

Title	ビフィズス菌の比較ゲノム解析によるヒト腸管内への定着メカニズムの解明
Sub Title	Comparative genome analysis of Bifidobacterium longum for elucidating the mechanisms of intestinal colonization
Author	渡部, 翔
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	生命と情報 No.22 (2015. ) ,p.235- 244
JaLC DOI	
Abstract	<p>ヒト腸内細菌叢は、宿主の消化、吸収、代謝への関与をはじめ、免疫機能の活性化や病原菌の増殖抑制といった宿主の恒常性維持に重要な役割を担っている。Bifidobacterium属細菌(ビフィズス菌)に代表されるいわゆる善玉菌と呼ばれる細菌は、整腸作用や感染症の予防をはじめ、腸内を酸性に保つことで悪玉菌の増殖抑制を行うなど様々な働きを持つことが知られている。これらのビフィズス菌はプロバイオティクス製品によって摂取することができるが、その効果には個人差がある。腸内細菌は同じ種であっても個人ごとに株レベルで異なるとの報告もあることから、ビフィズス菌についても個人固有の株が存在し、外来性のプロバイオティクス菌は定着することができないため、プロバイオティクスの効果には個人差があるのではないかと考えられる。そこで、本研究では個人固有のビフィズス菌株の存在やビフィズス菌の腸内定着メカニズムの解明を目指して、複数の健康者から単離したビフィズス菌株の全ゲノム配列比較を行った。本研究では、日本人の腸管内に数多く存在しており、ヒトに有益な効果をもたらすことが知られているBifidobacterium longumを対象とした。Randomly Amplified Polymorphic DNA法を用いて、2名の便から単離された205クローンのB. longumのおおまかなゲノム配列を比較した結果、ヒトの腸内に定着しているB. longumは個人間においてゲノム配列が異なることが示唆された。さらに詳細なゲノム配列を解析するため、次世代シーケンサーを用いて、2名の便から単離された12株のB. longumの全ゲノム解析を実施した。本ダイジェストではそれらの結果について議論を行う。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0235">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0235</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

**Comparative genome analysis of *Bifidobacterium longum* for elucidating the mechanisms of intestinal colonization**

ビフィズス菌の比較ゲノム解析によるヒト腸管内への定着メカニズムの解明

慶應義塾大学 環境情報学部 4 年

渡部 翔

**要旨**

ヒト腸内細菌叢は、宿主の消化、吸収、代謝への関与をはじめ、免疫機能の活性化や病原菌の増殖抑制といった宿主の恒常性維持に重要な役割を担っている。*Bifidobacterium* 属細菌（ビフィズス菌）に代表されるいわゆる善玉菌と呼ばれる細菌は、整腸作用や感染症の予防をはじめ、腸内を酸性に保つことで悪玉菌の増殖抑制を行うなど様々な働きを持つことが知られている。これらのビフィズス菌はプロバイオティクス製品によって摂取することができるが、その効果には個人差がある。腸内細菌は同じ種であっても個人ごとに株レベルで異なるとの報告もあることから、ビフィズス菌についても個人固有の株が存在し、外来性のプロバイオティクス菌は定着することができないために、プロバイオティクスの効果には個人差があるのではないかと考えられる。そこで、本研究では個人固有のビフィズス菌株の存在や、ビフィズス菌の腸内定着メカニズムの解明を目指して、複数の健常者から単離したビフィズス菌株の全ゲノム配列比較を行った。本研究では、日本人の腸管内に数多く存在しており、ヒトに有益な効果をもたらすことが知られている *Bifidobacterium longum* を対象とした。Randomly Amplified Polymorphic DNA 法を用いて、2 名の便から単離された 205 クローンの *B. longum* のおおまかなゲノム配列を比較した結果、ヒトの腸内に定着している *B. longum* は個人間においてゲノム配列が異なることが示唆された。さらに詳細なゲノム配列を解析するため、次世代シーケンサーを用いて、2 名の便から単離された 12 株の *B. longum* の全ゲノム解析を実施した。本ダイジェストではそれらの結果について議論を行う。

**Keywords :** *Bifidobacterium longum*, 腸内細菌, ビフィズス菌, 比較ゲノム解析

## 1. 序論

ヒトの腸内には100~1000種, 100兆個以上の腸内細菌が共生しており, Gut microflora (腸内細菌叢, 重量で約1.5 kg相当) を形成している. これらの腸内細菌は宿主と密接な共生関係にあり, 腸管上皮に抗原刺激を絶えず与えることにより, 出生後の乳児の免疫機能の発達や様々な生理機能発現に関与することが明らかにされてきた. 腸内細菌叢の構成は宿主の食生活, ストレス, 病原菌の感染や老化などによって変化することが知られており<sup>[1]</sup>, 過度に変化すると腸内細菌叢のバランスが乱れた状態であるDysbiosisを誘導する可能性があることが知られている<sup>[2]</sup>. Dysbiosisは, アレルギー性疾患や炎症性腸疾患のみならず, 肥満, 糖尿病やガンの原因となることが報告されており<sup>[3,4]</sup>, 腸内細菌叢を正常に保つことは疾患予防や健康維持のために重要であると考えられている. そのため我々は, 腸内細菌叢のバランスを改善する効果があるとして知られているプロバイオティクスに着目した. プロバイオティクスとは人体の健康に良い影響を与える生きた微生物, またはそれらを含む製品の総称であり, ヨーグルトなどに含まれる*Bifidobacterium*属細菌 (ビフィズス菌) が有名である. ビフィズス菌は, グラム陽性の偏性嫌気性桿菌の一種であり, Bifidobacteriales目*Bifidobacteriaceae*科*Bifidobacterium*属の細菌の総称である. ビフィズス菌は特に日本人の腸内細菌叢に数多く存在しており, 年齢や食生活に依存するものの, 腸内細菌叢全体の10%程度を占めると言われている<sup>[5]</sup>. ビフィズス菌は, 新生児が生まれた直後から数日の間に腸内に定着することが知られており, 母乳を飲んでいる幼児の腸内に存在しているビフィズス菌は, 腸内細菌叢全体の95%にも及ぶ<sup>[6]</sup>. こうした腸内におけるビフィズス菌の重要性は古くから知られており, プロバイオティクスやプレバイオティクスによって, 腸内でその存在量を増やそうとする試みが数多く行われてきた<sup>[7]</sup>. しかし, ヒトの腸内に存在するビフィズス菌は「個人固有」であることが報告されており<sup>[8]</sup>, また外来性のビフィズス菌は摂取をやめると腸内から排除されてしまうことが知られているため<sup>[9]</sup>, 外来生のビフィズス菌は何らかの理由で長期的にヒト腸内に定着することができないと考えられる. そのため, 本研究ではビフィズス菌の腸内への定着メカニズムを明らかにすることを目指し, 将来的にはより高効率なプロバイオティクス法を提案したいと考えた. 本研究においては, ビフィズス菌の中でも日本人の腸内において優勢を占め, かつプロバイオティクス効果<sup>[10,11]</sup>が報告されている*B. longum*を対象とし, 「個人固有」なビフィズス菌の存在の証明と, そのようなビフィズス菌がヒト腸内に定着するメカニズムの解明を目指す. 本ダイジェストでは, 個人固有なビフィズス菌の存在の証明と, 全ゲノム解析について現段階までに明らかになった結果を報告する.

## 2. 対象と手法

対象と手法はページ数の関係で部分的に記載する。詳細は卒業論文本文を参照。

### 2.1. RAPD法を用いた*B. longum*のゲノム配列比較

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法を用いてDNA多型の比較を行った。RAPD法はPCR法を応用し、DNAゲノム配列の差異の比較を行うための手法であり、細菌を種レベル、あるいは株レベルで区別するための手法として広く用いられている<sup>[12, 13]</sup>。RAPD法で用いるプライマーは、10塩基程度と通常のPCR法より短く、ゲノム中の様々な場所にプライマーが結合することで多様な長さの増幅断片が生成される。従って、増幅産物のバンドパターンをアガロースゲル電気泳動によって比較することで、容易にゲノム配列の差異を比較することができる。本研究では、ビフィズス菌種の判別に利用可能な2種類のプライマーを用いた (P2 : 5'-GATCGGACGG-3', P16 : 5'-TCGCCAGCCA-3')<sup>[14, 15]</sup>。PCRのテンプレートとして、各菌株のゲノムDNAは100 ng/reactionになるように添加した。PCRは初期変性を94°Cで5分行った後、94°Cで60秒、36°Cで60秒、72°Cで2分の条件を35サイクル繰り返し、最終伸長反応を72°Cで7分行った。PCRの後、アガロースゲル電気泳動を行い、バンドパターンの比較を行った。

## 3. 結果と議論

### 3.1. RAPD法を用いたゲノム配列比較

*B. longum*と判定された菌株から抽出したDNAに対して、P2プライマーを用いてPCRを実施し、おおまかなゲノム配列の比較を行った(図1)。F4の第1期(図1A)、第2期(図1B)および第3期(図1C)を比較すると、どちらも600 bp付近に主要なバンドが見られ、全体のパターンも類似していた。これは、14ヶ月経過後も腸管内のビフィズス菌のゲノム配列は変化しないことを示唆している結果であり、先行研究の報告と一致する<sup>[16]</sup>。F5の第1期(図1D)は、2, 3, 4, 5, 6 (i)と1, 7 (ii)と8 (iii)の3種類のバンドパターンが、第2期(図1E)は、1, 2, 3, 5, 7, 8 (i)と4, 6 (ii)の2種類のバンドパターンが、第3期(図1F)には、1, 2, 3, 4 (i)と5, 6, 7 (ii)と8 (iii)の3種類のバンドパターンが存在していた。各個人の各時期において検出されたRAPDのバンドパターンを表1にまとめた。これらの結果から、F4は各期間において同一個人内では類似したバンドパターンであり、常に1種類の菌株を保有している可能性が示唆されたが、一方でF5では同一個人内で複数種類のバンドパターンが検出されたため、同一個人内に存在する*B. longum*株のゲノムDNA配列は、必ずしも1種類ではない可能性が示唆された。同一個人内では複数種類のゲノム配

列の異なる*B. longum*が存在しているが、それらの配列は個人ごとに異なるため、腸内に存在している*B. longum*は個人固有であると考えられる。

表1：P2プライマーを用いて増幅された各バンドパターンの数

期間		種類数*			
		i	ii	iii	iv
F4	①	39			
	②	44			
	③	38			
F5	①	22	18	4	
	②	9	10		
	③	10	6	1	

\*RAPD解析で検出された各個人の各時期におけるRAPDパターンの種類と数

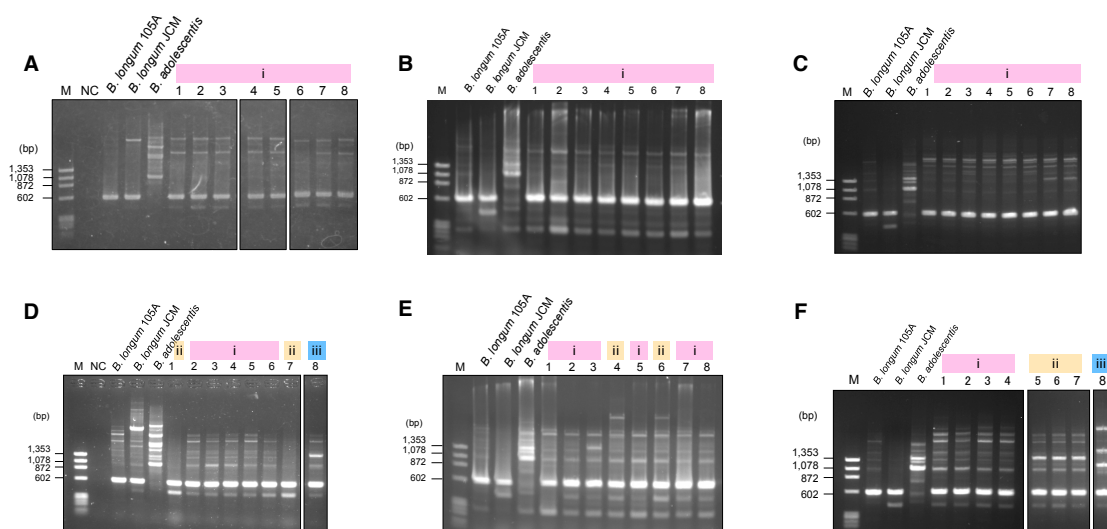


図1：P2プライマーを用いたRAPD法の結果

F4 (A-C), F5 (D-F)について、第1期 (A, D), 第2期 (B, E), 第3期 (C, F)のアガロースゲル電気泳動の結果を示した。PCRに使用したプライマーはP2、マーカーはφX174/*Hae* III digest (TaKaRa)であり、ポジティブコントロールは*B. longum* 105A, *B. longum* JCM1217, *B. adolescentis* JCM1275から抽出したDNAを用

いて同様のPCRを行ったサンプルを使用した。RAPD法に用いたコロニーのうち、各サンプルから代表的な8個のコロニーの結果を示す。1~8の番号は、使用したコロニーに任意に付与した番号である。

### 3.2. 長期間に渡る *B. longum* のゲノム配列比較

これまでに示した結果は時期ごと、また被験者ごとにアガロースゲル電気泳動を行ったため、得られたバンドパターンが時期や被験者を超えて完全に同一であるかどうか検証することができていなかった。そこで、これまでに得られた全ての *B. longum* 株を対象として、同時にRAPDおよびアガロースゲル電気泳動を行う必要があると考えた。RAPD法の結果、各サンプルに最も多く存在していたバンドパターンのクローンを、それぞれの便採取ポイントから2つずつ選択し、P2プライマー、P16プライマーを用いてPCRとアガロースゲル電気泳動を行った(図2)。その結果、F4とF5の両方において、3期間を通じてバンドパターンが類似はしていたものの、完全に同一ではなかったことから、この間に同一クローンがゲノム変化を生じた可能性が示唆された。これらの結果より、腸管内に存在しているビフィズス菌は、菌株レベルで変化する可能性があると考えられる。このように変化する要因としては、宿主の健康状態や、食生活の変化などが考えられる。一方で、それぞれのバンドパターンは個人間では異なっているため、我々の腸管内には「個人固有」なビフィズス菌株が存在していると考えられる。

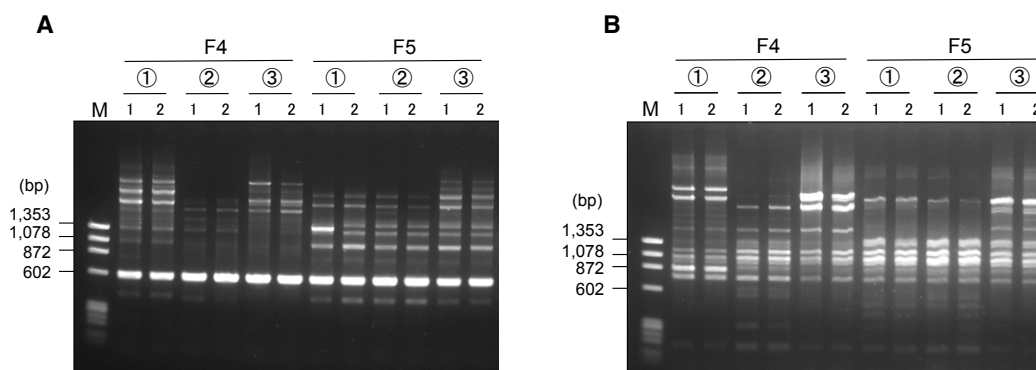


図2：3期間分の *B. longum* 菌株のRAPD法の結果

(A) P2プライマー、(B) P16プライマーを用いた結果。各被験者の第1期 (①)、第2期 (②)、第3期 (③) より、それぞれ2サンプルを選択し、PCRを行った。

### 3.3. *B. longum* の全ゲノム解析

#### 3.3.1. ショットガンシーケンスおよび *de novo* アセンブリ

MiSeqを用いて *B. longum* のショットガンシーケンスを行い、*de novo* アセンブリを行った。*de novo* アセンブリによって得られた各サンプルの総Scaffold長の合計、コンティグ数、GC含量を

表3に示した、*B. longum* NCC2705の全ゲノムサイズは2.26 Mbp, GC含量は60 %であるため<sup>[17]</sup>, 本研究で得られた菌株はいずれも同様のゲノムサイズおよびGC含量であり, *B. longum*の全ゲノム解析に耐える塩基配列情報を得ることができたと考えられる.

表3 : *de novo*アセンブリ結果

期間	クローン ID	総 Scaffold 長の合計 (Mbp)	コンティグ数	GC 含量 (%)
①	F4-1-1	2.43	97	59.98
	F4-1-2	2.43	102	59.95
②	F4-2-1	2.41	114	60.07
	F4-2-2	2.41	81	60.07
③	F4-3-1	2.41	195	60.09
	F4-3-2	2.42	146	60.10
-----				
①	F5-1-6	2.31	52	60.15
	F5-1-7	2.25	32	60.07
②	F5-2-7	3.82	167	57.76
	F5-2-8	2.24	80	60.10
③	F5-3-1	2.27	38	59.98
	F5-3-2	2.29	67	59.92

### 3.3.2. Mauveによるアセンブリの可視化および精度の検証

複数種類のゲノム配列の比較が可能なソフトウェアである Mauve (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>)を用いて, レファレンスゲノムに対してアライメントを行った. *de novo*アセンブリを行った12株のうちF4の第1期に単離されたF4-1-1の結果のみ示す(図3). この結果は, レファレンスゲノムとF4-1-1のゲノムにおいて塩基配列が概ね一致していることを示している. 1,200,000 bp付近にミスアセンブリの可能性が見受けられたが, 概ねレファレンスゲノム配列と同様の配列を有するコンティグが得られたと考えられる. 本ダイジェストに記載していない他のサンプルにおいても同様の傾向が見られた.

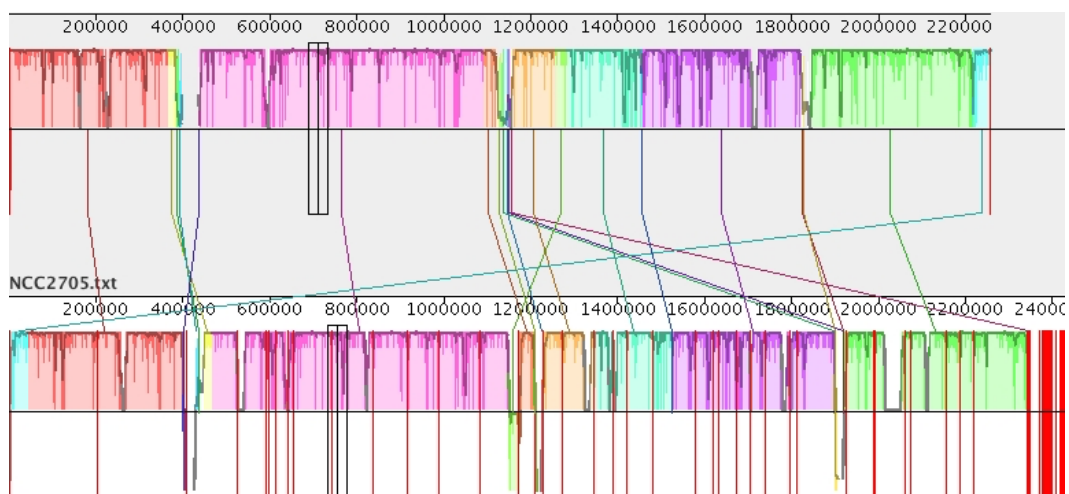


図3：Mauveによる逆位・ミスアセンブリの検証

図中の上段は、リファレンスである*B. longum* NCC2705を示し、下段はF4-1-1を示す。リファレンスに対してミスアライメントされていると考えられる配列は、黒い中央線より下側に表示される。上段と下段の配列を結ぶ線は、結ばれているブロック同士が同じ配列であったことを示している。

### 3.3.3. SNP解析の結果

被験者の腸内に定着していると考えられる*B. longum*において、定着に関与している因子を探るため、SNP解析を行った。リファレンスゲノムとして用いた*B. longum* NCC2705に対してマッピングを行い、非コード領域を含む全てのSNPの数、コード領域におけるSNPの数および、非同義コドンの割合をサンプルごとに求めた（表4）。すべての株において非同義置換が生じるSNPが占める割合は、全体のSNPの7割程度あることが明らかになった。これらの非同義置換は539から582種の遺伝子上に存在しており、中には終止コドンが新たに出現するパターンや、既存の終止コドンが消失するパターンもあり、株ごとの遺伝子の違いは広範に及んでいると考えられる。

表4：SNP解析の結果

期間	クローン ID	全 SNP 数*	コード領域における SNP		非同義コドン		非同義コドンが生じた遺伝子の種類数
			#	割合 (%)	#	割合 (%)	
①	F4-1-1	12,573	11,025	87.7	8,019	72.7	582
	F4-1-2	12,867	11,234	87.3	8,165	72.7	582



②	F4-2-1	12,849	11,225	87.4	8,152	72.6	580
	F4-2-2	12,510	10,970	87.7	7,964	72.6	580
③	F4-3-1	11,241	9,830	87.4	7,138	72.6	580
	F4-3-2	11,375	9,938	87.4	7,229	72.7	579
-----							
①	F5-1-6	12,604	10,840	86.0	7,903	72.9	550
	F5-1-7	12,437	10,759	86.5	7,880	73.2	556
②	F5-2-7	12,320	10,579	85.9	7,698	72.8	546
	F5-2-8	10,958	9,464	86.4	6,921	73.1	539
③	F5-3-1	12,394	10,707	86.4	7,755	72.4	543
	F5-3-2	11,859	10,251	86.4	7,467	72.8	547

\*非コード領域を含む全てのSNPの数を示す。

### 3.3.4. SNPの個人間比較

シーケンスを実施した12株に見受けられたSNPの個人差を比較した。個人間でのSNPの違いを比較するために、ヒートマップを用いて株ごとのSNPのパターンを視覚化した(図4)。サンプルとSNPの位置に対して階層的クラスタリングを実施した結果、樹形図は被験者ごとに分かれた。また同一宿主由来の6株に共通するが、他の宿主由来の6株には存在しないSNPも多数見受けられたことから、SNPが生じた位置は宿主個人間で顕著に異なっており、宿主個人に特有なSNPが多数存在していることが明らかになった。F4-1-1およびF4-2-2のように異なる期間のサンプルが隣接している場合が見られたが、これは宿主側の変化によりSNPの位置に多少の変化が生じたためであると考えた。ただし、本研究においては被験者数が2名のみであったため、SNPの位置の変化に関する詳細な議論を行うためには被験者数を増やす必要がある。RAPD法を用いた個人間のおおまかなゲノム配列比較において、*B. longum*のゲノム配列は個人固有であることが示唆されていたが、*B. longum*に生じたSNPにおいても個人固有だと考えられる位置が見受けられた。これは、宿主の腸内環境や健康状態、あるいは年齢などの変化に伴い、*B. longum*が腸内に定着するために生じた変異であり、宿主の腸内に定着するために重要な変化なのではないかと考えられる。今後はSNPが生じていた遺伝子の機能などを詳細に解析し、*B. longum*が宿主の腸内に定着するメカニズムを明らかにしていきたい。

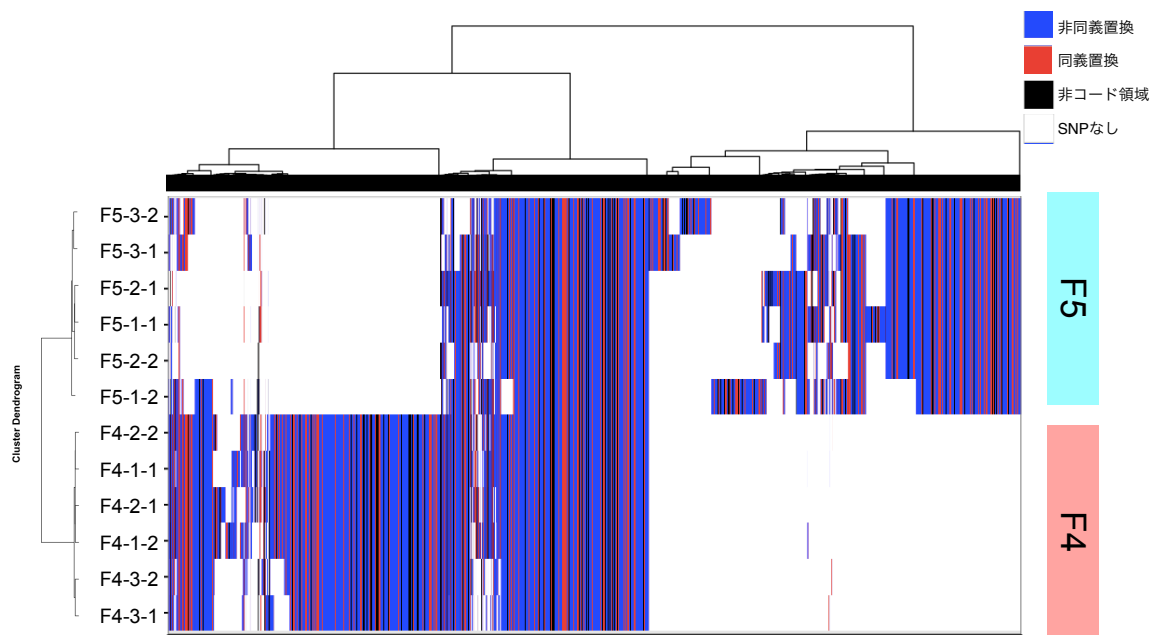


図4：SNPの位置を基にしたヒートマップ

縦軸はサンプル，横軸はSNPが見受けられた位置 (bp)を示す．SNPによる変異が非同義置換であった場合は青，同義置換であった場合は赤，非コード領域に生じたSNPは黒，SNPが見受けられなかった場合は白で示す．なおゲノム中で全サンプルに共通してSNPが見られなかった位置は図中には示していない．サンプルはピアソンの積率相関係数，SNPの位置はユークリッド距離を用いて階層的クラスタリングを行った．

#### 4. 結論

RAPD法による*B. longum*のゲノム配列比較の結果，同一個人内においては複数種類のゲノム配列の*B. longum*が存在していたが，個人間では全ての*B. longum*のゲノム配列が異なっていたため，各個人の腸内に存在している*B. longum*は個人固有である可能性が示唆された．また*B. longum*の全ゲノム解析の結果，SNPの位置は個人間で異なっており，個人固有である可能性が示唆された．これらの結果より，ヒトの腸内に定着している*B. longum*は各個人に固有であり，宿主の腸内環境に適応するために遺伝子が増変した結果，定着できるようになったのではないかと考えられる．

## 参考文献

- [1] Gerritsen J, Smidt H, Rijkers G, de Vos W. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr* 2011;6(3):209-240.
- [2] Kenya H, Dan RL. The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation. *Annu Rev Immunol* 2012;30:759-795.
- [3] Mueller C, Macpherson AJ. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. *Gut* 2006;55(2):276-284.
- [4] Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361(9356):512-519.
- [5] Favier C, Vaughan E, De VW, Akkermans A. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(1):219-226.
- [6] Harmsen H, Wildeboer-Veloo A, Raangs G, Wagendorp A, Klijn N, Bindels J, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30(1):61-67.
- [7] Alles M, Hartemink R, Meyboom S, Harryvan J, Van LK, Nagengast F, et al. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. *Am J Clin Nutr* 1999;69(5):980-991. (Kim et al., 2013)
- [8] Kohara T, Hayashi S, Hamatsuka J, Nishitani Y, Masuda Y, Osawa R. Intra-specific composition and succession of *Bifidobacterium longum* in human feces. *Syst Appl Microbiol* 2007;30(2):165-168.
- [9] Kim S, Suda W, Kim S, Oshima K, Fukuda S, Ohno H, et al. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res* 2013;20(3):241-253.
- [10] Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011;469(7331):543-547.
- [11] Odamaki T, S. H., Yonezawa S, Yaeshima T, Iwatsuki K, Tanabe S, Tominaga T, et al. Effect of the oral intake of yogurt containing *Bifidobacterium longum* BB536 on the cell numbers of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in microbiota. *Anaerobe* 2012;18(1):14-18.
- [12] Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald G, Zink R. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004;86(3):205-223.
- [13] Prodelalová J, Spanová A, Rittich B. Application of PCR, rep-PCR and RAPD techniques for typing of *Lactococcus lactis* strains. *Folia Microbiol (Praha)* 2005;50(2):150-154.
- [14] Krízová J, Spanová A, Rittich B. RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia Microbiol (Praha)* 2008;53(2):99-104.
- [15] Srůtková D, Spanova A, Spano M, Dráb V, Schwarzer M, Kozaková H, et al. Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *J Microbiol Methods* 2011;87(1):10-6.
- [16] Eisen M, Spellman P, Brown P, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(25):14863-14868.
- [17] Schell M, Karmirantzou M, Snel B V, D., Berger B, Pessi i, Zwahlen M, et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(22):14422-14427.

## 謝辞

本研究を進めるにあたって全面的にご指導頂きました福田真嗣特任准教授に心より御礼申し上げます。また、全ゲノム解析を行うにあたり、快くご指導下さいました荒川和晴特任准教授に心より御礼申し上げます。アドバイザーである村上慎之介氏には、実験の手法や進め方に関して非常に多くのことをご指導頂きました。石井千晴氏、伊藤優太郎氏にはタームペーパーを添削して頂いたり、研究手法を教えて頂いたりとお大変お世話になりました。また、吉田祐貴氏には、ゲノム解析について多くの助言をして頂きました。そして常在菌グループの皆様のおかげで充実した研究生活を送ることができました。最後になりましたが、このような研究の機会を与えてくださいました富田勝教授にこの場をお借りして心より御礼申し上げます。ありがとうございました。