



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Identification and characterization of <i>Dorea ammoniilytica</i> as a novel deoxycholic acid-producing bacterial species in the human gut microbiota
Author(s)	Kastawa, NI Wayan Eka Putri Gayatri
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16774号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16774
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99619
Type	doctoral thesis
File Information	NI_Kastawa_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



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 Ni Wayan Eka Putri Gayatri Kastawa

審査担当者	主査	教授	吹谷 智
	副査	教授	石塚 敏
	副査	准教授	前田智也

学位論文題名

Identification and characterization of *Dorea ammoniilytica* as a novel deoxycholic acid-producing bacterial species in the human gut microbiota
(ヒト腸内細菌叢における新規デオキシコール酸生産細菌種 *Dorea ammoniilytica* の同定と特性の評価)

本論文は英文 115 頁、図 25、表 12、4 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

生体内で脂質の消化吸収に寄与するステロイド化合物である胆汁酸は、一次胆汁酸として小腸に分泌されたのち、大腸において腸内細菌によりデオキシコール酸 (DCA) などの二次胆汁酸へと変換される。ヒト腸内で最も豊富な二次胆汁酸である DCA は、ヒトの主要な一次胆汁酸であるコール酸 (CA) から、腸内細菌の 7 α -脱水酸化反応により生成する。DCA 濃度の上昇は代謝疾患や大腸がん・肝がんの発症にも関与するため、腸内細菌叢における DCA の生成機構の解明は我々の健康維持にとって重要である。しかし既知の DCA 生成菌は *Clostridium scindens* など少数に限られ、その多様性は十分に解明されていない。一方で近年のメタゲノム解析により、7 α -脱水酸化反応に働く酵素群をコードする *bai* 遺伝子群が複数の分類上の科で同定されていることから、未同定の DCA 生成菌の存在が示唆されている。これらの背景から候補者は、ヒト由来新規 DCA 生成菌の同定を目的として、ヒト糞便からの探索を行い、同定された DCA 生成菌種のゲノムの特徴と生理学的特性を解析した結果を学位論文としてまとめている。

1. ヒト糞便からの新規 DCA 生成菌の探索

第 2 章ではヒト糞便からの新規 DCA 生成菌の探索について述べている。糞便懸濁液を 10^{-1} ~ 10^{-6} に段階希釈し、CA を終濃度 1 mM で添加した GAM 液体培地で培養した。薄層クロマトグラフィーおよび LC-MS 解析により、複数の希釈区において DCA の生成を確認した。続いて、DCA 陽性培養群の生菌数を測定し、 10^7 ~ 10^4 個の生菌を含む希釈液を CA 添加 GAM 培地に接種して DCA 生成能を評価したところ、 10^7 ~ 10^5 個の生菌を接種した複数の培養サンプルで DCA 生成を検出している。最大希釈区である 10^5 個の生菌を接種して得られた DCA 陽性群および陰性群を対象に 16S rRNA 遺伝子を標的とした菌叢解析を行った結果、79 種の Amplicon Sequence Variants (ASVs) を検出し、DCA 陽性群に特異的な 6 種の ASVs を検出している。その中で ASV_44 は DCA 陽性群の細菌叢の約 1.13% を占め、同 ASV の

16S rRNA 遺伝子配列は *Dorea ammoniilytica* および *Ruminococcus* sp. 653 (JCM 18685) の配列と一致することを明らかにした。以上の結果から、これらの細菌を新規 DCA 生成菌の候補として同定している。

2. 新規 DCA 生成菌の同定と特性解析

第 3 章では、前章の探索で同定された *D. ammoniilytica* JCM 34808^T および *Ruminococcus* sp. JCM 18685 の 2 株を用いて、全ゲノム解析および機能的な特性の解析を行っている。CA またはケノデオキシコール酸を基質として変換試験を行った結果、両株とも DCA またはリトコール酸をほぼ 100% の変換効率で生成し、高い二次胆汁酸生産能を持つことを示した。両株はゲノムに完全な *bai* 遺伝子群を保有しており、7 α -脱水酸化能を有することが遺伝的にも裏付けられた。さらに両株は 7 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素および胆汁酸塩加水分解酵素をコードすると推定される遺伝子を有することを明らかにしている。変換試験により機能を検証した結果、両株は前者の機能により、CA から異なる二次胆汁酸である 7-oxo-DCA を生成すること、また後者の機能により、アミノ酸が抱合された抱合型 CA から、アミノ酸を脱離させることにより、DCA 生成の基質として利用できることを明らかにしている。

16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統解析により、両株および他の *Dorea* 属細菌 2 株が同一の系統に属することを明らかにした。*D. ammoniilytica* を含む系統は *C. scindens* などの既知の DCA 生成細菌とは系統的に離れており、新規の DCA 生成菌を含む系統であることを示した。さらにゲノムの平均ヌクレオチド同一性解析の結果、これらの菌株はすべて *D. ammoniilytica* に分類されると判定される結果を得ている。またこれらの菌株は、異なる系統の DCA 生成菌 *Claveliimonas bilis* で観察された分断型の *bai* オペロン構造を共有していた。代謝経路予測に基づいた炭水化物の利用特性の解析では、両株が単糖類、D-マンニトール、デンプンを利用可能であり、既知 DCA 生成菌とは異なる炭水化物利用能を示すことを明らかにしている。

以上本研究では、ヒト糞便からの探索により同定された *D. ammoniilytica* を既知の DCA 生成菌とは異なる機能特性と系統的背景を持つ新規 DCA 生成菌種として明確に位置付け、メタゲノム解析で示唆されていたヒト腸内での DCA 生成菌の多様性の一端を実証した。これらの成果は、ヒトの健康に関与する腸内細菌の機能の解明ならびに腸内細菌叢における DCA 生成機構の解明に大きく貢献するものである。

よって審査員一同は、Ni Wayan Eka Putri Gayatri Kastawa 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。