

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21293

研究課題名（和文） -アミノ酪酸の未知なる機能発現メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel acting mechanisms of gamma-aminobutyric acid

研究代表者

高橋 恭子（TAKAHASHI, Kyoko）

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70366574

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、腸管内 -アミノ酪酸（GABA）の生理機能と作用機序の解明を目的とした。マウスへのビフィズス菌株投与により、腸内細菌叢の構成が変化し、腸管内GABA濃度の上昇、不安様行動の低下など行動特性の変化が誘導された。一方、血中のGABAおよびコルチゾール濃度には顕著な変化が認められなかった。さらに、マウス腸管より単離された菌株から高いGABA産生能を有する株が同定された。また、腸管上皮細胞にGABA受容体が発現し、GABA刺激により細胞内シグナル伝達が惹起されることが示された。したがって、腸管内GABAの作用機序として、腸管上皮細胞に発現する受容体を介する新たな機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸管内GABAに着目することにより、GABAの新規な機能発現メカニズムの可能性を示したものである。したがって、GABAの生理作用についてこれまでと異なる概念を確立し、脳腸関連の新たな側面を解明することにつながることを期待される。また、腸内細菌叢と腸管内GABA濃度の相関が示されたこと、腸内細菌叢と精神・神経疾患との関係が注目されていることから、腸内細菌叢への介入により、腸管GABAのコントロールを介した疾患の予防や治療への応用の道が拓かれることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the relationship between intestinal -aminobutyric acid (GABA) concentration and gut microbiota, and the physiological function and its mechanism of intestinal GABA. Administration of Bifidobacterium strain to mice altered the composition of gut microbiota, increased the concentration of intestinal GABA, and changed behavioral characteristics, such as a decrease in anxiety-like behavior. No significant changes were observed in serum GABA and cortisol levels. Furthermore, a bacterial strain isolated from mouse intestine was identified as having high GABA-producing ability. Expression of GABA receptors was detected on intestinal epithelial cells, and intracellular signaling was induced by GABA stimulation. These results suggested that intestinal GABA may act through the receptors expressed on intestinal epithelial cells.

研究分野：食品免疫学

キーワード：腸内細菌 -アミノ酪酸 腸管上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管には、体を構成する細胞よりも多い莫大な数の腸内細菌が生息し、腸内細菌叢を形成している。近年、腸内細菌叢の構成と様々な疾患に相関が報告されるなど、腸内細菌叢が宿主の生理機能の調節に不可欠な役割を果たし、健康と密接に関わることが急速に明らかにされてきた。特に最近では、脳と腸が密接に影響を及ぼし合う「脳腸相関」が注目され、それとともに腸内細菌叢の乱れと自閉症やうつとの関係をはじめ腸内細菌叢と神経・精神疾患の関わりが明らかにされてきた。そこで、本研究では腸内細菌が産生する γ -アミノ酪酸(GABA)が宿主に及ぼす作用に着目した。

GABA は、高等動物で抑制性の神経伝達物質として機能し、不眠やうつに対して抑制作用を示す。これらの精神安定作用は、脳に豊富に発現する GABA 受容体を介する。興味深いことに、GABA は、中枢神経系以外の末梢組織においても血圧上昇抑制作用、免疫調節作用、抗酸化作用など様々な活性を示す。さらに、経口摂取した GABA によるストレス低減効果などが実験的に証明され機能性食品として開発されているものの、血液脳関門があるために経口摂取した GABA が脳の GABA 受容体に作用するかについては意見が分かれ、その作用機序の詳細は不明であった。腸は第2の脳とも言われるように独自の神経ネットワークを持っており、腸管内の GABA が腸管の神経系に作用する可能性がまず考えられる。しかしながら、GABA の持つ多彩な生理作用は神経系への作用のみでは説明できず、新たな作用機序を含めた概念の構築が必要である。現在のところ神経細胞以外の細胞に対する GABA の作用については数少ない報告があるのみで、ほとんど明らかにされていない。

腸内細菌のなかには GABA の合成あるいは消費経路を有する菌が存在し、腸管内の GABA 濃度は、食餌由来成分に加えて腸内細菌叢による産生・消費に大きく依存すると考えられる。これまでに我々は、マウスに抗生物質およびプロバイオティクスを投与することにより、腸内細菌叢の構成と腸管内 GABA 濃度に相関があることを示してきた。さらに、特定の抗生物質およびプロバイオティクスの投与が血中 GABA 濃度に影響を及ぼすことなく腸管内 GABA 濃度を上昇させたことから、腸管内 GABA が血流による他組織への移動を介さずに腸管を起点として作用することにより脳に影響を及ぼすという新たな作用機序が存在するのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、腸管内 GABA 濃度と腸内細菌叢の関係、腸管内 GABA の生理機能とその作用機序を解明することを目的とする。特に、腸管上皮を介した新規な機能発現メカニズムを明らかにし、さらに、腸内細菌叢への介入により腸管 GABA 濃度を制御する手段を確立することを目指す。これにより、GABA の生理作用についてこれまでと異なる概念を確立するとともに、脳腸相関の新たな側面を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスへのビフィズス菌株投与による腸管内 GABA の変化と生理作用の解析

これまでに、マウスに特定のビフィズス菌株を経口投与することにより、腸内細菌叢の変化を介して、血中濃度を上昇させずに腸管内の GABA 濃度を上昇させることに成功している。マウスに本ビフィズス菌株を1日おきに2週間ゾンデを用いて経口投与し、経時的に糞便を採取するとともに、投与期間終了時に高架式十字迷路および Y 迷路を用いた行動試験を行った。また、投与期間終了後に血液、盲腸内容物、腸管上皮細胞を採取、調製した。

糞便の熱水・超音波処理による抽出物を限外ろ過に供して得られた <3kDa 画分を用い、アミノ酸誘導体化反応後、UPLC-MS/MS により GABA 濃度を測定した。血清中の GABA およびコルチゾール濃度は、それぞれ UPLC-MS/MS および ELISA により定量した。また、糞便および盲腸内容物から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンシングにより腸内細菌叢の解析を行った。腸管上皮細胞の細胞抽出物は、細胞内シグナル伝達分子のウェスタンブロッティング解析に使用した。

(2) 腸管上皮細胞における GABA シグナルの解析

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2, HT-29, HCT116 を用いて、定量 PCR により GABA 受容体各サブユニットの発現を測定するとともに、GABA で刺激して30分後および60分後の MAPK 分子のリン酸化をウェスタンブロッティングにより解析した。また、マウスの腸管組織切片を作成し、免疫蛍光染色により GABA 受容体の発現を観察した。さらに、マウス小腸クリプトよりオルガノイドを作成し、GABA 受容体各サブユニットの発現を定量 PCR にて、GABA 刺激時の MAPK 分子のリン酸化をウェスタンブロッティングにて解析した。

(3) GABA 高産生菌株の同定

マウス盲腸内容物により、選択培地を用いて菌株を単離した。これらの菌株について、グルタ

ミン酸あるいは GABA を添加した合成培地で培養し、培養上清中のグルタミン酸および GABA 濃度を測定することにより、GABA 合成能および消費能を評価した。

4. 研究成果

これまでに、マウスを用いて、抗生物質あるいはプロバイオティクスの経口投与により、腸内細菌叢の構成を様々に変化させて腸管内 GABA 濃度の変化を解析した結果、特定の抗生物質あるいはビフィズス菌株を経口投与した際にのみ GABA 濃度が上昇した。興味深いことにこのとき、血液中の GABA 濃度の上昇は認められなかったことから、GABA が腸管内で作用するのではないかと考え、腸管内 GABA の生理作用と腸管上皮を介した GABA の新たな作用機序について、以下の解析を行った。

(1) マウスへのビフィズス菌株投与による腸管内 GABA 濃度の上昇

マウスにビフィズス菌株を2週間経口投与して糞便中の GABA 濃度を経時的に測定した結果、投与開始1週間後の時点では対照群と差がなかったが、投与開始2週間後には対照群に比べて有意に高かった。したがって、ビフィズス菌株の投与により腸管内 GABA 濃度が上昇することが示された。一方、血清中の GABA 濃度には、ビフィズス菌株投与群と対照群の間で差が認められなかった。本ビフィズス菌株は、GABA 合成酵素遺伝子を持たないことから、腸管内 GABA の上昇は、腸内細菌叢の構成が変化して GABA 産生菌が増加あるいは GABA 消費菌が減少することによると考えられた。実際に、16S rRNA 遺伝子配列を用いた菌叢解析の結果、ビフィズス菌株投与群では対照群と比較してクロストリジウムの有意な減少やラクトバチルス属の増加傾向が観察されるなど、腸内細菌叢の構成が変化していることが示された。

(2) マウスへのビフィズス菌株投与が行動特性に及ぼす影響

まず、高架式十字迷路試験により不安様行動に及ぼす影響を解析した結果、オープンアームへの侵入回数がビフィズス菌株投与群で対照群に比べて有意に増加し、不安様行動が低減していることが示された。血清中コルチゾール濃度を測定した結果、ビフィズス菌株投与群と対照群で差は認められなかった。また、Y 迷路試験においては、ビフィズス菌株投与群で対照群と比べて自発的行動が減少し、空間作業記憶が向上する傾向が観察された。これらの結果から、ビフィズス菌株の投与により腸管 GABA 濃度が上昇し、宿主の行動特性が変化することが示された。

(3) 腸管上皮細胞における GABA 受容体の発現と GABA シグナル

ヒト腸管上皮細胞株を用いて GABA 受容体各サブユニットの発現を測定した結果、腸管上皮細胞に GABA 受容体が発現することが明らかになり、腸管内の GABA が腸管上皮細胞上の受容体を介して作用する可能性があると考えられた。さらに、脳においては様々なサブユニットが高発現するのに対し、腸管上皮細胞においては特定のサブユニットのみ発現が検出された。腸管上皮細胞株間で受容体サブユニットの発現パターンの違いが確認され、Caco-2 と HCT116 ではそれぞれ GABA_A 受容体、GABA_B 受容体が優位に発現することが明らかになった。これらの細胞株を GABA で刺激して MAPK の活性化を解析した結果、リン酸化の誘導や抑制が観察されたことから、GABA 刺激により腸管上皮細胞内にシグナル伝達が惹起されることが明らかになった。また、Caco-2 と HCT116 では GABA 刺激時の MAPK のリン酸化パターンが異なり、発現する受容体のタイプにより惹起される細胞内シグナルが異なると考えられた。

さらに、マウス腸管組織切片を用いた免疫蛍光染色により、腸管上皮における GABA 受容体の発現を確認した。また、マウス腸管オルガノイドを用いて、GABA 受容体の発現と GABA 刺激による細胞内シグナル伝達の解析を行った。その結果、腸管オルガノイドにおいても特定の GABA 受容体サブユニットの発現が認められ、特に、GABA_{B2} 受容体が脳組織と同程度に高発現していた。

(4) GABA 高産生菌の同定

(1)の投与試験においてビフィズス菌株投与群でそれぞれ減少および増加が観察されたクロストリジウムとラクトバチルス属の選択培地を用いて、マウス盲腸内容物より菌の単離を試みた。単離された菌を *in vitro* で培養し、GABA 合成能および消費能を評価した。その結果、全ゲノム配列の解析により *Enterococcus gallinarum* と同定された1株について、グルタミン酸添加培地で培養した際に、培養上清中に GABA を高産生することが確認された。この培養上清中の GABA 濃度は、高い GABA 産生能を持つことが報告されている *Lactobacillus brevis* よりも高かった。クロストリジウムについても複数株が得られたが、GABA 添加培地で培養した際にいずれも顕著な GABA 消費能を示さなかった。

これらの結果より、腸内細菌叢への介入により腸管内 GABA 濃度が変化すること、腸管内 GABA が宿主の行動特性に影響を及ぼす可能性が明らかになった。さらに、腸管内 GABA の作用機序として、腸管上皮細胞に発現する GABA 受容体を介する新たな機構の存在が示唆された。本研究により得られた成果は、腸管内 GABA の生理作用とその機構、および脳腸関連に関して、新しい概念の確立につながるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Narabayashi H, Koma C, Nakata K, Ikegami M, Nakanishi Y, Ogihara J, Tsuda M, Hosono A, Hanazawa S, Takahashi K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Gut microbiota-dependent adaptor molecule recruits DNA methyltransferase to the TLR4 gene in colonic epithelial cells to suppress inflammatory reactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Mol. Biosci.	6. 最初と最後の頁 1005136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2022.1005136. eCollection 2022.	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池上美音、原田岳、宮澤賢司、中西祐輔、高橋恭子
2. 発表標題 腸管上皮におけるGABAシグナル伝達の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mion Ikegami, Gaku Harata, Kenji Miyazawa, Yushiro Fuji, Hiroshi Matsufuji, Yusuke Nakanishi, Kyoko Takahashi
2. 発表標題 Changes in intestinal GABA concentration by intervention in gut microbiota and its physiological effects
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池上美音、原田岳、何方、宮澤賢司、高橋恭子
2. 発表標題 腸内細菌叢への介入による腸管GABA濃度の変化とその作用
3. 学会等名 日本食品免疫学会第17回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上 美音、近藤 祐衣、福本 凜太郎、原田 岳、何 方、宮澤 賢司、藤 佑志郎、松藤 寛、中西 祐輔、高橋 恭子
2. 発表標題 腸管内GABAの生理的意義とその機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	松藤 寛 (MATSUFUJI Hiroshi) (70287605)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	

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
---------	---------