

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07381

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質Mex-3Bによる腸内細菌叢の制御を介した代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of RNA-binding protein Mex-3B in the regulation of metabolism through the regulation of microbiota

研究代表者

山角 祐介 (Yamazumi, Yusuke)

東京大学・定量生命科学研究所・特任助教

研究者番号：40773768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNA結合タンパク質Mex-3Bが腸内細菌叢を制御することで個体の代謝を制御しているという知見を基に、インスリン感受性に影響を与える細菌の同定および Mex-3Bによる腸内細菌叢の制御機構の解明を目的として解析を進めてきた。 に関しては、糞中DNAに対するホールメタゲノムシーケンスにより、in silicoレベルではあるが菌を複数同定することができた。 に関しては、腸上皮細胞内免疫細胞に対するsingle cell RNA-seqにより、複数の細胞群の存在比が変化していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢は疾患や基礎代謝などに大きな影響を与えることが明らかになっている。しかしながら、腸内細菌叢に含まれる菌のうち、実際にどのような菌が有用なのか、また、なぜそれらの菌が腸内に存在しているかなどはあまり明らかになっていない。本研究では、基礎代謝の向上に寄与する可能性がある菌を複数同定することができただけでなく、なぜ腸内でその菌が増えるのか、その制御機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Gut microbiota is now recognized as the important tissue for the regulation of host metabolism. Disruption of microbiota (dysbiosis) leads to the obesity, exacerbation of insulin resistance, and diabetes mellites. On the other hand, some microorganisms improve host metabolism through the production of their metabolites. We have found that Mex-3B regulates insulin sensitivity through the regulation of microbiota and following metabolites change. To identify the microorganisms which affect insulin sensitivity, we performed whole metagenome sequencing analysis against fecal DNA and identified several microorganisms. Furthermore, we performed single cell RNA-seq analysis of intraepithelial immune cells and found that some cell populations are altered in Mex-3B deficient mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：腸内細菌 代謝

1. 研究開始当初の背景

我々は、RNA 結合タンパク質 Mex-3B のノックアウトマウスを作製し、寿命が顕著に延長していることを見出した。さらに、Mex-3B 欠損マウスは雄特異的にインスリン感受性が亢進していることを明らかにした。IGF-1 ヘテロ欠損マウスを用いた解析により、インスリン感受性の亢進が長寿命に関連していることが報告されていることから (Holzenberger et al., 2003 Nature) Mex-3B の欠損による寿命の延長はインスリン感受性の亢進を介している可能性があると考えられる。

近年、肥満・代謝制御における腸内細菌叢の重要性が注目されており、腸内細菌叢が肥満に影響し、それに伴うインスリン感受性の变化に寄与していることが報告されている。興味深い事例として、肥満の人の糞便から抽出した腸内細菌を移植したマウスは肥満に、痩せ型の人から抽出した腸内細菌を移植したマウスは痩せ型になることが報告されている (Ridaura et al., 2013 Science)。

このような背景から、Mex-3B 欠損雄マウスで認められるインスリン感受性の亢進には、雄特異的な腸内細菌叢の違いが重要な役割を果たしているのではないかと推測し、マウスの糞便の microbiome 解析を行った。その結果、雄の野生型マウスと Mex-3B 欠損マウスの腸内細菌叢は異なっており、Mex-3B 欠損雄マウスの細菌叢は野生型よりも多様性に富んでいることが明らかになった。

腸内細菌叢の違いがインスリン感受性に与える影響を調べるため、まず、マウスに抗生物質を投与し、腸内細菌を死滅させた際のインスリン感受性を調べた。その結果、腸内細菌叢の死滅により野生型雄マウスおよび Mex-3B 欠損雄マウス間のインスリン感受性の差はみられなくなった。次に、野生型無菌マウスへの糞移植実験を行い、腸内細菌の差がインスリン感受性に与える影響を調べた。その結果、野生型マウス由来の糞を移植したマウスでは無菌マウスと比べてインスリン感受性が悪化したのに対し、Mex-3B 欠損雄マウス由来の腸内細菌を移植したマウスでは、無菌マウスと比較してインスリン感受性に差が認められなかった。以上の結果から、Mex-3B は腸内細菌叢の制御を介して宿主のインスリン感受性を制御していることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究は、インスリン感受性に影響を与える細菌叢を同定する(1)とともに、Mex-3B による腸内細菌叢の制御機構を明らかにする(2)ことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) インスリン感受性に影響を与える細菌叢の同定

無菌マウスを用いた実験により、野生型雄マウス由来の糞を移植したマウスと Mex-3B 欠損マウス由来の糞を移植したマウスとでインスリン感受性に差が見られることが明らかになっている。この実験では、無菌マウスへ糞を移植してから4週間後にインスリン感受性の測定を行っているが、その過程で経時的に糞を回収している。この糞から細菌 DNA を回収し、16S rDNA 解析を行うことにより、野生型マウス由来糞移植群-Mex-3B 欠損マウス由来糞移植群間で構成に差のある細菌群の同定を試みる。しかしながら、腸内細菌のほとんどは培養条件の判明していない菌であるため、データベース上に情報がなく、科や属レベルでの同定に留まってしまう可能性が高い。したがって、具体的な菌を同定するためには菌の単離培養が必須と考えられる。腸内細菌の単離培養は非常な困難を伴うと予想されるが、本研究計画では、科や属レベルでの情報を基に、好気、嫌気条件下など、様々な培養条件下で目的の菌の単離培養を試みる。仮に菌の単離培養に成功した場合には、同定した菌を無菌環境下、あるいは SPF 環境下で飼育している野生型マウスへ移植し、インスリン感受性を測定することでインスリン感受性に影響を与える細菌群を同定できると考えられる。

また、単離培養が困難である可能性も考慮して、ホールメタゲノムシーケンスによる *in silico* での菌の同定も試みる。

(2) Mex-3B による腸内細菌叢制御機構の解明

腸内細菌叢の構成は食物中の脂肪や食物繊維の量によって変化することが明らかになっているが、本研究で用いているマウスはこうした条件は一定であるため、別の要因で腸内細菌叢が制御されていると考えられる。食事以外では、宿主の免疫機構の変化によって腸内細菌叢が変化することが知られている。例えば、様々な免疫不全マウスの腸内細菌叢は、野生型と比較して多様性が顕著に減少し、その構成も大きく変化していることが明らかになっている (Kawamoto et al., 2013 Immunity)。一方、我々は Mex-3B は肺で免疫系に作用し、アレルギー性気道炎症を制御していることを明らかにしている (Yamazumi et al., 2016 Cell Reports)。これらの事実から、Mex-3B が腸における腸管免疫に作用することで腸内細菌叢を制御している可能性があると考え

られる。腸管の組織染色や、腸管組織から回収した RNA を用いた定量的 PCR、RNA-seq などの手法によって、野生型マウスと Mex-3B 欠損マウス間での各種免疫細胞のマーカー遺伝子の発現量の差を調べることで、Mex-3B 欠損マウスにおける腸管免疫の変化を明らかにできると考えられる。また、腸上皮細胞内免疫細胞に対して single cell RNA-seq を行い、Mex-3B 欠損マウスで細胞の構成比に変化がないか検討する。

4. 研究成果

(1) インスリン感受性に影響を与える細菌叢の同定

16S rDNA 解析を行って野生型マウス由来糞移植群-Mex-3B 欠損マウス由来糞移植群間で構成に差のある細菌群の同定を試みた結果、Mex-3B 欠損マウス由来糞移植群ではクロストリジウム属などの細菌の構成比が大きく増えていることが明らかになった。クロストリジウム属を含め、Mex-3B 欠損マウスと野生型マウス間で存在比に差があった菌類が主に嫌気性細菌であったため、まずは嫌気性細菌の培養法の確立を試みた。糞懸濁液を様々な条件下でプレート培養し、プレートごとにコロニー群をまとめて 16S 配列を読んだ結果、いくつかの条件下で偏性嫌気性菌のクロストリジウム属が検出された。この結果から、少なくとも腸内細菌叢を構成する一部の嫌気性細菌の培養に成功したと考えられる。しかしながら、その後の研究により腸内細菌の単離培養系の確立には成功したものの、目的の菌を単離することはできず、同定には至らなかった。そこで、東京工業大学伊藤武彦教授と共同研究により、ホールメタゲノムシーケンスを用いた *in silico* での菌の同定を試みた。その結果、新規の細菌を複数同定することができた。同定できた菌には未知の菌も含まれており、今後の研究により単離に挑戦したいと考えている。

(2) Mex-3B による腸内細菌叢制御機構の解明

まず、野生型マウスおよび Mex-3B 欠損マウスから腸上皮細胞を単離して RNA を抽出し、RNA-Seq を行った。その結果、Defensin などの抗菌ペプチド合成遺伝子の発現量が Mex-3B 欠損マウスで上昇していた。Mex-3B はこれらの遺伝子の発現量を制御することで腸内細菌叢を制御している可能性が考えられる。

また、Mex-3B マウスと野生型マウスの免疫系の細胞を、X 線照射と骨髄移植を組み合わせることで入れ替え、インスリン感受性における免疫細胞の重要性を ITT により検討した。免疫系の細胞を入れ替えても K0 でのインスリン感受性の亢進が認められたことから、少なくとも免疫系以外の細胞集団が K0 の表現型に関与していることが明らかになった (図 1)。

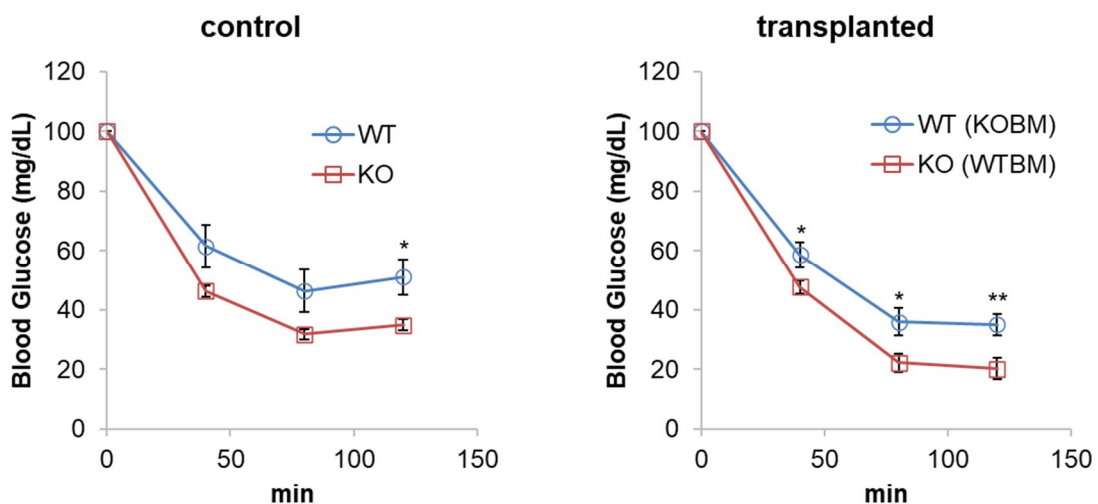


図 1: 骨髄移植後の ITT

WT (KOBM): X 線照射後、Mex-3B 欠損マウスの骨髄を移植した野生型マウス

KO (WTBM): X 線照射後、野生型マウスの骨髄を移植した個体 Mex-3B 欠損マウス

続いて、Mex-3B マウスと野生型マウスの腸上皮内免疫細胞を回収し、single cell RNA-seq を行った。その結果、Mex-3B の欠損により複数の細胞群の存在比が変化していることが明らかになった。特に CD8 陽性 T 細胞アイソフォーム群の割合が Mex-3B の欠損により大きく変化していることから、Mex-3B これらの細胞群の割合を制御することで腸内細菌叢の制御を行っている可能性が考えられる。

以上の結果をまとめると、Mex-3B は腸上皮細胞を含めた免疫系以外の細胞で機能し、免疫系に作用することで腸内細菌叢を制御していると推測される。今後は免疫系の細胞以外の腸管細胞に対して single cell RNA-seq を行うとともに、Mex-3B が具体的にどのような遺伝子を制御

することで腸内細菌叢を制御しているか、RNA-seq で同定された遺伝子を中心に解析を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yusuke Yamazumi, Oh Sasaki, Saki Suyama-Fuchino, Kazuyoshi Kohu, Yuki Kamoshida, Hiroaki Harada, Keishi Fujio, Takeaki Oda, Tetsu Akiyama	4. 巻 519
2. 論文標題 The RNA-binding protein Mex-3B plays critical roles in the development of steroid-resistant neutrophilic airway inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 220-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.08.158	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神永 環, 山角 祐介, 林 寛敦, 由良 敬, 秋山 徹
2. 発表標題 変異長寿マウスにおける腸内細菌叢制御機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
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
研究協力者	伊藤 武彦 (Ito Takehiko)	東京工業大学 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------