

令和元年6月13日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06549

研究課題名(和文) 宿主遺伝子変異がもたらす腸内環境変動の横断的・定量的評価

研究課題名(英文) A quantitative comparison study of gut ecological change caused by host gene mutations

研究代表者

重盛 駿 (Shigemori, Suguru)

信州大学・農学部・アソシエイト研究員

研究者番号：90803487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸内に生息する微生物と宿主細胞との相互作用から成る腸内生態系は、生体の恒常性維持において重要な役割を担っている。宿主が有する特定の遺伝子変異は、これらの相互作用を破綻させ、疾患の原因となることが示唆されているが、その全容は明らかでない。本研究では、多系統の遺伝子改変マウスが有する腸内細菌叢の構造を横断比較し、宿主遺伝子変異が腸内生態系に及ぼす影響の度合いを定量的に推定した。結果として、腸内細菌叢の変動に関連する3つの遺伝子変異を新規に発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、安定した腸内細菌叢の構造を変化させる原因として、3つの宿主遺伝子変異を新規に同定することに成功した。すなわち、本研究結果は、これら遺伝子変異が腸内生態系を変動させる分子機序の解明に繋がり、宿主遺伝子変異が腸内生態系間の相互作用機序において新たな知見をもたらすものと期待される。また、本研究手法は、宿主遺伝子変異が腸内細菌叢の変動に及ぼす影響を定量比較する一手法として、未知遺伝子の評価や新規遺伝子の同定に貢献するものと考えられる。将来的には、本研究結果が、疾患の予防や軽減に向けた新規バイオマーカーの発見や創薬、機能性食品・飼料の創出に繋がることを期待したい。

研究成果の概要(英文)：Animals possess a gut ecosystem which is formed by complex interactions between gut-inhabiting microorganisms and host cells. A growing body of evidence is accumulating to demonstrate that a balanced gut ecosystem plays a critical role in health maintenance of the host. It has been suggested that certain gene mutations in hosts are causal factors of diseases associated with a significant change of the gut ecosystem. However, the whole picture of this phenomenon remains unclear. In this study, the structure of gut microbiota was quantitatively compared among different strains of genetically modified mice to estimate the degree of gut ecological change caused by host gene mutations. As a result, three novel mutations that caused different shift in the gut microbial structure were identified.

研究分野：動物生命科学

キーワード：腸内生態系 腸内細菌叢 遺伝子改変マウス 16Sメタゲノム解析

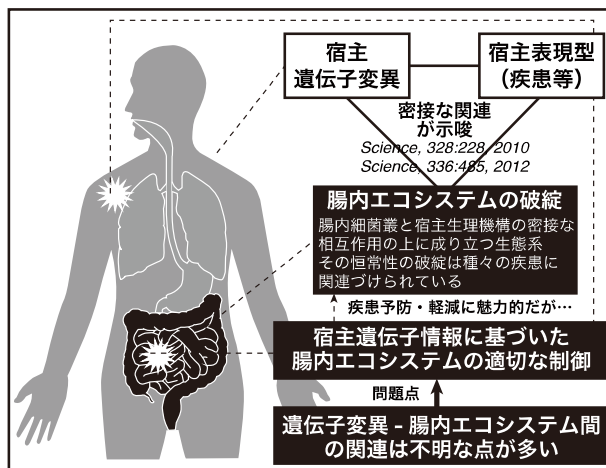
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景 (図)

ヒト腸管にはおよそ 1,000 種、100 兆個にもものぼる細菌が生息していると言われており、それらは免疫系・神経系・内分泌系といった宿主生理機構と密接に相互作用しながら、ユニークな生態系(“腸内エコシステム”と呼ぶ)を形成している。近年のオミクス研究の飛躍的進展に伴い、バランスのとれた腸内エコシステムは宿主の健康維持・増進に貢献する一方で、それらの破綻は炎症性腸疾患や大腸ガンといった腸管局所の疾患のみならず、自己免疫疾患や代謝疾患などの全身性疾患に関連することが明らかになってきた[1]。

乳酸菌やビフィズス菌をはじめとするプロバイオティクスの摂取は、異なる機序を介して腸内エコシステムを良好に維持・改善し、ヒトや家畜の健康に有益な効果をもたらすことが明らかになりつつある[2]。これまでに私は、宿主生理機構の制御から腸内エコシステムを有益に調節する考えに基づき、生体調節タンパク質を産生する遺伝子組換え乳酸菌や乳酸菌由来の機能成分の開発に取り組んできた。例えば、哺乳類由来の抗炎症タンパク質(ヘムオキシゲナーゼ-1)を産生する乳酸菌を作出し、同乳酸菌はマウス大腸の免疫系を調節することで、大腸炎症状を軽減することを明らかにした[3]。また、乳酸菌の機能性成分のひとつとして知られるオリゴDNAを経口的に腸管へ運搬するシステムを開発し、特定の配列を有するオリゴDNAの経口投与は腸管および全身の免疫応答を調節することで、マウスにおけるアレルギー性皮膚炎症状を軽減することを示した[4]。

このように、腸内エコシステムの的確な制御はヒトや家畜の健康維持・増進および疾患の予防・軽減において有力な戦略となり得る。したがって、「腸内エコシステムの恒常性はどの様に保たれているのか」もしくは「どの様に破綻し疾患へと繋がるのか」について理解することは極めて重要な課題と言える。興味深いことに、自然免疫系において重要な受容体である TLR5 の遺伝子を欠損したマウスは、腸内細菌叢の菌種組成の変化に伴い、メタボリックシンドローム様の症状を呈することが明らかにされた。加えて、TLR5 欠損マウスの糞便を移植した野生型無菌マウスはメタボリックシンドローム様の症状を示すことが明らかとなり、同遺伝子の変異による腸内エコシステムの変化が疾患の発症に重要であることが示唆された[5]。このように、宿主の特定の遺伝子の変異は腸内エコシステムを破綻させ、疾患を引き起こすことが示唆されている[6,7]。しかし、これら疾患関連遺伝子のうち、「どの遺伝子が、どの程度、またどの様に、腸管エコシステムに影響を及ぼしているか」については明らかにされておらず、宿主遺伝子変異/腸内エコシステムのみだれ/宿主表現型(疾患等)という3者の関連は不明な点が多い。以上の学術的背景から、特定の遺伝子変異の結果、異なる表現型を発現する宿主の腸内エコシステムの横断的な解析は、上記3者の関連を定量的に理解することにつながり、腸内エコシステムの適切な制御に向けた新たな知見をもたらすものと考え、本研究の着想に至った。



図

2. 研究の目的

本研究は、環境・遺伝的要因を統一した多系統の遺伝子改変マウスを宿主遺伝子変異モデルとし、それらの腸内エコシステムをオミクスの手法を用いて網羅的に解析することで、宿主遺伝子変異が腸内エコシステムに与える影響を、横断的かつ定量的に評価することを目的とした。とくに、腸内エコシステムの主要な構成員である腸内細菌に着目し、16S メタゲノム解析の手法を用いて、各系統の細菌叢構造の差異を統計学的に比較した。

3. 研究の方法

はじめに、解析対象とするマウスの選抜に着手した。腸内細菌叢に代表される腸内エコシステムの状態は、環境ならびに宿主遺伝といった様々な要因により変動することが知られている[8]。本研究では、これらの変動要因を可能な限り除外し、宿主標的遺伝子の変異が腸内エコシステムに与える影響の正確な評価・比較を試みた。すなわち、環境要因を統一するために、同一の動物飼育施設内で自然分娩により出生し、同一の環境下(specific pathogen-free, 一定の明暗サイクル, 一定の温度等)で同じ飼料と水にて飼育されている個体のみを選抜した。標

的遺伝子以外の遺伝的要因を排除するために、C57BL/6 をバックグラウンドとする野生型ならびに遺伝子改変系統のみを選択した。性別および飼育室・飼育ケージの異なる個体は別試験群として扱った。加えて、腸内細菌叢の構造が、哺乳期・離乳期より相対的に安定している、成マウス（8~15 週齢）のみを対象とした。結果として、26 群（n=3~5）から成る 10 系統（野生型マウス 1 系統、遺伝子改変マウス 9 系統）121 匹のマウスを解析対象として選抜した。

続いて、対象とする全てのマウスより新鮮便を採取した。得られた糞便より総 DNA を抽出し、16S リボソーム RNA 遺伝子の V1-V2 領域を含む DNA 断片を増幅した。増幅断片より 16S メタゲノムライブラリを調製し、次世代シーケンサー（MiSeq, Illumina）を用いて全配列を解読した。得られたデータは、細菌叢解析パイプライン（QIIME）を用いて処理・解析し、各群間における細菌叢構造を統計学的に横断比較した。

4. 研究成果

得られたデータを UniFrac 距離に基づく主座標分析にて解析した結果、野生型マウス（6 群）は、性別や飼育室・飼育ケージ、週齢（8~15 週齢）の違いに拘らず、類似した細菌叢を有することが明らかになった。すなわち、統一した環境下（一定環境の同一施設、飼料、水）で飼育した同一系統の成マウスの糞便細菌叢は極めて安定していることが示唆された。従って本実験系は、細菌叢変動要因を厳密に制御できていることが分かり、宿主標的遺伝子の変異が腸内細菌叢に与える影響を単純に評価できるものと考えられた。

9 系統の遺伝子改変マウスのうち、6 系統（12 群、8~12 週齢）は野生型マウスと類似した細菌叢を有していた。すなわち、6 系統の遺伝子変異は、糞便細菌叢の変動に影響しないことが示唆された。一方で、野生型マウスならびに上記 6 系統の遺伝子改変マウスの細菌叢とは著しく異なる 3 系統（6 群、8~13 週齢）の遺伝子変異系統を発見した。このうち 2 系統は、性別およびケージ差に関係なく変動が観察されたのに対し、他の 1 系統は特定のケージの雄のみにおいて変動していた。これらの系統はそれぞれ独立にクラスタリングされ、各系統間の細菌叢構造は異なることが示唆された。すなわち、系統毎の細菌叢の変動度合いを定量・比較することに成功した。

まとめると、本研究では、環境ならびに遺伝的要因を統一した 10 系統のマウス糞便細菌叢を網羅的に解析し、それらを横断比較することで、腸内エコシステムを変動させる 3 つの遺伝子変異を発見し、その程度を定量的に見積もることに成功した。今後、これら 3 つの遺伝子が腸内エコシステム間の変動させる分子機序に関して詳細に検討を加えれば、宿主遺伝子変異 腸内エコシステム間の相互作用機序において新たな知見をもたらすものと期待される。また、本研究手法は、宿主遺伝子変異が腸内細菌叢の変動に及ぼす影響を定量比較するための一手法として、未知遺伝子の評価や新規遺伝子の同定に貢献するものと考えられる。将来的には、本研究成果が、疾患の予防や軽減に向けた新規バイオマーカーの発見や創薬、機能性食品・飼料の創出に繋がることを期待したい。

< 引用文献 >

- [1] Fukuda & Ohno, *Semin Immunopathol.*, **36**:103-114, 2014.
- [2] Kitazawa *et al.*, "Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics", *CRC Press*, 2014.
- [3] Shigemori *et al.*, *Microb Cell Fact.*, **14**:189, 2015.
- [4] Wang *et al.*, *Mol Ther.*, **23**:297-309, 2015.
- [5] Vijay-Kumar *et al.*, *Science*, **328**:228-231, 2010.
- [6] Spor *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**:279-290, 2011.
- [7] Dabrowska & Witkiewicz, *Front. Microbiol.*, **7**:1357, 2016.
- [8] Carmody *et al.*, *Cell Host Microbe.*, **17**:72-84, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

月見 友哉, **重盛 駿**, 荒川 和晴, 増田 貴宏, 宮内 栄治, 中東 憲治, 富田 勝, 大野 博司, 森 浩禎, 福田 真嗣, 大腸菌ミュテーター株を用いたマウス腸内環境における適応変異解析, 第 41 回日本分子生物学会, 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/lab/shimolab/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。