

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19322

研究課題名(和文)「病は気から」を解明する：神経系による腸内細菌制御を介した恒常性維持機構

研究課題名(英文) Homeostasis through regulation of gut microbiota by the nervous system

研究代表者

倉田 祥一郎 (Kurata, Shoichiro)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90221944

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、経口感染した細菌に対する抵抗性と、腸内細菌叢を制御している神経細胞の特徴を遺伝子発現のレベルで明らかにすると共に、どのようにして腸管恒常性を維持しているかを解析した。その結果、本神経群は、成虫脳の神経細胞の代表的なサブタイプ(コリン作動性、GABA作動性、グルタミン酸作動性神経)が混在した神経細胞群であることが示唆された。さらに、この神経が、単一の腸内細菌のみを有する場合でも、その腸内細菌の量的な制御に関わり、腸内細菌に対する抵抗性の発現に関わる事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、感染抵抗性と腸内細菌叢の制御に関わる神経細胞が、コリン作動性、GABA作動性、グルタミン酸作動性神経が混在した神経細胞群であることが示唆され、単一の腸内細菌のみを有する場合でも、その腸内細菌の量的な制御に関わり、腸内細菌に対する抵抗性の発現に関わる事が明らかとなった。今後、今回行った遺伝子発現解析をもとに、神経の特徴付けがさらに進み、同等の神経細胞が哺乳動物にも存在するのか、さらには、同様の神経支配機構が哺乳動物でも腸管恒常性を制御しているのかなど、免疫系の神経支配による恒常性維持機構の解明が進むことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we characterized the neurons that regulate resistance to orally transmitted bacteria and the gut microbiota at the level of gene expression and how they maintain gut homeostasis. The results suggest that this neuronal population is a mixture of typical subtypes of adult brain neurons (cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons). Furthermore, we found that these nerves are involved in the regulation of the gut microbiota and in the resistance to the gut microbiota, even when only a single gut microbiota is present.

研究分野：生物系薬学

キーワード：神経-免疫関連 恒常性維持 ショウジョウバエ 腸管

1. 研究開始当初の背景

「病は気から」のことわざにもあるように、生体の多様な反応を調節する神経系が、病に対抗する免疫系に影響を与えていると考えられる現象は、誰もが経験している。今から 100 年ほど前の 1924 年、フランス パスツール研究所のメタルニコフは、昆虫の中樞神経である腹側神経索が透けて見えるハチミツガの幼虫の表皮の上から焼きごてを当て、特定の神経節を麻痺させると、その幼虫はピブリオ菌の感染から防御できなくなることを報告している (*Ann. Inst. Inst. Pasteur* 38, 787-826)。神経系が免疫系を制御していることを示唆する初めての知見である。その後、神経系と免疫系のクロストークは様々な生物や局面で指摘されているが、神経系による免疫制御に関する研究はあまり進展しておらず、どの神経細胞が、どのような制御を受けて、どのように免疫系を制御し、生体の恒常性を維持しているのかについては、比較的単純な神経系と免疫系を有する昆虫においてですら未だに明らかにされていない。ショウジョウバエは、ヒトの 10 万分の 1 足らずの神経細胞しか有さず、分子遺伝学的解析が容易なため、中樞神経系を有する生物で唯一全神経細胞のアトラス構築が進むなど、個体レベルでの神経細胞学が発展している。一方、免疫系も獲得免疫を持たず、自然免疫のみであり、その分子機構の解明が進んでいる。したがって、これまで未解明な、免疫系の神経制御を明らかにできる最も適した研究材料といえる。そこで、昆虫免疫系の神経支配についての解析の手掛かりを得るために、神経細胞学的手法を免疫研究に導入した。ショウジョウバエでは、特定の神経細胞の活性を人為的に操作して、その神経細胞の制御する事象を個体レベルで観察できる。例えば、静止膜電位の過分極作用を持つカリウムチャンネル Kir2.1 を発現させると、その神経活動を抑制できる。そこで、ショウジョウバエのエンハンサートラップ系統を用いて、Kir2.1 を発現させ、系統別に異なる神経細胞群を不活性化した。そして、その際、ショウジョウバエに自然感染するものの致死性は示さない軟腐病菌の経口感染に対する抵抗性を調べた。350 系統を用いたスクリーニングの結果、ほとんどの系統で感染抵抗性に影響が見られなかったが、NP3253 系統では、Kir2.1 の発現により感染抵抗性が著しく低下した (Kenmoku et al. *J. Exp. Biol.* 2016、図 1)。NP3253 系統での Kir2.1 の発現を全神経細胞で抑制すると、感染抵抗性の低下が見られなくなることから、NP3253 系統で Kir2.1 が発現した神経細胞 (NP3253 神経細胞群と命名した) が、経口感染に対する抵抗性を制御していることが明らかとなった。その後の解析により、NP3253 系統でより強く Kir2.1 を発現させると、そのショウジョウバエは、非感染の状況であっても、NP3253 神経細胞群を抑制するだけで生存率が低下することが明らかとなった。そしてその際、腸内細菌を除去すると、その神経抑制による生存率の低下が回復した。このことは、細菌の経口感染抵抗性を制御している NP3253 神経細胞群が、腸内細菌に対する抵抗性さえも制御していることを示している。さらに、NP3253 神経細胞群の抑制により、腸内細菌叢が大きく変動することが明らかとなった。

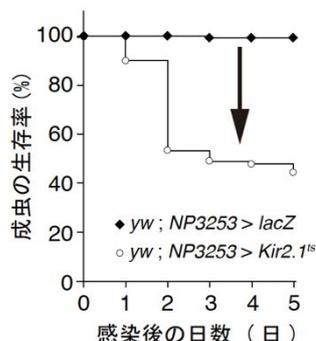


図 1. 神経抑制による感染抵抗性の低下
NP3253 神経細胞群を不活化すると
細菌感染抵抗性が低下する (○)

本研究では、免疫制御を行う NP3253 神経細胞の特徴付けを行うと共に、この神経細胞が、どのように腸内細菌叢を制御し、恒常性を維持しているかを明らかにする。これにより、免疫

系の神経支配による恒常性維持機構を解明することを目指す。本研究により、NP3253 神経細胞群の理解が進むことで、同等の神経が哺乳動物にも存在するのか、また、種を越えて、同様の神経支配機構が哺乳動物でも恒常性を制御しているのかなど、免疫系の神経支配による恒常性維持を明らかにする新しい研究領域の創出が期待される。さらに将来的には、「病は気から」から導かれるこれまでにない保健医療分野、例えば、脳神経系を考慮した免疫制御や、疾病予防・対策を目指す新規方法論の確立、あるいは神経・免疫連関を標的とした革新的な医薬品の開発などに発展する可能性が考えられる。

2 . 研究の目的

これまでに、ショウジョウバエで確立された神経操作技術を免疫研究に取り入れ、細菌感染に対する抵抗性を制御している神経細胞群 (NP3253 神経細胞群) を同定している (J. Exp. Biol. 2016)。この神経細胞群は、腸内細菌をも制御し、その制御が失われるとハエは死に至る。本研究では、免疫制御を行う NP3253 神経細胞の特徴付けと、その神経回路の構造決定を行う (項目 1) と共に、NP3253 神経細胞群が、どのように腸内細菌を制御し、恒常性を維持しているかを明らかにすることを目的とする (項目 2)。これにより、未踏であった神経系による免疫制御に光を当て、「病は気から」を活用した脳神経系を考慮した免疫制御・疾病対策や、神経・免疫連関を標的とした新規医薬品の開発といった、新しい保健医療分野の扉を開く。

3 . 研究の方法

(1) 研究項目 1 : NP3253 神経細胞群の回路構造の決定

NP3253 神経細胞群は、脳から腸管上部にかけて存在し、それらの細胞体は食道下神経節に約 60 個、脳のキノコ体に約 10 個存在している。この部位は、味覚や嗅覚の中枢であることが知られている。NP3253 神経細胞群のような、脳内のごく一部の神経細胞の特徴を明らかにすることは容易ではない。そのため、組織全体から特定の細胞の遺伝子発現を高感度に検出する手法である TaDa (Targeted DNA adenine methyltransferase identification, Marshall et al. 2016) 法を導入する。すなわち、大腸菌の DNA メチル化酵素 (Dam) を付加した RNA ポリメラーゼ (Pol) を、NP3253 系統を用いて、NP3253 神経細胞群でのみ発現し、それらの細胞で転写されているゲノム領域をメチル化する。その後、頭部全体からゲノム DNA を単離し、Dam-Pol でメチル化された領域を同定する。Dam-Pol 依存のメチル化は、NP3253 神経細胞群でのみ生じるので、これにより NP3253 神経細胞群特異的な遺伝子発現状況を知ることができる。

(2) 研究項目 2 : NP3253 神経細胞群による腸内細菌制御機構の解明

これまでの研究により、NP3253 神経細胞群を抑制すると、腸内細菌依存に宿主の生存率が低下すると共に、腸内細菌叢に変化が生じることが明らかとなっている。多様な菌種が混在する生体の腸管では、腸内細菌同士の競合といった副次的な影響が生じてしまい、NP3253 神経細胞群と、特定の腸内細菌の直接的な関連を解析することは難しい。そこで NP3253 神経細胞群と、それにより制御を受けている腸内細菌の直接的な因果関係を調べるために、NP3253 神経細胞群を抑制した個体から、NP3253 神経細胞群により制御を受けている腸内細菌を単離し、その単離した腸内細菌のみで、腸内細菌叢を単一化したノトバイオート個体を作成する。そのノトバイオート個体において、NP3253 神経細胞群を抑制し、腸内細菌叢の変化を調べる。加えて、NP3253 神

経細胞群を抑制したノトバイオート個体の生存率を調べる。

4. 研究成果

(1) 研究項目1: NP3253 神経細胞群の回路構造の決定

TaDa 法を導入し、NP3253 神経細胞群特異的な遺伝子発現状況を明らかにした。次に、過去の解析 (Estacio, Biology Open 2020) から、成虫脳の神経細胞の代表的なサブタイプ (コリン作動性、GABA 作動性、グルタミン酸作動性神経) の Dam-Pol II の TaDa 解析データを取得し、NP3253 神経細胞群のデータと比較した。

その結果、NP3253 神経細胞群は、1つのサブタイプに分類されるのではなく、むしろ、これらのサブタイプが混在した神経細胞群であることが示唆された。さらに、これらのサブタイプの平均値と比較して、NP3253 神経細胞群で特異的に発現する遺伝子を探索したところ、NP3253 神経細胞群で特異的に発現する遺伝子をピックアップすることに成功した。今後、NP3253 神経細胞群での、これらの遺伝子の機能を解析することで、NP3253 神経細胞群の特徴を捉えることができると期待している。

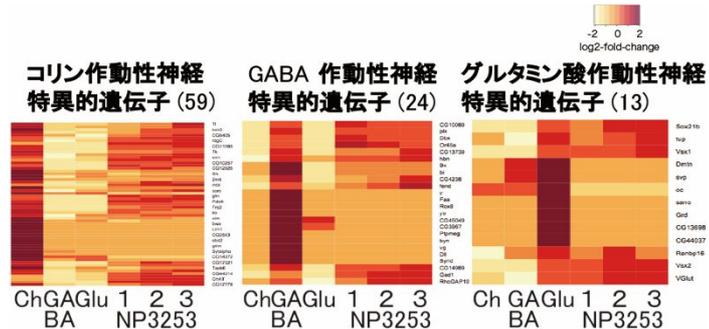


図 2. NP3253 神経細胞群の Pol II-TaDa 解析
コリン作動性 (Ch)、GABA 作動性 (GABA)、
グルタミン酸作動性 (Glu) 神経特異的遺伝子の
NP3253 神経細胞群での発現状況を示している

(2) 研究項目2: NP3253 神経細胞群による腸内細菌制御機構の解明

NP3253 神経細胞群を抑制した個体から *A. persici* を単離した。無菌化したショウジョウバエを、単離した *A. persici* を含む培地で飼育し、腸内細菌叢を *A. persici* で単一化したノトバイオート個体を作成した。そのノトバイオート個体において、NP3253 神経細胞群を抑制し、腸内細菌叢の変化を調べたところ、単一菌種からなる腸内細菌叢を持つ個体においても、NP3253 神経細胞群の抑制により、腸内細菌量が増加することが明らかとなった。さらにその際、神経抑制によりノトバイオート個体の生存率が低下した。これらの結果は、NP3253 神経細胞群が、単一の腸内細菌のみを有する場合でも、その腸内細菌の量的な制御に関わり、腸内細菌に対する抵抗性の発現に関わる事を示している。次に NP3253 神経細胞群の不活性化により *A. persici* が増加する原因を調べた。*Acetobacter* はエタノール代謝により酢酸を産生する菌であることから、*A. persici* ノトバイオート個体に、ショウジョウバエの餌であり、エタノールを産生する酵母や、エタノールそのものを与えたところ、NP3253 神経細胞群を不活性化していない場合でも、*A. persici* 細菌数の増加が見られた。2018 年度から 2019 年度に行った挑戦的研究 (萌芽) 「八工が明らかにする「病は気から」: 免疫系を制御する神経細胞」で行った、網羅的トランスクリプトーム解析から、NP3253 神経細胞群の抑制により、腸管でのアルコール還元酵素 *Adh* の発現が低下することが明らかとなっている。これらの結果から、NP3253 神経細胞群の抑制により、腸管における *Adh* の発現が低下し、その結果、腸管内でのエタノール濃度が上昇して *A. persici* が増加していることが考えられ、NP3253 神経細胞群が腸内細菌の菌種特異的にその菌数を制御し、腸管の恒常性を維持している可能性が指摘された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shoichiro Kurata
2. 発表標題 Neural control of gut homeostasis in Drosophila
3. 学会等名 The Uehara Memorial Foundation Symposium 2021 “Brain-periphery interactions in health and diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉田祥一郎
2. 発表標題 昆虫の自然免疫
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋場春佳, 石橋謙太郎, 鈴木拓朗, 布施直之, 大坪和香子, 北澤春樹, 倉田祥一郎
2. 発表標題 ショウジョウバエ神経系による腸内細菌叢の制御を介した腸管恒常性維持機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shoichiro Kurata
2. 発表標題 Neural control of gut homeostasis through regulation of microbiota and pathogens in Drosophila
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井希帆、Nguyen Quang Dat、石橋謙太郎、布施直之、大坪和香子、谷本拓、北澤春樹、倉田祥一朗
2. 発表標題 シヨウジョウバエ神経系による飢餓応答制御機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院薬学研究科生命機能解析学分野 http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html 神経による腸内フローラ制御を介した健康維持 https://w3.tohoku.ac.jp/frid/project/page-46/
--

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

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