

# (猪飼 桂) 論文内容の要旨

## 主 論 文

### Nitrogen fixation and *nifH* diversity in human gut microbiota

ヒト腸内微生物叢における窒素固定活性と *nifH* 遺伝子の多様性

(猪飼桂、板倉学、西嶋傑、鶴丸博人、須田瓦、蔦谷匠、冨塚江利子、田所聖志、馬場淳、小谷真吾、夏原和美、森田彩子、米田穰、Andrew R. Greenhill、Paul F. Horwood、井上潤一、大熊盛也、本郷裕一、山本太郎、Peter M. Siba、服部正平、南澤究、梅崎昌裕)

(掲載雑誌名・*Scientific Reports* 6, Article number: 31942 2016 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻

(主任指導教員：山本太郎教授)

## 緒 言

窒素固定は、原核生物が窒素分子を生物が利用可能な窒素態であるアンモニアに還元する反応で、多くの生態系において生物に必要な窒素源の供給に寄与している。特に植物や無脊椎動物の共生細菌叢による窒素固定が、宿主動植物や生態系にとって必須の役割を果たすことが明らかとされてきた一方で、ヒトを含む脊椎動物の共生細菌叢の窒素固定については知見がほとんどない。1970年代に、窒素摂取量が恒常的に少ないパプアニューギニア(PNG)人の腸内微生物叢が着目され、その糞便から単離した細菌が窒素固定能を持つと報告された。しかしながら、詳細な解析はなされておらず、ヒト腸内微生物叢において実際に窒素固定が行われているかは不確かなままであった。

本研究では、ヒト腸内微生物叢の窒素固定能の解明を目的として、ヒト糞便の窒素固定活性の測定ならびに窒素固定に必要なニトロゲナーゼ還元酵素遺伝子(*nifH*)の多様性解析を試みた。

## 対象と方法

PNG人19名と日本人9名を対象とした。PNG人の窒素摂取量は41.8–148.0 mg/体重 kg/日、日本人の窒素摂取量は170.9–273.3 mg/体重 kg/日であった。各個人から糞便サンプルを採取し実験に供した。

窒素摂取量が標準必要量(105 mg/体重 kg/日)と同等以下のPNG人4名、標準必要量より多いPNG人2名と日本人2名の凍結糞便サンプルを、 $^{15}\text{N}_2$ ガスに暴露し、糞便サンプルによる $^{15}\text{N}$ 取込量を測定した。また、日本人5名の糞便サンプルを使用して、窒素固定活性の排泄後の経時変化の影響をアセチレン還元法による窒素固定活性測定により検証した。

次に、PNG人6名と日本人4名の糞便サンプルからDNAとRNAを抽出し、*nifH* 遺伝子配列のPCRおよびRT-PCR増幅による検出と、増幅産物の塩基配列解析を行った。取得した*nifH*の代表配列について定量PCRを行い、糞便サンプル中の遺伝子

コピー数を推定した。

さらに、PNG 人 16 名と日本人 2 名、加えて共同研究者による日本人 100 名の糞便 DNA メタゲノムデータを取得し、*nifH* およびニトロゲナーゼ遺伝子 *nifDK* 配列を抽出した。公開されているヨーロッパ 3 カ国と中国のヒト腸内微生物叢メタゲノムデータについても同様の情報解析を行い、ヒト腸内細菌叢の *nifH* 遺伝子を網羅的に分子系統解析した。

## 結 果

PNG 人と日本人の糞便サンプルの  $^{15}\text{N}_2$  取込実験の結果、全てのサンプルにおいて  $^{15}\text{N}$  の取り込みが確認され、窒素固定速度 (0.065–0.147 nmol/サンプル g/時) と宿主の窒素摂取量に有意な相関はみとめられなかった。オートクレーブ処理した糞便サンプルでは  $^{15}\text{N}$  の取込みはなかった。また、アセチレン還元法によっても、日本人の糞便サンプルが窒素固定活性を持つことを確認した。その活性は、排泄後 24 時間以内に著しく低下し、窒素固定速度と排泄後の時間が有意な負の相関を示すことも明らかにした。

次に、PNG 人と日本人糞便サンプルから抽出した DNA および RNA を用いて、*nifH* 遺伝子の塩基配列解析を行った。分子系統解析の結果、取得した *nifH* 遺伝子及び転写産物配列は 2 つの系統群に分類された。一方は *Klebsiella* 属の *nifH* と 99% の塩基配列相同性を示し、他方は哺乳類腸内由来の *Clostridiales* 目細菌の *nifH* と 97% 以上のアミノ酸配列相同性を示した。これらの *nifH* 遺伝子の特異的定量 PCR の結果、PNG 人および日本人の糞便サンプルには、 $10^5$ – $10^9$  コピー/サンプル g の範囲の *nifH* 遺伝子が存在した。

PNG、日本、中国、およびヨーロッパ 3 カ国の腸内微生物叢メタゲノム中の *nifH* 配列を相同性検索により取得し、分子系統解析した結果、上記の *Klebsiella* 属と *Clostridiales* 目細菌のいずれかの *nifH* と 97% 以上の高いアミノ酸配列相同性をもつ *nifH* のみが検出された。同時に、各メタゲノムデータ中に、*Klebsiella* 属と *Clostridiales* 目細菌と推定される *nifDK* 配列が存在することも確認した。

## 考 察

PNG 人と日本人の糞便が窒素固定活性を示したことから、PNG と日本を含む上記 6 カ国のヒト腸内微生物叢から *Klebsiella* 属と *Clostridiales* 目の *nifHDK* 配列が検出されたことから、ヒト腸内微生物叢が宿主窒素摂取量にかかわらず広く窒素固定能をもつことが強く示唆された。

本研究のデータに基づき計算したヒト腸内微生物叢の窒素固定量は、ヒトの窒素摂取必要量に対してその 0.01% 以下であり、窒素固定の宿主の窒素栄養への寄与は非常に小さいものと考えられる。しかしながら、ヒト糞便サンプルの窒素固定活性は排泄後に著しく低下していたことから、ヒト腸内における実際の窒素固定活性は、より高い可能性がある。