

## 62. 腸内細菌叢と腸管の恒常性の維持機構

川畑 俊一郎

Key words : ショウジョウバエ, 腸内細菌叢, トランスグルタミナーゼ, 囲食膜, タンパク質架橋反応

九州大学 大学院理学研究院  
生物科学部門

### 緒言

腸内の常在細菌は宿主の免疫反応から免れて増殖し、腸管の恒常性に寄与するとともに各種栄養源の供給を行っている。しかし、腸管の病原体センサー（ペプチドグリカン受容体）は病原細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンだけでなく、常在細菌のペプチドグリカンにも応答する。したがって、常在細菌に対しては、ペプチドグリカンに対する応答を負に制御し、腸内細菌叢を維持する機構が存在するはずである。我々は、キイロショウジョウバエを用いて、タンパク質同士を糊付けする酵素であるトランスグルタミナーゼ (TG) が、発生段階において表皮形成に必須であること<sup>1)</sup>、また、転写因子の Relish を細胞質内で分子間架橋し、ペプチドグリカンの応答を抑制することで、常在細菌に対して免疫寛容となることを報告した<sup>2)</sup>。さらに、腸管の TG の機能を阻害すると、ハエが短命となることが判明し、その原因は、免疫寛容性を失った腸管から過剰に産生される抗菌ペプチドにより、腸内細菌叢が変化した結果であると推定された<sup>2)</sup>。

一方では、TG が腸管の囲食膜の形成に不可欠であることが判明した。囲食膜は、キチンおよびキチン結合タンパク質からなり、腸管上皮を管のよう覆っている。機能的には哺乳類腸管のムチン層に相当し、感染微生物に対する物理的な障壁となっている。本研究の目的は、TG の機能阻害の前後における腸内細菌叢の変化を解析して、短命の原因を明らかにするとともに、TG による腸管の恒常性の維持機構を解明することである。ヒト腸管内の細菌数は約  $10^{14}$ 、菌種は約 500 種と膨大であるが、ハエの腸内細菌数は約  $10^5$ 、菌種は 5 から 20 種と単純である。したがって、ハエは腸内細菌叢の解析と腸管の恒常性維持機構を研究する上で優れたモデル系である。

### 方法

#### 1. TG ノックダウン前後における腸内細菌叢の解析

TG-RNAi ハエでは、野生型とは異なる腸内細菌叢を有していると推定されたため、TG-RNAi ハエと野生型ハエの腸管から DNA を抽出し、細菌の 16S-rRNA の保存領域に対応する PCR プライマーを用いて DNA を増幅し、その塩基配列を解析した。この結果をもとに細菌ゲノムデータベースを利用して、TG-RNAi ハエに特異的な腸管の細菌群を同定した。それらの細菌群が短命の原因となる可能性があるため、野生型の無菌バエに同定した細菌を感染させて、生存日数をコントロールのハエと比較した。

#### 2. 囲食膜を構成するキチン結合タンパク質の同定と TG による架橋化の解析

囲食膜を構成する成分として同定されたタンパク質の多くはキチン結合性タンパク質であり、その相同遺伝子をデータベースで調べた。また、同定したすべてのキチン結合タンパク質の組換えタンパク質を大腸菌で作製し、TG により、架橋化されるかを解析した。さらに、調製した組換えタンパク質を抗原として抗体を作製して、*in vivo* において囲食膜のキチン結合タンパク質が架橋化されているかを Western Blot にて解析した。同定したキチン結合タンパク質の遺伝子を GAL4/UAS システムを用いて、ノックダウンを行い囲食膜形成における影響を解析した。

## 結 果

### 1. TGのノックダウン前後における腸内細菌叢の解析

次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析を行ったところ、TG-RNAi系統、およびコントロール系統では腸内細菌叢が異なることが分かった(図1)。

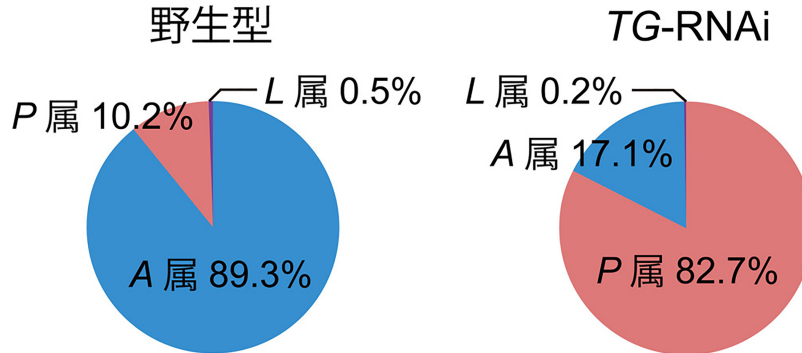


図1. TG-RNAiによる腸管の細菌叢の変化。  
腸内細菌を構成する細菌の存在を百分率で示した。

また、同系統間においても加齢に伴って腸内細菌叢が変化していた。TG-RNAi系統が短命である原因を詳しく調べるために、腸管より細菌を単離した。その結果、A属2種とL属1種の腸内細菌の単離に成功した。単離したA属2種はいずれも16S-rDNA配列が完全に一致する種がデータベース上になく、新種と考えられたため、*A. sp#1*、*A. sp#2*と名付けた。次世代シーケンサーによる解析で、主要な腸内細菌として検出されたP属については、今回はハエ腸管から単離出来なかった(投稿準備中)。TG-RNAi系統は、野生型に比べて短命であるため、腸管より分離した細菌の性質を検証することでTG-RNAi系統短命の原因を解明するために、現在も実験を継続している。

### 2. 囲食膜を構成するキチン結合タンパク質の同定とTGによる架橋化の解析

ショウジョウバエの囲食膜タンパク質についての情報は少ないが、ハマダラカやイラクサギンウワバエにおいては囲食膜を構成するタンパク質がいくつか明らかにされており、囲食膜を構成する成分として同定されたタンパク質の多くは、R&Rモチーフを含有するキチン結合性のタンパク質である。データベースで相同遺伝子を調べたところ、ショウジョウバエのゲノム上には、3種の遺伝子(ここでは、それぞれ遺伝子A、B、Cとする)が存在した。ショウジョウバエの各組織における遺伝子CのmRNA量を定量PCRにより解析した結果、中腸における発現量が一番高いことが判明した。次に、タンパク質Cが囲食膜を構成するタンパク質であるかを確かめるため、囲食膜透過性評価の実験を行った。遺伝子CをRNAiしたハエにおいて、コントロールと比較すると、蛍光ラベルしたデキストラン粒子が囲食膜を通過して腸管上皮まで広がっている様子が確認された。この結果より、タンパク質Cが囲食膜形成に寄与していることが示唆された。組換え体のタンパク質Cを調製し、TGの合成基質であるダンシルカダベリンをTG存在下で作用させたところ、TG依存的にダンシルカダベリンがタンパク質Cに取り込まれることが分かった。ハエの成体内でもタンパク質CがTGにより架橋されているか確認するため、タンパク質Cの抗体を用いてウェスタンブロットを行った。ハエ成虫全身のタンパク質をウェスタンブロットにより解析したところ、タンパク質Cのアミノ酸配列から推定される単量体の分子量ではなく、ゲルトップに高分子のバンドとして検出された。また、腸管から抽出した腸管タンパク質を用いてウェスタンブロットしたところ、ゲルトップに高分子のタンパク質Cに対する抗原バンドが確認された<sup>3)</sup>。

## 考 察

TG-RNAiによるハエの短命の原因は、TGによる制御を失った転写因子Relishが過剰に応答し、抗菌性ペプチドにより腸内細菌叢のバランスを崩してしまった結果であった(図2)。

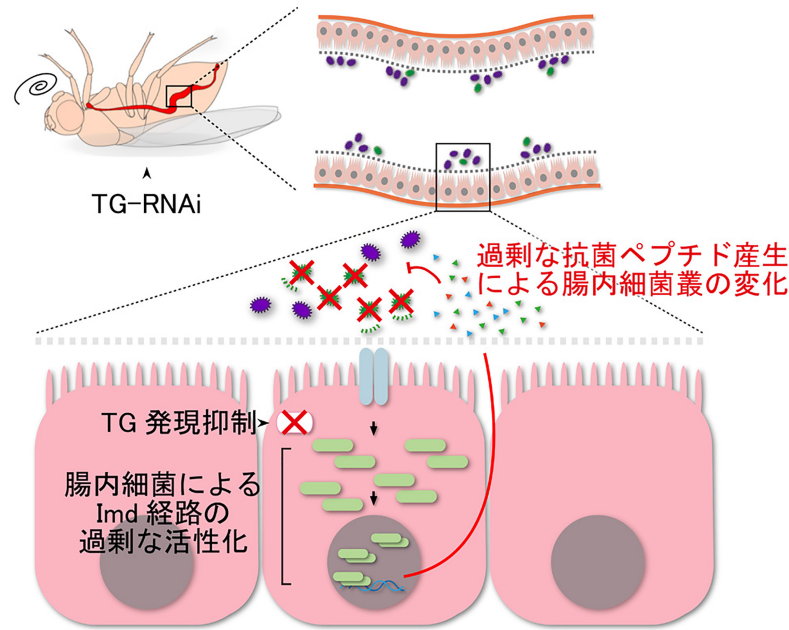


図2. *TG*-RNAiによる寿命減少の原因.

抗菌ペプチド産生の変化により、腸内細菌叢のバランスが変化し、宿主の寿命が減少した。

今回の研究で腸管より分離した細菌の性質を検証することで *TG*-RNAi 系統短命の原因を明らかにすべく、現在、詳細に実験している最中である。また、タンパク質 C の生理的な意義を調べるために、C 遺伝子を RNAi したハエの生存率を解析している。例えば、通常飼育において、C 遺伝子の RNAi による生存率の低下は認められなかったが、ある種の病原細菌を食べさせると、RNAi ハエの急激な生存率低下がみられた。ハエを使った腸管免疫の研究は、哺乳類と比べて腸内の細菌種が少ないこと、実験動物として取り扱いやすいことから、2008 年以降にわか研究推進の拍車がかかり始めている。腸管は口から感染してきた細菌と常に接しており、常時危険にさらされているため、免疫反応の最重要の場と言っても過言ではない。しかし、腸管免疫の全貌ははままだに分かっておらず、特に腸内共生細菌の維持機構については未開な部分が多く残されている。今回の成果、すなわち「トランスグルタミナーゼが腸内細菌叢や腸管免疫を調節している」という新しい概念が、哺乳類の腸管免疫研究においても新たな研究の引き金になることが期待される。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院理学研究院の柴田俊生助教、および同大学大学院システム生命科学府の大学院生、関原早苗、横 光輝、百間谷茉依である。

### 文 献

- 1) Shibata, T., Ariki, S., Shinzawa, N., Miyaji, R., Suyama, H., Sako, M., Inomata, N., Koshiba, T., Kanuka, H. & Kawabata, S. : Protein crosslinking by transglutaminase controls cuticle morphogenesis in *Drosophila*. *PLoS ONE*, **5** : e13477, 2010.
- 2) Shibata, T., Sekihara, S., Fujikawa, T., Miyaji, R., Maki, K., Ishihara, T., Koshiba, T. & Kawabata, S. : Transglutaminase-catalyzed protein-protein cross-linking suppresses the activity of the NF- $\kappa$ B-like transcription factor relish. *Sci. Signal*, **6** : ra61, 2013.
- 3) Shibata, T., Maki, K., Hadano, J., Fukikawa, T., Kitazaki, K., Koshiba, T. & Kawabata, S. : Crosslinking of a peritrophic matrix protein protects gut epithelia from bacterial exotoxins. *PLoS Pathog.*, **11** : e1005244, 2015.