

【総説】

腸マイクロバイオーーム研究における無脊椎モデル生物の有用性

中川 久子

雪印メグミルク株式会社 ミルクサイエンス研究所

要約

腸内細菌叢の多様性や菌種構成の異常が腸疾患に限らず、癌や心血管疾患、認知症等様々な疾患の発症や進行に関与することが明らかになってきている。腸内細菌叢の個人差は加齢に伴い複雑さが増すことから、その相互作用の全容は不明のままである。老化研究において有用なツールであるショウジョウバエやセンチュウは、単純な腸管構造と腸内細菌叢構成を有しており、無菌的な飼育も容易であることから、腸マイクロバイオーーム研究においても腸内細菌叢による生体の機能恒常性維持の基礎的理解に貢献している。

キーワード：腸マイクロバイオーーム、ショウジョウバエ、センチュウ

1. はじめに

ヒトの腸管内には、およそ 1000 種類 100 兆個にも及ぶ細菌が生息しており、宿主の健康や精神に大きく影響する。腸内細菌叢の解析は次世代シーケンサーの出現とともに飛躍的に加速し、健康人の腸内細菌叢解析のみならず、老化関連疾患と腸内細菌叢の関連の解明が進められている。また「腸内フローラ」や「腸内細菌」、「脳腸相関」といった言葉が広く一般化し、健康長寿を目指して腸の健康を意識する高齢者が増加しているため、腸内細菌叢をターゲットとした創薬・サプリメントやプロバイオティクスを含む食品の研究開発が現在盛んに行われている。その研究手法の多くはヒト臨床試験による効果の検証や介入研究などが主であるが、腸内細菌叢と老化の直接的な関係はヒトにおいては未だ不明な点が多い。ヒトの腸内細菌の約 9 割が Firmicutes 門、Bacteroidetes 門、Proteobacteria 門、Actinobacteria 門に分類される。2006 年 Gordon らにより^[1] 肥満者の腸内細菌叢では Firmicutes 門に属する菌が多く、Bacteroidetes 門に属する菌が少ないことが報告され、今では Firmicutes 門 / Bacteroidetes 門比 (F/B 比) と肥満の関係は公知となっている。F/B 比は加齢によって高くなる傾向にあり、その他に加齢により

Clostridium 属の割合変化や *Gammaproteobacteria* の増加などが報告されている^[2-4]。しかし腸内細菌叢は個々の生活環境、食事、健康状態等に左右され、加齢に伴い個人差がより大きく複雑になるため、表現型を特定の属と関連付けることは非常に困難である。それに対し単純な腸管構造や腸内細菌叢を有するショウジョウバエとセンチュウは、加齢に伴う宿主と腸内細菌の相互作用の理解を促進し、寿命及び老化関連疾患との関連性を検討する上で非常に有用である。本稿では、ショウジョウバエとセンチュウの腸内細菌叢、腸管構造と腸管免疫機構の加齢による変化について概説する。

2. ショウジョウバエ

ショウジョウバエの腸の構造は、腸管上皮細胞層の一層と腸管幹細胞と腸管内分泌細胞が管腔を形成しており、外側は筋肉で覆われている^[5]。管腔には囲食膜と呼ばれるキチンや糖タンパク質から構成される膜が存在する^[6]。実験的環境下及び野外で生育したショウジョウバエの腸内細菌は Proteobacteria 門と Firmicutes 門の 2 門からなり、*Lactobacillaceae* 科と *Acetobacteraceae* 科が大部分を占め、一部 *Enterococceae* 科と *Enterobacteriaceae* 科の存在が報告されている^[7-9]。これらの腸内細菌の多くは安定して腸に留まることが出来ないため、食事により都度補給する必要がある^[10, 11]。Shukla らは、抗生物質を使用し無菌的な環境で飼育したショウジョウバエと通常飼育環境下で飼育したショウジョウバエの遺伝子発現プロファイルを用いて Gene Ontology 解析し比較した。その結果加齢に伴って発現変化する遺伝子の内、Hsp70、Hsp26、Hsp27 などの生体防御に関

連絡先：中川 久子

〒350-1165 埼玉県川越市南台 1-1-2

TEL : 049-242-8060

FAX : 049-242-8123

E-mail : hisako-nakagawa@meg-snow.com

わるストレス応答遺伝子や CecC、DptB、AttA といった免疫応答遺伝子を含む約 7 割の遺伝子が無菌環境下の個体では認められなかったことを報告した^[12]。

ショウジョウバエの腸管免疫は、(1) 囲食膜による腸管上皮細胞の防御、(2) 腸管上皮細胞の活性酸素種 ROS (Reactive Oxygen Species) の産生による菌の排除、(3) IMD (Immune deficiency) 経路を介した抗菌ペプチド (AMPs) の産生による菌の排除、(4) 感染により傷ついた上皮細胞の修復という 4 つの防御システムが存在する。ショウジョウバエの組織を損傷壊死させる *Pseudomonas entomophila* や *Serratia marcescens* 等の昆虫病原性微生物と腸内細菌を見分ける要因の一つとして、ウラシルの産生の有無があげられる。ウラシル産生は病原性の高い微生物に特徴的であり、G タンパク質共役型受容体がウラシルを受容し、下流の Gαq を活性化することで、MAPK-ATF2 経路を介した Duox 酵素活性が誘導される^[13, 14]。例えばショウジョウバエの腸内細菌である *Lactobacillus plantarum* によって産生された L-lactate は、モノカルボン酸トランスポーターを介して腸細胞に取り込まれ、LDH により酸化された後 NADH を産生する^[15]。このように病原微生物の排除と腸内細菌の維持により腸管免疫機構が制御されている。加齢ショウジョウバエの腸上皮は、腸幹細胞 (ISC) が異常増殖し、異形成により選択的透過性などの腸上皮バリア機能の喪失が起こる^[16, 17] ため、感染症や死亡率増加につながる。無菌的に飼育したショウジョウバエでは ISC 増殖による腸のバリア機能喪失が有意に遅延する^[18] ことから、腸内細菌叢の変化が腸管免疫機構の破綻を誘導することが示唆されている。

腸バリア機能の低下が起きた状態では、病原微生物だけではなく、乳酸菌などの共生細菌も菌の増殖が制御できない場合、寿命の短縮を起こすことがある。増殖した *Lactobacillus plantarum* は、腸内乳酸量を増加させ NADPH オキシダーゼ Nox を介した ROS 産生を誘導し、結果的に腸の損傷や ISC の増殖による腸の異形成を促進することが分かっている^[15]。また加齢による体内プリン体代謝最終産物アラントインの蓄積に酢酸菌が関与している^[19] 等、加齢ショウジョウバエを用いた研究では、有用と考えられている細菌の新たな側面も明らかになっている。今後、プロバイオティクスなどの効果を検証するには、時間的な腸内細菌の量的変化と構成変化を踏まえた研究が必要である。

3. センチュウ

体長 1 mm のセンチュウにも咽頭から食道、腸、肛門への消化器系が存在し、「内なる外」と言われる構造はヒトと等しい。センチュウの栄養源は細菌であり、実験環境下では大腸菌を摂取して飼育されている。自然環境中のセンチュウの腸内細菌叢はヒト腸内細菌叢にも存在する Bacteroidetes 門、Actinobacteria 門、Firmicutes 門、Proteobacteria 門の 4 つの門で構成されている^[20, 21]。咽頭部にはグラインダーを備えており、細菌をすりつぶ

して消化吸収している。センチュウの特徴である透明な体は、青色色素給餌法 (Smurf Assay) による腸管透過性の評価や特定の菌の体内動態の評価に適している。McGee らは、透過型電子顕微鏡を用いて加齢に伴う腸の形態変化や腸内細菌動態を詳細に解析し、腸核の喪失や微絨毛の喪失、腸の歪み、大腸菌の蓄積が起きることを報告した^[22]。この大腸菌の増殖は、腸管免疫系を過剰に活性化して過剰な ROS 産生を誘導し、その結果 ATP の枯渇、代謝異常およびタンパク質恒常性の喪失をもたらす。

センチュウの腸管では、腸上皮に発現した TIR-1 が多量体化し NADase 活性を介して PMK-1 シグナル経路を活性化する免疫システムが働いている^[23]。また細菌感染により CeDUOX/BLI-3 から産生された ROS が PMK-1 経路を介して SKN-1 を活性化し、抗酸化ストレス応答を亢進することも報告されている^[24]。Zhang らの報告では、腸内細菌 *Pseudomonas mendocina* が PMK-1 経路を活性化して緑膿菌の感染防御に働くことを示している^[25]。このように乳酸菌や特定の非病原性細菌が腸に定着すると、病原体に対するこれらの免疫応答性が高まることは既知となっている。我々は以前に *Lactobacillus gasseri* SBT2055 の摂取がセンチュウにとってマイルドなストレスとなり、PMK-1 シグナル経路を活性化し、ROS 消去系遺伝子の発現亢進やミトコンドリアの機能恒常性の維持に働くといったミトホルミシス効果を示すことを明らかにした^[26]。プロバイオティクスによるセンチュウの寿命延長効果は、カロリー制限をミミックした効果や抗酸化ストレス応答の亢進等、様々なメカニズムが報告されているが、プロバイオティクス摂取による低水準の免疫応答活性化は共通して起きており、それぞれの効果の違いは定着したプロバイオティクスの構成成分と代謝産物によるものであると推察される。近年オーム解析の発展により、細菌代謝産物の網羅的な解析が可能となっている。このことから代謝産物による健康機能の報告が年々増加傾向にある。例えば細菌によって合成されるビタミン K₂ が脂肪分解と消化を促進して生存率を亢進すること^[27]、最終糖化産物形成を誘導するメチルグリオキサル産生が少ない組換え大腸菌は TORC2 / SGK-1 / DAF-16 経路を介して寿命延長作用を示すこと^[28] 等の報告がある。腸内細菌やその代謝産物の正負の影響は、単一の菌や素材、化合物の有効性を理解する上で無視してはならないため、少なくとも RFLP 解析や糞便の有機酸量の確認が必要である。

4. おわりに

上述のようにマイクロバイオーム研究の注目度は高く、その解析技術は得られるデータ量やリード長などが飛躍的に向上している。またその解析ツールも既存のオンラインデータベースのみならず多くの解析用 MATLAB プログラムが公開されているなど昨今のマイクロバイオーム研究にはドライ研究である情報科学の知識が必須になってきている。

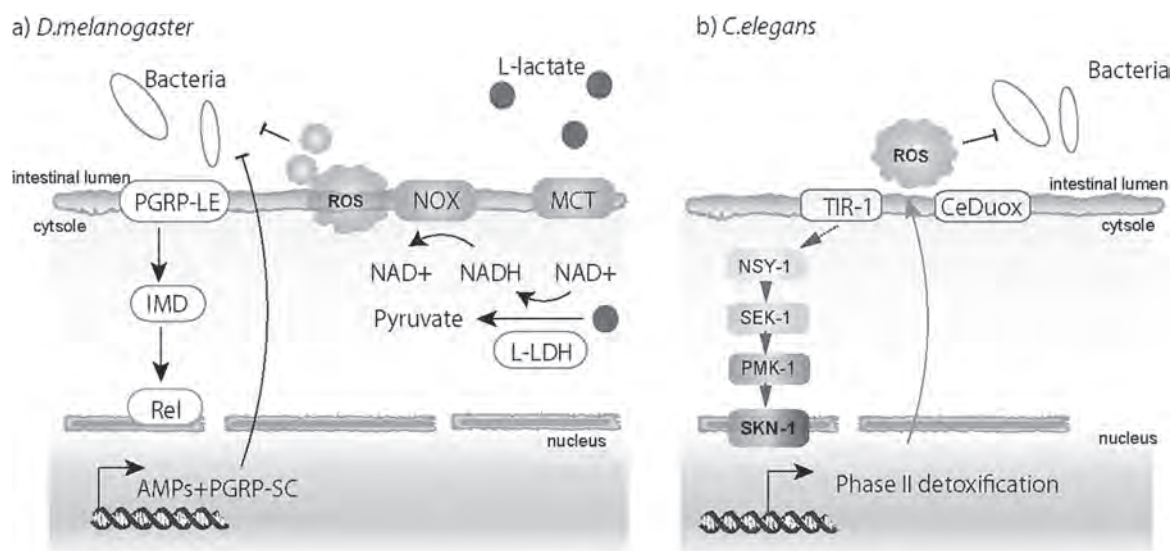


図1 ショウジョウバエ (*D.melanogaster*) とセンチュウ (*C.elegans*) の腸マイクロバイームによる腸管免疫応答モデル図

a) Peptidoglycan recognition protein LE (PGRP-LE) が細菌ペプチドグリカンを認識し、IMD—Relish 経路を活性化して、抗菌ペプチド (AMP) やペプチドグリカン分解酵素活性を持つ PGRP-SC の産生を誘導する。また乳酸菌などの共生細菌により産生された L-lactate がモノカルボン酸トランスポーター (MCT) を介して腸細胞に運ばれ、宿主の乳酸脱水素酵素 (LDH) によって酸化され、ピルビン酸と NADH を生成する。触媒サブユニット NADPH oxidase (NOX) が ROS を産生し殺菌に働く。

b) NADPH oxidase ファミリーの一つである dual oxidase (CeduoX1) により産生された ROS や Toll interleukin-1 receptor domain protein/TIR1 が NSY-1 (MAPKKK) や SEK-1 (MAPKK) の MAPK 経路を介して、SKN-1 による抗酸化因子や薬物代謝酵素の転写を誘導し、ストレス応答と生体防御応答を促進する。

またウェット研究では腸内細菌叢のヒト化モデルに取り組むラボが増えてきており、マウスやラット、ゼブラフィッシュ等を用いた報告が散見される。しかし作業者の違いなどからデータの一貫性が得られない事があるため、NBRC は解析結果の妥当性評価等に使用可能な「NBRC ヒト常在微生物カクテル」の提供を開始した。

今後、老化と腸内細菌叢、腸内免疫、健康の因果関係を紐解くためには、それぞれの特性をよく理解し適切なマイクロバイーム解析ツールと適切なモデル生物を選択することが重要である。

参考文献

1. Ley, R.E., P.J. Turnbaugh, S. Klein, et al., Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006. 444(7122): p. 1022-3.
2. Claesson, M.J., S. Cusack, O. O'Sullivan, et al., Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108 Suppl 1: p. 4586-91.
3. Mariat, D., O. Firmesse, F. Levenez, et al., The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*, 2009. 9: p. 123.
4. Biagi, E., L. Nylund, M. Candela, et al., Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*, 2010. 5(5): p. e10667.
5. Buchon, N., N.A. Broderick, and B. Lemaitre, Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Microbiol*, 2013. 11(9): p. 615-26.
6. Lehane, M.J., Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol*, 1997. 42: p. 525-50.
7. Fink, C., F. Staubach, S. Kuenzel, et al., Noninvasive analysis of microbiome dynamics in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol*, 2013. 79(22): p. 6984-8.
8. Wong, A.C., J.M. Chaston, and A.E. Douglas, The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. *ISME J*, 2013. 7(10): p. 1922-32.
9. Adair, K.L., M. Wilson, A. Bost, et al., Microbial community assembly in wild populations of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *ISME J*, 2018. 12(4): p. 959-972.
10. Broderick, N.A., N. Buchon, and B. Lemaitre, Microbiota-induced changes in *drosophila melanogaster* host gene expression and gut morphology. *mBio*, 2014. 5(3): p. e01117-14.
11. Storelli, G., M. Strigini, T. Grenier, et al., *Drosophila* Perpetuates Nutritional Mutualism by Promoting the Fitness of Its Intestinal Symbiont

- Lactobacillus plantarum. *Cell Metab*, 2018. 27(2) : p. 362-377 e8.
12. Shukla, A.K., K. Johnson, and E. Giniger, Common features of aging fail to occur in *Drosophila* raised without a bacterial microbiome. *iScience*, 2021. 24(7) : p. 102703.
 13. Lee, K.A., S.H. Kim, E.K. Kim, et al., Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*, 2013. 153(4) : p. 797-811.
 14. Lee, K.A., B. Kim, J. Bhin, et al., Bacterial uracil modulates *Drosophila* DUOX-dependent gut immunity via Hedgehog-induced signaling endosomes. *Cell Host Microbe*, 2015. 17(2) : p. 191-204.
 15. Iatsenko, I., J.P. Boquete, and B. Lemaitre, Microbiota-Derived Lactate Activates Production of Reactive Oxygen Species by the Intestinal NADPH Oxidase Nox and Shortens *Drosophila* Lifespan. *Immunity*, 2018. 49(5) : p. 929-942 e5.
 16. Biteau, B., C.E. Hochmuth, and H. Jasper, JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell*, 2008. 3(4) : p. 442-55.
 17. Park, J.S., Y.S. Kim, and M.A. Yoo, The role of p38b MAPK in age-related modulation of intestinal stem cell proliferation and differentiation in *Drosophila*. *Aging (Albany NY)*, 2009. 1(7) : p. 637-51.
 18. Clark, R.I., A. Salazar, R. Yamada, et al., Distinct Shifts in Microbiota Composition during *Drosophila* Aging Impair Intestinal Function and Drive Mortality. *Cell Rep*, 2015. 12(10) : p. 1656-67.
 19. Yamauchi, T., A. Oi, H. Kosakamoto, et al., Gut Bacterial Species Distinctively Impact Host Purine Metabolites during Aging in *Drosophila*. *iScience*, 2020: p. 101477.
 20. Dirksen, P., S.A. Marsh, I. Braker, et al., The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model. *BMC Biol*, 2016. 14: p. 38.
 21. Vaiserman, A.M., A.K. Koliada, and F. Marotta, Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Res Rev*, 2017. 35: p. 36-45.
 22. McGee, M.D., D. Weber, N. Day, et al., Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging *C. elegans*. *Aging Cell*, 2011. 10(4) : p. 699-710.
 23. Peterson, N.D., J.D. Ico, J.E. Salisbury, et al., Pathogen infection and cholesterol deficiency activate the *C. elegans* p38 immune pathway through a TIR-1/SARM1 phase transition. *Elife*, 2022. 11.
 24. Hoeven, R., K.C. McCallum, M.R. Cruz, et al., Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans*. *PLoS Pathog*, 2011. 7(12) : p. e1002453.
 25. Montalvo-Katz, S., H. Huang, M.D. Appel, et al., Association with soil bacteria enhances p38-dependent infection resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun*, 2013. 81(2) : p. 514-20.
 26. Nakagawa, H., T. Shiozaki, E. Kobatake, et al., Effects and mechanisms of longevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 2016. 15(2) : p. 227-36.
 27. Qu, Z., L. Zhang, W. Huang, et al., Vitamin K2 Enhances Fat Degradation to Improve the Survival of *C. elegans*. *Front Nutr*, 2022. 9: p. 858481.
 28. Shin, M.G., J.W. Lee, J.S. Han, et al., Bacteria-derived metabolite, methylglyoxal, modulates the longevity of *C. elegans* through TORC2/SGK-1/DAF-16 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. 117(29) : p. 17142-17150.

The invertebrate models in the research on gut microbiome

Hisako Nakagawa
MEGMILK SNOW BRAND Co., Ltd.

Abstract

Abnormalities in the diversity and species composition of the intestinal microbiota are known to be involved in aging-related diseases in the host; therefore, control of intestinal aging is also important for health maintenance. However, the intestinal microbiota varies widely among individuals depending on their living environment and health condition, making it difficult to obtain a complete picture of the intestinal microbiota. *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, which have simple intestinal tract structures and relatively low amounts of intestinal microbiota are highly throughput and the efficacy of a single bacterium can be easily evaluated.

In this review, we briefly describe the intricate relationship between the gut structure, gut microbiome and host aging obtained using *D.melanogaster* and *C.elegans*.

Keywords : Gut microbiome, *D.melanogaster* and *C.elegans*