HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Physiological and genomic characteristics of Eubacterium sp. c-25 and their implications on the diversity of deoxycholic acid producers in the human gut [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Song, Isaiah Youhak
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14813号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85681
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Isaiah_Youhak_Song_review.pdf, 審査の要旨

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　Isaiah Youhak Song

審査担当者　主　査　准教授　吹谷 智
副　査　教　授　横田 篤
副　査　教　授　小林 泰男
副　査　助　教　前田 智也

学位論文題名

Physiological and genomic characteristics of *Eubacterium* sp. c-25 and their implications on the diversity of deoxycholic acid producers in the human gut（*Eubacterium* sp. c-25 の生理学的およびゲノムの特徴とヒト腸内のデオキシコール酸生産菌の多様性における意義）

本論文は英文 129 頁，図 25，表 10，5 章からなり，参考論文 1 編が付されている．

胆汁酸は肝臓で合成され, 小腸で脂質の消化吸収に働くステロイド化合物である．その一部は大腸へと流入し，腸内細菌によって二次胆汁酸へと変換される．代表的な二次胆汁酸であるデオキシコール酸（DCA）は，ヒトの主要な一次胆汁酸であるコール酸 (CA) から，7 位炭素に付加されたヒドロキシ基の除去反応（7α 脱水酸化反応）により生成する．DCA は強い抗菌活性を示し，腸内細菌叢の制御因子として，また肝がんや大腸がんの発がん因子として働くことが知られている．DCA を生成する腸内細菌は, *Clostridium* 属およびその関連種の 6 種が報告されているのみで，腸内細菌叢における DCA 生成菌の多様性は明らかになっていない．

この課題に対し候補者は，1980 年代に DCA 生成菌として単離されたものの，研究が進められていなかった *Eubacterium* sp. c-25 株について, 生理学的な性状およびゲノムの特徴を明らかにし, 得られた情報を利用した新規変換菌の同定に基づいて, 腸内における DCA 生成菌の多様性の解明を試みた結果を学位論文としてまとめた．

1)　*Eubacterium* sp. c-25 株の生理学的な特徴と比較ゲノム解析

走査型電子顕微鏡による観察を行い, *Eubacterium* sp. c-25 株は *Clostridium* 属とは異なる, 複数の細胞が長軸方向に連結した特徴的な鎖状の形態を示すことを明らかにした．さらに CA から DCA への変換培養試験を行い，既知 DCA 生成菌である *Clostridium scindens* G10 および ATCC 35704^{T} と比較したところ, すべての菌種が pH 7 または 8 で最大生育量および最大 DCA 変換率を示した．最大 DCA 変換率は *C. scindens* 両株において 80～90%に達したのに対し，*Eubacterium* sp. c-25 株の変換率は最大で 50%程度であり，*C. scindens* に比べると低い変換活性を示すことを明らかにした．

Eubacterium sp. c-25 株の完全長ゲノム配列を決定したところ，本菌は単一の環状ゲノムを持ち，総塩基対数は 3.04 Mbp, 2,893 個のタンパク質をコードする遺伝子を有していた（GenBank Accession No. AP024845）．本菌のゲノム中には *Clostridium*

属 DCA 生成菌で見出されている 7α 脱水酸化反応に必要な酵素群の遺伝子（*bai* 遺伝子）のオーソログが存在していたが，*Clostridium* 属と異なり単一のオペロンを形成しておらず，3 つの隣接したオペロンに分かれていることを見出した．培養菌体を用いた定量 RT-PCR 解析により，DCA 生成の基質である CA の存在下で，3 つのオペロンにそれぞれ存在する遺伝子が有意に発現誘導されることを明らかにした．

これらの結果から，本菌が既知の DCA 生成菌とは異なる性状とゲノム構造を持つ新規 DCA 生成菌であることを明らかにした．本研究により，ヒト腸内細菌叢にはより多様な DCA 生成菌が存在する可能性が実証されたと評価できる．

2)　*Eubacterium* sp. c-25 株の系統解析と新規 DCA 生成候補菌種の同定

DCA 生成菌の多様性を探るため，本菌で同定された BaiB 遺伝子のオーソログを有する新規菌種をゲノムデータベースから探索したところ，*Dorea* 属のヒト糞便由来単離菌株 2 種およびマウス盲腸内細菌 *Sporofaciens musculi* が同定された．これらのゲノム配列中の推定 *bai* オペロンの構造は，本菌のそれと酷似しており，*C. scindens* の *bai* オペロンの構造とは異なっていた．一方，16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析を行ったところ，本菌と新たに同定された 3 菌株は互いに系統的に異なり，また既知の DCA 生成菌とも異なる系統群に属することを明らかにした．

さらに *bai* 遺伝子群の中で，DCA 生成菌に特有で他の菌種には保有されていないマーカー遺伝子を探索し，3 種類の遺伝子を同定した．このうちの BaiE 遺伝子の配列を用いて BaiB の場合と同様の探索を行ったところ，ヒト糞便由来の *Dorea* sp. および *Clostridium* sp.，ペンギンのグアノ由来の単離株 *Proteocatella sphenisci* が見出された．これらの推定 *bai* オペロンの構造は *Eubacterium* sp. c-25 株で見出された構造とは異なり，*C. scindens* の *bai* オペロンの構造と類似していた．

これらの結果は，DCA 生成に働く腸内細菌がこれまで考えられていたよりも系統的に多様であり，かつ *bai* 遺伝子群の構造にも多様性があることを初めて明らかにした成果であると評価できる．

以上，本研究では，*Eubacterium* sp. c-25 株は生理学的，系統学的，ゲノム科学的特徴の面からユニークな DCA 生成菌であること，さらに腸内細菌叢における DCA 生成菌の多様性を明らかにした．これらの成果は，腸内細菌による DCA 生成機構の理解ならびに複雑な腸内細菌叢における二次胆汁酸代謝システム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，Isaiah Youhak Song 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．