

研究課題：異種動物における宿主寿命と腸内細菌叢に関する研究

氏名：亀崎 圭太

所属：政策・メディア研究科 2年 BI プログラム

要旨

動物の消化管内には多種多様な微生物が腸内細菌叢を形成しており、宿主が摂取した食物を分解することによって宿主の消化吸収活動に関与していることが知られている。近年の研究によって腸内細菌叢は消化活動だけでなく、免疫応答やストレス耐性、神経伝達物質の分泌コントロールを始めとした生体内代謝反応の調整など様々な役割を担っていることが明らかとなってきた。自然環境下では免疫力や食物からの栄養吸収効率、ストレス耐性の低下等は死と密接に関係していることから、本研究では腸内細菌と野生動物の自然環境下での寿命(=生存可能な時間)には何らかの関連があると考えた。マウスを用いた研究においては無菌マウスと **Specific pathogen-free** マウスで寿命が異なる事や、プロバイオティクス投与による寿命延伸効果が既に知られており、少なくともマウスにおいては腸内細菌叢と寿命との間に関係性がある事が既に示されている。しかし、地球上には多様な動物種が存在しており、これまで得られている知見が普遍的なものであるのかという点については明らかとなっていない。そこで、本研究では各種データベースより収集した複数の動物種の糞便から得られた腸内細菌叢プロファイルを基に寿命と腸内細菌叢の相関関係を明らかにする事を目指した。代表的な塩基配列データベースである **DDBJ Sequence Read Archive (DRA)**、**Sequence Read Archive (SRA)**、**The European Nucleotide Archive (ENA)**を用いて **16S rRNA** 遺伝子配列を検索・収集し、19 プロジェクト、23 動物種の腸内細菌叢プロファイルを得た。これらのデータについてメタデータを基に解析したところ、寿命と腸内細菌叢の関係性について明らかにする事はできなかったが、これまで細菌叢解析の結果に対して影響が大きいと考えられてきた **16S rRNA** 遺伝子中の領域の違いによる影響よりも動物種の違いによる影響の方が大きいということが示唆された。一方で、データベース上には解析に必要なメタデータが不足している事から本研究の解析に利用できなかったデータも多量に存在しており、データ登録時のメタデータ付加の徹底が不十分であることも明らかになった。今後、増え続けると考えられる公共データベースに登録されるデータには適切にメタデータが付与されなければ再解析等に利用する事ができず、データの価値が半減してしまう。そのため、本研究のような統合解析において重要と考えられるメタデータの項目を示し、将来の公共データベースの充実を期待したい。

キーワード

1. 寿命、2. 腸内細菌叢、3. 16S rRNA、4. データベース

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科
亀崎 圭太

第1章 序論

1.1 寿命に関する知見

動物の寿命は何によって決定されるのかという点はこれまで多くの研究者が取り組んできたテーマである。これまでに行われてきた多くの研究によって、様々な要因が寿命を短縮する事や、死を誘導する事が明らかになってきた。これらの研究をもとに様々な仮説が提唱されてきたが、近年まではプログラム説とフリーラジカル説という2つの説が特に支持されてきた。プログラム説(1-4)は、「遺伝子の中に老化がプログラムされている」とするもので、寿命遺伝子や長寿遺伝子を探索する研究が行われている。プログラム説の有力な証拠としてテロメアの存在が挙げられる。真核動物の染色体は直線状であり、その両端には末端が存在する。染色体の両端に存在する末端以外にもDNA末端は存在しており、それらは分解や修復の対象として酵素などの標的となるが、正常な染色体の末端がこれらの作用を受けることは避けなければならない。そこで、真核動物の染色体の両端にはテロメアと呼ばれる、特徴的な繰り返し配列を持つDNAと様々なタンパク質からなる構造体によって保護されている(5、6)。この構造体はテロメアーゼと呼ばれる酵素によって修復を受け無い場合、細胞分裂のたびに短くなっていくことが知られており(7)、細胞老化の十分条件の1つとして知られている。また、遺伝的要因で発生する早老症患者のテロメアを健常者と比較すると短いことが知られている(7)。一方で、1956年にハーマンによって提唱されたフリーラジカル説(8-10)とは「生体内で発生するフリーラジカル(電子の数が奇数の高酸化性分子)によって酸化修飾を受けたDNAやたんぱく質、脂質が蓄積する事で最終的に細胞機能が破綻する事で老化が起こる」との考え方で、酸化メカニズムや修復メカニズムの解明に関する研究が行われている。

これらの2説以外の観点でも寿命に影響する様々な研究が行われている。昆虫や魚類などの変温動物は環境温度によって平均寿命と最長寿命が変動する事が知られており、キイロショウジョウバエは環境温度が10℃から30℃の間で2倍以上寿命に差が生まれる(11)。また、実験用に用いられるラットやマウスは食事制限によって寿命が延びる事が実験的に知られている。これらの効果が霊長類にも同様に現れるのかを確認する事を目的として行われた2009年に発表されたアカゲザルを対象とした研究事例では、低カロリー食を与えた群は通常食を与えた群に比べて疾患への罹患率が下がり、生存率も高くなった(12)。この事から低カロリー食は寿命の延長に効果があると考えられるようになった。しかし、2012年に発表された同様の研究では高カロリー食を与えられた群の方が長寿であった事が報告され(13)相反する結果が得られているが、カロリー量の違いによって寿命に影響が現れる事は確認された。その他にも、実験動物に対して強制水泳や電気ショックなどの物理的苦痛や過密飼育による心理的苦痛などを通じてストレスを与えると寿命が短くなる事が知られている(14)。先進国を対象として幸福度が高いと回答した群と低いと回答した群での平均寿命には大きな差があった事が知られている(15)。

このように寿命に対して様々なアプローチで研究がなされてきているが、地球上に存在する多くの動物は加齢に伴う老衰による死ではなく、疾病に罹患する事による病死が主な死因である。そこで本研究では寿命を生存可能な時間と定義づけ研究活動を行った。

1.2 腸内細菌叢とは

腸内細菌叢とは動物の腸管内に存在する微生物群の総称であり宿主と深く関わっている存在である(16)。動物は出産時に腔内細菌叢に晒された時より様々な最近に曝される。呼吸によって空気中の、授乳や食事によって様々な細菌叢に曝され、その過程において腸内細菌叢を獲得していく。腸内細菌は年齢や性別、外部環境、食生活や健康状態など様々な因子によって影響を受ける事が知られている。腸内細菌叢は宿主が摂取した食物を分解する事によって宿主の消化吸收活動に関与していることが明らかになっており、海藻類をよく摂取する日本人には海藻由来の多糖類を分解する事ができる腸内細菌が存在する(17)。ヒトの腸内細菌叢は3つのエンテロタイプに分類する事ができるという報告などによって(18)、腸内細菌叢は食生活によってタイプが分かれるという報告がなされている。腸内細菌叢は宿主の消化吸收活動に深く寄与する一方で、その他にも様々な影響を宿主に与えている事が近年の研究によって明らかになってきた。肥満(19-23)や糖尿病(24, 25)、アトピー性皮膚炎(26, 27)、大腸炎(28)等様々な疾病に腸内細菌叢が関係している事が報告されている。また、腸内細菌叢は神経伝達物質であるセトロニンの分泌コントロールにも寄与している(29)事が明らかになっている。こういった知見から腸内細菌叢は宿主の健康に深く関与している事が明らかになっており、プロバイオティクスヨーグルト等の健康食品をはじめとした様々な経済活動に繋がっている。さらに健康維持にも関与している事から医療費の削減や健康寿命等の観点からも様々な研究が行われている。また、近年特に注目されている点として免疫機構との関係性が挙げられる。動物には免疫機構と呼ばれる外部環境からの防衛機構が存在しており、ナチュラルキラーT細胞に代表される生まれつき有している機構である自然免疫や、抗原を認識した樹状細胞が発したシグナルをきっかけとした反応系に代表され後天的に獲得される獲得免疫の2種類が存在する。近年の研究によって腸内細菌叢はこの免疫機構に大きな影響を与えている事が明らかになってきた(30)。腸管内には100兆個をこえる*Bacteroides*門や*Firmicutes*門を中心とした多種多様な細菌が生息しており、これらの腸内細菌は腸管内で代謝活動を行っている。腸管免疫系は環境要因によって制御されており、GFマウスにおいてはパイエル板を始めとしたリンパ組織やTh17細胞などの数が少ないことが知られている。そのためSPFマウスと比較して感染リスクが高いことが知られている(31, 32)。腸管における恒常性の維持に一役を担う腸管上皮細胞は腸内細菌から様々な影響をうけており、無菌マウスにセグメント細菌とよばれる腸内細菌叢を接着させることで小腸の腸管上皮細胞に腸管上皮細胞からの血清アミロイドAなどの産生を促進し、Th17細胞の分化を誘導することが可能であることが知られている(33, 34)。

1.3 細菌叢解析に関して

シーケンス技術が発達するまでは培養法を用いて細菌叢解析が行われてきた。しかし、シーケンス技術の発達に伴い腸内細菌の多くは難培養性でありこれまでの研究処方では全体像の把握は不可能であったことが明らかになった。その後、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(Fluorescence *in situ* hybridization: FISH)法やDGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法等様々な手法が用いられてきた。近年では末端標識制限酵素断片多型分析(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: T-RFLP)法とクローンライブラリー法の2種類が主に使用されている。T-RFLP法は末端を蛍光標識したプライマーを用い、16S rRNA 遺伝子を増幅させた後に複数種類の制限酵素を用いて断片に化させたもののうち蛍

光されたもののみをシーケンサーによって検出する手法である。クローンライブラリー法とは、培養を経ずにサンプルから直接DNAやRNAを抽出し、PCR法を用いて細菌の場合16S rRNA遺伝子を増幅させる。このため難培養微生物の情報についても取得することが可能である。その後得られたPCR産物に対してシーケンサーを用いて塩基配列を決定し、データベースと比較する。現在データベースに登録されているデータの多くは Roche 社の 454 GS FLX シーケンサーや illumina 社の MiSeq で測定されたものである。454 GS FLX シーケンサーはリード長が長い反面、1runあたり測定可能なリード数が少ない。一方でMiSeqはリード長が短く、1runあたりの測定可能なリード数が多い特徴を持つ。クローンライブラリー法で測定された16S rRNA遺伝子配列を用いた研究を学術誌に発表する際には、多くの雑誌においてその生データを国立遺伝学研究所(National Institute of Genetics : NIG)、National Center for Biotechnology Information (NCBI)、European Molecular Biology Laboratory(EMBL)の3機関が運営するいずれかのデータベースに登録することを義務付けている。

1.4 寿命と腸内細菌叢の関係性について

腸内細菌叢は宿主に様々な影響を与え、疾病とも深いつながりがある事から寿命と腸内細菌叢の関係性についても研究が行われている。無菌(Germ-Free: GF)マウスとSPF(Specific pathogen-free)マウスではGFマウスの方が長寿である事が知られている(35)。これはマウスの死因の多くが感染症への罹患によるものであり、無菌マウスは外部環境から隔離された環境下で飼育されるため感染リスクが無く、結果的に寿命が伸びていると考えられる。また、腸内細菌叢が産生するポリアミンがマクロファージにおける炎症性サイトカインの合成を阻害することにより全身性炎症を減少させることが知られているが(36)、老化の進行に伴いポリアミンの産生量は減少し全身性炎症を発症する。そこで減少するポリアミンをプロバイオティクスの摂取により補う事で全身性炎症を抑制し、マウスの寿命を延ばす事に成功した(37, 38)報告がある。このようにマウスにおいては腸内細菌叢と寿命との間に関係性がある事が既に明らかとなっているが、これ迄に挙げた研究例は実験動物として技術が確立しているマウスを用いて得られたデータを元に得られた結果である。自然界には数多くの動物種が存在しており、多様な腸内細菌叢が形成され様々な機能を担っており、細菌は周囲の環境によってその挙動が変わる事が知られている。このことから、これまでに得られた知見が全ての動物種に対して有効かどうかは明らかでは無い。そこで、本研究では様々な動物種に関する知見を収集し解析する事で宿主の寿命と腸内細菌叢がどのような関係性にあるのか明らかにしたいと考えた。しかし、様々な動物種を対象とした寿命の研究を行うためには各動物に適した飼育環境を用意する必要があり、またその飼育のために多大なリソースが必要となる。更に多くの動物種は複数年生きる事から筆者が研究可能な期間を考慮すると自ら飼育し実験する事は難しい。そこでデータベースに登録された様々な研究プロジェクトのデータを用いて解析を行う方法を選択した。

第 2 章 対象と手法

2.1 16S rRNA 遺伝子配列データの収集

国立遺伝学研究所(National Institute of Genetics : NIG)が運営する DDBJ Sequence Read Archive (DRA)と National Center for Biotechnology Information (NCBI)が運営する Sequence Read Archive (SRA)、European Molecular Biology Laboratory(EMBL)が運営する The European Nucleotide Archive(ENA)の 3 データベースを用いて 16S rRNA 遺伝子配列を用いた腸内細菌叢を対象とした研究プロジェクトを検索しデータを収集した(図 1)。検索時のワードは様々な動物種の学名や俗称を用い、各データベースにて付与されているタグからも検索を行った。この時点で収集した動物種は 37 種で合計プロジェクト数は 250 であった(付録 1)。

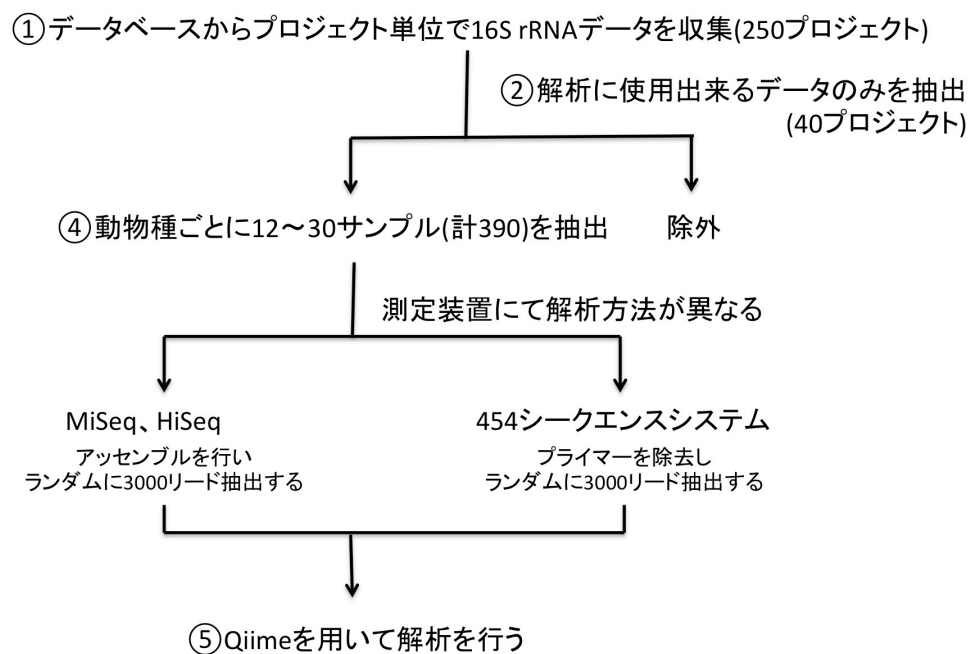


図1. 本研究におけるフローチャート

本研究で行った解析をフローチャートで示した。最終的に解析に用いた390サンプルについては表1で述べた。

2.2 利用可能なデータの抽出

収集したデータについて解析に使用できるかどうか判断するために更に調査を行った。調査を行った点は次の通りである。

- (1)論文として公開されているか。
- (2)疾病関連の研究であるか。

(3)サンプル情報が適切に付加されているか。

これは疾病関連の研究であった際にコントロールのみを抽出するためである。

(4)測定装置がRoche社の454シーケンス技術を用いて測定されたデータであるかどうか。454シーケンスシステムで測定されたデータであればプライマー情報が必要となるためである。

(5)プライマー情報が取得できるか。454シーケンス技術で測定したデータはプライマーが除去されることなく登録されているため、プライマーを外す必要があるため。

これらについて調査を行った上で解析に使用するサンプルを決定した。解析方法については次項で述べるが、動物種毎のサンプル数の偏りが非常に大きかったことから、収集したデータの中からそれぞれ12-30サンプルを選別し(表1)解析を行った。

表1 本研究において使用したデータの一覧

動物種名	プロジェクト番号	サンプル数	機器	read形式	Region	平均寿命	生息地	分類	食性
イグアナ	ERP016749	20	HiSeq	single	不明	15	森林	爬虫類	雑食
イヌ(ビーグル)	SRP092477	12	MiSeq	pare	V4	10	平地	哺乳類	雑食
ウサギ	SRP068764	20	MiSeq	pare	不明	3	草原	哺乳類	草食
ウシ	SRP074884	20	MiSeq	pare	不明	20	草原	哺乳類	草食
ウニ	SRP062365	10	MiSeq	pare	不明	10	水中	棘皮動物	雑食
ウマ	SRP060764	20	MiSeq	single	V4	20	草原	哺乳類	草食
オオカミ	SRP090443	20	HiSeq	single	不明	15	森林	哺乳類	肉食
キツネザル	ERP014686	20	MiSeq	single	不明	20	森林	霊長類	草食
コウモリ	ERP016131	19	HiSeq	single	不明	3	森林	哺乳類	雑食
ゴールデンハムスター	SRP018334	12	454	single	V7-9	3	草原	哺乳類	雑食
タンガニカ湖シグレット5種	SRP045780	30	454	single	V1-2	3	水中	魚類	草食
タンガニカ湖シグレット5種	SRP045780	30	454	single	V3-4	3	水中	魚類	草食
シカ	SRP045434	20	MiSeq	single	不明	20	森林	哺乳類	草食
ブラックジャッカル	SRP044660	20	MiSeq	pare	不明	15	森林	哺乳類	雑食
チーター	SRP044660	20	MiSeq	pare	不明	10	草原	哺乳類	肉食
ツバメ	ERP016512	20	MiSeq	single	不明	2	森林	鳥類	雑食
ネコ	SRP043386	20	MiSeq	single	V4	15	平地	哺乳類	肉食
ブタ	SRP065751	20	MiSeq	pare	不明	10	森林	哺乳類	雑食
マウス	SRP050978	17	MiSeq	pare	V3-4	2	平地	哺乳類	雑食
ツリーイグアナ	SRP062680	20	MiSeq	single	V4	15	森林	爬虫類	雑食

2.3 細菌叢プロファイルの解析

収集したデータのうち454シリーズを用いて得られたデータについてQiimeを用いてプライマー配列とIndex配列を除去した。MiSeqを用いて得られたデータについてはFLASH(39)を用いてアセンブルを行い、その後クオリティ値 =25 を基にクオリティコントロールを行

った。サンプル毎にリード数が異なる為、3000リードをランダムに抽出して解析に用いた。その後、全データを統合しQiimeを用いてOTUを生成し解析を行った。主成分分析 (principal component analysis; PCA)と orthogonal partial least squares discriminate analysis (OPLS-DA)はSIMCA-P+ software (ver. 12.0, Umetrics)を使用してそれぞれ解析を行った。

第 3 章 結果と考察

本研究における最初の目標では、動物の寿命を大きく左右する疾病と、その罹患に影響するプロバイオティクス投与実験を行ったデータを収集し、動物種間でのその挙動の変化を比較する事を目指した。しかし、データの収集を行った結果多くのデータにはサンプル情報や実験条件等本解析を行うために必要なメタデータが付与されておらず目的の解析を行う事ができなかった。そこで収集する事ができた動物種のメタデータを基に複数の観点から解析を行った。

3.1 寿命と腸内細菌叢との関係性について

寿命と腸内細菌叢との間に普遍的な関係性が存在するかという観点から解析を行った。その結果を図2に示す。

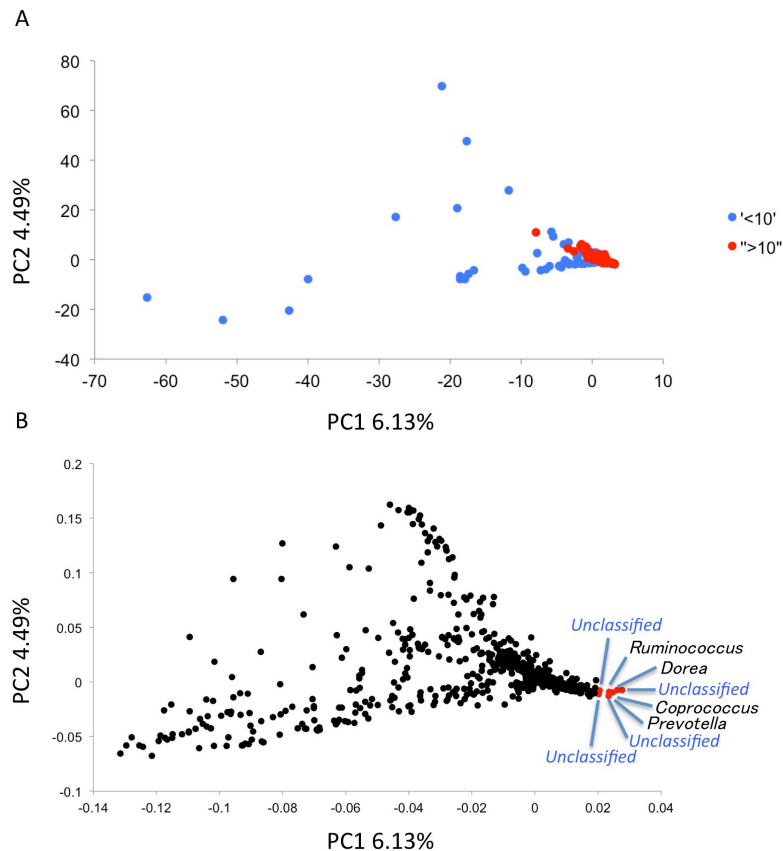


図2. PCA解析の結果(寿命)

390サンプルに対して寿命と腸内細菌叢との関係性をみることを目的としてPCA解析を行った。A) PCA解析の結果。赤は平均寿命が10以上のサンプル群を、青は10未満のサンプル群をそれぞれ指している。B) PCAのLoadingを示している。

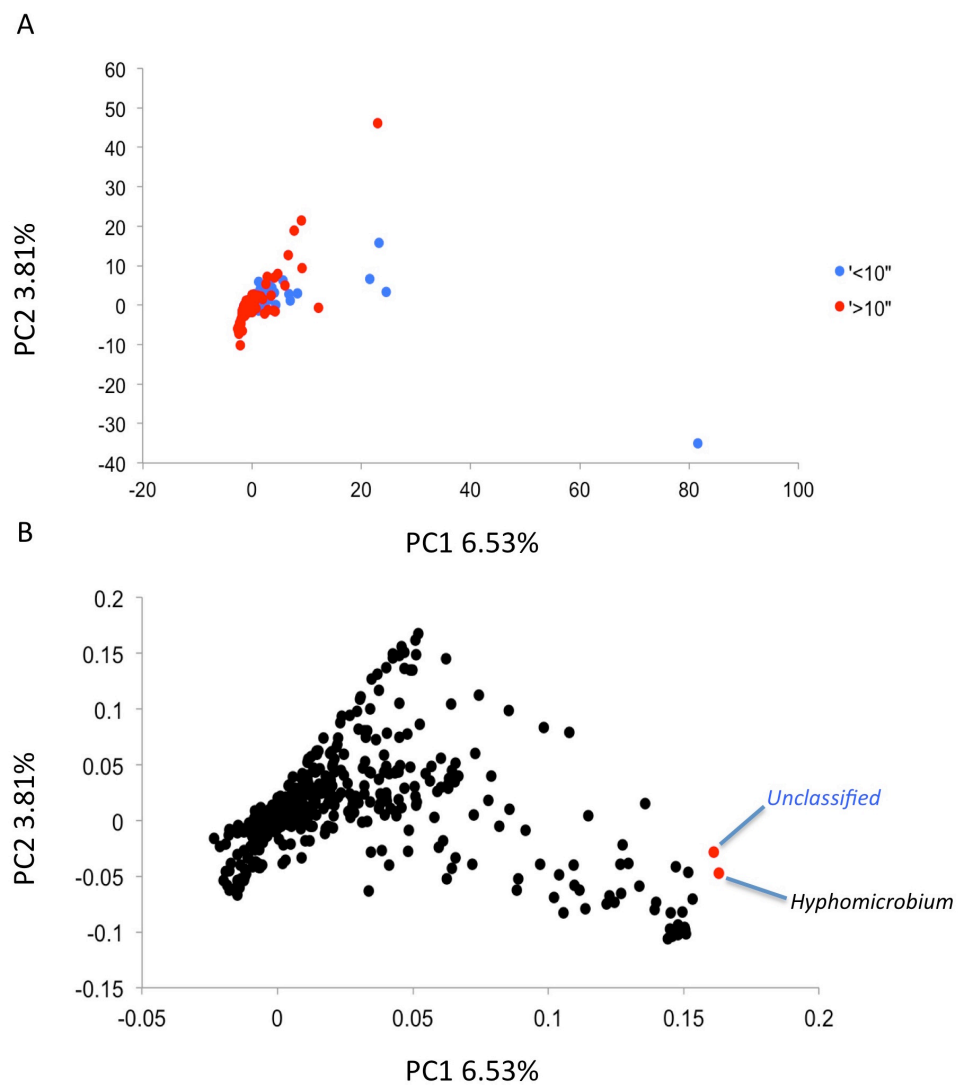


図3. PCA解析の結果(寿命：水中に生息する動物を除く)

収集した390サンプルのうち生息環境が水中であるサンプルを除いた320サンプルに対してPCAを行った。A) PCA解析の結果。赤は平均寿命が10以上のサンプル群を、青は10未満のサンプル群をそれぞれ指している。B) PCAのLoadingを示している。

3.2 生息環境と腸内細菌との関係性について

生息環境と腸内細菌叢との間に関係性が存在するかという観点から解析を行った。その結果を図3に示す。また、水中動物が特異的な様相を呈していた為、水中動物を除いたサンプルについても同様の検証を行いその結果を図4に示した。

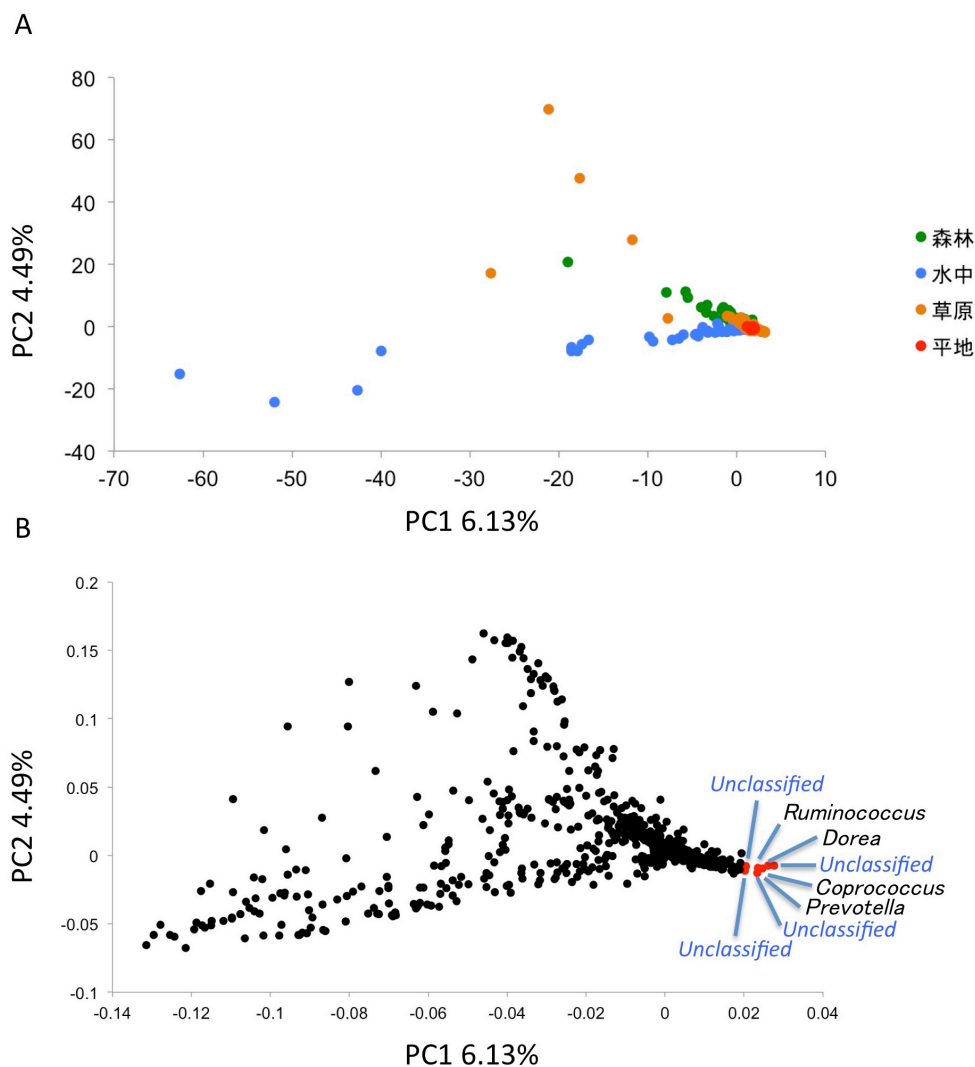


図4. PCAの結果(生息環境)

390サンプルに対して生息環境と腸内細菌叢との関係性をみることを目的としてPCA解析を行った。A) PCA解析の結果。緑が森林を、青が水中を、オレンジが草原を、そして赤が平地をそれぞれ示している。B) PCAのLoadingを示している。

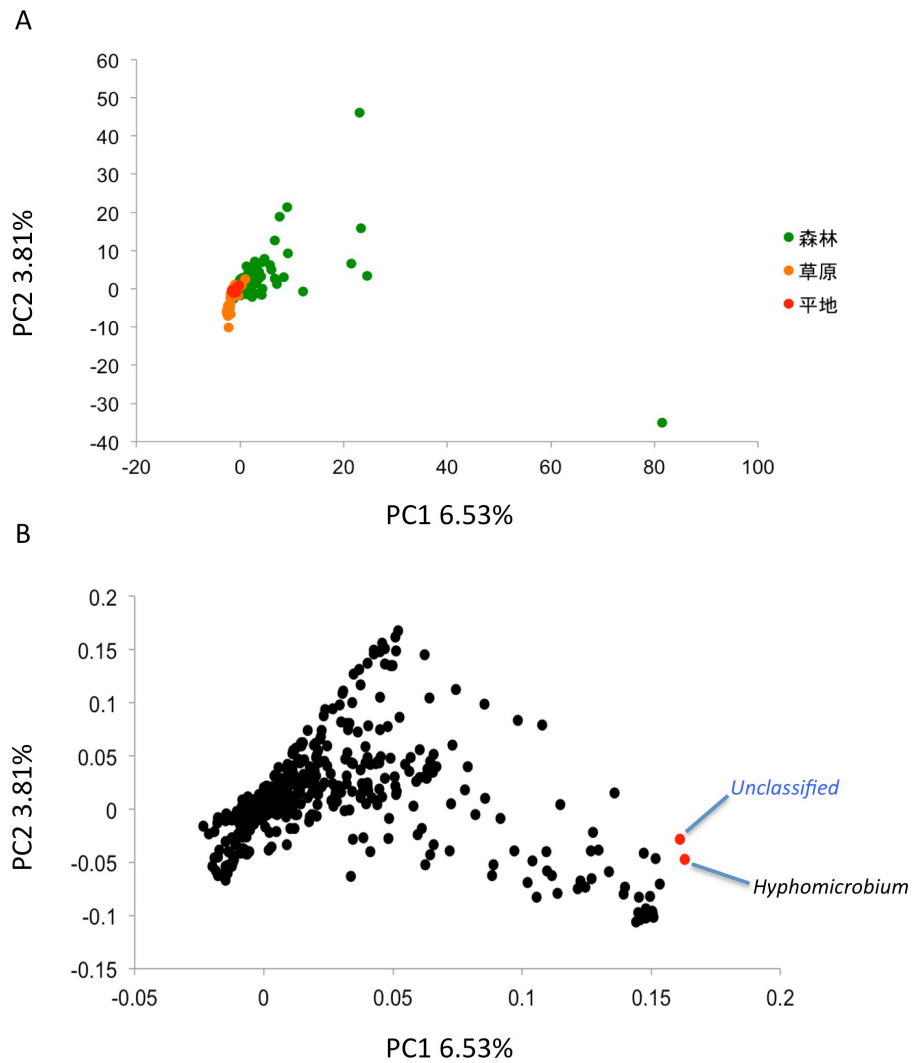


図5. PCAの結果(生息環境：水中に生息する動物を除く)

収集した390サンプルのうち生息環境が水中であるサンプルを除いた320サンプルに対してPCAを行った。A) PCA解析の結果。緑が森林を、オレンジが草原、赤が平地を示している。B) PCAのLoadingを示している。

3.3 食性との関係性について

食性と腸内細菌叢との間に関係性が存在するかという観点から解析を行った。その結果を図5に示す。また、水中動物を除いたサンプルについても同様の検証を行い図6に示した。

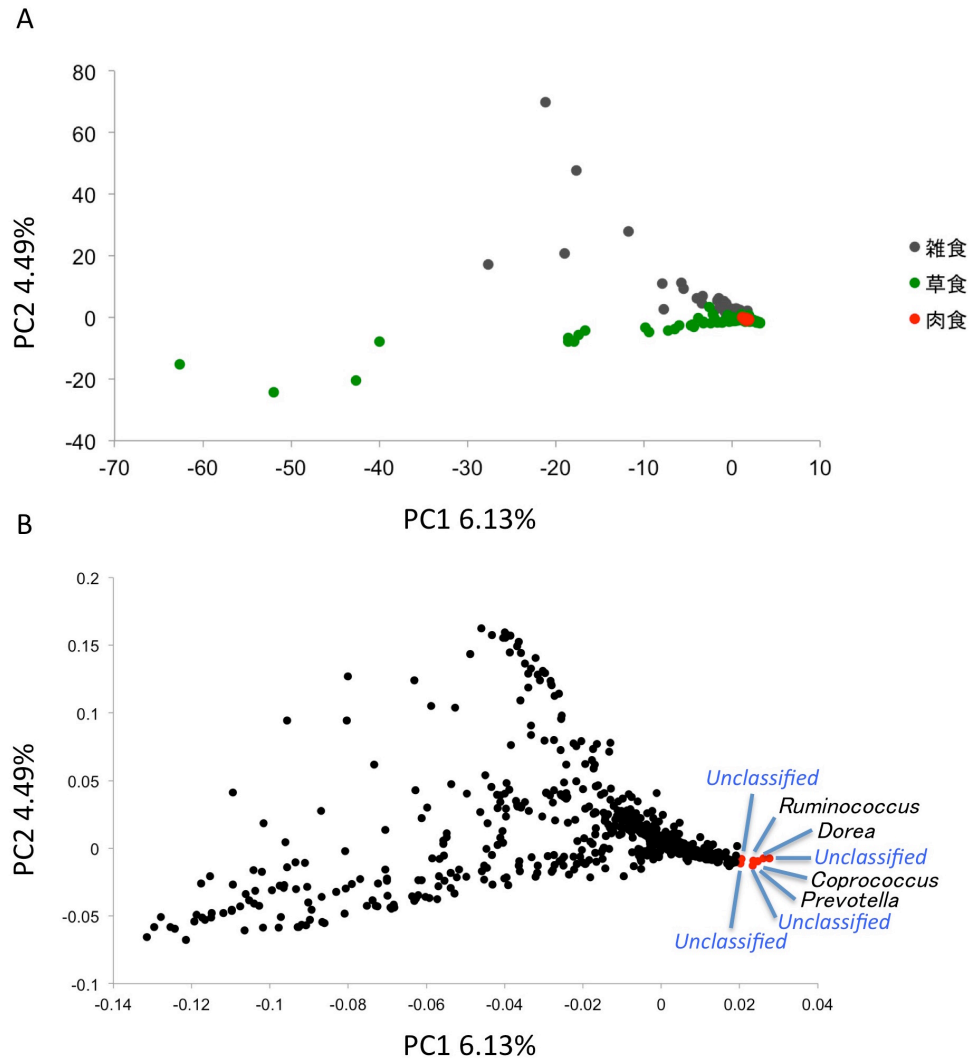


図6. PCAの結果(食性)

390サンプルに対して食性と腸内細菌叢の関係を見ることを目的としてPCAを行った。A) PCA解析の結果。灰色が雑食を、緑が草食、赤が肉食を示している。B) PCAのLoadingを示している。

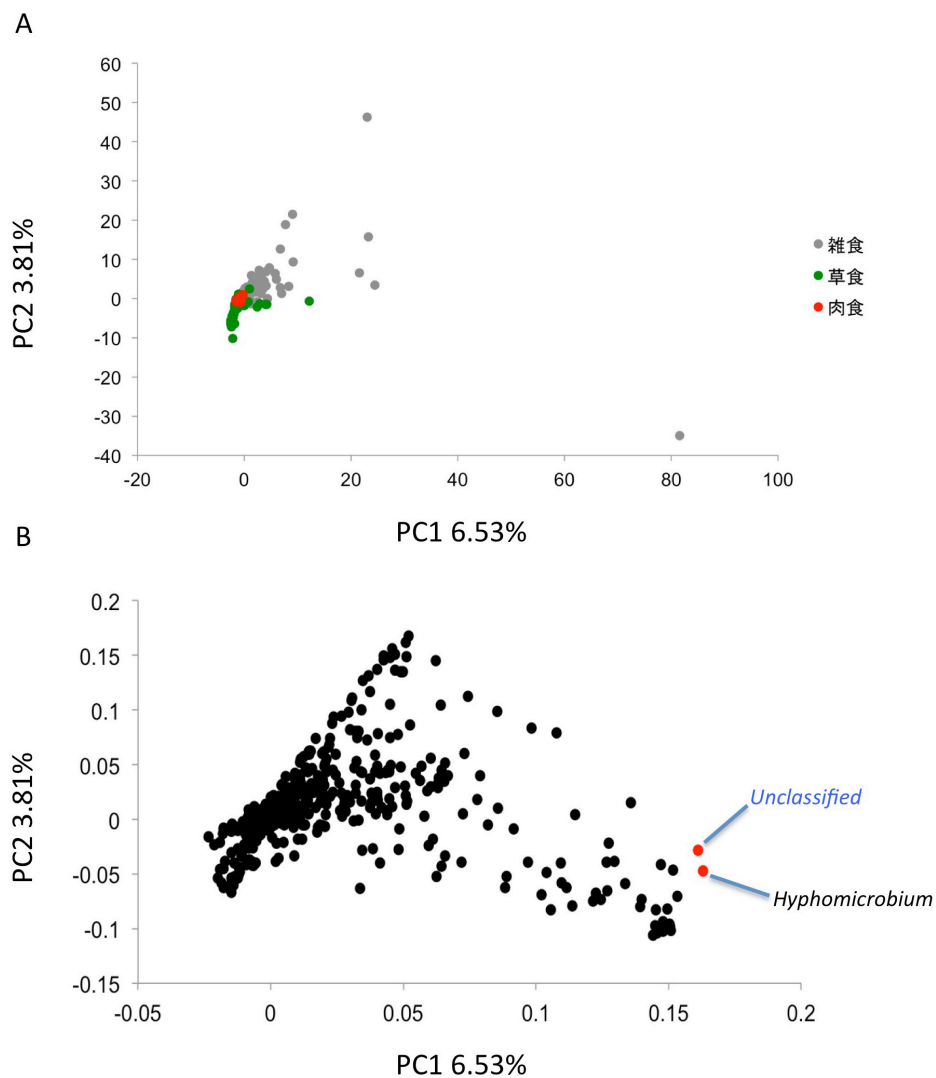


図7. PCAの結果(食性：水中に生息する動物を除く)

収集した390サンプルのうち生息環境が水中であるサンプルを除いた320サンプルに対してPCAを行った。A) PCA解析の結果。灰色が雑食を、緑が草食、赤が肉食を示している。B) PCAのLoadingを示している。

3.4 16S rRNA遺伝子配列内の可変領域の違いによる影響について

regionの違いを評価する為に同一のサンプルに対して異なるregionで増幅したサンプルを用いて解析を行った。その結果を図7に示す。また、水中動物を除いた複数の動物種で同様の検証した結果を図8に示す。

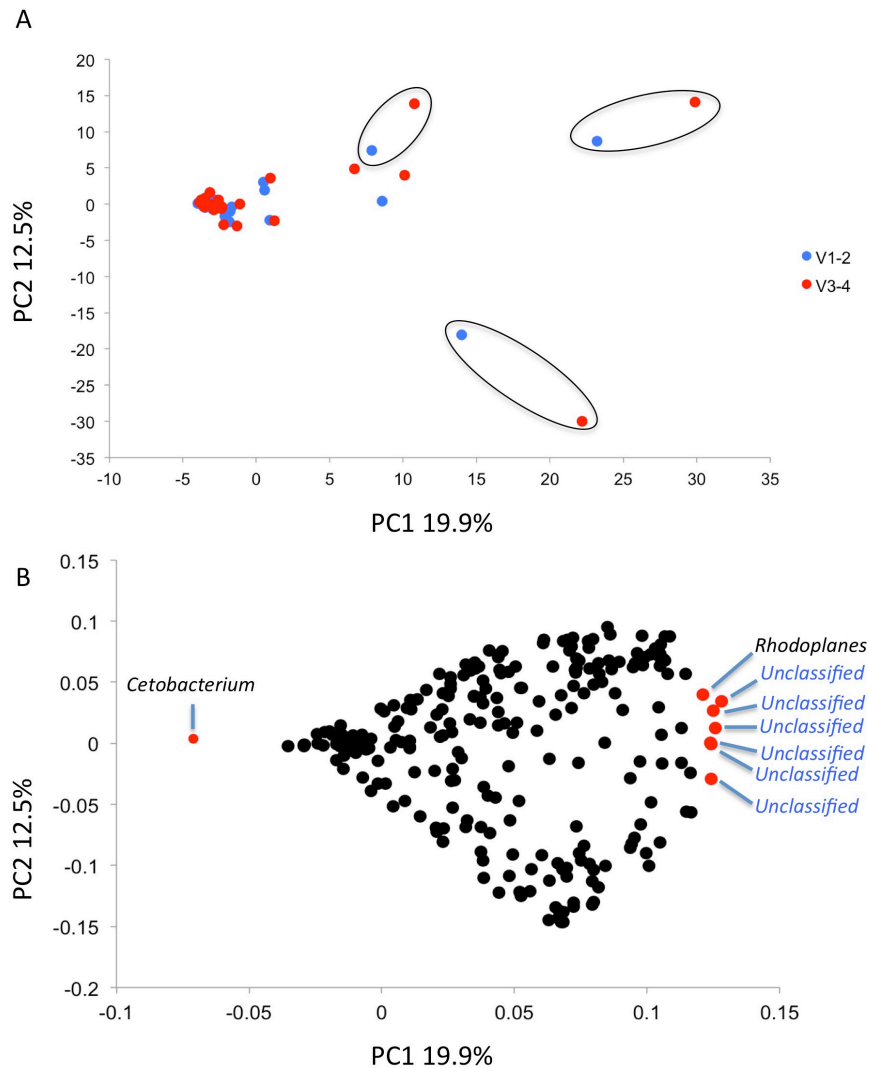


図8. PCAの結果(regionの違い：同一サンプルでのregionの違いによる影響)

同一のサンプルに対して異なるregionを増幅したサンプルを用いてregionの違いによる影響を評価した。A) PCA解析の結果。青はV1-2領域を、赤はV3-4領域を増幅したサンプルをそれぞれ示している。枠で囲まれているサンプルは共通の個体を示す。B)PCAのLoadingを示している。

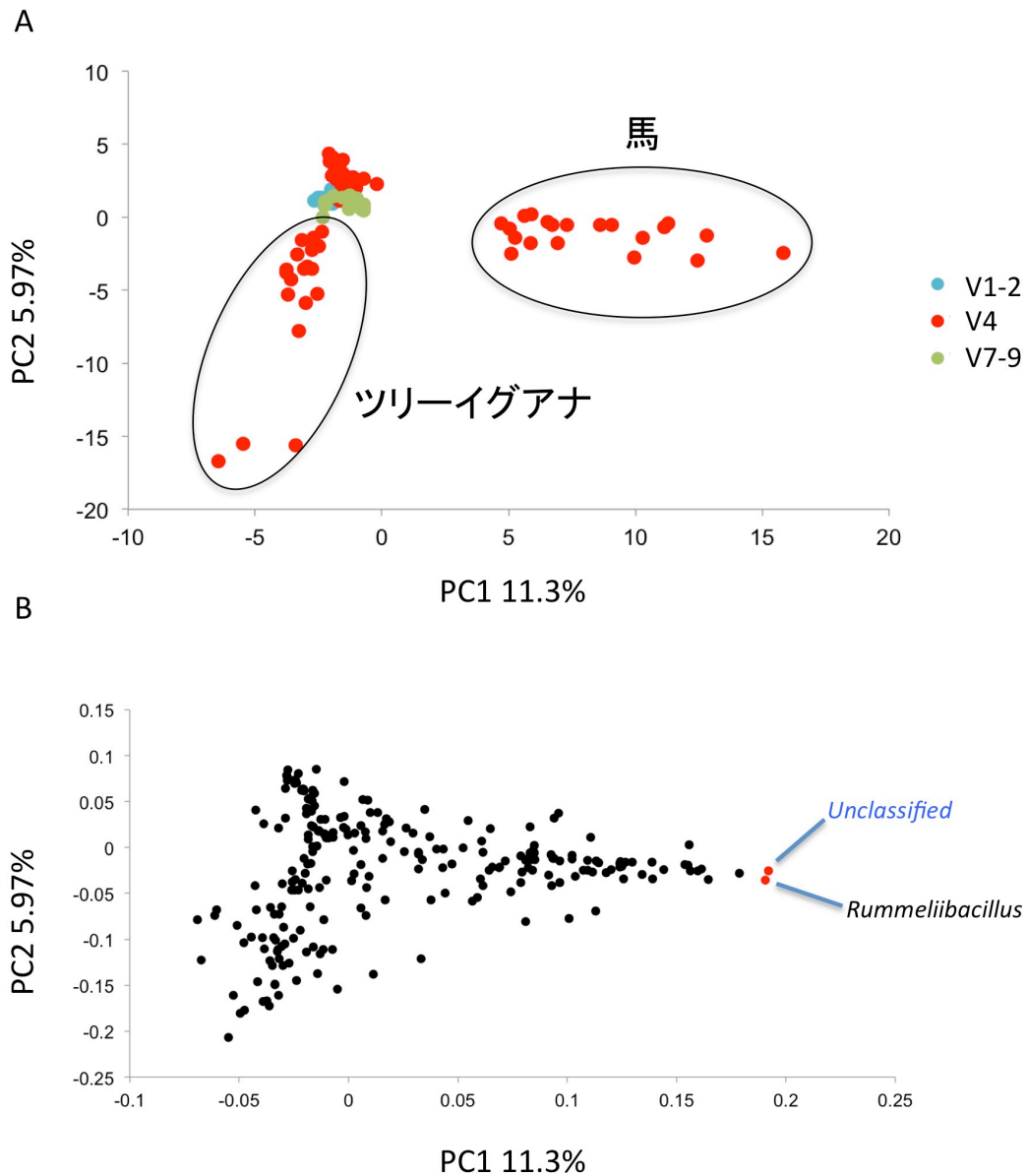


図9. PCAの結果(regionの違い：水中に生息する動物を除く)

異なるregionを増幅した複数の動物種を含むサンプルを用いてregionの違いによる影響を評価した。A) PCA解析の結果。青はV1-2領域を、赤はV4領域、緑はV7-9領域を増幅したサンプルを示している。B) PCAのLoadingを示している。

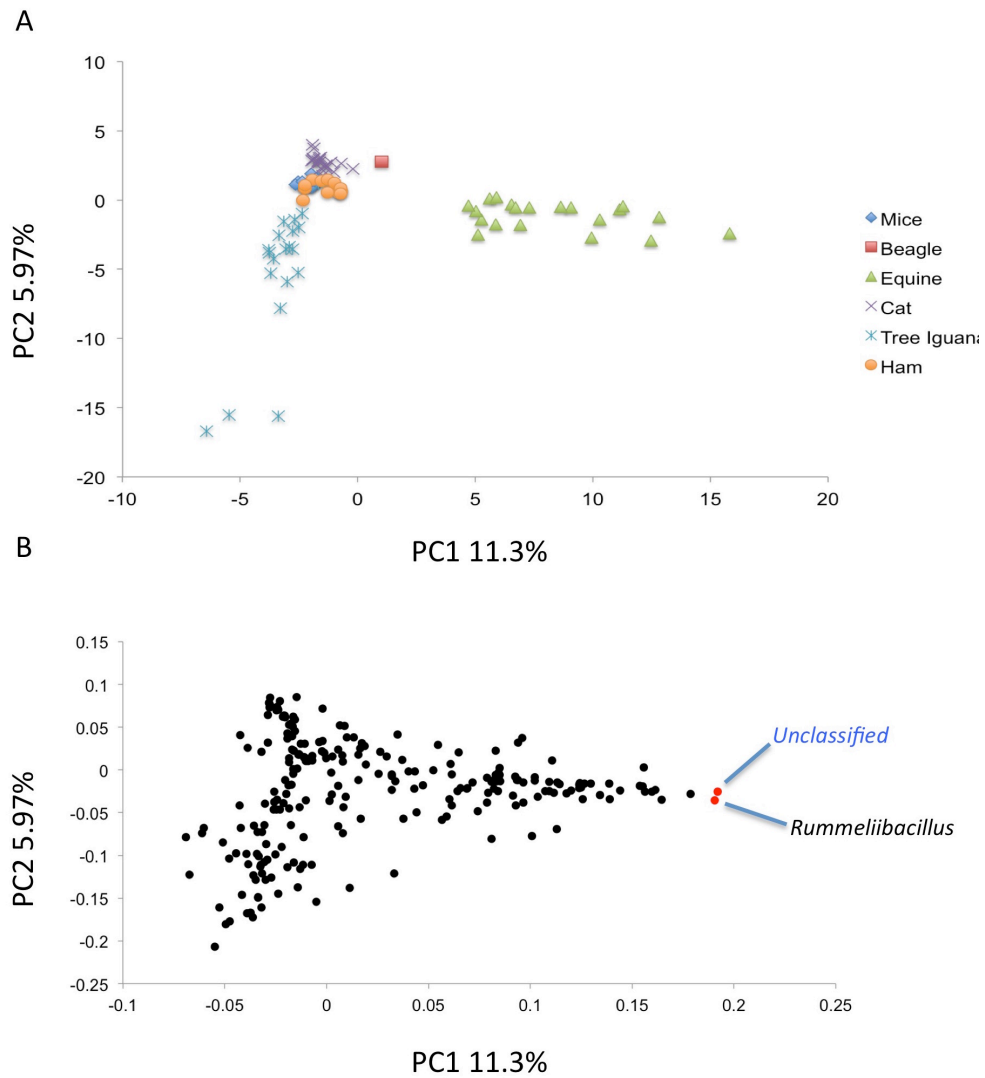


図10. PCAの結果(regionの違い：水中に生息する動物を除いた動物種別)

異なるregionを増幅した複数の動物種を含むサンプルを用いて動物種の違いをみた。A) PCA解析の結果。濃青はマウス、赤はビーグル犬、緑は馬、紫が猫、青がツリーイグアナ、レンジがハムスターを示している。B) PCAのLoadingを示している。

第 4 章 議論

本研究ではデータベースから取得したデータを元に解析を行うことを目指した。16S rRNA遺伝子配列データの多くが登録されているDRA、SRA、ENAの3種のデータベースよりデータを収集し解析に用いた。37動物種 250プロジェクトを収集したが、16S rRNA遺伝子配列解析において主流なソフトウェアであるQiimeを用いた解析のために必要なデータが取得できないものを除外し、また解析においてサンプルのメタデータが取得できないものを更に除外した。また、動物種ごとに収集できたサンプル数に大きな差があったため、実験手技による影響等を避けるため同一のプロジェクトから12-30サンプルを抽出し解析に用いた。その結果解析に使用できたのは、23動物種 390サンプルであった。しかし、当初の目的である多種多様な動物種における腸内細菌叢と宿主との関係性について解析を行うために適切なサンプルを収集することはできなかった。

そこで、収集したデータを基に解析に用いた動物種のメタデータに関して解析を行った。寿命と生息環境、食性の違いによる影響についてPCA解析を行った(図2, 4, 6)。また、水中に生息する動物サンプルが他と異なる様相を呈していることから、水中に生息する70サンプルを除外して再度解析を行った(図3, 5, 7)。しかしながら、水中生物のサンプルを除外したにも関わらず海水、淡水及び土壌に広く見いだされるグラム陰性の非芽胞形成偏性好気性桿菌である*Hyphomicrobium*が検出された。また、水中に生息する動物を除外し比較した結果、*Dorea*や*Prevotella*、*Coprococcus*などの陸上生物の口腔内や腸内に存在する細菌が共通している事が見て取れる。しかし、草食動物の胃などに存在するグラム陽性菌の一属であり、セルロースの分解能力を持つ事が知られている*Ruminococcus*は草食の動物群に寄与しているわけではなかった。(図6)。また、先行研究において食性の違いが腸内細菌叢に大きな影響を与えている(18, 40)ことが明らかになっているが、本解析においても草食と雑食で異なる傾向を示すことが示唆された(図6, 7)。

16S rRNA遺伝子配列を用いた細菌叢解析に対してバイアスを与える影響について調査を行ったところ、シーケンシング時に対象とする16S rRNA遺伝子配列内の可変領域の違い(41)と実験時の抽出法の違いによる影響(42)が16S rRNA遺伝子配列を用いた細菌叢解析に影響を与える可能性が高いことが示唆されていた。そこで、本研究で収集したサンプル内に同一のサンプルに対して異なる16S rRNA遺伝子配列内の可変領域を増幅したサンプルが存在したため2群間で比較を行った(図8)。しかしながら、16S rRNA遺伝子配列内の可変領域による違いは明確に観測することができず、同一個体同士で固まる傾向が示された。また、収集したサンプルの中で16S rRNA遺伝子配列内の可変領域が判明しているサンプルを抽出し、全サンプルと水中に生息するサンプルを除いた2種類の解析を行った結果(図9, 10)においては動物種の違いによる影響が大きいという結果が得られた。このことから、先行研究で示されている16S rRNA遺伝子配列内の可変領域による影響は存在するものの、動物種や個体間での違いによる影響がそれを勝る可能性が示唆された。しかし、本研究において使用したデータに対しては抽出方法に関するメタデータは付加されておらずその影響について議論することはできなかった。

本研究ではデータベースより16S rRNA遺伝子配列データを収集し解析を行うことを目指したが、現状のデータベースには第三者が解析を行うために必要なメタデータの多くが付与されておらず解析を行う事ができない事が明らかになった。次世代シーケンサーはバーコード配列と呼ばれるサンプルを判別する為の塩基配列を付加し測定を行うため、バー

コード配列の情報が登録されていない生データのみでは解析を行う事ができない。また、サンプル別に登録がされている場合においても各サンプルがどのようなサンプルであるのかを示す情報、454シーケンスシステムを用いて測定が行われたサンプルに関してはプライマー情報など様々な情報を取得できなければ解析を行う事ができない。また、データにどのようなバイアスがかかっているかを評価し、その補正を行うためには454シーケンスシステム以外の測定法であってもプライマー情報やDNA抽出方法など様々なメタデータが必要となる。そこで、シーケンスコストの低下が進み、今後増加していくであろう様々な動物種のシーケンスデータを有効に活用するためにはより詳細な情報をデータベースに登録すべきである。また、データベースには論文として投稿されているものだけでなく、大学の卒業論文など様々な媒体で発表されているものもあり、参照できない媒体に登録されているものも数多く存在する。こういったことからデータベースに登録する際に付加すべき情報(表2)を提言する。

表2. データベース時に登録することを提言する情報一覧

付加する情報	付加する必要性
region	解析に必要であると共に 補正の必要性を検討するため
抽出法	補正の必要性を検討するため
各サンプル のメタデータ	様々な視点からの研究に 貴重なリソースを利用するため
実験種類	研究の目的に沿うデータであるかについて 効率的に判断する為
投稿先の情報	使用機材や実験条件など 詳細な情報を取得する為

第 5 章 結論

本研究では16S rRNA遺伝子配列データベースより情報を取得し解析を行うという手法を用いて腸内細菌叢と宿主の寿命(=生存可能な期間)の関係性について探る事を目的として研究を行った。宿主と腸内細菌叢との間に関係性がある事はマウスで既に示唆されており、他種動物においても同様の知見が得られるのであれば有用なプロバイオティクスの開発に繋がる重要な発見となる。更に、本研究で用いたデータベースより収集したデータを基に様々な視点から解析を行う事ができる有用な手法である。更に、近年の急速なシーケンシング技術の発達とコストの低下によって今後16S rRNA遺伝子配列を対象とした研究は加速度的に増加していく事が期待される事から将来性も期待出来る。一方で、本研究で明らかになったように現状のデータベースには第三者が解析を行うために必要なメタデータの多くが付与されておらず解析を行う事ができないデータが非常に多く活用する事ができないのが実情である。本研究においても十分なサンプルを収集する事ができず当初の目的である多種多様な動物種における腸内細菌叢と宿主との関係性について解析を行う事は叶わなかった。しかしながら、収集したデータを基に解析を行った結果、先行研究によって明らかになっている食性の違いによる腸内細菌叢への影響に関して類似した結果を得る事ができた。また、これまで16S rRNA遺伝子配列内の可変領域の違いが腸内細菌叢解析の結果に大きく影響をあたえるとされてきたが、個体間の差や動物種の違いはその影響よりも大きい事が示唆された。しかしながら、腸内細菌叢解析の結果に大きく影響をあたえるとされている、糞便からDNAを抽出する際に使用する方法による違いについては本解析では検証することができなかった。

今後加速度的に登録データが増えていくことが期待されることからサンプル数を増やすことによって補正を行うことも1つの手法ではあるが、寿命に関する研究は短期間では行えない。そのため、データベース登録時に適切なメタデータを登録し、その情報を基に様々な補正を行っていくことが重要になる。そのため、本研究のような統合解析において重要と考えられるメタデータの項目を示し、将来の公共データベースの充実を期待したい。

参考文献

1. Hrubant HE (1964) Specific Genetic Control of Life Span. *J. Gerontol.* 19:451-452.
2. Clark AM & Gould AB (1970) Genetic control of adult life span in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 5(2):157-162.
3. Wright WE & Hayflick L (1975) Nuclear control of cellular aging demonstrated by hybridization of anucleate and whole cultured normal human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 96(1):113-121.
4. Goodrick CL (1975) Life-span and the inheritance of longevity of inbred mice. *J. Gerontol.* 30(3):257-263.
5. Blackburn EH & Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120(1):33-53.
6. Greider CW & Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43(2 Pt 1):405-413.
7. Glick B, Perkins WD, Rosse C, & Schwarz MR (1975) Comparison of lymphocyte populations bearing surface immunoglobulins in avian bone marrow, bursa, spleen and thymus. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 49(3):332-340.
8. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11(3):298-300.
9. Harman D (1972) Free radical theory of aging: dietary implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 25(8):839-843.
10. Harman D (1981) The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78(11):7124-7128.
11. Miquel J, Lundgren PR, Bensch KG, & Atlan H (1976) Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 5(5):347-370.
12. Colman RJ, et al. (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325(5937):201-204.
13. Mattison JA, et al. (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489(7415):318-321.
14. Thiebot MH, Martin P, & Puech AJ (1992) Animal behavioural studies in the evaluation of antidepressant drugs. *Br. J. Psychiatry Suppl.* (15):44-50.
15. Frey BS (2011) Psychology. Happy people live longer. *Science* 331(6017):542-543.
16. Holmes, E. et al. (2012) Gut Microbiota Composition and Activity in Relation to Host Metabolic Phenotype and Disease Risk. *Cell Metabolism*, 16, 559-564.
17. Hehemann, J. H. et al. (2010) Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464, 908-12.
18. Arumugam, M. et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174-80.
19. Samuel BS, et al. (2007) Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(25):10643-8.

20. Sarmiento-Rubiano LA, et al. (2007) Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Res Microbiol* 158(8-9):694-701.
21. Nadal I, et al. (2012) Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 33(7):758-67.
22. Chang CJ, et al. (2015) *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat Commun*. 6:7489.
23. Wu M, et al. (2015) Genetic determinants of in vivo fitness and diet responsiveness in multiple human gut *Bacteroides*. *Science* 350(6256).
24. Everard A, et al. (2011) Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60(11):2775-86.
25. Halmos T, Suba I (2016) Physiological patterns of intestinal microbiota. The role of dysbacteriosis in obesity, insulin resistance, diabetes and metabolic syndrome. *Orv Hetil* 157(1):13-22
26. Bjoerkstein, B. et al. (1999) The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 29, 342-6.
27. Bjoerkstein, B. et al. (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 108, 516-20.
28. Devkota S , et al. (2012) Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10^{-/-}* mice. *Nature* 5:487(7405):104-8.
29. Yano JM, et al. (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161(2):264-276.
30. Ryu Okumura & Kiyoshi Takeda. (2016) Crosstalk between intestinal epithelial cells and commensal bacteria. *領域融合レビュー*, 5, e007
31. Kamada, N., Kim, Y. G., Sham, H. P. et al.(2012) Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science*, 336, 1325-1329
32. Kitajima, S., Morimoto, M., Sagara, E. et al.(2001) Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free *IQI/Jic* mice. *Exp. Anim.*, 50, 387-395
33. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, M. et al.(2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139, 485-498
34. Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M. et al. (2015) Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell*, 163, 367-380
- 33.
35. Tazume S, et al. (1991)Effects of germfree status and food restriction on longevity and growth of mice. *Jikken Dobutu*;40(4):517-22.
36. Nishimura, K. et al.(2006). Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *J. Biochem.*, 139, 81
37. Matsumoto M, et al. (2011) Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One* 6(8):e23652

38. Kibe R, et al. (2014) Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. *Sci Rep* 4:4548.
39. Tanja Magoč, et al. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Genome analysis* Vol. 27 no. 21:2957–2963
40. Ley RE, et al. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320(5883):1647-1651.
41. Shengqin Wang. (2016) Improving the microbial community reconstruction at the genus level by multiple 16S rRNA regions. *Journal of Theoretical Biology*. Volume 398 1-8
42. 松木隆広. (2006) 糞便サンプルからの DNA の抽出法. *腸内細菌学雑誌*. 20, 259-262.