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 entire text]
Author(s)	TAWTHEP, SARINYA
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/67747
Type	doctoral thesis
File Information	Sarinya_Tawthep_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文の要約

博士の専攻分野の名称　博士（農学）　氏　名　Sarinya Tawthep

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）

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-オキソ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た．1700 株のラット盲腸内容物由来腸内細菌株に対してスクリーニングを行い，得られた 127 株の候補株について，詳細な菌種同定と二次胆汁酸生成能の評価を行い，最終的に新規二次胆汁酸生成菌として 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（以下 CDCA）の 7 位のヒドロキシ基を酸化して，それぞれ 7-オキソデオキシコール酸（7-oxo-DCA）および 7-オキソ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} がどちらの基質に対しても 24 時間で 90%に至る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 24 時間で 80%以上という高い変換率で生成する

ことを明らかにした. 一方で CDCA を基質とした場合, 両株は同様の反応で CDCA の 7 位のヒドロキシ基がエピメリ化されたウルソデオキシコール酸を生成したものの，その変換率は 15%程度と CA を基質とした場合に比べて明らかに低かった. げっ歯類では，CDCA は 6 位の炭素にヒドロキシ基が付加され，特有の胆汁酸であるムリコール酸に変換されるため，腸内での CDCA の存在量は低いことが知られている．一方 CA はこのような付加反応を受けないことから，腸内での存在量は CDCA よりも高い. これらのことから, *Clostridium disporicum* F4 および *Clostridium subterminale* C4 では，CDCA よりも CA に対する高い変換活性が獲得されたものと推察される．また興味深いことに，これらの菌種の基準株は CA からのウルソコール酸生成活性を全く示さなかったことから, 菌種レベルではなく菌株レベルでの胆汁酸変換能の多様性が存在することが示唆された. これらの新規二次胆汁酸生成菌に加えて，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. これらの二次胆汁酸生成菌の単離は, 今後腸内での胆汁酸変換の動態を明らかにする上で非常に重要な基盤になると考えられる.

2. DCA 生成に関わる新たな細菌間相互作用の解析

上記の研究で単離された *B. nordii* C5 および DCA 生成菌である *C. scindens* G10 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．一方で *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. これらの結果から, 両菌株間の何らかの相互作用により, DCA 生成の活性化がもたらされていると推察された. 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，この相互作用は菌種に特異的なものではなく，DCA 生成菌全般において成立すると考えられた.

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，それらの胆汁酸代謝の特徴を明らかにした．さらに単離菌株を用いた共培養試験から，DCA 生成の活性化につながる新たな細菌間相互作用の存在を見い出すことができた．以上の成果は，これまで不足していた二次胆汁酸生成菌に関する知見を増強するものであり, 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.