

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670119

研究課題名(和文) 共生細菌を介する体温調節機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of commensal bacteria-mediated thermoregulation

研究代表者

梅田 真郷 (Umeda, Masato)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10185069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：体温は生体の恒常性維持において最も重要な因子の一つであるが、その分子レベルでの調節機構については未だ不明な点が数多く残されている。申請者らは、ショウジョウバエの温度選択行動を指標にした分子遺伝学的手法を駆使することにより体温調節に関わる分子群の同定を進めている。その過程で、共生細菌の有無により温度選択行動が大きく変化することを見出した。本研究では、1) 次世代シーケンサーを用いた各種ショウジョウバエ個体の共生細菌叢の同定、2) 体温調節行動に影響を及ぼす菌体の特定、3) 質量分析を用いた共生細菌の産生する特異な脂質分子の同定、を行った。

研究成果の概要(英文)：Although thermoregulation is one of the essential homeostatic processes that maintain animal's functional capacities in fluctuating thermal environments, its underlying molecular mechanisms still remain enigma. To identify molecules involved in thermoregulation, we have conducted mutagenesis and screens for mutants with altered temperature preference in *Drosophila melanogaster*. During the course of this study, we found that the thermoregulatory behavior of *Drosophila* is strongly affected by the presence of commensal gut bacteria. In this study, we have identified, 1) Gut microbiome present in the different strains of *Drosophila*, using next generation sequencer, 2) Species of bacteria that affect the thermoregulatory behavior, 3) Novel molecular species of lipids produced by the commensal bacteria using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

研究分野：生化学

キーワード：昆虫 環境 温度 行動 共生細菌

1. 研究開始当初の背景

体温は生体の恒常性維持において最も重要な因子の一つであるが、その分子レベルでの調節機構については未だ不明な点が数多く残されている。申請者は、ショウジョウバエの温度選択行動を指標にした分子遺伝学的手法を駆逐することにより体温調節に関わる分子群の同定を進めている。その過程で、共生細菌の有無により温度選択行動が大きく変化することを示唆する予備的知見を得た。最近になり、腸内細菌をはじめとする共生細菌が宿主動物の代謝・免疫・行動・情動などの様々な高次機能に影響を及ぼすことが明らかにされている。しかし、共生細菌が個体の体温調節に如何なる影響を及ぼすかについては、未だ研究例が無い。

2. 研究の目的

本研究では、

- 1) ショウジョウバエ腸内細菌叢の特定：
当研究室の保有するショウジョウバエ系統の腸内細菌叢について、各系統間で類似の細菌叢を有するのか、あるいは個々の系統により異なった細菌叢を有するのか、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析により明らかにする。
- 2) 体温調節行動に影響を及ぼす腸内細菌の同定：
当該系統から腸内細菌を分離培養する系を開発し、体温調節行動に影響を及ぼす菌種の同定を行う。
- 3) 体温調節行動を制御する分子群の同定：
腸内細菌の産生する物質についてメタボローム解析を行い、体温調節行動に影響を及ぼす分子群を特定し、その作用メカニズムを分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) ショウジョウバエ温度選択行動の測定：
ペルチェ素子を利用した自作の温度勾配形成装置上のアガロースプレートに 5 ~ 35 の温度勾配を形成し、27.5 領域においた 3 齢幼虫のプレート上での選択温度を解析することにより温度選択行動を測定した (*Science* 323:1740, 2009)。
- 2) ショウジョウバエ個体より分離した腸管および飼育培地より DNA を回収し、rRNA16 配列の V1 及び V2 領域を標的としたアンプリコンライブラリーを作製し、次世代シーケンサーにより塩基配列の決定・解析を行った。個々の配列を 97% の相同性によってまとめた OTU (operation taxonomic unit) を作製し、得られたシーケンスデータを基に主要な OTU 配列を BLAST の blastn プログラムを用いて細菌種の照合を行った。
- 3) 腸内細菌の産生する脂質メディエータの解析：
無菌飼育および通常飼育のショウジョウバエ成虫個体より脂質成分を分離し、Sep-PakC18 により固相抽出し、脂質メディエ

ータ画分として液体クロマトグラフィーによる分離後、リニアイオントラップ型四重極マススペクトロメーターにより脂質メディエータの定量的質量分析を行った (LC-MS/MS 解析)。

4. 研究成果

1) 共生細菌による温度嗜好性の変化

我々は、ショウジョウバエ 3 齢幼虫の温度選択行動を定量的に測定する装置を開発し、幼虫が飼育温度、餌の種類、遺伝子改変によるエネルギー代謝レベルの変化等々の体内環境の変化に依存して再現性良くその選択温度を変えることを明らかにしている。今回、ショウジョウバエ卵を次亜塩素酸ナトリウムおよび 70% エタノールで洗浄することにより付着する細菌を除去し、無菌的に飼育することで共生細菌を除去したショウジョウバエ幼虫を調製し、その温度嗜好性の変化を解析した。その結果、無菌培養したショウジョウバエ幼虫は 24.8 を中心とする温度領域に分布し、通常培養個体の選択温度 (21.9) より約 3 高い領域を選択した。一方、無菌培養した幼虫を通常培養した雄成虫個体と共飼育することにより共生細菌を再添加すると通常飼育と同様の 21.3 に回復することを見出した (図 1)。細菌等の感染により体温の上昇 (発熱) が惹起されることは、生体防御反応において極めて重要であり、昆虫類においても細菌感染により高温を選択する

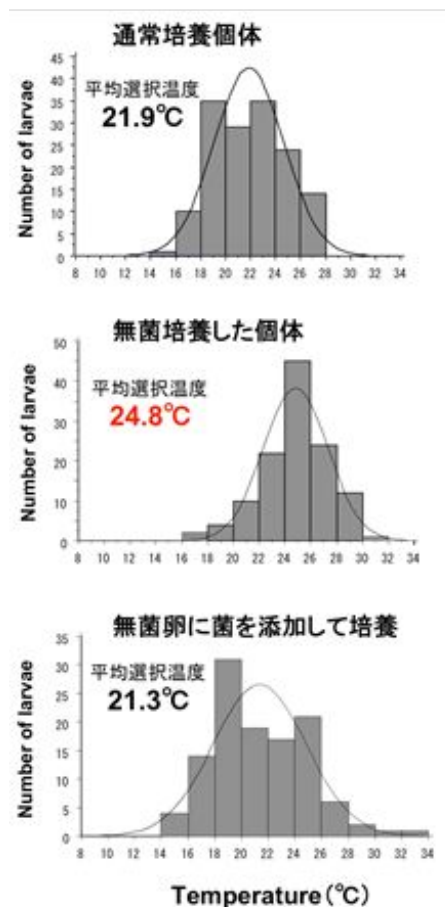


図 1. 共生細菌による温度選択行動の変化

(発熱する) 応答が観察されている。一方、今回の観察は、共生細菌の存在により低温選択行動が誘導されることから、通常の細菌感染に対する生体防御反応とは異なると想定された。

2) 共生細菌叢のメタゲノム解析

当研究室での通常飼育環境下におけるショウジョウバエ共生細菌叢の網羅的な解析を、DNA 次世代シーケンサーを用いた細菌 16S rRNA 遺伝子ライブラリーの解析によって行った。解析サンプルとして w^{1118} の 3 齢幼虫及び成虫における腸、また飼育環境中の細菌叢として飼育に用いたエサを用いた。その結果、 w^{1118} の 3 齢幼虫における腸内細菌叢は *Orbus sasakiae*、*Providencia rettgeri*、*Lactobacillus plantarum* と相同性の高い 3 種によってそのほとんどが構成されることが明らかになった。また、成虫の腸内細菌を解析したところ同様に 3 齢幼虫と比較して *P. rettgeri* の割合の減少は見られるものの *O. sasakiae*、*L. plantarum* によってほとんどが構成されることが明らかとなった。さらに飼育環境の細菌は上記の *O. sasakiae*、*P. rettgeri*、*L. plantarum* に加えて *L. brevis*、*Acetobacter indonesiensis*、*A. pasteurianus* によって構成されることを見出した。*Lactobacillus* および *Acetobacter* については先行研究によりショウジョウバエの共生細菌として存在が明らかにされている細菌である。*Orbus sasakiae* と相同性の高いとされた細菌はこの細菌特異的なプライマーを用いた PCR 法による、より詳細な 16S rRNA 遺伝子配列解析の結果から、データベース上の最も相同性の高い単離および同定されている細菌系統 (*Frischella perrara* PEB0191 : *O. sasakiae* と同じ Orbaceae 科細菌) との間でも相同性が 94% であることから新種の可能性の高い細菌であると考えられた。 w^{1118} 系統 (w^{1118} 、Canton-S、Oregon-R) 間やストックセンター間での共生細菌叢を解析した結果、各系統間の共通性はなく、細菌の種類は共通なものが多いがそれぞれの構成比や存在の有無は個々の系統により固有の細菌叢を有することが明らかとなった。また、*O. sasakiae*、*L. plantarum* の 2 種の細菌はすべての系統に存在していた。

3) 共生細菌の単離

エサ及びショウジョウバエ個体のホモジネートを寒天培地上に塗布し 25 °C にて培養し、好氣的環境もしくは嫌氣的環境下で細菌コロニーを生成させた。嫌気培養では嫌気グローブボックス (タバイエスベック) 内で寒天培地へ塗布した後、アネロパック (三菱ガス化学) を封入した密閉容器中で培養した。また、ニュートリエント寒天培地、MRS 寒天培地、トリプチソースソイ寒天培地、ROGOSA 寒天培地、2-YT 寒天培地等をはじめとする種々の培地を用いて、菌体の培養を試みた。その結果、*L. plantarum*、*L. brevis*、

P. rettgeri、*A. indonesiensis* を含む 12 種類の細菌と 1 種類の真菌が単離された。現在、単離した菌の腸管への定着、温度選択性に及ぼす影響について詳細な解析を進めている。

4) 共生細菌の産生する脂質メディエータの網羅的解析

温度選択性への影響を与える細菌性因子の同定を行うため LC-MS/MS による代謝産物解析を行った。解析対象としては脂肪酸を含む脂質メディエータに着目した。共生細菌によって産生される脂肪酸、特に単鎖脂肪酸は宿主のエネルギー代謝を制御することが知られているが、より長鎖な脂肪酸の脂肪酸の代謝産物は着目されていない。本解析では多価不飽和脂肪酸の代謝産物を中心に 438 種類の物質について無菌飼育と通常飼育条件下での比較解析を行った。解析の結果、無菌飼育状態と通常飼育状態との間で最も変化率の大きな物質としてリノール酸代謝産物の一種である特異な脂肪酸 X の上昇を確認した (図 2)。

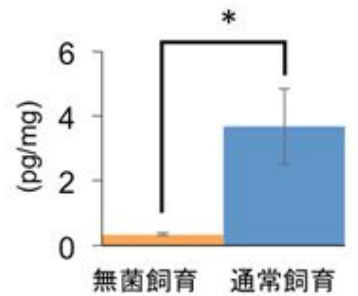


図 2. 共生細菌の産生する脂肪酸 X

Transient receptor potential A1 (TRPA1) チャンネルは、ショウジョウバエの体温調節行動を制御する温度受容体として報告され、TRPA1 の発現抑制により高温選択性が誘導されることが示されている (Hamada F. N., et al. Nature 454:217, 2008)。一方、哺乳動物に発現する TRPA1 は、脂肪酸によって活性の制御を受けることが知られていることが知られている。そこで、脂肪酸代謝産物を介した体温調節行動の変化に關与するのではないかと考え培養細胞でのショウジョウバエ TRPA1 チャンネルの強制発現と脂肪酸 X による活性評価を行った。その結果、脂肪酸 X は TRPA1 チャンネルの高温域での温度応答性が顕著に増大することを見いだした (図 3)。これらの知見は、腸内共生細菌の産生する特異な脂肪酸 X がショウジョウバエの温度受容チャンネル

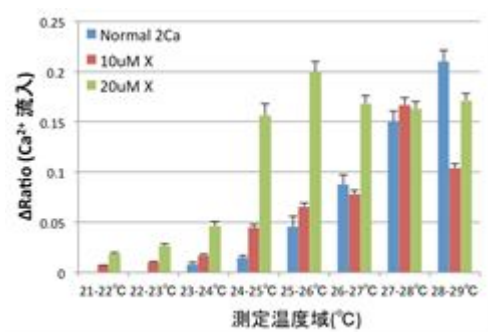


図 3. 脂肪酸 X による TRPA1 チャンネルの温度応答性の変化

TRPA1 の温度応答性を変化させることにより、高温域でのショウジョウバエの温度回避行動を誘発することにより、低温選択性を誘導する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Ogawa R, Nagao K, Taniuchi K, Tsuchiya M, Kato U, Hara Y, Inaba T, Kobayashi T, Sasaki Y, Akiyoshi K, Watanabe-Takahashi M, Nishikawa K, Umeda M. Development of a novel tetravalent synthetic peptide that binds to phosphatidic acid. *PLOS ONE* (2015) accepted. 査読有

Nagao K, Juni N, Umeda M. Membrane lipid transporters in *Drosophila melanogaster*. "*Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols*" *Springer*. (2015) in press. 査読無

山本真寿・従二直人・加藤詩子・梅田真郷：ショウジョウバエと脂質研究、遺伝子医学MOOK 24 号「最新生理活性脂質研究とその臨床・創薬応用研究」117-123 (2013). 査読無

[学会発表](計 4 件)

梅田真郷：生物のロバスト制御と脂質生物学、第 57 回日本脂質生化学会、2015.5.29、一橋大学一橋講堂(東京)

梅田真郷：「脂質の比較生物学」、第 1 回 Integrated Lipidology Meeting、2015.2.25、日本平ホテル(静岡)

梅田真郷：昆虫のユニークな膜脂質と脂質代謝機構、第 9 回スフィンゴセラピ研究会、2014.7.18、山中温泉河鹿荘ロイヤルホテル(加賀)

梅田真郷：ショウジョウバエのユニークな膜構築と脂質代謝機構、2014 年日本農芸化学会大会、2014.3.30、明治大学生田キャンパス(川崎)

[図書](計 2 件)

梅田真郷：脂質のダイナミクス、梅田真郷編「生体膜の分子機構 - リピッドワールドが先導する生命科学」化学同人、153-191 (2014).

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅田 真郷 (UMEDA, Masato)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10185069

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

加藤 詩子 (KATO, Utako)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90362392

従二 直人 (JUNI, Naoto)

京都大学・大学院工学研究科・研究員

研究者番号：90572199