

腸内細菌叢が動物の季節応答に及ぼす影響

松本 昇子

主論文の要約

生物を取り巻く環境は常に変化している。中でも、地球の規則的な自転と公転によって生じる昼夜や季節の巡りは、生物が予測可能な環境変化をもたらす。生物が周期的な環境変化を予測し、変化に適した応答を示すことは、エネルギーを効率よく利用するために必要な能力である。季節が存在する地域において生物は、日長や気温、降水量など季節的な環境変化にさらされている。生物は、日長の変化を有力な手がかりとして季節変化を感じ取り、生殖、成長、冬眠、脱皮などの生理機能や行動を変化させる。

生物の全身には「常在菌」と呼ばれる細菌が細菌叢を形成しており、腸管細菌叢は最もボリュームの大きな細菌叢の一つである。腸内細菌叢は二次代謝産物や菌体による刺激などを介して宿主の全身に影響を及ぼす。つまり、腸内細菌叢と生理状態の関連を明らかにすることは、生物の健康を理解するうえで重要な意義を持つ。

腸内細菌叢の構成は一定ではなく、加齢や遺伝的背景といった内的要因や、食餌や薬物治療といった外的要因によって変化する。驚くべきことに、腸内細菌叢もまた周期的なリズムを刻む。マウスの腸内細菌叢は、24時間という短い期間でダイナミックな組成変化を示すことが報告されている。さらに、ヒトやいくつかの野生動物において、腸内細菌叢の構成が季節に伴って変化することが知られている。タンザニアの先住民族であるハツァ族や、エチオピアに生息するゲラダヒヒ *Theropithecus gelada* を対象とした研究では、雨季と乾季で腸内細菌叢の組成が異なっていた。これらの先行研究では、季節的な食餌内容の差が腸内細菌叢組成に影響を及ぼしたと述べられている。しかし、腸内細菌叢の季節差が及ぼす生理的な意義は不明であった。

そこで本研究では、季節変動する外部因子を制御し、食餌内容の季節差に依存しない腸内細菌叢の季節変化とその影響について明らかにすることを本研究の目的とした。3種類の脊椎動物、アカゲザル *Macaca mulatta*、マウス *Mus musculus*、ウズラ *Coturnix japonica* が持つ特性を利用し、腸内細菌叢に影響を及ぼす外部季節変動因子を制御して実験を行った。

アカゲザル *Macaca mulatta* は霊長目オナガザル科マカク属に分類される哺乳類であり、野生ではインドや中国近辺に分布する。遺伝的および生理学的にヒトに近いことから、霊長類の実験動物として研究利用されてきた。カニクイザル *Macaca fascicularis* も実験用霊長類として広く利用されるが、一年を通して繁殖できるカニクイザルと異なり、アカゲザルは短日環境で繁殖を行う季節繁殖動物である。

総合緒言で述べたように、いくつかの動物種で腸内細菌叢の季節変化が報告されている。アカゲザルの近縁種であるニホンザル *Macaca fuscata* の野生個体において

も、食餌の季節差によって腸内細菌叢の組成に季節変化が生じたと報告されている。つまり、季節適応に纏わる腸内細菌叢の季節変化の仕組みを明らかにするうえで、第一に食餌内容の季節差をなくす必要がある。

本章では、餌内容を均一に管理された野外飼育個体のアカゲザルを用いて、食餌以外の季節変動因子が腸内細菌叢に及ぼす影響を検討した。直腸スワブは結腸細菌叢を評価するのに代替可能な手段である。雌雄のアカゲザルそれぞれ2頭から2ヶ月に1度直腸スワブを採取し、16S rRNA 解析によりスワブ細菌叢の季節差と雌雄差について検討した。

JTK_cycle によって細菌叢の周期的な変化を解析したところ、オスの *Pseudomonadota* は Cool 群で高く Warm 群で低い有意な周期性を持つことが算出された。細菌門毎に季節条件間の統計比較を行った結果、雌雄に共通して *Bacteroidota* は Warm 群、*Pseudomonadota* は Cool 群で有意に高い割合を示すことが明らかとなった。さらにアルファ多様性の比較では、オスは Cool 群で有意に高い多様性を示し、有意差はないもののメスでも同様の傾向を示した。細菌叢の雌雄差についても検討を行ったが、門レベルで有意な差はなかった。一方で、PICRUSt2 による細菌叢の機能予測結果には雌雄差があり、メスの Cool 群でエネルギー代謝に関わる TCA cycle が高まっていることが明らかとなった。これは、同じ季節条件においても腸内細菌叢が宿主にもたらす影響は性別によって異なり、メスにおいては腸内細菌叢が冬季のエネルギー代謝をサポートしている可能性が考えられる。

第1章では、食餌内容が一年を通して一定であっても、食餌以外の外部季節変動因子によってアカゲザルスワブ腸内細菌叢の季節差が生じること、アカゲザルスワブ腸内細菌叢には雌雄差が存在することが明らかになった。

遺伝的背景の違いは腸内細菌叢に影響を与えることが知られている。アカゲザルは遺伝的に均一ではなく、さらに個体数を確保し難いことから、第2章では実験用 CBA/N マウスを用いた。実験環境下で気温と日長を操作した人工的な季節条件による腸内細菌叢の変化を明らかにした。さらに、腸内細菌叢の組成や比率は日内リズムを示すことが知られているため、4時間毎にサンプリングを行い、CBA/N マウスにおける日内リズムの季節条件間差についても評価した。

盲腸と大腸それぞれの PCoA において LW 群と SC 群は有意に異なるクラスターを示すこと、日内変動のパターンが季節条件によって異なること、盲腸 *Bacteroidota* 門の割合が LW 条件下で有意に高いことが明らかとなった。また、JTK_Cycle を用いて門レベルでの相対存在度のリズム性を検討したところ、盲腸では *Bacteroidota* と *Deferribacterota* が LW 条件で、*Desulfobacterota* が SC 条件で明確な日内リズムを示し、大腸では *Desulfobacterota* が LW と SC の両方で有意な日内リズムを示した。第2章では、食餌内容の変化がなくとも、日長や気温の変化によって腸内細菌叢構成が変化する

ることを明確に証明した。しかしながら、これらの季節的变化が宿主動物の生理、行動、疾病にどのように影響するかが次の課題として残った。

第1章と第2章の結果から、食餌が同じであっても日長や温度などの外部因子に季節変化によって腸内細菌叢に明瞭な違いが生じることが明らかになった。しかし、その生理学的な意義は不明であった。そこで第3章では、優れた日長応答能を持つウズラを用いて研究を行った。

ウズラは洗練された季節適応機構を持っており、光周期の変化に対して迅速かつ明瞭な反応を示す。短日 (SD) 条件から長日 (LD) 条件へウズラを移動すると、長日1日目が終わるまでに血清黄体形成ホルモンの誘導が観察される。また、精巣重量の変化も劇的であり、LD条件への移行後2週間以内に観察することができる。盲腸は鳥類の健康に影響を与える重要な腸管部位であるため、盲腸の腸内細菌叢プロファイルは広く研究されている。

ここでは、長日もしくは短日環境で飼育したウズラの盲腸内容物を用いて 16S rRNA 解析を行い、ウズラ盲腸内細菌叢の季節変化を検討した。さらに、季節によって異なる細菌叢がウズラにもたらす影響について明らかにすることを目的として、長日環境で飼育したウズラの盲腸細菌叢を短日個体に移植し、ウズラの季節適応として顕著な表現型である生殖線の発達を評価した。

抗生物質投与によって、LD条件による卵巣発達は有意に抑制された。16S rRNA 解析によってメスウズラの盲腸細菌叢を明らかにしたところ、LD群とSD群の盲腸細菌叢は有意に異なるクラスターを形成した。門レベルの統計比較によってLD群では *Bacteroidota* と *Pseudomonadota*、SD群では *Actinomycetota* の割合が有意に高いことがわかった。アルファ多様性について統計比較を行ったところ、有意差はなかったものの、LD群で高い多様性を示す傾向があった。次に、盲腸細菌叢の季節変化が生殖活動に及ぼす影響を評価するため、SD条件下で飼育したウズラにLD個体由来の盲腸細菌叢を強制経口投与により移植した。その結果、PBSを投与した対照群に比べ、LD盲腸細菌叢を移植した個体では有意に卵巣重量が重いことがわかった (t 検定、 $p = 0.0498$)。これらの結果は、メスの卵巣の光周反応に盲腸細菌叢の季節変化が寄与している可能性を示唆している。第3章では、ウズラの盲腸細菌叢は人工的な日長操作によりダイナミックな変化を示すことが明らかとなった。さらに、盲腸細菌叢の日長条件による変化は、メスウズラの卵巣発育の光周性制御に影響を与えることがわかった。

3種に共通して、食餌に差がなくても腸内細菌叢に季節差が生じることが明らかとなった。マウス、ウズラにおいては、実験室環境での人工的な季節条件によっても腸内細菌叢に影響が生じることが明らかとなった。*Bacteroidota* の相対的存在量は3種に共通して夏環境(アカゲザル: Warm群、マウス: LW群、ウズラ: LD群)において有意に高い割合を示すことが明らかとなった。*Bacteroidota* は多くの脊椎動物の腸内

細菌叢において主要なメンバーであり、宿主の代謝を助ける。さらに、アカゲザルとウズラのアルファ多様性は、アカゲザルは冬条件である Cool 群、ウズラは夏条件である LD 群で有意に高まっていた。腸内細菌叢の豊富な多様性は正常な生理機能の維持につながる。アカゲザルとウズラは季節繁殖生物であり、アカゲザルは冬にウズラは夏に生殖活動を行う。動物の繁殖活動には多大なコストがかかるため、繁殖期に限定して様々な生理機能がダイナミックに活性化される。性ステロイドホルモンが腸内細菌叢に影響を及ぼすことが知られており、この結果は血中性ホルモン濃度の変化によって生じた可能性がある。

腸内細菌叢の季節変化については、これまでもいくつかの生物種において報告があったが、その生理的な意義は不明であった。本研究では、アカゲザル、マウス、ウズラといった進化的にも大きく異なる 3 種類の生物において、環境の季節変化によって腸内細菌叢が変化することを明らかにした。これらの生物において、食餌の内容が一定であっても予想以上に大きな差が認められたことは興味深い。

本研究で明らかになった“宿主を日長や気温の季節変化に暴露することで腸内細菌叢が変化する”“季節条件間での腸内細菌叢の差は宿主の生殖生理に影響を及ぼす”という現象は、腸内細菌叢と宿主の相互コミュニケーションがあつてこそ生じる。腸内細菌叢は暗く温度が一定な腸内に生息しており、外界の刺激に直接接触れることはないため、この結果は宿主と腸内細菌叢の共生関係を如実に表す。このような共生関係は、全ての生物が他者との関わりの中で生きていることを知らしめる。