HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Isolation of the novel secondary bile acid-producing bacteria from rat cecal contents and clarification of their interaction related to deoxycholic acid formation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	TAWTHEP, SARINYA
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12873号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67746
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sarinya_Tawthep_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（農学）　氏　名　Sarinya Tawthep

審査担当者　主査　教授　横田　篤
副査　教授　小林泰男
副査　講師　吹谷　智

学位論文題名

Isolation of the novel secondary bile acid-producing bacteria from rat cecal contents and clarification of their interaction related to deoxycholic acid formation

（ラット盲腸内容物からの新規二次胆汁酸生成細菌の単離と
デオキシコール酸生成に関わる細菌間相互作用の解明）

本論文は英文 139 頁, 図 25, 表 14, 4 章からなり, 参考論文 1 編が付されている.

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成される両親媒性の分子であり，一次胆汁酸として合成されたのち，十二指腸へと分泌されて脂質の消化吸収に働く．一次胆汁酸の一部は大腸へと流入し, 腸内細菌の作用により様々な二次胆汁酸へと変換される．胆汁酸は細菌の細胞膜に作用するため抗菌活性を示し，一部の二次胆汁酸は高い抗菌活性を示すことから, 胆汁酸は腸内細菌叢の構造を制御する重要な因子であることが明らかにされている．近年，腸内細菌叢が宿主の健康に大きな影響を与えることが広く知られるようになったことから, 二次胆汁酸を生成する腸内細菌を単離し，その胆汁酸代謝の特徴を明らかにすることは，腸内での胆汁酸代謝の機構を明らかにするためだけでなく, 生成した二次胆汁酸が腸内細菌叢と宿主に与える影響を明らかにする上でも非常に重要である．本研究は，ラット盲腸内容物から新規二次胆汁酸生成菌の単離と胆汁酸変換能の解析を行い, さらに代表的な二次胆汁酸であるデオキシコール酸（以下 DCA）の生成に関わる細菌間の相互作用について解析した結果をまとめたものである.

1.　7-oxo 型およびウルソ型二次胆汁酸を生成する新規二次胆汁酸生成菌の単離と胆汁酸変換能の解析

腸内細菌叢の多様性を鑑みると，二次胆汁酸生成菌についての知見は不足している. そこで本研究では, ラット盲腸内容物から新規二次胆汁酸生成菌の単離を試み, 新たに 6 菌種を単離した．これらのうち，*Anaerostipes caccae* D10, *Bacteroides nordii* C5, *Clostridioides difficile* D7, *Clostridium cadaveris* G11 およびそれらの基準株は，ヒトの代表的な一次胆汁酸であるコール酸（以下 CA）およびケノデオキシコール酸の 7 位のヒドロキシ基を酸化して, それぞれ 7-oxo-デオキシコール酸（7-oxo-DCA）および 7-oxo-リトコール酸を生成することを明らかにした．CA から 7-oxo-DCA への変換率は菌株によって異なっていたが，*B. nordii* C5 およびその基準株 JCM 12987^{T} が最も高い変換率を示した．また，*Clostridium disporicum* F4 および *Clostridium subterminale* C4 は CA の 7 位のヒドロキシ基をエピメリ化して，ウルソ

コール酸を生成することを明らかにした．これらに加えて，既知の生成菌種ではあるものの，CA から DCA を生成する *Clostridium scindens* G10 をげっ歯類から初めて単離した．

2. DCA 生成菌における新たな DCA 生成経路の同定

DCA 生成菌である *C. scindens* G10 および 7-oxo-DCA 生成菌である *B. nordii* C5 の胆汁酸変換における相互作用を明らかにするため，CA を基質とした両株の共培養試験を行った．共培養により DCA への変換率は 80%を越え，*C. scindens* G10 の単独培養の場合よりも高い変換率を示したことから，*B. nordii* C5 との共培養により DCA 生成が活性化されることを明らかにした．また *B. nordii* C5 の単独培養では 60%以上の 7-oxo-DCA への変換率を示したが，共培養下では 7-oxo-DCA は数%程度しか検出されなかった．この結果から，「*B. nordii* C5 が CA から変換した 7-oxo-DCA を *C. scindens* G10 が DCA 生成の基質として利用しているのではないか」という仮説を立てた. この仮説を検証するために, CA を添加した培地で *B. nordii* C5 を培養し, 同株を除いた培地で *C. scindens* G10 を培養するという 2 段階培養を行ったところ, 1 段階目の培養で生成した 7-oxo-DCA を *C. scindens* G10 が CA に変換し, さらに DCA へと変換することを明らかにした．異なる DCA 生成菌種である *Clostridium hiranonis* JCM 10541^{T} を用いた場合も同様の結果が得られたことから，上記の仮説が DCA 生成菌において成立すると考えられた．また標品の 7-oxo-DCA を基質とした DCA 生成菌の単独培養試験においても同様の結果が観察された．これらの結果から，DCA 生成菌が 7-oxo-DCA を DCA へと変換する新たな生成経路を有することを明らかにした．

以上本研究では，ラット盲腸内容物から新規二次胆汁酸生成菌を単離し，それらの相互作用の解析から, DCA 生成菌における新たな DCA 生成経路を明らかにした．以上の成果は, 腸内での二次胆汁酸生成の機構の解明に大きく寄与するものである．

よって審査員一同は，Sarinya Tawthep が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた．