

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19330

研究課題名（和文）寿命を延ばす腸内細菌とその代謝産物の同定

研究課題名（英文）Identification of gut microbes and metabolites that extend fly lifespan

研究代表者

倉石 貴透（Kuraishi, Takayuki）

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：90613167

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）：研究代表者は、ショウジョウバエを無菌状態で長期間維持する技術を確立している。無菌バエを線滅菌したエサで飼育すると、幼虫が成長を完全に止めて死んでしまうことを見出していた。また、無菌バエについて、幼虫期をオートクレーブエサで飼育して成虫期に線滅菌エサで飼育すると、寿命が顕著に短縮することを見出していた。本研究では、通常菌叢バエから腸内細菌を複数種類単離し、幼虫期の成長停止や成虫期の寿命短縮を回復させる腸内細菌の探索を行った。その結果、酢酸菌が当該表現型を回復させることを見出した。加えて、酢酸菌が産生する微量栄養素が幼虫の成長と成虫の寿命を回復させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が世界中で進展し、健康寿命を伸ばすための基礎的研究が期待されている。「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の対象として、近年特に注目を集めている。腸内細菌が宿主に与える影響の分子基盤として、腸内細菌が産生する代謝産物が重要な要素と考えられている。本研究では、栄養不足の飼育環境において、酢酸菌が産生する微量栄養素がショウジョウバエの成長や寿命をサポートすることを示した。

研究成果の概要（英文）：We have developed a novel technique that enables one to keep germ-free flies for multiple generations. We found that larvae raised with  $\gamma$ -ray irradiated food stopped their growth, and that adult flies raised with  $\gamma$ -ray irradiated food (larval stage, autoclaved food) reduced their lifespan significantly. In this study, we isolated several gut bacteria from our wild-type flies, and generated gnotobiotic flies with those bacteria. We found that Acetobacter recovered both larval growth and reduced adult lifespan. We also identified a micronutrient that could be supplied by Acetobacter recovered both larval growth and reduced adult lifespan.

研究分野：自然免疫学

キーワード：腸内細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト腸内細菌叢は、腸管内に棲む 1,000 種類 1,000 兆個 (計 1kg) もの多種多様な細菌の混合物から構成されている。腸内細菌が作り出す代謝産物は上皮細胞から体内に取り込まれ、ヒトの健康に対して直接的に影響を及ぼす。したがって、有益な腸内細菌種や代謝産物の同定できれば、健康寿命の延伸へと応用できる。しかし、健康寿命への影響を調べる実験研究は、哺乳類を用いた場合には数年に及ぶために非常に障壁が高い。さらに哺乳動物では、腸内細菌は代謝産物に加えて宿主との直接的接触により影響を及ぼすため、相互作用のメカニズム解析が複雑化する。ゆえに、宿主寿命を延ばす腸内細菌種を発見してその機構を明らかにする研究は、これまでにほとんど行われていない。そのため人類は、寿命延伸に有益な腸内細菌についての科学的知見を持ち合わせていない。この問題を克服するため、研究代表者・倉石は、寿命が 2 ヶ月程度と短く、腸管内腔の囲食膜が腸内細菌と上皮細胞との直接的接触を阻むという特徴を持つ (PNAS 108:15966-71, (2011), 研究代表者責任著者) キイロショウジョウバエ (以下、ハエ) を用いて、腸内細菌代謝産物が健康寿命に与える影響を調べる研究を開始した。

宿主に多種多様な細菌が棲んでいる状況で、特定の腸内細菌と宿主との相互作用を調べることは難しい。腸内細菌叢を完全に排除した「無菌動物」を作成して細菌由来代謝産物をいったんゼ口にし、そこに特定の菌を定着させて解析する必要がある。しかしこれまで、完全に腸内細菌叢を除去してハエを飼育し続ける技術が無かった。そこで研究代表者は、ハエの無菌化手法や飼育装置そしてエサの成分を改良し、完全な無菌ハエを何世代にもわたって維持することに成功した。すなわち、世界初の無菌ハエ維持技術を確立した。

無菌ハエは、線滅菌したエサで飼育した場合、極めて特徴的な表現型を 2 つ示した。1 つ目は、線滅菌したエサで飼育した無菌ハエの幼虫が成長を完全に止めて死んでしまうことである。2 つ目は、寿命が 3 週間程度へと著しく短縮することである。これらの生理異常が生じる原因を本研究で突き止めることを目標とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、無菌ハエ成長停止を回復させる腸内細菌とその代謝産物の同定を試みた。また、無菌ハエの寿命を延ばす腸内細菌と代謝産物の同定を目的として研究を進めた。将来的に目指すところは、宿主の成長と生存を支える腸内細菌代謝産物をヒトに応用するシーズを得ることである。

### 3. 研究の方法

無菌動物の飼育に用いる器具やエサは滅菌処理を行う必要がある。主に使用される滅菌方法はオートクレーブによる滅菌やガンマ線照射による滅菌である。ショウジョウバエのエサは、これらの滅菌方法で滅菌することが可能である。しかし、ガンマ線滅菌を行ったエサ (以下、ガンマ線滅菌エサ) で飼育を行うと無菌ハエ幼虫が成長しないことがわかった。また、幼虫期の成長停止を回避するため、オートクレーブを行ったエサ (以下、オートクレーブエサ) で幼虫を育て、成虫期になった後にガンマ線滅菌エサで成虫を飼育した。その結果、通常菌叢ハエと比較して、無菌ハエの寿命は著しく短くなった。

これらの結果は、ガンマ線滅菌エサによるハエの飼育において、通常菌叢ハエに存在する腸内細菌が幼虫の成長や成虫の寿命をサポートしていることが考えられる。そこで、通常菌叢ハエを飼育することで腸内細菌がエサに混入した状態を作り出し、そこに無菌ハエを入れて飼育した。すなわち、腸内細菌を戻した無菌ハエを作成し、幼虫の成長を観察した。

次に、通常菌叢ハエの腸管を回収して破砕し、さまざまな組成の培地に塗布してコロニーを単離した。リボソーム RNA をコードする遺伝子領域を PCR 法で増幅してシーケンスを行い、菌種を同定した。

単離した腸内細菌を無菌ハエに摂食させ、数世代の飼育後、CFU アッセイにて腸内細菌の定着を確認した。酢酸菌のみを定着させたハエ (酢酸菌ノトバイオート) と乳酸菌ノトバイオートを作出した。作出したそれぞれのノトバイオートハエについて、ガンマ線滅菌エサで幼虫を飼育して成長を観察した。また、成虫をガンマ線滅菌エサで飼育して寿命を測定した。

ガンマ線滅菌エサでは、成長に必要な栄養素がガンマ線滅菌によって破壊されている可能性があるかと予想される。そこで、LC-MS/MS や HPLC によるエサ成分の分析を実施した。ガンマ線滅菌エサで減少している微量栄養素に着目し、当該栄養素をガンマ線滅菌エサに添加して飼育した無菌ハエ幼虫の成長を観察した。また、成虫の寿命を測定した。

### 4. 研究成果

通常菌叢ハエの腸内細菌を無菌ハエに戻した幼虫の成長を観察した。その結果、幼虫の成長停止は見られなくなり、成長は回復した。すなわち、ガンマ線滅菌エサ飼育における無菌ハエ幼虫の成長をサポートする腸内細菌が存在することが示唆された。そこで、通常菌叢ハエからさまざまな腸内細菌を単離した。乳酸菌と酢酸菌が単離された主な腸内細菌であったため、これらをそ

れぞれ単独で定着させたノトバイオートハエを作出した。CFU アッセイにより、通常菌叢ハエと同程度の腸内細菌数が定着していることが確認されるノトバイオートハエを作出できた。そこで、これらのノトバイオートハエを用いて、ガンマ線滅菌エサで幼虫の成長と成虫の寿命を測定した。その結果、乳酸菌ノトバイオートでは幼虫の成長と成虫の寿命は無菌ハエと同様であったのに対し、酢酸菌ノトバイオートでは、幼虫の成長と成虫の寿命はともに正常に戻った。すなわち、酢酸菌が、ガンマ線滅菌エサ飼育における無菌ハエ幼虫の成長と成虫の寿命をサポートしている責任細菌であることが明らかとなった。

ガンマ線滅菌エサに含まれる低分子化合物について、LC-MS/MS および HPLC 分析を行った。その結果、微量栄養素であるビタミンの一種（以下、微量栄養素）がほとんど失われていることがわかった。そこで、微量栄養素をガンマ線滅菌エサにさまざまな濃度で添加して、幼虫の成長と成虫の寿命を観察した。その結果、HPLC による微量栄養素の検出限界を遙かに下回る濃度で、幼虫の成長と成虫の寿命が回復した。したがって、微量栄養素が幼虫の成長と成虫の寿命をサポートしていることが明らかになった。ノトバイオートハエを作成した乳酸菌と酢酸菌のゲノムを解析したところ、乳酸菌には微量栄養素を合成する酵素経路が欠損しており、酢酸菌には存在していた。この結果は、酢酸菌が微量栄養素をハエに供給していることを強く示唆する。

本研究は、ガンマ線滅菌エサによるハエの飼育というやや特殊な飼育環境ではあるものの、腸内細菌が産生する微量栄養素が宿主の成長や寿命をサポートすることを示した初めての研究である。これは、研究代表者が確立した無菌ショウジョウバエ技術が、腸内細菌が産生する重要な代謝産物の解析に有用であることを示している。今後の本技術を活用し、健康寿命延伸といった保健衛生上の重要な課題に対し、腸内細菌代謝産物をヒトに応用するシーズを得る基盤が確立できたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Pratomo AR, Salim E, Hori A, Kuraishi T	4. 巻 23
2. 論文標題 Drosophila as an Animal Model for Testing Plant-Based Immunomodulators	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 14801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232314801	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 該当する
1. 著者名 Kadoguchi H, Hori A, Kuraishi T	4. 巻 181
2. 論文標題 Gut microbes and Drosophila behavior	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuromethods	6. 最初と最後の頁 57-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2321-3_5	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Ogai Kazuhiro, Nana Benderli Christine, Lloyd Yukie Michelle, Arios John Paul, Jiyarom Boonyanudh, Awanakam Honore, Esemu Livo Forgu, Hori Aki, Matsuoka Ayaka, Nainu Firzan, Megnekou Rosette, Leke Rose Gana Fomban, Ekali Gabriel Loni, Okamoto Shigefumi, Kuraishi Takayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Skin microbiome profile of healthy Cameroonians and Japanese	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05244-5	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 該当する
1. 著者名 Kano H, Iwashita S, Kuraishi T, et al.	4. 巻 24
2. 論文標題 cGMP signaling pathway that modulates NF- $\kappa$ B activation in innate immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103473 ~ 103473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103473	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 Yamashita Kyoko, Oi Ayano, Kosakamoto Hina, Yamauchi Toshitaka, Kadoguchi Hibiki, Kuraishi Takayuki, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Activation of innate immunity during development induces unresolved dysbiotic inflammatory gut and shortens lifespan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 dmm.049103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.049103	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 Masyita A, Salim E, Asri RM, Nainu F, Hori A, Yulianty R, Hatta M, Rifai Y, Kuraishi T.	4. 巻 547
2. 論文標題 Molecular modeling and phenoloxidase inhibitory activity of arbutin and arbutin undecylenic acid ester	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun	6. 最初と最後の頁 75-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 下川 ひろみ、堀 亜紀、瀧原 速仁、門口 響、紺谷 優季、平野 里佳、松本 光晴、奥田 修二郎、倉石 貴透、栗原 新
2. 発表標題 腸内細菌に由来するポリアミンによる宿主の寿命延伸効果
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hibiki Kadoguchi, Aki Hori, Kenya Honda, Takayuki Kuraishi
2. 発表標題 Studies on host-microbe interaction in Drosophila melanogaster
3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門口響、堀亜紀、本田賢也、倉石貴透
2. 発表標題 無菌ショウジョウバエを用いた宿主と腸内細菌の相互作用解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Kuraishi
2. 発表標題 Sterile inflammation in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第44回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Kuraishi
2. 発表標題 <i>Drosophila</i> gut as a model to decipher pathogenic and symbiotic interactions between host and microbes
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Emil Salim, Saori Nonaka, Koki Kamiya, Aki Hori, Takumi Nishiuchi, Shoji Takeuchi, Noriyuki Kodera, Takayuki Kuraishi
2. 発表標題 Pore-Forming Toxin Monalysin from Entomopathogenic Bacterium <i>Pseudomonas entomophila</i> : Molecular and Functional Analysis
3. 学会等名 Japan <i>Drosophila</i> Research Conference 14
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	栗原 新  (KURIHARA Shin)  (20630966)	近畿大学・生物理工学部・准教授   (34419)	

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