

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21594

研究課題名(和文) ノトバイオート蝇を用いた健康寿命の腸内細菌による延伸効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of gut microbes on the extension of healthy life span using the gnotobiotic fly

研究代表者

栗原 新 (Kurihara, Shin)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：20630966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、無菌化したハエに野生型大腸菌株、ポリアミン合成酵素遺伝子を欠損させた大腸菌株、あるいはポリアミン合成酵素遺伝子を相補した大腸菌株をそれぞれ定着させたノトバイオートハエを作成し、それぞれのノトバイオートハエポリアミンを含まない飼料を与えて飼育した。これらのハエの平均寿命は、ポリアミンを産生できる野生株を定着させた群で27.3日、ポリアミンを産生できない欠損株を定着させた群で22.0日、ポリアミンを産生できる相補株を定着させた群で25.4日であった。以上の結果から、腸内細菌に由来する代謝産物であるポリアミンが、宿主の寿命を延伸する効果が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な高齢化の進展により、健康寿命の延伸が大きな課題となっている。「もう一つの臓器」としての腸内細菌叢は健康寿命延伸を目的とした介入対象として、ますます注目を集めている。腸内細菌の保健効果は主に腸内細菌の代謝産物によってもたらされると考えられている。本研究では腸内細菌の代謝産物であるポリアミンがハエの寿命を延伸することを示した。寿命の延伸は保健効果の中でも最大の価値を有しており、本研究は腸内細菌の代謝産物が宿主生物の寿命を延伸することを明確に示した、世界初の研究成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared gnotobiotic flies in which wild-type *E. coli* strains, *E. coli* strains lacking the polyamine synthase gene, or *E. coli* strains complemented with the polyamine synthase gene were respectively colonized in germ-free flies, and each gnotobiotic fly was fed a polyamine-free diet. The average lifespan of these flies was 27.3 days in the group in which a wild-type *E. coli* capable of producing polyamines was colonized, 22.0 days in the group in which a gene-deleted strain incapable of producing polyamines was colonized, and 25.4 days in the group in which a complementary strain capable of producing polyamines was colonized. These results indicate that polyamines, which are metabolites derived from gut microbes, are effective in prolonging the lifespan of the host.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリアミン 寿命延伸 腸内細菌 ノトバイオートハエ 代謝産物

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内に存在する大量(1 kg)かつ多種多様(150 菌種以上)な細菌の混合物は「ヒト腸内細菌叢」と呼ばれており、その代謝産物は腸管上皮を通過して体内に取り込まれ、ヒト健康に対して直接的に影響を与える。したがって、腸内細菌叢の有益な代謝産物を増加させることができれば健康寿命の延伸に有効である。しかし、腸内細菌の代謝産物がもたらす宿主動物の健康寿命への影響についての解析は、マウス等を用いた場合には数年に及ぶ動物実験が必要であることから費用・時間の面で障壁が高く、これまでに行われていない。

ポリアミンは分子内に2つ以上のアミノ基を有する脂肪族炭化水素の総称であり、代表的なポリアミンにはプトレッシンやスペルミジンが挙げられる。ポリアミンの経口摂取により、寿命の延伸(Nat. Cell Biol. 11:1305-14. (2009))、記憶力の増強(Nat. Neurosci. 16:1453-60 (2013))、心機能の向上(Nat. Med. 22:1428-1438. (2016))などの効果が報告されている。ポリアミンは腸内細菌叢の重要な代謝産物である。その腸管内濃度は最大数 mM に達し、大腸粘膜から体内に取り込まれる(Sci. Rep. 4:4548. (2014))ことがわかっている。これまでの研究により、プロバイオティクスやアミノ酸の投与により腸管内腔のポリアミン濃度が上昇し、さらに健康寿命が延伸すること(PLoS One. e23652. (2011))が報告されている。しかし、ここで観察された腸管内腔のポリアミン濃度の上昇と健康寿命の延伸は、投与したプロバイオティクスあるいはアミノ酸自体の副効用であった可能性は否定できず、詳細な解析が必要である。また、過去の報告にあるポリアミンの経口摂取による寿命延伸効果は、腸内細菌叢を持つ動物を使った実験であるため、経口摂取由来のポリアミンによる効果であるか、あるいは腸内細菌由来のポリアミンによる効果であるかの切り分けができていない。

無菌ハエはキイロシヨウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)を無菌化処理した、腸内細菌叢を持たないハエである。この無菌ハエに微生物を定着させ、ノトバイオート化することで、定着させた微生物が宿主であるハエに与える影響について解析することが可能となる。また、ハエの平均寿命は2カ月程度であり、マウスと比較すると10分の1以下である。この寿命が短いハエを用いれば、腸内細菌の代謝産物が宿主にもたらす寿命延伸効果を簡便に解析することが可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、

- (1) 経口摂取あるいは腸内細菌に由来するポリアミンの保健効果を切り分けること
- (2) ポリアミン合成系遺伝子の破壊・相補を行った大腸菌を腸管に定着させたノトバイオートハエを用いて腸内細菌に由来する代謝産物の寿命延伸効果を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

無菌ハエにポリアミンを経口投与し、その生存曲線をポリアミンを投与しなかった無菌ハエの生存曲線と比較することで、経口摂取のみに由来するポリアミンが寿命延伸効果を持つかを解析した。また、ポリアミン合成系遺伝子の破壊・相補を行った大腸菌を腸管に定着させたノトバイオートハエにポリアミンを含まない餌を与え、腸内細菌が大腸内で生産するポリアミンが宿主の寿命延伸に及ぼす効果について精密に解析した。

## 4. 研究成果

まず、実験に用いるハエの飼料を検討した。実験室で汎用的に使用されているハエの飼料に含まれるポリアミンをHPLCを用いて測定した。この結果、無菌ハエの実験に用いられるガン

マ線滅菌リッチ飼料およびノトバイオオートハエ実験に用いられるオートクレーブ滅菌通常飼料には、数 100 nmol/mg of protein 程度、あるいは数 nmol/mg of protein 程度のポリアミン（プトレッシン、スペルミジン、スペルミン）がそれぞれ含まれていたために、ポリアミンの生体への効果を解析するには不適切であった。そこで、ポリアミン以外の化学薬品を混合して作成するホリディック飼料（Nature Methods. 11:100–105. (2014)）を用いることとした。

次に、経口摂取由来のポリアミンが生体に与える影響を解析するために、ホリディック飼料（ポリアミンを含まない）、終濃度 15 mM でプトレッシンを添加したホリディック飼料、終濃度 10 mM でスペルミジンを添加したホリディック飼料を用いてハエを飼育し、カプラン＝マイヤー法により、それぞれの飼料の摂取群における生存率曲線を作成し、得られた生存率曲線の形状の差異を一般化 Wilcoxon 検定で解析した。プトレッシンを含む飼料を摂取した群とポリアミンを含まない飼料を摂取した群の生存率曲線の形状を比較したところ（図 1）、統計学的に有意に異なっていた（ $p = 0.0035$ ）。また、スペルミジンを含む飼料を摂取した群とポリアミンを含まない飼料を摂取した群の生存率曲線の形状についても、統計学的に有意に異なっていた（ $p = 0.00032$ ）。さらに生存率曲線から、それぞれの飼料を与えたハエの平均寿命を算出したところ、ポリアミンを含まない飼料を摂取した群で 18.2 日、プトレッシンを添加した飼料を摂取した群で 20.8 日、スペルミジンを添加した飼料を摂取した群で 21.1 日であった。以上より経口摂取したポリアミンは、無菌ハエの寿命を延伸することが明らかとなった。

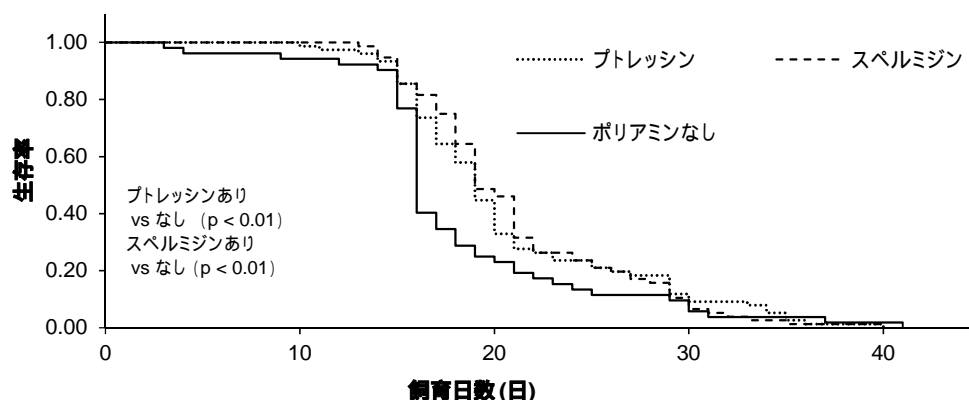
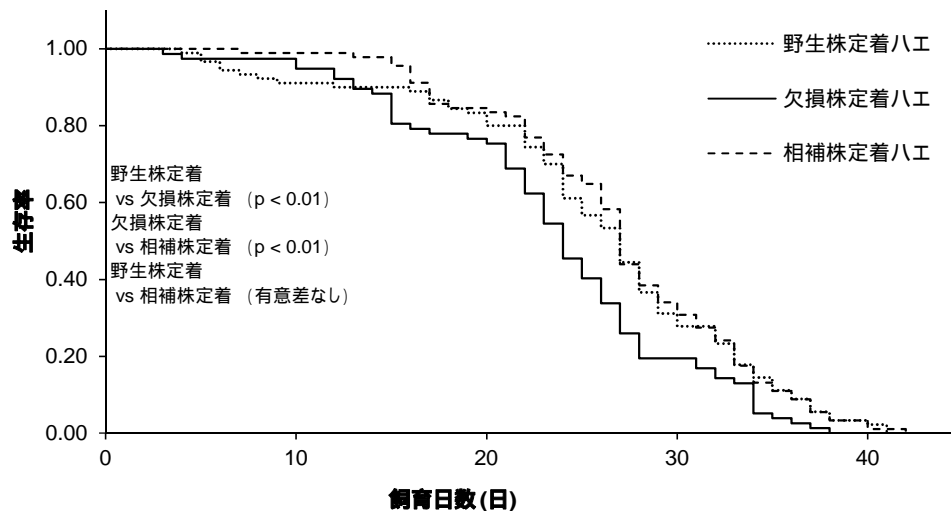


図1 食餌に添加したポリアミンの寿命伸長効果

プトレッシンを含むホリディック飼料を摂取した無菌ハエ ( $n = 76$ )、スペルミジンを含むホリディック飼料を摂取した無菌ハエ ( $n = 76$ )、またはポリアミンを含まないホリディック飼料を摂取した無菌ハエ ( $n = 52$ ) を飼育した。1日毎に死亡数を測定し、飼育日数毎の生存率をプロットすることで、生存率曲線を作成した。さらに各生存率曲線の形状の差異について検定を行うとともに、平均寿命を算出した。

最後に、腸内細菌に由来するポリアミンが宿主に与える影響について解析するために、無菌化したハエに野生型大腸菌株（pBelobac11/MG1655、ポリアミンを産生できる）、ポリアミン合成酵素遺伝子を欠損させた大腸菌株（pBelobac11/MG1655 except  $\Delta speB \Delta speC \Delta speF$ 、ポリアミンを産生できない）あるいはポリアミン合成酵素遺伝子を相補した大腸菌株（pBelobac11- $speF^+ potE^+ -yggB^+ speA^+ B^+ -speC^+ /MG1655$  except  $\Delta speB \Delta speC \Delta speF$ 、ポリアミンを産生できる）をそれぞれ定着させたノトバイオオートハエを作成した。それぞれのノトバイオオートハエにはホリディック飼料（ポリアミンを含まない）を与え、飼料の交換ごとにその表面に大腸菌の培養液を投与することで、菌株を腸管内で恒常的に保持するように飼育した。カプラン＝マイヤー法により、定着させた菌株ごとの群における生存率曲線を作成し、生存率曲線の形状の差異を一般化 Wilcoxon 検定で解析した。ポリアミンを産生できる野生株を定着させた群とポリアミンを産

生できない欠損株を定着させた群の生存率曲線の形状を比較したところ(図2)、統計学的に有意に異なっていた( $p = 0.018$ )。また、ポリアミンを産生できない欠損株とポリアミンを産生できる相補株を定着させた群の生存率曲線の形状についても、統計学的に有意に異なっていた( $p = 0.0018$ )。一方で、いずれもポリアミンを産生できる野生株あるいは相補株を定着させた群の生存率曲線を比較したところ、生存率曲線の形状に有意差はなかった( $p = 0.61$ )。さらに、生存率曲線から、それぞれの大腸菌株を定着させたハエの平均寿命を算出したところ、ポリアミンを産生できる野生株を定着させた群で 27.3 日、ポリアミンを産生できない欠損株を定着させた群で 22.0 日、ポリアミンを産生できる相補株を定着させた群で 25.4 日であった。以上より腸内細菌に由来するポリアミンは、ポリアミンを含まない飼料で飼育したハエの寿命を延伸することが明らかとなった。



**図2 腸内細菌に由来するポリアミンの寿命伸長効果**

ポリアミンを産生できる野生株を定着させたハエ( $n = 90$ )、ポリアミンを産生できない欠損株を定着させたハエ( $n = 77$ )、ポリアミンを産生できる相補株を定着させたハエ( $n = 91$ )を飼育した。1日毎に死亡数を測定し、飼育日数毎の生存率をプロットすることで、生存率曲線を作成した。さらに各生存率曲線ごとの差の検定を行うとともに、平均寿命を算出した。

無菌ハエにポリアミンを含まない飼料を摂取させた群と比較して、ポリアミン(プトレッシンあるいはスベルミジン)を含む飼料を摂取させた群で寿命が延伸したことから、経口によるポリアミン摂取は寿命延伸効果があることが明らかとなった。さらに、ポリアミンを産生できない腸内細菌を定着させたノトバイオートハエと比較して、ポリアミンを産生できる腸内細菌を定着させたノトバイオートハエの寿命が延伸したことから、腸内細菌由来のポリアミンは宿主の寿命延伸効果があることが明らかとなった。腸内細菌由来のポリアミンの寿命延伸効果は、食餌由来のポリアミンの寿命延伸効果と比較してほぼ同等であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	倉石 貴透  (Kuraishi Takayuki)  (90613167)	金沢大学・薬学系・准教授    (13301)	
研究分担者	松本 光晴  (Matsumoto Mitsuharu)  (50505972)	協同乳業株式会社研究所・研究所・主幹研究員    (92648)	

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