

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06034・19K21171

研究課題名（和文）純血種犬を用いた細菌叢に影響を与える宿主の新規遺伝子の探索

研究課題名（英文）Analysis of association between fecal and oral microbiome and host genomic characteristics using purebred dogs

研究代表者

水上 圭二郎（Mizukami, Keijiro）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：20727721

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、純血種犬の細菌叢解析を行い、細菌叢に関する宿主のゲノム領域を同定することを目的とした研究である。

最初に我々は、同一環境下で飼育されている柴犬53頭の直腸便を用いて、一般性質に関する細菌叢の特徴を分析した。その結果、腸内細菌叢が加齢に伴い変化することを同定した。

次に、その性質を用いて、宿主の遺伝的特徴と腸内および口腔細菌叢の関連性をゲノムワイド関連解析によって調べた。その結果、複数の細菌において関連性が示唆されるゲノム領域が検出された。今後、再現実験や機能性研究によりこれらの関連性の有無をより明確にする必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体の細菌叢は様々な疾患と関係しており、その重要性が益々注目されている。近年、細菌叢構成の変化に宿主の遺伝的素因も影響することが報告され、より正確な細菌叢の解釈には遺伝的背景が重要であると考えられている。

今回我々は、同一環境下の純血種犬の特性を利用し、少数検体を用いて細菌叢の特徴とそれに関連する遺伝的特徴の同定を試みた。その成果の一つとしてイヌの腸内細菌叢が年齢により変化すること明らかにし、細菌叢研究における年齢情報の重要性を確認した。さらに、特定の細菌の量と関連する宿主のゲノム領域を同定したため、これらの細菌や領域の詳細な解析によって、今後の細菌叢研究に有益な知見が得ることが可能となった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify host's genomic region associated with fecal and oral microbiome using 53 purebred Shiba dogs.

First, we analyzed changes in fecal microbiome based on general characteristics, and revealed fecal microbiome changes depending on aging in dogs.

Next, we analyzed the association between fecal and oral microbiome and genetic characteristics using genome-wide association study incorporating with age information. As a result, some bacteria showed association with single nucleotide polymorphisms, suggesting that some genomic regions in dogs would have effect on the abundance of specific bacteria in feces and oral. Reproductive experiments and the subsequent functional analyses are required in order to confirm these association.

研究分野：獣医遺伝学

キーワード：細菌叢解析 加齢性変化 腸内細菌 ゲノムワイド関連解析

1. 研究開始当初の背景

生体に存在する細菌叢は、宿主の生体機能と密に関係している。特に、細菌叢構成の異常 (dysbiosis) は様々な疾患と関連している。例えば、クローン病患者の腸内細菌叢において、多様性の減少や *Clostridium* 属菌の減少などが認められている。近年、一般集団における細菌叢解析の各種データを量的形質とした宿主 DNA に対するゲノムワイド関連解析が行われており、宿主の遺伝子も細菌叢に変化をもたらす重要な因子であることが示された (Hall et al. Nat Rev Genet. 2017)。一例を挙げると、ビタミン D 受容体をコードする *VDR* 遺伝子の多型がヒトの腸内細菌叢の構成を変化させることが報告され、マウス実験において再現性も確認された。

このように、宿主のゲノムを調べることで、細菌叢解析に対する新たな知見が得られ始めている。宿主の遺伝子と細菌叢の関連性については、ヒトとマウス以外の高等生物では調べられていない。細菌叢は宿主の系統学的な違いを強く反映するため、細菌叢に影響を与える新規のゲノム領域がイヌを含む他の高等生物において同定される可能性は極めて高い。これにより、細菌叢変化と疾患の因果関係解明のためのデータが得られ、細菌叢データと遺伝子情報を併せた新規治療法の提案や、多因子性疾患の複雑な発症因子の特定につながる。さらに、宿主と細菌の共生原理の理解や遺伝子の新規機能の発見等の生物学的な知見も得られる。

2. 研究の目的

本研究は、『イヌの腸内および口腔細菌叢に影響を与える宿主の遺伝子を解明し、細菌叢変化と疾患の因果関係解明に繋がる基礎データを作成すること』を目的とした研究である。

3. 研究の方法

我々は、同一環境下で飼育されている柴犬 53 頭の直腸便および 49 頭の口腔スワブを採取し、嫌気条件下にて保管後、細菌の DNA を抽出し、高速シーケンサーにて 16S rRNA の可変領域の塩基配列を決定した。さらに、それらのイヌから血液を採取し、宿主の DNA を抽出後、マイクロアレイを用いてゲノムワイドに分布する 17 万個の一塩基多型 (SNP) の遺伝子型を決定した。

最初に、より正確な解析を行うために、性別や年齢等種々の一般性質に関する腸内細菌叢変化を調べた。得られたシーケンスデータを基に、細菌叢解析用のオープンソースソフトウェアを用いて、細菌叢の特徴を示す各パラメータを分析した。

次に、宿主の遺伝的特徴と細菌叢の関連性を調べた。まず、SNP データから算出した個体間の遺伝的距離と腸内細菌叢構造の類似性と比較した。次に、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) 用のオープンソースソフトウェアを用いて、個体内の菌種の豊富さや各細菌量に関して GWAS を実施した。その際、上記の解析でイヌにおいても加齢が細菌叢に影響を及ぼすことが明らかとなったため、年齢データを共変量として使用した。

同様の解析を口腔細菌叢に対しても実施した。最終的に腸内細菌叢と口腔細菌叢の関連性を調べた。

4 . 研究成果

まず、イヌの一般的性質に関連する腸内細菌叢変化について調べた。性別に関する解析では、細菌叢の個体ごとの多様性や個体間の群集構造の違い、特定の細菌の量に対する性別の影響は認められなかった。一方、加齢に関する解析では、細菌叢の多様性が加齢に伴い減少すること、個体間の年齢差が大きくなる程、細菌叢構造の違いも大きくなることを明らかにした。また、加齢に伴い有意に増加する細菌が存在した。さらに、ネットワークを構成する細菌群を同定し、年齢と有意に相関する細菌群を同定した。これら研究成果は微生物学の国際学術誌 (FEMS Microbiol Lett. 2019;366(8)) にて発表した。

次に、宿主の遺伝的特徴と細菌叢の関連性を調べた。宿主間の遺伝的距離と腸内細菌叢構造の類似性の間に有意な相関は認められなかった。次に、細菌叢解析で得られたデータに対して GWAS を実施した。その結果、個体内の細菌種の豊富さに関連する SNP は存在しなかった。一方、各細菌量に関しては、13 個の細菌において解析 SNP 数での多重補正後に有意な関連を示す SNP が同定された。ただし、解析数での補正を追加した多重補正後に有意差が残るものは存在しなかった。

同様の解析を口腔細菌叢に対しても実施したところ、腸内細菌叢と同様、解析 SNP 数での補正後に 7 個の細菌において有意な関連を示す SNP が同定された。これらの細菌や SNP において、腸内細菌叢と口腔細菌叢の間に共通性は認められなかった。

以上より、本研究により、イヌの細菌叢の特徴が明らかとなったと同時に、細菌量に影響を与えるゲノム領域の存在の可能性が示された。今後、再現実験や機能性研究を行うことによりこれらの関連性の有無をより明確にする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchiyama Jumpei, Matsui Hidehito, Murakami Hironobu, Kato Shin-ichiro, Watanabe Naoki, Nasukawa Tadahiro, Mizukami Keijiro, Ogata Masaya, Sakaguchi Masahiro, Matsuzaki Shigenobu, Hanaki Hideaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Potential Application of Bacteriophages in Enrichment Culture for Improved Prenatal Streptococcus agalactiae Screening	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 552 ~ 552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v10100552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchiyama Jumpei, Shigehisa Ryu, Nasukawa Tadahiro, Mizukami Keijiro, Takemura-Uchiyama Iyo, Ujihara Takako, Murakami Hironobu, Imanishi Ichiro, Nishifuji Koji, Sakaguchi Masahiro, Matsuzaki Shigenobu	4. 巻 163
2. 論文標題 Piperacillin and ceftazidime produce the strongest synergistic phage-antibiotic effect in Pseudomonas aeruginosa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 1941 ~ 1948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-018-3811-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizukami Keijiro, Uchiyama Jumpei, Igarashi Hiroto, Murakami Hironobu, Osumi Takafumi, Shima Ayaka, Ishihara Genki, Nasukawa Tadahiro, Une Yumi, Sakaguchi Masahiro	4. 巻 366
2. 論文標題 Age-related analysis of the gut microbiome in a purebred dog colony	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnz095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水上圭二郎, Dorsey-Oresto A, Raj K, Erings A, Furrow E, Kolicheski A, Giger U
2. 発表標題 ミニチュアシュナウザーにおける遺伝性非定型抗酸菌症に関連する宿主遺伝子の同定
3. 学会等名 第2回日本ワンヘルスサイエンス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imanishi I, Uchiyama J, Matsuda T, Mizukami K, Shimakura H, Nasukawa T, Kamiie J, Kurata K, Fujimura M, Shimakura K, Nishifuji K, Sakaguchi M
2. 発表標題 IgE reactivity to Pacific cod (<i>Gadus macrocephalus</i>) fish allergens in dogs with canine atopic dermatitis.
3. 学会等名 2019 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古澤悠, 水上圭二郎, 阪口雅弘, 矢吹映, 大和修
2. 発表標題 犬の遺伝性腭炎関連遺伝子の検索：トイプードルにおけるSPINK1アレル頻度
3. 学会等名 第15回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今西市朗, 内山淳平, 水上圭二郎, 上家潤一, 那須川忠弥, 藤村正人, 蔵田圭吾, 阪口雅弘
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎犬におけるサカナアレルゲンに対するIgE反応性
3. 学会等名 第2回日本ワンヘルスサイエンス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 那須川忠弥, 内山淳平, 田原口智士, 太田董, 氏原隆子, 松崎茂展, 村上裕信, 水上圭二郎, 阪口雅弘
2. 発表標題 一般遠心機を利用した塩化セシウム密度勾配遠心法によるウイルス精製の検討
3. 学会等名 第2回日本ワンヘルスサイエンス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小方雅也, 内山淳平, 松井秀仁, 那須川忠弥, 渡辺直貴, 水上圭二郎, 村上裕信, 松崎茂展, 花木秀明, 阪口雅弘
2. 発表標題 妊娠中B群連鎖球菌検査におけるバクテリオファージ利用の検討
3. 学会等名 第2回日本ワンヘルスサイエンス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原馬明子, 十川 剛, 水上圭二郎, 田中智夫, 森 健志, 飯塚七海, 守口 徹, 齋藤弥代子
2. 発表標題 犬の認知機能不全症の発症に関わる素因の検討
3. 学会等名 日本脂質栄養学会第27回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水上圭二郎, 内山淳平, 五十嵐寛高, 村上裕信, 大隅尊史, 島綾香, 石原玄基, 那須川忠弥, 宇根有美, 阪口雅弘.
2. 発表標題 加齢によるイヌの腸内細菌叢の変化
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水上圭二郎, 内山淳平, 五十嵐寛高, 村上裕信, 大隅尊史, 島綾香, 石原玄基, 那須川忠弥, 宇根由美, 阪口雅弘.
2. 発表標題 純血種犬コロニーを用いた腸内細菌叢の加齢性変化の同定
3. 学会等名 第3回日本ワンヘルスサイエンス学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----