

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04604

研究課題名(和文) ノトバイオート技術を基盤としたハダカデバネズミの真社会性制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the eusociality control structure of naked mole rat by using gnotobiotic technique

研究代表者

森田 英利 (Morita, Hidetoshi)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：70257294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ハダカデバネズミのworker、king、queen、C57BL/6系統とBalb/c系統のSPFマウスの腸内細菌叢を比較した。UniFrac解析の結果、ハダカデバネズミは固有の細菌叢を有していた。網羅的16S解析により腸内細菌叢を明らかにしたダカデバネズミのqueenとworkerの糞便をC57BL/6系統の無菌マウスに経口投与しノトバイオートマウスを作製した。対照群にはモルモットの糞便を用いた結果、対照群よりハダカデバネズミのqueenの腸内細菌叢を移植した場合、性成熟は遅れる傾向にあった。現在、共同研究らとハダカデバネズミのworkerから子宮と卵管のエピジェネティクス解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：The gut microbiota of naked mole rat (worker, king, queen) and SPF mouse (Balb/c and C57BL/6) were compared. As the result of UniFrac analysis, naked mole rats had the peculiar gut microbiota. The gnotobiotic mice in this study were constructed by inoculating each gut microbiota (feces) of naked mole rat (worker and queen) to germ-free mouse (C57BL/6). The microbiota (feces) of guinea pig was used as a control. Sexual maturation tended to be delayed when transplanting the gut microbiota of queen naked mole rat rather than the control. Currently, we are conducting epigenetics analysis of the uterus and fallopian tube of queen naked mole rat with co-workers.

研究分野：応用微生物学

キーワード：真社会性 ハダカデバネズミ ノトバイオート技術 エピジェネティクス解析

1. 研究開始当初の背景

ハダカデバネズミは顕著な癌化耐性機能と老化耐性機構を有することから、癌と長寿研究のモデル動物として重用されている (Tian et al, Nature, 2013; Gorbunova et al, Nat Rev Genet, 2014)。また、哺乳類では極めて珍しく、ハダカデバネズミは「真社会性」と呼ばれる分業制の階級社会を形成する。巣内で繁殖を行うのは1匹の女王と数匹の王のみで、他の個体は雌雄共に不妊の兵士・労働者として巣内の仕事に従事する。ただし、女王から引き離された下位の雌個体は数ヶ月後に自動的に女王化(排卵)し、黄体形成ホルモン・エストラジオール・プロゲステロン等の分泌量が増加する。そのため、巣内で女王は何らかの手段で他の雌個体の女王化を抑制している可能性が強く示唆される。しかしながら、女王化の抑制および抑制解除時の機構は全く不明である。

エピジェネティック機構とは「DN 配列自身の変化ではなく、後天的な化学修飾により遺伝子の発現が制御される」現象で、その中でもゲノム DNA 中のシトシンのメチル化は特に重要なエピジェネティック機構である。真社会性昆虫のミツバチにおいて女王蜂と雌の働き蜂は遺伝的に同一ながら、幼虫時に与えられるローヤルゼリーを介して DNA メチル化の部分に差が生じ、結果として女王蜂あるいは不妊の働き蜂へと分化する現象が報告されている (Kucharski et al.2008)。腸内細菌の産生する酪酸が、エピジェネティクスに關与する可能性の報告も蓄積してきている。

2. 研究の目的

本研究では、ハダカデバネズミの腸内細菌叢について、SFP マウスおよび SPF ラットとの比較解析を行った。その際に、ハダカデバネズミの飼育環境での違い(飼育機関 A、B、C)が、腸内細菌叢の違いを生むかどうかについても情報を得た。そして、無菌マウス(C57BL/6)の雌に対して、飼育機関 C のハダカデバネズミの雌の糞便によるノトバイオートマウスを作成し、その生殖器の成熟度について検討した。

3. 研究の方法

1) ハダカデバネズミの腸内細菌叢を構成する菌種の特定と組成の決定

本学実験動物委員会の承認に基づいて、本実験を行いハダカデバネズミの糞便は3ヶ所の異なった機関から提供された。各動物の糞便を採取し、溶菌酵素、アクロモペプチターゼ、クロロホルム・フェノールを用いた DNA 精製法 (Microbes Environ, 2007) により、採取した糞便から細菌のゲノム DNA を高収率で回収した。次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ社、岡大バイオバンク所有) を用いて、精製した DNA 中の 16S rRNA 遺伝子の可変領域 (V3-V4) の塩基配列決定を行う。次に、

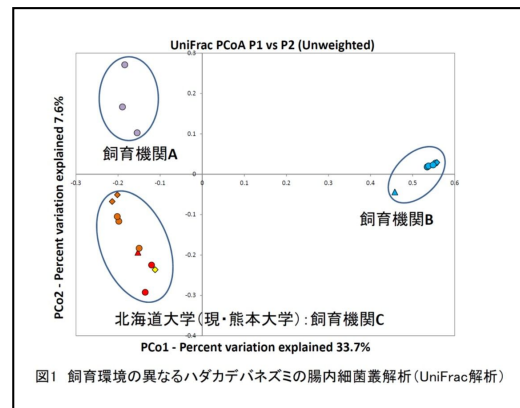
QIIME (<http://www.qiime.org/>) というツールを使って、得られた塩基配列群をその配列の類似度に基づいてグループ分けした。各グループの代表配列をデータベース上の配列と照合して、各グループの属レベルでの菌種を特定し、各糞便のフローラを構成する菌種の組成を決定する。続けて、UniFrac 解析を行い、各糞便のフローラ構造間の類似度を数値化する。これにより、アルツハイマー型認知症患者の腸内フローラに特有に見られる菌種とその組成を明らかにする。

2) ノトバイオートマウスの作出

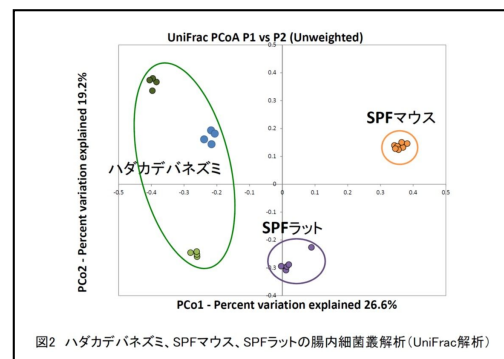
C57BL/6 系統の無菌マウスに、腸内細菌叢を網羅的に確認しているハダカデバネズミの糞便を経口投与し、ノトバイオートマウスを作成した。その対照群には、無菌のもの、モルモットの糞便で作出したノトバイオートマウス (C57BL/6) を用いた。15 週目に剖検し、子宮や卵巣、その他のサンプル採取を行った。

4. 研究成果

国内においてハダカデバネズミを飼育しているところは少ないが、本研究の研究分担者による飼育以外に、2 つの飼育機関から糞便の提供を受けた。3 つの飼育環境の異なるハダカデバネズミ (waker) の腸内細菌叢解析の結果、飼育環境の違いは各所での餌の違いと考えられるが、図 1 のとおり飼育機関ごとにクラスターの形成がみられた。



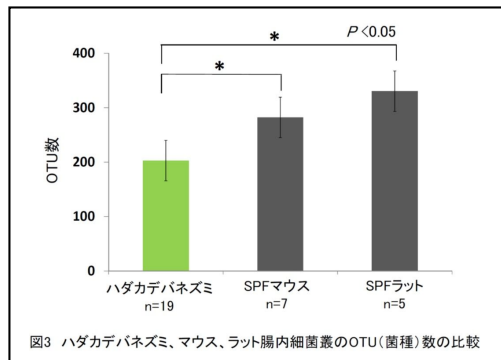
また、これらと、SPF ラットと SPF マウス



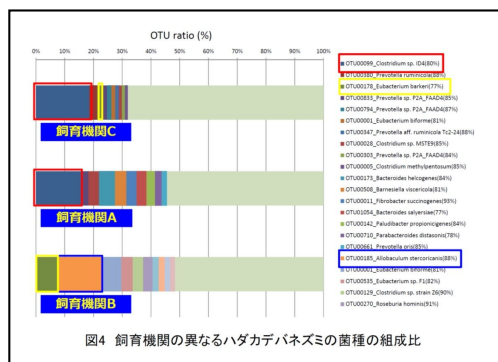
との比較を行った。図 2 のとおり、動物種ごとに異なるクラスターを形成し、また図 1 で

示した飼育環境による違いは動物種を超えて腸内細菌叢がことなっていないことがわかる。

飼育機関Cのハダカデバネズミ（以下の実験にはこの糞便を使用）SPFラットとSPFマウスにおけるOTU数を比較したところ、図3のとおりハダカデバネズミは菌種の多様性が低いことが伺える。



そこで、図4のとおり、3機関で飼育しているハダカデバネズミの種レベルでアサインしたところ、菌種をアサインできないもの、すなわち菌種未同定の細菌が5~7割ほど含まれており（図4の帯グラフの右の驚色の部分）ハダカデバネズミは固有の細菌叢をもつことが考えられる。



本研究において、この細菌叢解析の結果をもとに、生菌分離を行い新菌種候補の細菌の生菌分離できた。細菌学的な視点からの意義を有すると考えている。

C57BL/6系統の無菌マウスに、腸内細菌叢を網羅的に確認しているハダカデバネズミの糞便を経口投与し、ノトバイオームマウスを作出した。

それらのマウスから糞便を採取し、網羅的な細菌叢解析を実施した。すなわち、ハダカデバネズミとその糞便を無菌マウスに経口投与して作出したノトバイオームマウスの腸内細菌叢を比較した。その結果は図5のとおり、ハダカデバネズミとそのノトバイオームマウスの腸内細菌叢は類似しており、同じ齧歯類ということもあって、ハダカデバネズミ腸内細菌叢の構成細菌が、うまく定着できたものと推察される。

近年、ヒト腸内細菌叢の研究には目覚ましいものがあり、長寿と腸内細菌叢および癌の発症と腸内細菌叢についての知見が多く報告されてきている。ハダカデバネズミは、他の齧歯類と比較しても、長寿であり、またがんを発症しないという特徴をもっており、それが、他の齧歯類と大きく異なる腸内細菌に起因する可能性については、興味深く考えている。その視点からの研究の進展もあり得るのではないかと今回のハダカデバネズミ腸内細菌叢の結果から考察しておきたい。

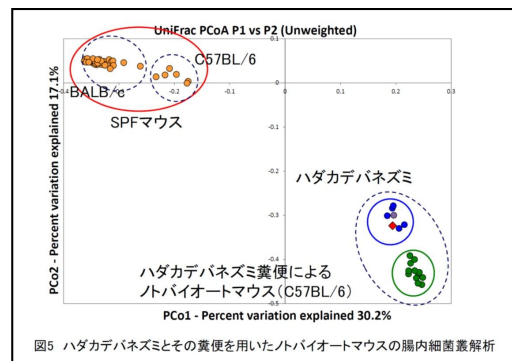


図5 ハダカデバネズミとその糞便を用いたノトバイオームマウスの腸内細菌叢解析

15週齢まで飼育した後に剖検し、各部位について検討した。子宮の湿重量を比較した結果、重さの結差はなかったが、ハダカデバネズミ糞便によるノトバイオームマウスでは子宮膜は薄くなって正常な子宮の様子ではなかった。卵巣の湿重量の比較した結果、無菌マウスおよびモルモット糞便によるノトバイオームマウスと比較して、ノトバイオームマウスでは有意にその重さが軽かったことから未成熟の様子が推察された。また、ハダカデバネズミ糞便によるノトバイオームマウスでは雌マウスのエストラジオール分泌と性成熟の抑制が示唆された。

まとめ：

本研究では、網羅的16S解析により腸内細菌叢を明らかにしたダカデバネズミの queen と worker の糞便を C57BL/6 系統の無菌マウスに経口投与しノトバイオームマウスを製作した。対照群にはモルモットの糞便を用いた結果、対照群よりハダカデバネズミの queen の腸内細菌叢を移植した場合、性成熟は遅れる傾向にあった。現在、共同研究らとハダカデバネズミの worker から子宮と卵管のエピジェネティクス解析を進めている。

5. 主な発表論文等

この報告書の提出期間までには特になし。現在、学術論文の作成中である。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 英利 (MORITA, Hidetoshi)

岡山大学・大学院環境生命科学研究所・教授

研究者番号：7 0 2 5 7 2 9 4

(2)研究分担者

藤 英博 (TOH, Hidehiro)

九州大学・生体防御医学研究所・特任講師

研究者番号：1 0 3 5 3 4 6 8

三浦 恭子 (MIURA, Kyoko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：8 0 5 8 3 0 6 2