

平成 29 年 4 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18855

研究課題名(和文) ショウジョウバエの腸管において腸内細菌の違いを感知する新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of host-microbe interaction in the gut of *Drosophila melanogaster*

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、ショウジョウバエ腸管における腸内細菌と宿主の相互作用について解析を進めている。本研究では、ショウジョウバエを完全に無菌化することを試みた。これは、特定の細菌のみを定着させて解析を行なうために必要な重要な技術であるが、これまでに真に無菌のショウジョウバエを確立して数世代にわたって維持することは困難であった。そこで研究代表者は、無菌マウス維持に利用される無菌アインレータを用い、無菌ショウジョウバエの維持・作成のための方法を確立した。すなわち、完全に微生物フリーのショウジョウバエを安定して飼育することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：The intestinal tract is one of the first organs acquired by multicellular organisms in the course of evolution. Because of its essential role in the digestion and absorption of food, its nutritive environment provides an ideal niche for commensal microbes, the effects of which are considered tremendous on hosts. *Drosophila melanogaster*, an invertebrate model organism, certainly possesses a gut, and its microbes could be used for investigating host-microbe interactions. However, generating and maintaining "germ-free" *Drosophila* is rather challenging. In this study, we established a solid and perhaps the first method for establishing germ-free flies, using a vinyl isolator and fly food with a specific composition. This germ-free fly technique could provide a pivotal basis for analyzing gnotobiotic *Drosophila*, which will improve our understanding of evolutionarily conserved host-microbe interactions in the intestine.

研究分野：腸管免疫学

キーワード：腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

「内なる外」と呼ばれる腸管は、体内にありながら外界と接している特徴的な器官である。腸管内には摂取した食物や腸内常在菌、外から侵入した病原性細菌などが存在している。侵入した病原性細菌は、宿主の免疫応答により腸管から排除される必要があるが、宿主にとって有益な働きをする腸内常在菌は適切に維持されている。病原性細菌と腸内常在菌とを区別して認識し、腸管免疫応答を制御することは宿主にとって非常に重要である。なぜならば、この機構が破綻すると炎症性腸疾患などの発症につながるからである。しかし、病原性細菌と有益な常在菌を見分け適切に制御する分子機構はまだ良く分かっていない。

上記のメカニズムに迫るため、研究代表者は、腸管における新規の免疫応答経路を見つけることで、この特別なメカニズムの解明に迫ろうと考えた。そして、これまでに報告のなかったグラム陽性菌経口感染時の免疫応答の解析を行い、Imd 経路を介してストレス応答因子の発現が誘導されることを明らかにした。本研究では、腸管においてグラム陽性菌の感染を認識する因子を同定し、その因子が Imd 経路をどのように活性化するかを明らかにすることを目標とした。

2. 研究の目的

グラム陽性菌経口感染後の腸管での遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイ解析により調べたところ、味覚受容体や嗅覚受容体といった低分子化合物の受容体の発現量が経口感染により変化することが示唆された。そこで、これらの低分子化合物の受容体が病原性細菌や腸内常在菌に特有の低分子化合物を認識し、腸管での免疫応答を制御しているのではないかという仮説をたて検証を行うこととした。そのためには、無菌化したショウジョウバエを作出し、そこに病原性細菌や腸内常在菌を定着させる技術が必要となる。しかし、真に無菌のショウジョウバエを作成して数世代にわたって維持することは、これまで非常に困難であった。

そこで本研究の主目的の一つとして、ショウジョウバエの完全無菌化と維持を行うこと、と設定した。

また、腸内細菌叢と自然免疫系との相関を検討し、当初の目的である「腸管においてグラム陽性菌の感染を認識する因子を同定し、その因子が Imd 経路をどのように活性化するかを明らかにする」を達成するための手がかりを得ることを試みた。

3. 研究の方法

無菌のショウジョウバエを何世代にもわたって飼育するため、無菌マウスの維持に利用するピニールアイソレータを用いた。また、無菌化による栄養状態の不良を改善するため、エサのタンパク成分や酵母抽出液成分を

増やしたエサを用いた。エサの滅菌は、通常行われているオートクレーブでは無く、線滅菌により行った。胚の滅菌は、通常行われている次亜塩素酸処理に加え、エクスポアによる処理を追加した。胚の滅菌の前に、顕微鏡下で幼虫を取り除いた。ピニールアイソレータの使用定法に従い、滅菌したエサと胚をアイソレータ内に持ち込み、ハエを飼育した。無菌化の確認は、無菌マウスのチェックと同様の培養法にて行った。

ショウジョウバエ野生型個体と、IMD 経路変異体の一つである Relish 変異体について、腸内細菌叢の違いを、次世代シーケンサーを用いたメタ 16S 解析により調べた。さらに、ショウジョウバエ自然免疫系に影響を与える変異体系統について、メタ 16S 解析により半網羅的に腸内細菌叢を決定した。

4. 研究成果

上記の手法により、数世代にわたって無菌状態を維持したショウジョウバエの飼育法を確立した。

研究室で維持しているさまざまなショウジョウバエ系統の腸内細菌を調べた。Oregon R、y w、w といった wild type コントロールでは Lactobacillus 属が非常に多くの割合を占め、ついで Acetobacter 属が多く、この 2 種類で 9 割以上を占めていた。一方、自然免疫応答に重要な Toll 経路や Imd 経路、ROS 産生経路の変異体個体などでも、Lactobacillus 属が非常に多くの割合を占め、ついで Acetobacter 属や Corynebacterium 属が占めており、野生型と大きな違いは見られなかった。

その他の自然免疫関連遺伝子変異体のメタ 16S 解析により、野生型と変異体では、細菌叢が多少異なっているものの、大きな違いはないことがわかった。さらに、メタ 16S 解析の情報を基に、ショウジョウバエの腸内細菌を多数単離して培養可能とした。

マウスのフンや腸管内容物を投与し、マウス由来の腸内細菌がショウジョウバエに定着するか調べた。マウス由来の腸内細菌のうち、さまざまな好気性菌や通性嫌気性菌の定着が見られた。

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 6 件)

1. Kenmoku H†, Hori A†, Kuraishi T†*, Kurata S*

“Novel mode of induction of the humoral innate immune response in *Drosophila* larvae”

Dis. Model. Mech. 10: 271-281

doi: 10.1242/dmm.027102

*co-corresponding authors

† These authors contributed equally to this work

- #Senior author
査読有
- Kenmoku H, Ishikawa H, Ote M, **Kuraishi T**, Kurata S
“A subset of neurons controls the permeability of the peritrophic matrix and midgut structure in *Drosophila* adults.”
doi: 10.1242/jeb.122960
J. Exp. Biol. 219 (Pt15): 2331-2339. 2016
査読有
 - Kanoh H†, **Kuraishi T***, Tong L-L, Watanabe, Nagata S, Kurata S*
“Ex vivo genome-wide RNAi screening of the *Drosophila* Toll signaling pathway elicited by a larva-derived tissue extract.”
Biochemical and Biophysical Research Communications 467(2): 400-406. 2015
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.138.
*co-corresponding authors
† These authors contributed equally to this work
査読有
 - Kuraishi T***, Kenmoku H†, Kurata S*.
“From mouth to anus: functional and structural relevance of enteric neurons in the *Drosophila melanogaster* gut.”
Insect Biochemistry and Molecular Biology 67: 21-26. 2015
*co-corresponding authors
† These authors contributed equally to this work
査読有
 - Kanoh H†, Tong L-L†, **Kuraishi T***, Suda Y, Momiuchi Y, Shishido F, Kurata S*.
“Genome-wide RNAi screening implicates the E3 ubiquitin ligase Sherpa in mediating innate immune signaling by Toll in *Drosophila* adults.”
Sci. Signal. 400(8): ra107. 2015
doi: 10.1126/scisignal.2005971.
*co-corresponding authors
† These authors contributed equally to this work
査読有
 - Momiuchi Y†, Kumada K†, **Kuraishi T**†, Takagaki T, Aigaki T, Oshima Y, Kurata S*
“Role of phylogenetically conserved co-chaperone protein Droj2/DNAJA3 in NF-κB signaling.”
J. Biol. Chem. 290(39): 23816-23825. 2015
doi: 10.1074/jbc.M115.664193
† These authors contributed equally to this work
査読有

[学会発表](計 24 件)

- Takayuki Kuraishi**
Infection-dependent versus -independent

- activation of *Drosophila* innate immune signaling [招待有り]
Japan-Brazil Malaria Workshop, São Paulo, Brazil, 15-17 March, 2017
- 倉石貴透**
“シヨウジョウバエモデルを用いた微生物と宿主の相互作用メカニズム解析: 微生物感染依存的な自然免疫活性化から感染非依存的な活性化メカニズムの解明” [招待有り]
国立長寿医療研究センターセミナー、愛知、2017年2月3日
 - Aki Hori, Hiroyuki Kenmoku, Shoichiro Kurata, **Takayuki Kuraishi**
Novel mode of induction of the innate immune response in *Drosophila* larvae
The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Osaka, Japan, January 20-21, 2017
 - Takayuki Kuraishi**, Kanoh Hiroataka, Li-Li Tong, Shoichiro Kurata
E3 ubiquitin ligase Sherpa mediates Toll innate immune signaling in *Drosophila* melanogaster
The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Osaka, Japan, January 20-21, 2017
 - 倉石貴透**
“シヨウジョウバエモデルを用いた自然免疫シグナルの解析: 微生物感染依存的な自然免疫活性化から感染非依存的な活性化メカニズムの解明へ” [招待有り]
立教大学生命理学研究センターセミナー、東京、2016年11月29日
 - Takayuki Kuraishi**
Infection-dependent versus -independent activation of *Drosophila* innate immune signaling [招待有り]
Nekken, Nagasaki University, Nagasaki, November 17, 2016
 - 倉石貴透**
“Guts, Germs, and Forceps”
モデル動物研究会「ムシサカナの会@金沢」金沢、2016年10月7日
 - 倉石貴透**
”シヨウジョウバエモデルを用いた自然免疫シグナルの解析: 微生物感染依存的な自然免疫活性化から感染非依存的な活性化メカニズムの解明へ” [招待有り]
金沢大学がん進展制御研究所セミナー、金沢、2016年9月20日
 - Takayuki Kuraishi**, Kanoh Hiroataka, Li-Li Tong, Shoichiro Kurata
E3 ubiquitin ligase Sherpa mediates Toll innate immune signaling in *Drosophila*
The 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, Tokyo, Japan, September 9-11, 2016
 - Takayuki Kuraishi**
Infection-dependent versus -independent

- activation of *Drosophila* innate immune signaling [招待有り]
The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji-shima, Japan, September 6-9, 2016
11. **倉石貴選**
"Guts, Germs, and Forceps"
昆虫ワークショップ 2016 (第 10 回)、箱根、2016 年 8 月 30 日-9 月 1 日
 12. **Takayuki Kuraishi**, Kanoh Hirota, Li-Li Tong, Shoichiro Kurata
E3 ubiquitin ligase Sherpa mediates Toll innate immune signaling in *Drosophila*
THE ALLIED GENETICS CONFERENCE 2016, Orlando, USA, July 13-17, 2016
 13. **Takayuki Kuraishi**
Gut defense mechanisms in *Drosophila* adults [招待有り]
The 8th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Seoul, Korea, June 20-24, 2016
 14. **倉石貴選**、狩野裕考、佟麗々、倉田祥一朗
“新規 E3 リガーゼ Sherpa によるショウジョウバエ Toll 経路を介した自然免疫応答の制御”
日本生化学会北陸支部台 34 回大会、金沢、2016 年 5 月 28 日
 15. **Takayuki Kuraishi**
Isolation of a novel toxin from entomopathogenic bacteria *Pseudomonas entomophila* [招待有り]
第 89 回日本細菌学会総会、大阪、2016 年 3 月 24 日
 16. **Takayuki Kuraishi**
Infection-dependent versus -independent activation of *Drosophila* innate immune signaling [招待有り]
National Institute of Genetics, Seminar, Mishima, 2016 年 1 月 14 日
 17. 石澤 勇輝、麻生 高裕、石川 裕規、**倉石貴選**、倉田 祥一朗
“DNA ウイルス感染により誘導されるアポトーシスのメカニズム解析”
第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 3 日
 18. 神 啓祐、**倉石貴選**、倉田 祥一朗
“ショウジョウバエ培養細胞を用いた細胞内共生細菌 *Wolbachia* による宿主ウイルス抵抗性付与機構の解析”
第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 3 日
 19. 狩野 裕考、**倉石貴選**、トウ レイレイ、須田 大翔、初内 義希、宍戸 史、倉田 祥一朗
“新規 E3 リガーゼ Sherpa によるショウジョウバエ Toll 経路を介した自然免疫応答の制御機構”
第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月 3 日
 20. 狩野裕考、**倉石貴選**、トウ・レイレイ、倉田祥一朗
“新規 E3 ligase Sherpa によるショウジョウバエ自然免疫応答の制御機構”
第 54 回日本薬学会東北支部大会、岩手医科大学、2015 年 9 月 26 日
 21. **倉石貴選**
内因性リガンドによる進化的に保存された自然免疫活性化機構の解明
さきがけ「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域 平成 27 年度研究報告会、東京コンファレンスセンター品川、2015 年 11 月 6 日
 22. **倉石貴選**
Toll 経路の活性化に必要な新規シグナル伝達因子 Sherpa の同定と機能解析 [招待有り]
日本遺伝学会第 87 回大会「生命」への多面的アプローチ ショウジョウバエをモデルとして、仙台、2015 年 9 月 24 日
 23. **倉石貴選**
ショウジョウバエ自然免疫で働く新規因子の同定と機能解析 [招待有り]
第 297 回生物科学セミナー、大阪大学大学院理学研究科、2015 年 7 月 13 日
 24. **倉石貴選**
ショウジョウバエ Toll 経路を制御する新規因子 Sherpa の同定と機能解析
第七回免疫適塾、筑波、2015 年 7 月 4 日
- 〔図書〕(計 1 件)
1. **Kuraishi T†***, Kanoh H†*, Momiuchi Y†, Kenmoku H†, Kurata S
“The *Drosophila* Toll pathway: a model of innate immune signaling activated by endogenous ligands.”
Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation, Chapter 11, Springer JP 119-129 (2016)
*co-corresponding authors
† These authors contributed equally to this work
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
- 取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉石 貴透 (KURAIISHI, Takayuki)
金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授
研究者番号：90613167

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし