

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 5 年 5 月 1 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学大学院附属薬剤耐性菌実験施設
職 名 准教授
研究代表者 久留島 潤

下記のとおり令和4年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:22007)

1. 共同研究課題名	腸管上皮オルガノイド共培養系を利用したヒト腸内環境における細菌応答の時空間解析			
2. 共同研究目的	腸内細菌叢は腸管組織と直接的・間接的に相互作用することで、ヒトの正常な生体調節の恒常性に寄与していることが、主に疫学的な研究手法によって明らかにされている。しかしながら、腸内細菌とヒト腸管組織との相互作用の分子機構については十分に理解されていない。本研究課題では、群馬大学生体調節研究所の佐々木伸雄教授が開発した腸管上皮オルガノイドとの共培養系 (Sasaki et al. Gastroenterology 2020) を利用し、擬似的ヒト腸管内における腸内細菌の環境応答の変化を、時空間的な解析を単一細胞レベルで実施する。			
3. 共同研究期間	令和 4 年 4 月 1 日 ~ 令和 5 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 久留島 潤	医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設	職名:准教授 学位:博士(生命科学) 取得年月日:2012.3.31	実験・解析・研究の総括	
(分担研究者)				
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	粘膜エコシステム制御分野	氏 名	佐々木 伸雄

次の6, 7, 8の項目は、枠を自由に変更できます(横幅は変更不可)。6, 7, 8の項目全体では2頁に収めてください。

6. 共同研究計画

腸内細菌叢は腸管組織と直接的・間接的に相互作用することで、ヒトの正常な生体調節の恒常性に寄与していることが、主に疫学的な研究方法によって明らかにされている。しかしながら、腸内細菌とヒト腸管組織との相互作用の分子機構については十分に理解されていない。本研究課題では、群馬大学生体調節研究所の佐々木伸雄教授が開発した腸管上皮オルガノイドとの共培養系 (Sasaki et al. Gastroenterology 2020) を利用し、擬似的ヒト腸管内における腸内細菌の環境応答の変化を、時空間的な解析を単一細胞レベルで実施する。具体的には、人の生体調節に重要であることが知られている腸内細菌について、オルガノイド共培養によって特異的に誘導される遺伝子発現を網羅的に同定する。得られた興味深い遺伝子について、蛍光発現レポーター株を構築し、蛍光イメージングにより時空間的な発現動態を可視化する。これによって、腸管組織との相互作用に基づく腸内細菌の生態生理が解明されることが期待される。

まず実験系の基盤として、各種腸内細菌のヒト腸管上皮オルガノイド共培養系における生育を確認し、Tn-seqによって、腸内での生育に必須なゲノム領域を網羅的に同定する。同時に、RNA-seqにより、腸管上皮オルガノイドとの共培養で変動する遺伝子発現の解析を行う。これによって得られた興味深い遺伝子および代謝経路の動態について、蛍光発現で検出するレポーター株を CRISPR-Cas9 を利用したゲノム改変により作出する。多くの腸内細菌種では未だ CRISPR-Cas9 技術が確立されていないが、RNA-seq と Tn-seq の結果を解析して得られるゲノムアノテーション情報を基に、腸内菌種ごとにゲノム改変系の最適化が可能である。蛍光レポーター株を用いて、蛍光顕微鏡下での共培養のライブイメージングを行い、発現動態の時間変化ならびに腸管上皮に対する発現細菌細胞の空間的分布を解析する。さらに、観察された腸内細菌の環境応答を誘導する活性をもつ腸管上皮由来の因子を同定するため、蛍光/化学発光検出マイクロプレートリーダー上で、化合物スクリーニングを行う。

7. 共同研究の成果

【目的】まず、薬剤耐性プラスミドの水平伝播を検出する、あるいは水平伝播を媒介する遺伝子の発現誘導を生物発光によってモニターするためのレポーター菌株を遺伝子組み換えによって構築した。これを用いて、オルガノイドの培養上清を腸内環境の模倣環境条件として、種々の検討を行った。

【方法】これまでに、腸管組織からのシグナル(代謝物)が細菌プラスミドの接合伝達効率に与える影響を調べた。具体的には、オルガノイドを培養していない新鮮なオルガノイド用培地(コントロール)と二次元組織化した腸管オルガノイドを数日間培養した培地上清(オルガノイド上清)に用いて細菌のレポーター株の培養を行い、保温機能付きマイクロプレートリーダーを用いて、濁度(OD620)を指標とした細菌の生育と特定の遺伝子発現をレポートする生物発光のカイネティクスを取得した。

【結果】接合時に誘導される *prgB* 遺伝子の発現誘導を解析したところ、オルガノイド上清そのものに接合を誘導する活性はないことが示唆された。一方、受容菌との共培養により、クオラムセンシング機構(細菌細胞間のコミュニケーションによる情報伝達)依存的な接合を誘導させたところ、オルガノイド上清ではコントロール培地と比べて顕著な *prgB* 遺伝子発現の増強が認められた。興味深いことに、構成的な発現が知られているプラスミド複製分配遺伝子 *parA* の発現がオルガノイド上清で上昇することが見出された。一方、細菌の生育はオルガノイド上清においてコントロール培地よりも抑制的であった。

以上の結果より、オルガノイド上清に含まれる何らかの成分が、細菌の生育を抑制する一方、菌体内のプラスミドコピー数を上昇させることで、接合開始のシグナルを受け取った際に接合遺伝子の見掛け上の発現上昇につながる可能性が考えられる。このことは、腸管内環境がより効率的に細菌同士の遺伝子交換を促していることを示唆する。今後、培地ロット間での再現性や、オルガノイド上清の具体的な活性物質の同定を試みる予定である。また、この宿主から細菌への種間シグナル伝達系を分子レベルで明らかにするために細菌側の関与因子をゲノムワイドに探索する予定である。

8. 共同研究成果に関連する学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文, 又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等をできる限り記載してください。なお, 論文の場合は, PDFファイルを以下の研究所庶務係のメールアドレスまで報告書と併せてお送りください。) 研究所庶務係 e-mail : kk-msomu4@jimu.gunma-u.ac.jp

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文
該当なし

②この共同研究に基づくとの記載のある論文
該当なし

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名, 開催日, 演題)
該当なし

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

1. 双方の研究の背景と実験デザインに関するディスカッション
2. オルガノイド培地の受け渡しに伴う、サンプル調製方法など実験ノートレベルの情報共有
3. 実験結果と以降の実験デザインについてのディスカッション