト上科に属する類人猿の腸内乳酸菌の特徴を知る必要があると考えられるが、これまで飼育下ばかりでなく野生の類人猿について腸内細菌の検索はほとんど実施されていないことから、申請者は、ヒト上科に属する類人猿をターゲットとして腸内の乳酸菌を分離同定し、その性質を明らかにすること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しようと試みた。

第2章では、ガボン共和国ムカラバ・ドゥドゥ国立公園の熱帯林に生息する野生ニシローランドゴリラ (*Gorilla gorilla gorilla*) および野生チュウオウチンパンジー (*Pan troglodytes troglodytes*)、野生シンリンゾウ (*Loxodonta africana cyclotis*) の糞便から *Bifidobacterium* 属の新菌種を分離することに成功し、菌株 GG01 および類縁 12 株の分類学研究を行った結果を報告している。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に基づき、GG01 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、GG01 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い国際的に承認されている。

新菌種 *B. moukalabense* は、ヒトから優勢に分離される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にされた。本菌は、ゴリラと同所的に生息するチュウオウチンパンジーやシンリンゾウ糞便からもまれに分離されるが、野生ニシローランドゴリラの糞便から優勢に分離されるので、ニシローランドゴリラに特異的なビフィズス菌であると結論づけている。この新菌種は、デンプン分解活性が弱く、旺盛にデンプンを分解できるヒト型のビフィズス菌とは異なっていた。

ゴリラに特異的でヒトには見つからないヒト型のビフィズス菌を発見したことにより、ヒトとビフィズス菌の関係を明らかにする重要な材料を獲得したと評価できる。

第3章では、京都市動物園で飼育されているニシローランドゴリラ3個体およびガボン共和国ムカラバ・ドゥドゥ国立公園の野生ニシローランドゴリラの糞便から新規の乳酸桿菌を発見し分離同定を行った結果を報告している。

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、16S rRNA 遺伝子配列および *pheS* 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株が単一系統のクラスターを形成し、既存種から区分されることを明らかにした。最終的に既存種との DNA-DNA ハイブリダイゼーションから既存種と区分される新菌種であることを明らかにし、*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行った。この菌種の検出は配列だけの登録も含め、ローランドゴリラとマウンテン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している。この菌種は、ヒトで見つかる *L. reuteri* グループに属しているがヒト由来の *Lactobacillus* と比較して、ヘミセルロース分解力やフェノール誘導体などの植物二次代謝産物を分解する能力を持つことが特徴的である。リボタイピングによる詳細解析で、飼育ゴリラからのみ検出されるものと野生ゴリラから検出されるものの二つのグループに分けられることを示した。この二つのグループは、上記のヘミセルロース分解力やフェノール誘導体分解能力に差があり、飼育ゴリラ由来株ではこうした能力が失われヒト由来近縁株と同じ表現系を示すように変異していることが示された点は重要である。また、NaCl に対する抵抗性も野生ゴリラ由来株と飼育ゴリラ由来株に大きな差があり、飼育ゴリラ由来株に高い NaCl 抵抗性が認められた点は、飼育ゴリラの食事がミネラルバランスを十分維持したペレット飼料などでまかなわれている点、野生ゴリラは食事中的 Na 不足に常にさらされている点などから、同一種においても株レベルで飼育条件への適応がすでに始まっていることを示しており、宿主と腸内細菌の共進化を考える上できわめて示唆に富んだ内容であるといえる。

第4章では、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、

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、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、相互に分離されることを示した。一方、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が、既存の科に属さない配列が、18~40%も検出されていることから、これらの動物の腸内細菌叢を特徴づける細菌種は、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を示唆したことは重要である。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、次世代技術に加えて未知種の分離と同定が必要であることを明瞭に示した。また、肉食の割合が増加することで誘導される菌群の存在を示唆した点も重要であると考えられる。

第5章では、第2章から第4章の結果を総括している。本研究では、食事の内容に規定される腸内環境に共生腸内細菌が適応することによって、種の分化が進む可能性が示されている。ヒトへの系統進化の過程で、我々の祖先は、果実食・葉食に依存するゴリラの食性を維持していたと思われる状態から、動物性の食物をより多く摂取するように変化したチンパンジーとの共通祖先の食事形態へと変化し、そこから完全二足歩行を確立し肉食の割合をさらに増加させた狩猟採集生活へ移行したと推測されている。本研究は、約1万年前とされる農耕の発明によるデンプン摂取量の増加と食塩の積極的摂取によるNa不足からの解放が共生腸内細菌の共進化に大きな影響を与えたことを示唆する内容となっている。

以上、本論文は、ゴリラに特異的な乳酸菌を新たに発見し、新種として確立したことに加え、ヒトと腸内細菌の共進化のメルクマールとなったイベントを明らかにする理論基盤を構築した。以上より、本論文は博士論文の要件を十分に満たすものであると評価出来る。

6 最終試験の結果の要旨

本論文の内容は、平成26年8月8日午後1時より、図書館視聴覚室において公開の博士学位論文発表会で発表された。口頭発表後、質疑応答が行われ、動物種に固有の腸内細菌叢が発達・維持される理由、ビフィズス菌や乳酸桿菌の新種を確立する際に必要とされる要件、特に DNA-DNA ハイブリダイゼーションの有効性、これらの新菌種の表現系と遺伝的性質、ゴリラやチンパンジーの腸内環境に対するこれらの乳酸菌の適応と宿主にとっての有用性の獲得、メ

タゲノム解析と古典細菌学手法の合体のストラテジー、今後の課題として申請者が現在実施している全ゲノム解析結果に関する予備的な考察の紹介とその情報を用いて行ったゲノムワイドな比較検討からヒトと腸内細菌の共進化を考えるための方法論や研究戦略など、多岐にわたる内容であったが、それぞれ適切に回答した。最終試験の結果としては、審査委員全員一致で合格とした。

以上