

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22295

研究課題名（和文）腸内細菌叢のin vivo再構築による宿主行動および生理機能の解明

研究課題名（英文）Reconstruction of gut microbiota to understand host-microbe interactions influencing physiology and behavior of honey bees

研究代表者

宮崎 亮（Miyazaki, Ryo）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：80712489

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）：ミツバチ腸内細菌叢を人工的に再構築し、ミツバチの寿命と摂食行動に対する腸内細菌の影響を解析した。その結果、腸内細菌の保有自体はミツバチ個体にとって負担であることが分かった。この現象は無菌マウスを使った研究結果と類似しており、生物に共通の特徴である可能性がある。一方、特定の腸内細菌の組合せがミツバチの寿命に対して正の効果があることも見出され、腸内細菌同士の相互作用が宿主にとって重要であることが示唆された。また、2-5時間の絶食後のミツバチの味覚応答を調べたところ、腸内細菌の存在は味覚応答に影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

保有する腸内細菌が全て培養でき、腸内細菌のあらゆる組合せで宿主への影響を評価できるミツバチを用いることで、個々の腸内細菌の機能だけでなく、腸内細菌同士の相互作用がもたらす効果を実験的かつ網羅的に解析できることを、本研究によって示すことができた。これはミツバチが腸内細菌叢研究の新しいモデルとして有用であることを示している。本研究は国内学会等の招待講演で発表し、複数の論文執筆の最終段階にある。また、社会性昆虫の腸内細菌叢について国際専門誌から総説執筆依頼を受けて発表しており、国内外の注目度も高い。

研究成果の概要（英文）：We artificially reconstructed the gut microbiota of honey bees with all possible combinations of microbes and analyzed their effects on the longevity and gustatory responsiveness of the host. We found that the presence of gut bacteria is in itself a cost for individual honey bees. This result is similar to those of studies using sterile mice and may be a common feature of living organisms. On the other hand, we also found that certain combinations of gut bacteria had a positive effect on the lifespan of honey bees, suggesting that interactions among gut bacteria are important to the host. In addition, the gustatory response of honey bees after 2-5h of starvation was unrelated to the presence of gut microbiota.

研究分野：微生物生態学

キーワード：腸内細菌叢 社会性昆虫 ミツバチ

### 1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌による宿主の健康維持に着目した研究が増えており、腸内細菌叢の研究は今まさに黎明期から成長期へと移行している。一般的に、腸内細菌叢による宿主生理機能制御の研究ではマウスやショウジョウバエなどのモデル動物が使われる。モデル動物を使うことで宿主と微生物双方の操作が容易になり、遺伝学が使えるメリットもある。しかし、動物が共進化によって獲得した腸内細菌叢を研究する上で、これらモデル動物には重大な欠点がある(表1)。まず、腸内細菌叢の複雑さと腸内細菌の単離・培養技術の不足により、個々の腸内細菌を直接操作しながら宿主の生理機能を解析することが困難な点が挙げられる。そして、マウスやショウジョウバエの腸内細菌叢は不安定で、個体ごとに容易に変化してしまう点がある(Engel and Moran, 2013, FEMS Microbiol Rev; Carmody et al., 2015, Cell Host Microbe)。つまり、宿主と腸内細菌の相関関係が弱く共進化が十分に進行・確立していないため、研究室や系統による腸内細菌叢の個体差が非常に大きいのである。これらの要因により、腸内に共生する全ての細菌の機能、すなわち腸内細菌同士の相互作用や宿主の生理機能・行動に与える影響を、実験的に解明することは現実的に不可能に近い。そこで、宿主と腸内細菌叢の関係を体系的に解析することのできる新しい実験モデルが求められる。

ミツバチ		ヒト	マウス	ショウジョウバエ
5 <sup>1)</sup>	腸内細菌種	>1000	~1000	—
○ <sup>2)</sup>	細菌叢の安定性	○ <sup>3)</sup>	△ <sup>4)</sup>	× <sup>2)</sup>
全て○	腸内細菌の単離・培養・遺伝学	殆ど×	殆ど×	—
○ <sup>5)</sup>	無菌宿主の作製	×	○	○

1) Kwong and Moran 2016. 2) Engel and Moran 2013. 3) Sekeja et al. 2011. 4) Carmody et al. 2015. 5) Kwong et al. 2014

表1. ミツバチとモデル動物の腸内細菌叢の比較

### 2. 研究の目的

本研究で用いる社会性昆虫のミツバチは、哺乳類同様に安定した腸内細菌叢を有するが、その構成はよりシンプルで、全ての腸内細菌が実験室で培養可能である(表1)。また無菌ミツバチの作製が可能であることから、腸内細菌を任意の組合せで投与・定着させ、宿主への影響を比較・評価することができる。本研究では、このミツバチの優れた生物学的特徴を活かして、宿主に共生する腸内細菌叢の *in vivo* 再構築系を確立し、個々の腸内共生細菌が宿主の行動や生理機能に与える影響を直接的かつ網羅的に解析するとともに、その分子基盤の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の3課題を遂行する(図1)。

#### 課題1. ミツバチ腸内細菌叢の *in vivo* 再構築

5種類のミツバチ腸内細菌を培養し、全31通りの組合せの腸内細菌カクテルを無菌ミツバチに経口投与する。各ノトバイオート個体の腸から経時的にDNAを抽出し、細菌16S rRNA遺伝子のシーケンシングまたは定量PCRを行い、各腸内細菌の増殖と定着を確認する。また、経時的にノトバイオート個体の腸切片を作製し、摂取した腸内細菌に対してFISH解析を行うことで、腸内細菌叢の形成を視覚的に確認する。申請者らの予備実験では、2-3日で5種の腸内細菌による高次集合体形成が確認されている。

課題2. 腸内細菌の全組合せパターンにおける宿主生理状態ならびに行動解析

個々の腸内細菌が宿主の生理状態や行動に与える影響を調べるために、全31通りのノトバイオート個体について、フィットネスから社会性動物特有の高次行動に至るまで様々な階層の生体機能を測定する。寿命、形態、記憶学習能力に代表される個体レベルのパラメータだけでなく、ノトバイオート個体にバー



図1. 本研究のスキーム

コードを付けて通常の巣（コロニー）に戻し、他個体との相互作用や採餌行動、「8の字ダンス」といった社会行動をビデオ撮影して観察・分析する。これらの解析から、各腸内細菌の役割と重要性を明らかにし、個体機能や生理状態の低下に関与する腸内細菌種あるいはその組合せを同定する。

### 課題3. 宿主機能低下に関与する宿主-微生物双方の分子基盤の解明

課題2の結果に基づき、腸内細菌叢の組合せによって変化する宿主生理機能と行動の分子基盤を“腸内細菌”と“宿主”双方の解析から明らかにする。具体的には、特定の組合せの腸内細菌カクテルで個体機能が低下したノトバイオート個体について、脳、腸、感覚器からRNAを抽出してRNA-seqを行い、正常機能を示す組合せの個体と比較して発現変動した宿主遺伝子を同定する。発現変動レベルの高い遺伝子については各組織において *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色を行い、特定の腸内細菌の存在・組合せによって制御される宿主因子を明らかにする。さらに、腸から抽出したDNAとRNAを用いて、腸内細菌数の定量と遺伝子発現解析を行うことで、腸内細菌側のエフェクター因子も同定する。

## 4. 研究成果

網羅的なミツバチ腸内細菌叢の再構築により、ミツバチの寿命と摂食行動に対する腸内細菌の影響を全組合せにおいて解析した。その結果、腸内細菌の保有自体はミツバチ個体にとってコストであることが分かった。この現象は無菌マウスを使った研究結果と類似しており、生物に共通の特徴である可能性がある。一方、特定の腸内細菌の組合せがミツバチの寿命に対して正の効果があることも見出され、腸内細菌単独の効果ではなく腸内細菌同士の相互作用が宿主にとって重要であることが示唆された。

また、飢餓期間が2-5時間の短期飢餓状態では、腸内細菌はミツバチの味覚応答に影響を与えないことが明らかとなった。この結果は、腸内細菌がミツバチの味覚応答性を変化させるという従来の研究結果とは異なるものであり、餌と飢餓条件によって腸内細菌の関連性が異なることを示唆している。研究期間全体を通して、全組合せの腸内細菌カクテルを作製・利用することで、ミツバチの生理状態や行動への腸内細菌の影響をかつてない精度で網羅的に解析することができた。現在はこれらの成果を複数の論文にまとめており、投稿の最終段階にある。また、社会性昆虫の腸内細菌叢について国際専門誌から総説執筆依頼を受け、発表した。

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 Wolter Laura A., Suenami Shota, Miyazaki Ryo	4. 巻 71
2. 論文標題 Frischella japonica sp. nov., an anaerobic member of the Orbales in the Gammaproteobacteria, isolated from the gut of the eastern honey bee, Apis cerana japonica Fabricius	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.004712	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 -

1. 著者名 Suenami Shota, Koto Akiko, Miyazaki Ryo	4. 巻 14
2. 論文標題 Basic Structures of Gut Bacterial Communities in Eusocial Insects	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/insects14050444	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6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮崎亮
2. 発表標題 ミツバチと腸内細菌の関係
3. 学会等名 ミツバチサミットプレイベント2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Suenami, Laura A. Wolter, Kirsten M. Ellegaard, Philipp Engel, Ryo Miyazaki
2. 発表標題 Species-specific traits of gut symbionts Frischella associated with different honey bees
3. 学会等名 International Union for the Study of Social Insects 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末次翔太、Laura Wolter、宮崎亮
2. 発表標題 比較ゲノムによる、ミツバチに固有な2種のFrischella属腸内細菌の生態学的機能の解析
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎亮
2. 発表標題 Gut microbial communities in eusocial insects
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末次翔太、宮崎亮
2. 発表標題 ミツバチの味覚応答に対する腸内細菌叢の影響の解析
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末次翔太、福田洸平、宮崎亮
2. 発表標題 天然のミツバチに対する蛍光細菌の定着能力の解析
3. 学会等名 ミツバチサミット2019
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
スイス	University of Lausanne			