

キイロシヨウジョウバエを用いた  
睡眠促進作用を有する乳酸菌およびビフィズス菌の探索と  
その作用機序に関する研究

神 太郎

(2024年3月)

本学位論文の内容は、下記原著論文を参考に作成されたものである。

どちらも村上弘樹氏と著者が筆頭著者となった論文であることから、本学位論文における両者の貢献部分を以下に記す。

- ・原著論文1におけるキイロショウジョウバエを用いて *Lactiplantibacillus plantarum* の睡眠への影響を調べることに、原著論文2における複数の属にわたる乳酸菌とビフィズス菌の作用を評価することという、研究の起点となる方向性は両者で議論して決定したため均等に貢献した。
- ・研究に供した菌がショウジョウバエの睡眠行動に及ぼす影響を明らかにした後の作用機序等に関する部分は著者が実施した。
- ・実験結果の解析、考察は著者が実施した。
- ・原著論文の執筆は全て著者が行った。
- ・各実験における貢献については結果の項に記載する。

なお、原著論文2において、著者は石元広志博士との共同責任著者である。

1. Taro Ko<sup>\*</sup>, Hiroki Murakami<sup>\*</sup>, Azusa Kamikouchi, Hiroshi Ishimoto, (2022).

Biogenic action of *Lactobacillus plantarum* SBT2227 promotes sleep in *Drosophila melanogaster*.

iScience, Volume 25, Issue 7, 104626

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104626>.

\* These authors contributed equally to this work.

2. Taro Ko<sup>\*†</sup>, Hiroki Murakami<sup>\*</sup>, Shunjiro Kobayashi, Azusa Kamikouchi, Hiroshi Ishimoto<sup>†</sup>, (2023).

Behavioral screening of sleep-promoting effects of human intestinal and food-associated bacteria on *Drosophila melanogaster*.

Genes to Cells, Volume 28, Issue 6, 433–446

<https://doi.org/10.1111/gtc.13025>

\* These authors contributed equally to this work.

† These authors are designated as co-correspondence authors.

## 目次

緒言.....	4
第1章 乳酸菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> SBT2227 が産生する物質はキイロシヨウジヨ ウバエの睡眠を促進する .....	6
1-1. 序論 .....	6
1-2. 材料と方法 .....	8
1-3. 結果 .....	13
1-4. 考察 .....	31
第2章 キイロシヨウジヨウバエを活用したヒトまたは食物由来の微生物の睡眠促進作用 のスクリーニング .....	34
2-1. 序論 .....	34
2-2. 材料と方法 .....	35
2-3. 結果 .....	39
2-4. 考察 .....	59
総括.....	62
利益相反の開示 .....	64
参考文献 .....	65
謝辞.....	75

## 緒言

睡眠または睡眠様状態は哺乳類や魚類などの脊椎動物からショウジョウバエや線虫に至る多くの動物で観察される (Keene & Duboue, 2018)。睡眠は肉体的・精神的な疲労の回復に必要なだけでなく、記憶の定着や保持といったシナプス可塑性の変化を伴う脳機能の適切な実行に役立っている (Rasch & Born, 2013; Raven et al., 2018)。そのため、睡眠が不足すると疲労が蓄積して脳機能の適切な実行が困難になる。例えばスペースシャトル・チャレンジャー号の墜落やスリーマイル島の原発事故は、睡眠が不足したことにより起きたと考えられる大きな産業事故である。身近なところでは、主観的な眠気の強さに応じて、交通事故発生頻度が高いことを示す研究結果もある (Ozer et al., 2014)。睡眠不足は脳機能以外にも、肥満や高血圧、糖尿病といった生活習慣病のリスクを高める可能性があり (Cappuccio & Miller, 2017; Chaput et al., 2023; Reutrakul & Van Cauter, 2018)、事故や疾病を含めた睡眠に関連する経済的損失は年間数兆円以上と試算されている (Hafner et al., 2017)。このように睡眠不足に起因する個人・社会の損失は大きいものの、睡眠を十分にとれていない者は多い。研究デザインや不眠症の定義によって異なるが、不眠症の有病率は少なくとも 10%以上だとされる (Itani et al., 2016; Tiseo et al., 2020)。これまでに睡眠不足の問題を克服するために様々な睡眠薬が開発されているが、種類によっては中毒や依存症、副作用を引き起こすものもある (Atkin et al., 2018; Brandt & Leong, 2017)。そのため、睡眠薬に代わる選択肢の一つとして、毎日摂取しても体への負担の少ない睡眠をサポートする食品が求められている。

乳酸菌等の微生物は古くから食品の発酵に活用され、人々の食生活を潤してきた。例外は存在するものの、多くの生物の腸内には微生物が存在し、その一部は摂食した食物由来の微生物で構成されている (Pasolli et al., 2020)。今から 100 年以上前に、Metchnikoff はそのような発酵食品及びそこに含まれる微生物が健康に寄与するとの考えを提唱した (Metchnikoff, 1907)。その後多くの研究が行われ、腸内細菌あるいは生きてまま摂取した乳酸菌等の微生物が、抗肥満作用 (Barathikannan et al., 2019)、心血管疾患のリスク低減 (Witkowski et al., 2020)、免疫の活性化 (Shi et al., 2017)、精神的健康への寄与 (Zagórska et al., 2020) などに関与することが明らかにされた。さらに、微生物が死菌であっても、摂食者の生理機能に寄与する例が報告されるようになった (Mitsuoka, 2000; Nakamura et al., 2016)。このような豊富な食経験と生理機能への期待を背景に、乳酸菌等の微生物は機能性素材としての活用が盛んに行われている。

キイロショウジョウバエは単純な脳と神経系を持ち、神経科学分野で広く使われるモデル生物である。睡眠の分野においても積極的に研究が進められ、睡眠の調節に関してショウジョウバエとヒトとで多くの点で類似していることが明らかにされてきた。具体的には、生理学的、薬理的な睡眠の調整機構、内分泌およびニューロンによる調節、概日リズムや恒常性維持といった点である (Huber et al., 2004; Koh et al., 2006; Kume et al., 2005; Ly et al., 2018; M. N. Wu et al., 2009; Yuan et al., 2006)。また、多くの生物と同様にショウジョウバエも腸内細菌を有しており、その腸内細菌叢はヒトやマウスと比べて単純な構成

となっている (Erkosar et al., 2013)。脳-腸-腸内細菌軸の研究でも活用され (Broderick & Lemaitre, 2012; C. N. A. Wong et al., 2011)、腸内細菌が運動 (Schretter et al., 2018)、採餌 (Leitão-Gonçalves et al., 2017; A. C.-N. Wong et al., 2017)、匂い誘導性の産卵機構 (Qiao et al., 2019)、食物の好み (Venu et al., 2014)など様々な機能に影響を及ぼすことが明らかにされた。これらの知見は、キイロショウジョウバエが睡眠分野においても脳-腸-腸内細菌間の相互作用の研究に活用できることを示唆するものである。実際に、ショウジョウバエを用い、腸内細菌と睡眠の関係を調べた研究も少しずつ報告されてきた (Jia et al., 2021; Selkrig et al., 2018; Silva et al., 2020)。しかし、その結果は必ずしも一致していない。

そこで本研究ではショウジョウバエを用いて腸内細菌や経口摂取する乳酸菌が睡眠に及ぼす影響を明らかにし、その作用メカニズムを一端でも解明することを目的とした。仮に、睡眠を調節する微生物がヒトとショウジョウバエとで共通する睡眠調節機構を介して作用した場合、その微生物を睡眠調節作用を有する新規機能性素材として開発できる道が拓ける。つまり、消費者に睡眠薬に代わる選択肢を提供することに繋がり、睡眠不足という社会課題の解決への貢献が期待できる。

第1章では、ショウジョウバエの腸内細菌を構成する主要な菌である *Lactiplantibacillus plantarum* に着目し、睡眠への影響を検討した。その結果、ショウジョウバエにおいて腸内細菌が睡眠に及ぼす影響はほぼ認められなかったが、*L. plantarum* を経口摂取すると死菌体であってもハエの睡眠を促進させることが分かった。本論では、当該微生物の睡眠への作用と、推定される作用機序について述べる。

第1章の結果は *L. plantarum* が有する成分がハエの睡眠を促進することを表している。このことは、他の微生物であっても類似の成分を有していればハエの睡眠を促進する可能性を示している。もし、他菌種であっても同じような睡眠促進作用を有する菌、あるいは近縁の菌種であっても異なる睡眠促進作用を有する菌を見いだせれば、その差異を調べることで作用成分や作用機序の解明が進む。そこで第2章では、*L. plantarum* を含む計39種類の微生物について睡眠促進作用への影響を評価し、睡眠促進作用を有する新たな菌と、睡眠促進作用を示さないその同種異株を見出した。本論では、それら菌を用いて明らかにした作用機序の一端について述べる。

## 第1章 乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* SBT2227 が産生する物質はキイロショウジョウバエの睡眠を促進する

### 1-1. 序論

動物は食物とともに、食物に付着している微生物を摂取し、その微生物の一部が腸内細菌叢を構成する (Pasolli et al., 2020)。このことは、同じ動物種であっても食性が異なれば腸内細菌叢も異なることを示唆している。実際にショウジョウバエにおいても野外の個体と研究室で飼育された個体で腸内細菌叢が異なるだけでなく、研究室ごとにも異なる例が報告されている (Chandler et al., 2011)。一方、*Lactiplantibacillus plantarum* のように、野外のショウジョウバエから研究室で飼育されたハエにまで共通して存在する微生物も報告されている (Broderick & Lemaitre, 2012)。これまでに、ショウジョウバエにおいて腸内細菌を人為的に除去しても睡眠はほとんど変化しないとする報告と (Jia et al., 2021; Selkrig et al., 2018)、腸内細菌を除去するとわずかに睡眠が増加するとの報告がある (Silva et al., 2020)。腸内細菌がハエの睡眠に及ぼす影響は明確ではないものの、既存の腸内細菌がハエの睡眠を調節している可能性は否定できない。腸内細菌が宿主の生理機能に作用する一つの経路として、宿主が摂食した食物などから腸内細菌が産生した様々な代謝産物が腸から吸収されて宿主に影響を及ぼすという考え方がある (Mitsuoka, 2000)。この考え方に立脚すると、腸内細菌から供給される代謝産物を宿主に供給できれば、腸内における微生物の存在の有無に関係なく宿主の生理機能を変化させることが可能となる。私は、ショウジョウバエの睡眠における腸内細菌の影響についてこれまで一致した見解が得られていない原因の一つは、その研究方法にあると考えた。既報では通常飼育したショウジョウバエと、抗生物質処理等で無菌化したショウジョウバエの行動を比較している。しかし、上述したように研究室ごとに腸内菌叢を構成する微生物は異なるため、無菌ハエの状態は研究室間である程度一致していても、通常飼育のハエの腸内の状態は研究毎に異なる可能性がある。つまり、一致した結果が得られた研究で使用したハエは腸内菌叢が類似していたが、異なる結果が得られた研究ではハエの菌叢が異なっていたと考えた。

そこで私は、*L. plantarum* に着目した。複数の研究室において腸内細菌と睡眠に共通の関係性が認められた原因が、異なる研究室のハエにも存在する *L. plantarum* に起因する可能性があると考えたためである。また、*L. plantarum* は、ショウジョウバエにおいて幼虫の成長を促進するだけでなく (Storelli et al., 2011)、ショウジョウバエとマウス双方において低栄養様状態の緩和 (Schwarzer et al., 2016) や腸管上皮における ROS 産生の促進とそれによる細胞増殖の促進 (Jones et al., 2013) をする。このように、*L. plantarum* の宿主に対する作用にはショウジョウバエと哺乳類で共通性があるため、仮に *L. plantarum* がハエの睡眠行動に作用した場合、ヒトにも同様の作用をする可能性があると考えた。

腸内細菌の代謝産物が宿主の生理機能に影響を及ぼしているとする、*L. plantarum* の存在の有無あるいは存在量の多寡により生理機能への影響の程度が異なると考えられる。既存の研究同様に通常飼育したハエと無菌ハエを比較したのでは、*L. plantarum* 及びその代謝

産物の量のコントロールが難しい。そこで私は、培養した *L. plantarum* をハエに経口投与し、睡眠行動への影響を評価することとした。なお、本研究は腸内細菌や経口摂取する乳酸菌が睡眠に及ぼす影響を明らかにすることを目的としつつも、その結果見出した菌や成果をもとに機能性素材を開発することを視野に入れている。乳酸菌には、各菌種に基準株と呼ばれるその菌種で最初に発見が報告された菌株が存在する。しかしながら、必ずしも基準株がその菌種を代表する特徴を有する菌株とは限らず、また将来の商業利用を想定すると独自の菌株である方が望ましい。そこで、本研究ではヒトから分離した *L. plantarum* の SBT2227 株（以下、LP2227 と呼ぶ）を使用した。

## 1-2. 材料と方法

### 1-2-1. 使用したキイロショウジョウバエの系統と維持条件

本研究ではキイロショウジョウバエを標準的なコーンミール/酵母ベースの餌（50 g/L グルコース、45 g/L 酵母、40 g/L コーンフラワー、8 g/L 寒天、4 ml/L プロピオン酸、3 ml/L ボーキニン）を与え、温度 24±1°C、相対湿度 60±3%、12 時間ごとの明暗周期条件（12 時間 L/D）下で飼育した。*Canton-S<sup>2202u</sup>* を野生型系統として使用した。別の野生型系統である *Amherst\_3* (BDSC\_4265) を、*Canton-S<sup>2202u</sup>* で認められた現象を確認するために使用した。また、*Gal4/UAS* システムを活用して目的とする遺伝子の発現を抑制できるハエ系統を作製した。Table 1-1 に本研究で使用したハエを示した。

実験には、羽化後 10 時間以内に二酸化炭素麻酔下で雌雄選別し、回収した処女メスのみを使用した。回収したハエは餌の入ったバイアルに 15~20 匹ずつ入れて実験に使用するまで維持飼育した。

**Table 1-1. List of bacterial strains used in the study**

系統名	入手先	識別番号
<i>Canton-S<sup>2202u</sup></i>	Dr. Takaomi Sakai, Tokyo Metropolitan Univ., Japan	-
<i>Amherst_3</i>	Dr. Teiichi Tanimura, Nagoya Univ., Japan	BDSC_4265
<i>Act-Gal4<sup>25FO1</sup> / CyO, Act-GFP</i>	Dr. Awasaki, Kyorin Univ., Japan	BDSC_4414
<i>tub5-GS-Gal4</i>	Dr. Scott D. Pletcher, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA	-
<i>UAS-AstA-RNAi</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center (BDSC ; Bloomington, IN, USA)	BDSC_25866
<i>UAS-Mip-RNAi</i>	BDSC	BDSC_41680
<i>UAS-AstC-RNAi</i>	BDSC	BDSC_25868
<i>UAS-CCHa1-RNAi</i>	BDSC	BDSC_57562
<i>UAS-CCHa2-RNAi</i>	BDSC	BDSC_57183
<i>UAS-Dh31-RNAi</i>	BDSC	BDSC_41957
<i>UAS-NPF-RNAi</i>	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center (VDRC ; Vienna, Austria)	VDRC ID: 108772



### 1-2-2. 乳酸菌サンプルの調製

LP2227 は雪印メグミルク株式会社 (Tokyo, Japan) から入手した。LP2227 は Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) 培地 (BD Biosciences, CA, USA) を使用し、37°C で 16 時間培養した。培養後に培養液を遠心分離 (7,000 × g, 20 分, 4°C) することで回収した菌体ペレットは、滅菌生理食塩水 (0.9% NaCl) に懸濁して再度遠心分離する工程を 2 回繰り返し、培地成分を除去した。次いで、菌体ペレットをトレハロース溶液に懸濁し、培養に用いた培地量の 10 分の 1 量に濃縮した (トレハロース終濃度 12.5%)。得られた菌体懸濁液は 4°C で 2~5 時間インキュベートし、液体窒素で急速凍結した後、実験に使用するまで -80°C で保存した。この菌体懸濁液の生菌数は  $5.2 \times 10^{10}$  cfu/mL であった。

LP2227 菌体の加熱処理サンプルを調製するため、LP2227 菌体懸濁液を 65°C で 1 時間インキュベート (HB-80 : TAITEC Co., Saitama, Japan)、または 121°C で 15 分オートクレーブ (MLS-3751 : PHC Corporation, Tokyo, Japan) した。加熱処理後の生菌数は、それぞれ <3,000 cfu/mL (65°C、1 時間) と <100 cfu/mL (121°C、15 分) であった。

また、次の方法で LP2227 菌体の破碎サンプルを調製した。培養後に遠心回収し、滅菌生理食塩水を用いた洗浄工程により培地成分の除去をした菌体ペレットを、トレハロース溶液に懸濁せずに凍結乾燥をした。凍結乾燥して得た菌体 60.3 mg を 3 mL の滅菌超純水に懸濁し、5.0 mL 容量のビーズショッカー破碎用チューブ (TOMY SEIKO Co., Tokyo, Japan, Cat#TM-657) に 0.1 mm 径のガラスビーズ 2 g とともに入れた。ビーズ式細胞破碎装置 (MS-100R, TOMY SEIKO Co., Tokyo, Japan) を用い、4,200 rpm で 10 秒破碎する工程を 30 秒のインターバル間隔で 12 回繰り返して菌体を破碎した。破碎後、細胞ストレーナー (メッシュサイズ 40 μm, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いてビーズを取り除き、菌体破碎液を回収した。ビーズは滅菌超純水で洗浄し、その洗浄液も菌体破碎液として回収して、再度凍結乾燥をした。

### 1-2-3. 摂食量の測定

摂食量の測定は、既報の条件を一部改変して実施した (Shell et al., 2018; Q. Wu et al., 2020)。具体的には以下の通り測定した。睡眠測定に供する際のコントロール食または LP2227 菌体を含む試験食に青色色素 (1% w/v, Blue No. 1, Fujifilm Wako Pure Chemicals Corporation, Osaka, Japan) を混ぜ、それぞれ給餌用の容器 (10 μL tip, Molecular BioProducts, CA, USA, Cat# 3500) に充填した。50 mL 容量のコニカルチューブ (Greiner, Kremsmünster, Austria, Cat# 227261) の蓋に穴を開け、その穴に餌を充填した給餌カップを挿入した。10 匹のハエをコニカルチューブに入れ、餌がセットされた蓋を閉めて 3 時間摂食させた。その後ハエを回収し、1 mL の超純水中で磨り潰して体内の色素を溶出した。また、別の 1 mL の超純水でハエを回収後のコニカルチューブ内壁を洗い、内壁に排泄された糞中の色素を溶出した。これら色素溶出液を等量混合し、分光光度計 (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用い 630

nm の吸光度を測定した。

#### 1-2-4. 抗生物質投与

ショウジョウバエ飼育用の餌に、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、エリスロマイシン（いずれも Fujifilm Wako Pure Chemicals Corporation, Osaka, Japan, Cat# 205-08591, Cat# 016-23301, Cat# 117-00341, Cat# 057-07151）をそれぞれ 50 µg/mL、50 µg/mL、50 µg/mL、15 µg/mL となるよう添加した。羽化後に回収したハエを、この抗生物質を添加した餌で 4 日間飼育した。4 日目に体内の微生物数を定量した。

#### 1-2-5. ショウジョウバエ体内の微生物数の定量

ハエを 70%エタノールに 15 秒浸して体表面上の微生物を除去した後、滅菌したリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で 2 回、15 秒ずつ濯いだ。滅菌したペッスルを用い、ハエ 3 匹を 100 µL PBS 中で破碎した。破碎液を適宜希釈して MRS 寒天培地に塗布し、嫌気、好気条件それぞれで 37°C で 3 日間培養し、菌数を測定した。なお、嫌気条件は AnaeroPack-Anaero（Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan）を使用して生成した。

#### 1-2-6. グラム染色

LP2227 の懸濁液および破碎液を、スライドガラスに塗布した後、メタノールで固定した。一次染色にはビクトリアブルーを、脱色にはピクリン酸含有エタノールを、対比染色にはフクシンを使用した（いずれも Muto Pure Chemicals Co., Ltd. Tokyo, Japan）。

#### 1-2-7. 睡眠測定

ショウジョウバエの睡眠測定には、*Drosophila activity monitoring system* (DAMs: Trikinetics, MA, USA) を使用した。羽化後 4 日目の処女メスのショウジョウバエを、コントロール餌または試験餌を一端に詰めた 5×65 mm のガラスチューブに入れた後、もう一端に綿の栓をした。このガラスチューブを DAMs にセットした。DAMs を 25±1°C、12 時間 L/D（8～20 時を明期、20～翌 8 時を暗期）に設定したインキュベータに入れ、一晩新しい環境で馴化した後、翌朝 8 時からデータ収集を開始した。

睡眠測定時の餌組成を示す。破碎処理をしていない LP2227 を用いた試験時のコントロール餌は、トレハロース（6.25%）、スクロース（5.0%）、寒天（1.0%）とした。LP2227 を含有する試験餌は、LP2227 菌体懸濁液（トレハロース終濃度 12.5%）を、スクロース 10.0%とバクタアガー 2.0%を含む溶液と等量混合することで、トレハロース（6.25%）、スクロース（5.0%）、寒天（1.0%）、LP2227（約 1.0%、凍結乾燥重量として）に調製した。なお、LP2227 菌体懸濁液は、トレハロース溶液と混合する前に菌体ペレットの一部を回収して凍結乾燥後の重量を測定することで、培養液を 1/10 濃縮した場合に得られる菌体の凍結乾燥重量が約 20 mg/mL であることを確認している。

破砕処理をした LP2227 を用いた試験の際のコントロール餌の組成はスクロース (5.0%)、寒天 (1.0%) とし、試験餌には破砕した LP2227 (終濃度として 10.1 mg/mL) または破砕液を遠心分離して得られた上清画分 (終濃度として 5.4 mg/mL)、沈殿画分 (終濃度として 3.0 mg/mL) をそれぞれコントロール餌に添加したものをを用いた。

また、*GeneSwitch* システムを利用して遺伝子発現を調節する際には、RU486 (Mifepristone, Sigma-Aldrich, MO, USA) を終濃度 500  $\mu$ M となるよう餌に添加した。

ショウジョウバエの行動量のデータは 1 分間隔で取得し、5 分以上不活動であった場合に“睡眠”と判定した。行動パラメーターは全て統計解析ソフト R の Rethomics パッケージ (Geissmann et al., 2019) を使用して算出した。ショウジョウバエは多相性の睡眠をとる。ここでは、その一回の睡眠のことを睡眠バウト (sleep bout) と呼ぶ。睡眠量 (sleep amount) は、評価対象期間内の全ての睡眠バウトの時間を合計することで算出した。睡眠潜時 (sleep latency) は夜間の開始に相当する Zeitgeber time 12 (ZT12、ZT0-12: 明期、ZT12-24: 暗期) から最初の睡眠バウトが検出されるまでの時間とした。睡眠バウト長 (sleep bout length) には、評価対象時間内に検出された睡眠バウトの長さの中央値を使用した。睡眠バウト数 (number of sleep bouts) は、評価対象時間内に検出された睡眠バウトの回数とした。また、評価対象時間内にハエが赤外線ビームを横切った回数を活動量 (activity counts) とし、活動指数 (activity index) は、昼または夜間の活動量を、それぞれの評価対象時間における覚醒時間で割ることによって算出した。

#### 1-2-8. リアルタイム PCR

*GAL4/UAS* システム、および *GeneSwitch* システムにより目的の遺伝子をノックダウンできているか検証するため、RNA 抽出キット (RNAiso Plus, Takara Bio, Shiga, Japan) を使用してハエからトータル RNA を抽出した。5 匹のハエを 500  $\mu$ L の RNAiso Plus 溶液に入れ、ペッスルで磨り潰し、以降の作業はキットのプロトコルに従い実施した。抽出した RNA は、100  $\mu$ L の RNase-free water に溶解した。

トータル RNA から ReverTra Ace qPCR RT master mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。リアルタイム PCR 反応には Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いた。また、以下のプライマーを使用した。全ての操作をキットのプロトコルに従った。*Neuropeptide F (NPF)* のプライマーには FlyPrimerBank (Hu et al., 2013) に掲載されている配列情報を用いた。*Ribosomal protein 49 (rp49)* を内部標準とした。

*rp49*-f; 5'-AGTATCTGATGCCCAACATCG-3'

*rp49*-r; 5'-CAATCTCCTTGCGCTTCTTG-3'

*AstA*-f; 5'-TTGCACCGCGTATCCTGTCT-3'

*AstA*-r; 5'-ATGCTATGGGCACGGGATGG-3'

*CCHal*-f; 5'-CCCAAATCGATGCCGACAATG-3'

*CCHal-r*; 5'-GCAATTGGCCTCGGAATGTT-3'

*Mip-f*; 5'-CTCTAGCACCTAGTCTCCACG-3'

*Mip-r*; 5'-GTTGCCATTTGGTATGTATTGATGT-3'

*NPF-f*; 5'-TCCGCGAAAGAACGATGTCA-3'

*NPF-r*; 5'-CTCCTCATTAACCGCGAGC-3'

#### 1-2-9. RNA シークエンシング解析

RNA シークエンスに供するための腸の RNA は、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。通常通りの方法で 3 日目まで睡眠を評価して投与した菌の効果が現れていることを確認した上で、睡眠実験を開始してから 4 日目の ZT12 にハエを測定チューブごと DAMs から取り出し、各群 20 匹から腸(クロップの下部からマルピーギ管の上部まで)を摘出した。測定チューブは氷上に置き、作業は ZT12-14 の間に行った。摘出した腸は直ちに 2-メルカプトエタノールを添加した Buffer RLT (RNeasy mini kit 付属)に入れた。RNA 抽出は独立して 3 回行い、得られた RNA 溶液を等量混合して測定に供した。

RNA シークエンスライブラリの構築とシークエンシングは Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea) に委託し、Illumina NovaSeq6000 system で実施した。読み取ったフラグメントはキイロショウジョウバエのゲノムデータ (NCBI GCF\_000001215.4\_Release\_6\_plus\_ISO1\_MT) にマッピングし、StringTie (Pertea et al., 2015)を用いて再構築した。RNA 発現レベルの比較には、edgeR (Robinson et al., 2010)を用いて負の二項分布の正確検定を適用した。

対照群と LP2227 投与群の両方で検出できた遺伝子について、発現量が 2 倍以上で、かつ  $p < 0.05$  のものを発現量が異なる遺伝子 (Differential expressed gene, DEG) とした。またどちらか一方の群でのみ検出できた遺伝子も DEG に含めた。これら DEG について、g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>)を用いて Gene Ontology 解析を実施した。

#### 1-2-10. 統計解析

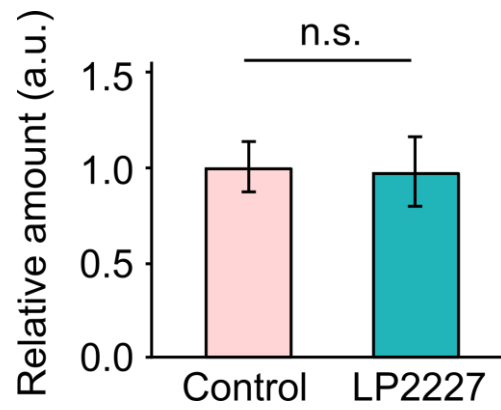
統計解析には R を用いた。サンプルサイズの推定には G\*Power software (Faul et al., 2007) を使用した。全てのデータについて Shapiro-Wilk test で正規性を確認し、適した解析手法を適用した。Welch's *t*-test または Wilcoxon-Mann-Whitney test を繰り返す際には Bonferroni 法で  $p$  値を補正した。有意水準は 0.05 とした。箱ひげ図の箱では中央値と四分位範囲を、ひげでは外れ値を除いた最大および最少のデータポイントを表した。睡眠促進効果の大きさを評価するために、次式を使用して Wilcoxon-Mann-Whitney test で得られた  $z$  値から効果量  $r$  を算出した： $r = z / \sqrt{n}$ 。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. LP2227 の経口投与がハエの睡眠に及ぼす影響

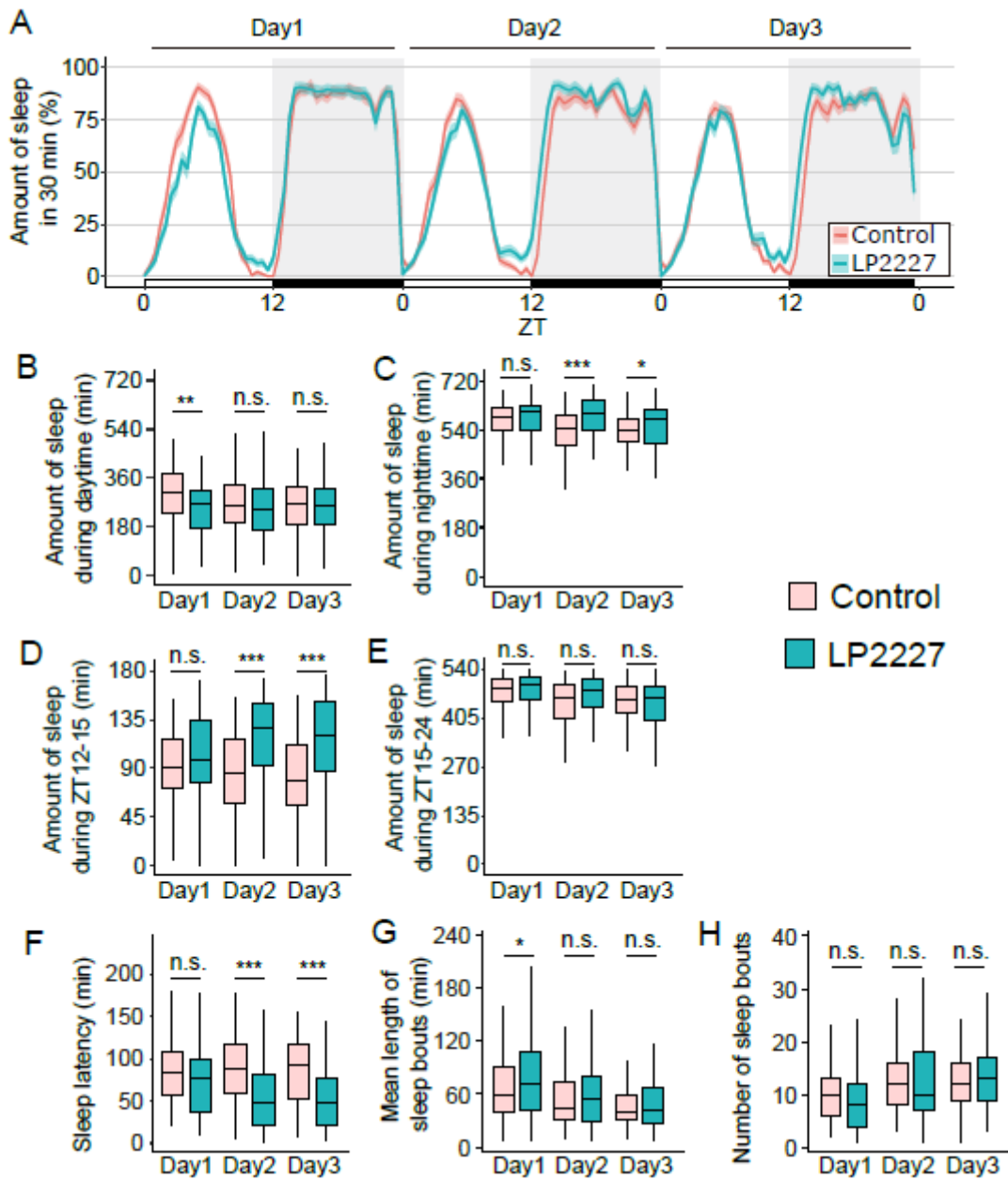
LP2227 をハエに経口投与して睡眠への影響を評価するにあたり、まず LP2227 を含む餌に対する嗜好性を調べた。睡眠行動を評価する際の餌（5%スクロース、1%寒天）と、そこに LP2227 を約 1 重量%混ぜた餌をそれぞれハエに供与したところ、両餌に対する摂食量に有意な差は認められなかった（**Figure 1-1**）。そのため、ハエの両餌に対する嗜好性に差はないことを確認できた。そこで、LP2227 を含む餌と、含まない餌をショウジョウバエに与えてハエの睡眠パターンを比較したところ、両群のハエとも 12 時間毎の明暗周期下での睡眠として典型的な、明期と暗期（主観的な日中と夜間）のそれぞれで眠る睡眠パターンを示した（**Figure 1-2A**）（Andretic & Shaw, 2005; Hendricks et al., 2000）。睡眠に関するパラメーターを定量的に評価したところ、日中の睡眠量は LP2227 の投与により測定 1 日目は有意に減少し、2 日目以降は同様の減少は認められなかった（**Figure 1-2B**）。対照的に、LP2227 の投与による夜間の睡眠量の変化は 1 日目では認められず、2, 3 日目で有意な増加を示した（**Figure 1-2C**）。3 日目の睡眠パターンに着目すると夜間開始時に顕著に睡眠量が増加していることが見て取れた（**Figure 1-2A**）。そこで夜間開始時の 3 時間、ZT12-15 の睡眠量を評価したところ LP2227 投与群で有意に増加していた（**Figure 1-2D**）。一方、それ以降の夜間の時間帯である ZT15-24 では睡眠量に有意な差は認められなかった（**Figure 1-2E**）。夜間開始時の睡眠量が増加したことから入眠潜時を評価したところ、入眠潜時も LP2227 摂取群で有意に短縮していた（**Figure 1-2F**）。睡眠バウトの長さや回数については、3 日間を通して LP2227 摂取群と対照群との間に差は認められなかった（**Figure 1-2G and H**）。なお、変化が顕著だった測定 3 日目 ZT12-15 の睡眠量の増加と入眠潜時の短縮の 2 つの指標については用量依存性も認められた（**Figure 1-3**）。さらに、他の遺伝的背景を有する野生型系統のハエ（*Amherst\_3*）でも LP2227 による両指標の変化を確認できたことから（**Figure 1-4**）、測定 3 日目における ZT12-15 の睡眠量の増加と入眠潜時の短縮を LP2227 による睡眠促進作用の典型的な表現型と捉えて、以降の分析の主な指標として使用することとした。

なお、摂食量の評価と *Amherst\_3* に対する LP2227 の作用は著者が、その他については村上氏と著者が実験、解析ともに共同で実施した。



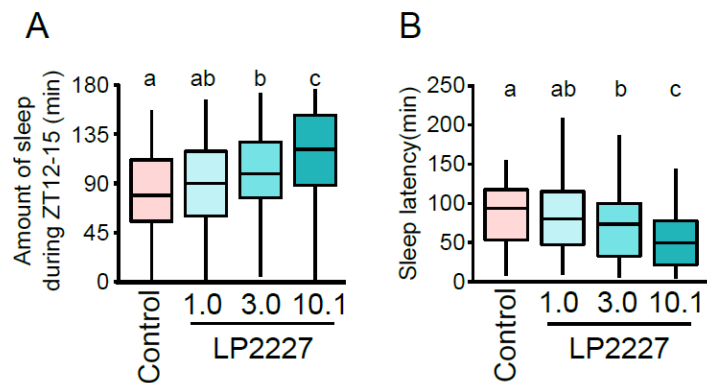
**Figure 1-1. Flies fed the LP2227 food as well as the control food.**

The amount of food consumed for 3 h in response to the control food and LP2227 food was measured. Bars represent mean  $\pm$  SD.  $n = 5$  for control group,  $n = 6$  for LP2227 group. Student's  $t$ -test was applied for statistical analysis. n.s.; not significant.



**Figure 1-2. Oral administration of LP2227 increased sleep at the onset of night-time and decreased sleep latency.**

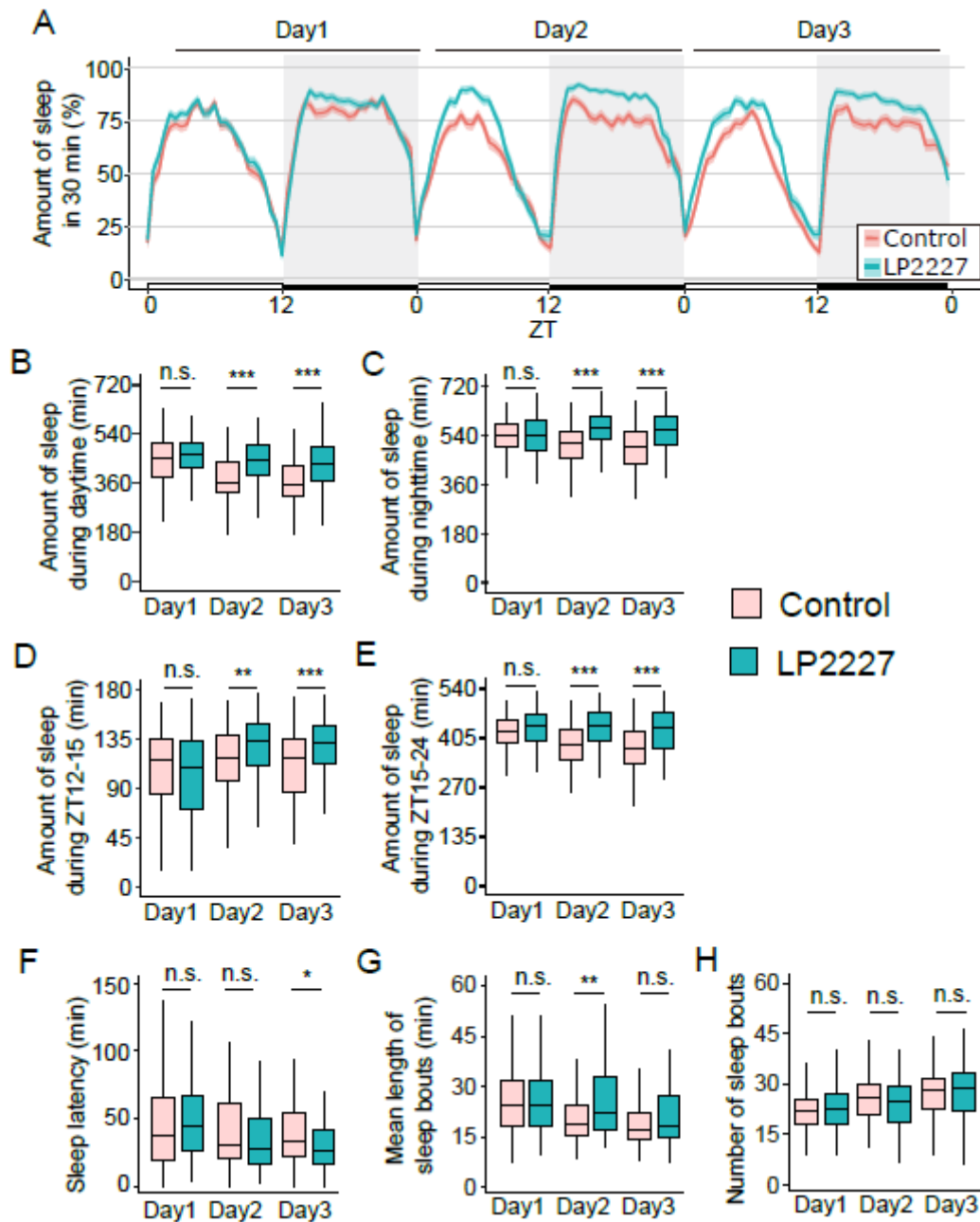
(A) Sleep patterns of flies fed control food (red) or LP2227 food (green). Sleep traces are presented as mean  $\pm$  SEM. (B–H) Amount of sleep during daytime (ZT0–12); (C) amount of sleep during night-time (ZT12–24), amount of sleep at specific timing; (D) ZT12–15 and (E) ZT15–24. (F) Sleep latency, (G) sleep bout length, and (H) number of sleep bouts during night-time.  $n = 96$  for each group. Wilcoxon-Mann-Whitney test was used for statistical analysis, adjusted with the Bonferroni correction.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ , n.s.; not significant.



**Figure 1-3. The sleep-promoting effects of LP2227 are dose-dependent.**

Flies were treated with different concentrations of LP2227 (1.0, 3.0, and 10.1 mg/mL). The time period of interest was set at ZT12-15 on day 3. (A) Amount of sleep (Kendall rank correlation coefficient:  $\tau = 0.22, p = 8.58e-9$ ). (B) Sleep latency (Kendall rank correlation coefficient:  $\tau = -0.22, p = 4.59e-9$ ). The concentration of LP2227 is shown below each graph.  $n = 96$  in each group. Dwass-Steele-Critchlow-Friger test was applied for multiple comparisons. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ , and different letters indicate statistical differences between groups.





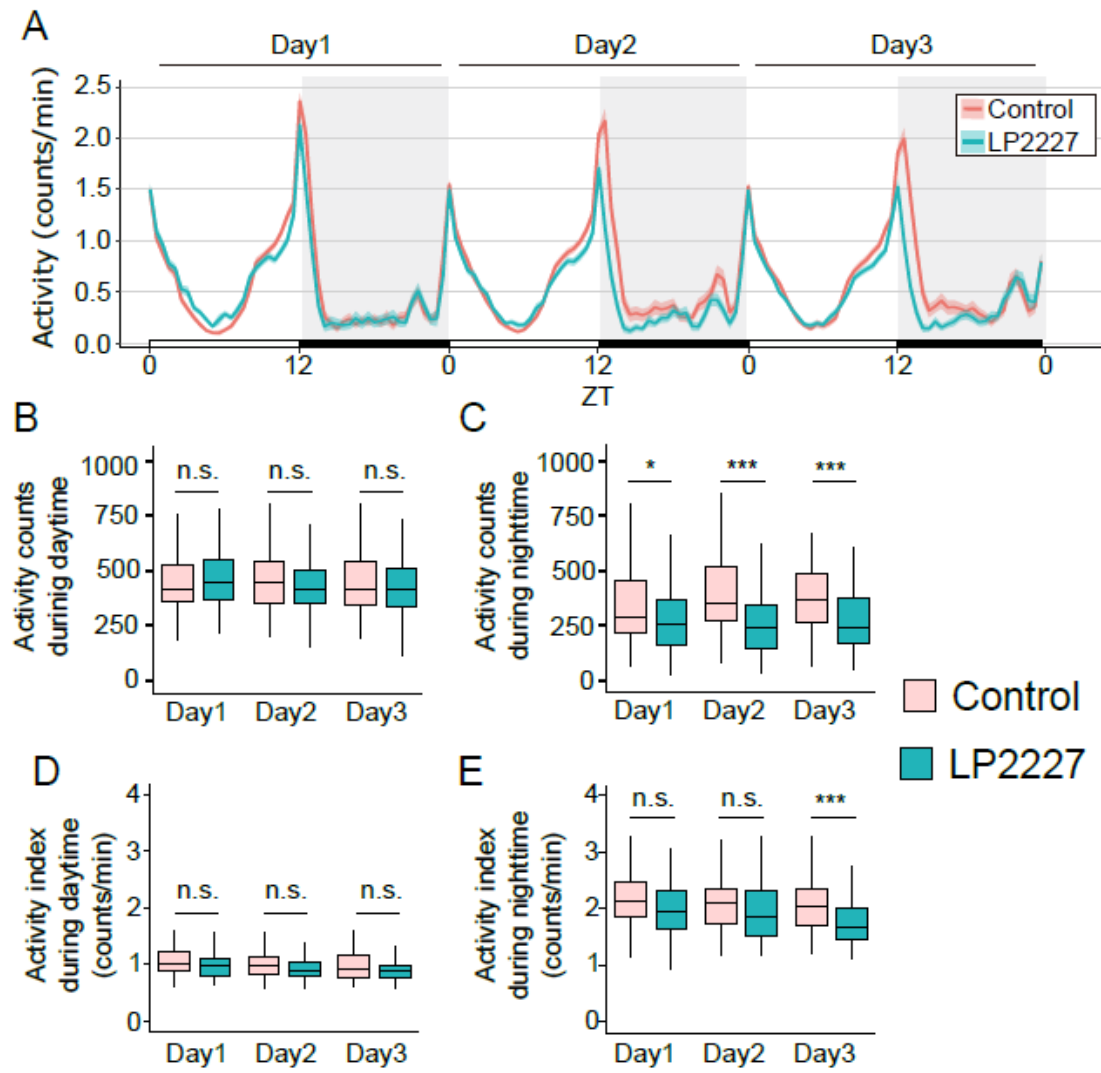
**Figure 1-4. The sleep-promoting effects of LP2227 were confirmed in another wild-type strain, the genetic background of which differed from that of *Canton-S*<sup>2202u</sup>.**

(A) Sleep patterns of female Amherst-3 fed control food (red) or LP2227 food (green). Sleep traces are presented as mean  $\pm$  SEM. (B) Amount of sleep during daytime (ZT0-12), (C) amount of sleep during night-time (ZT12-15), amount of sleep at specific timing; (D) ZT12-15 and (E) ZT15-24, and (F) sleep latency.  $n = 96$  for each group. The Welch's t-test was applied for (B), and the Wilcoxon-Mann-Whitney test was applied for the others.  $p$ -values were adjusted by Bonferroni correction. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s.; not significant.

### 1-3-2. LP2227 の経口投与がハエの覚醒行動に及ぼす影響

睡眠と覚醒は表裏一体である。一般的に、睡眠が促進されれば覚醒が抑制されるが、この関係が表現型に常に現れるとは限らない。例えばショウジョウバエにおいて、Fernandez-Chiappe らは睡眠の増加は伴わない活動レベルの低下、Potdar and Sheeba は活動レベルの低下を伴わない睡眠の増加を報告している (Fernandez-Chiappe et al., 2020; Potdar & Sheeba, 2018)。そこで、私は LP2227 がハエの覚醒時の行動に及ぼす影響を調べた。LP2227 を投与した 3 日間の活動パターンを見ると、LP2227 を摂食したハエでは夜間に行動量が減少していることが分かる (**Figure 1-5A**)。日中と夜間に分けて行動量を定量化したところ、日中の行動量には有意な変化は認められないが、夜間の行動量は LP2227 により有意に減少していた (**Figure 1-5B and C**)。行動量の減少は、運動機能の低下に起因する可能性がある。そこで、LP2227 が運動機構を棄損していないか調べるために、覚醒時間当たりの行動量である活動指数 (activity index) を算出した。その結果、ショウジョウバエの主な活動時間帯である日中の活動指数に両群間で差は認められなかった (**Figure 1-5D**)。一方、3 日目の夜間の活動指数は LP2227 の投与により有意に低下した (**Figure 1-5E**)。LP2227 を投与しても日中の活動は正常で、睡眠が促進される夜間には覚醒レベルが低下した。つまり LP2227 は運動機能を棄損しているのではなく、睡眠を促進していると考えられた。

本項の実験は村上氏と著者が共同で実施し、解析は著者が行った。



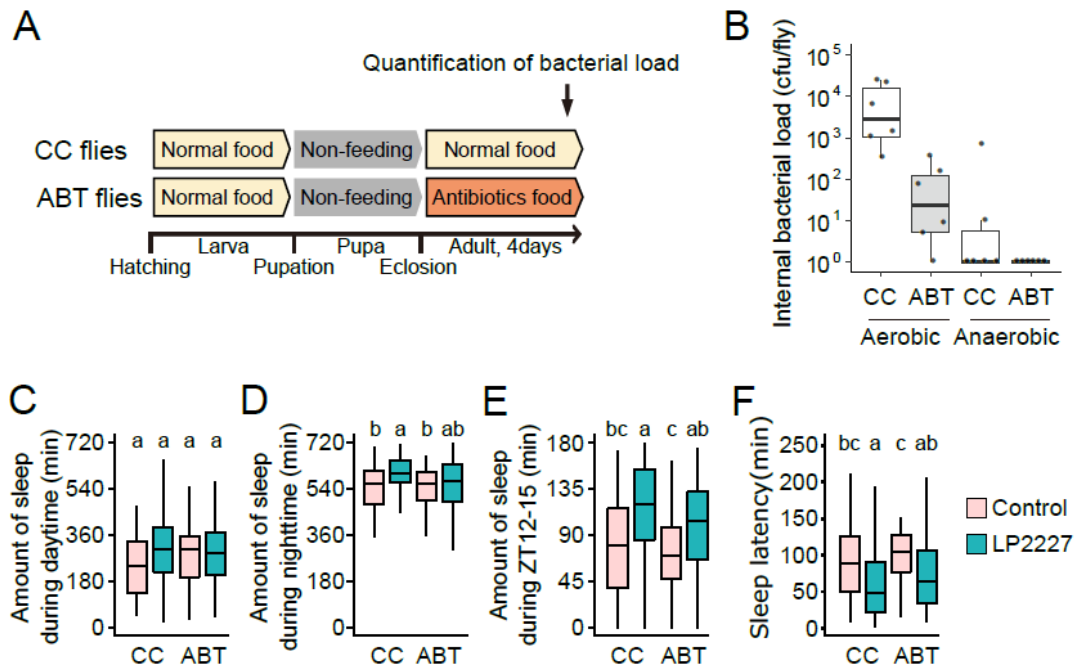
**Figure 1-5. Wakefulness was altered in flies fed LP2227**

(A) Activity patterns of flies fed control food (red) or LP2227 food (green). (B and C) Activity counts during daytime (ZT0-12), and (C) night-time (ZT12-24). (D and E) Activity index during daytime, and (E) night-time.  $n = 96$  for each group. Wilcoxon-Mann-Whitney test was used for statistical analysis, adjusted with the Bonferroni correction.  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ , n.s.; not significant.

### 1-3-3. ハエの既存の腸内細菌叢は LP2227 の睡眠促進作用の発現に影響しない

LP2227 の睡眠促進効果に、ハエの既存の腸内細菌が関与しているか調べるため、抗生物質を投与して既存の腸内細菌を除去したハエを作成した (**Figure 1-6A**)。好氣的条件下で増殖する菌の数を抗生物質を投与したハエ (antibiotic-treated flies, ABT flies) と通常の条件下で飼育した対照群のハエ (control conventional flies, CC flies) とで比較すると、抗生物質の投与により約 1/100 まで低減していた (**Figure 1-6B**)。また、嫌氣的条件下でもハエ体内の菌数を測定したところ、抗生物質の投与により微生物は検出限界以下まで減少していた (**Figure 1-6B**)。 *L. plantarum* を含む乳酸菌の多くは嫌氣的条件下で増殖できることから、抗生物質処理により大部分の乳酸菌は除去できたと考えられた。この抗生物質を投与したハエと、通常飼育したハエの睡眠行動を比較すると、日中の睡眠量、夜間の睡眠量、ZT12-15 の睡眠量、睡眠潜時のいずれにおいても有意な差は認められなかった (**Figure 1-6C - F**)。一方、LP2227 の投与により、抗生物質投与ハエと通常飼育ハエの双方において睡眠促進作用の指標とした ZT12-15 の睡眠量の増加と睡眠潜時の短縮が確認された (**Figure 1-6E and F**)。体内の菌の状態の異なるハエの睡眠量 (ZT12-15) と入眠潜時に対する LP2227 投与が及ぼす効果の大きさ (効果量) が類似していたことも踏まえると (**Figure 1-6E and F**, sleep amount effect size ( $r$ ) = 0.35 and 0.29, and sleep latency effect size ( $r$ ) = 0.31 and 0.34, respectively)、ハエの既存の腸内細菌叢は LP2227 の睡眠促進作用に重要ではないことが示唆された。

本項の実験において腸内細菌を除去したハエの作成は村上氏が、そのハエにおける LP2227 の影響の確認と結果の解釈は著者が行った。



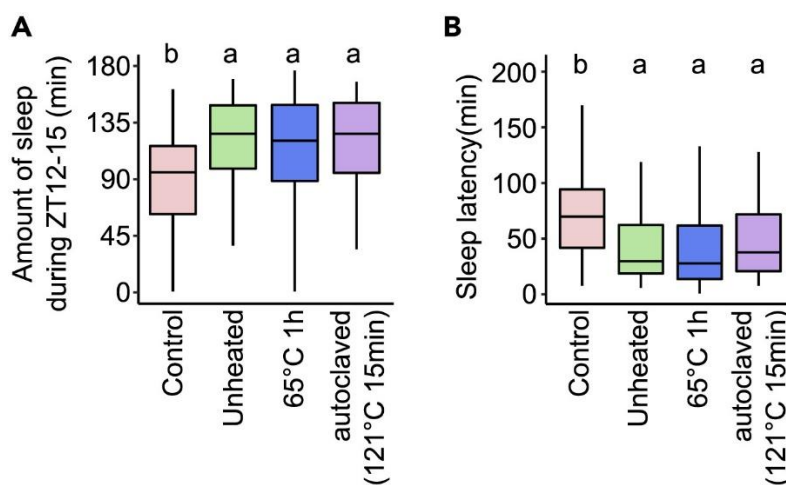
**Figure 1-6. Elimination of gut microbes did not alter the sleep effects of LP2227.**

Flies fed control conventional food (CC flies) or antibiotic-containing food (ABT flies) were tested for sleep. (A) Schematic diagram illustrating the experimental flow. (B) Internal bacterial load in CC and ABT flies ( $n = 6$ ). (C–F) Amount of sleep during daytime on day 3, (D) amount of sleep during night-time on day 3, (E) amount of sleep during ZT12-15 on day 3, and (F) sleep latency on day 3. (C–E)  $n \geq 58$  for each group. The Steel-Dwass-Critchlow-Fligner method was used for statistical analysis. Different letters indicate statistical differences between groups ( $p < 0.05$ ).

#### 1-3-4. タンパク質を加熱変性させた LP2227 も睡眠促進効果を示す

LP2227 が生菌であることが睡眠促進効果に必要なか確かめるため、加熱殺菌した LP2227 をハエに投与して睡眠への影響を調べた。LP2227 を、65°C で 1 時間または 121°C で 15 分間オートクレーブしてハエに投与した。LP2227 はどちらの加熱条件であっても、測定 3 日目 ZT12-15 の睡眠量を有意に増加させた (Figure 1-7A)。同様に、入眠潜時の有意な短縮も両加熱条件ともに認められた (Figure 1-7B)。これら結果は、LP2227 が睡眠促進効果を発現するために生菌である必要はないことを示している。さらに、タンパク質が加熱変性するようなオートクレーブ処理をした LP2227 でもハエの睡眠を促進させたことから、LP2227 が保持する熱安定性の高い成分が睡眠促進効果の有効成分であることが示された。

本項において菌体の加熱条件は著者が主導で決定し、加熱菌体の作成は村上氏が実施、ハエにおける加熱菌体の効果検証自体は再現性確認のために 3 回実施した試験のうち 2 回を著者が、1 回を村上氏が実施した。



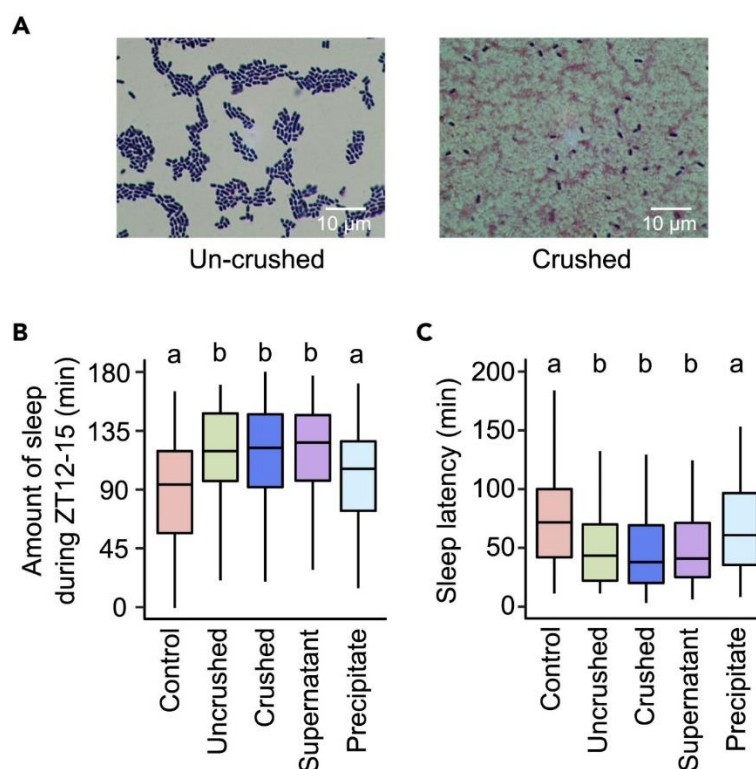
**Figure 1-7. Heat denaturation of LP2227 did not alter its effects on fly sleep.**

(A and B) Amount of sleep during ZT12-15 on day 3, and (B) sleep latency on day 3 of flies fed control (red), unheated LP2227 (green), heat-treated LP2227 (65°C for 1 h, blue), or autoclaved LP2227 (121°C for 15 min, purple).  $n = 95-96$  for each group. The Steel-Dwass-Critchlow-Fligner method was used for statistical analysis. Different letters indicate statistical differences between groups ( $p < 0.05$ ).

### 1-3-5. LP2227 菌体の破碎上清に睡眠促進効果を発現する有効成分が存在する

LP2227 が保持する成分のうち、睡眠促進作用を発現する成分を特定するため、菌体を破碎し、細胞内・細胞膜成分が豊富に含まれる上清画分（破碎上清画分）と、細胞壁成分が豊富に含まれる沈殿画分（破碎沈殿画分）に分離した。菌体破碎前後のサンプルをグラム染色し、菌体を十分に破碎できていることを確認した（**Figure 1-8A**）。そこで、非破碎菌体、破碎菌体、破碎上清画分、破碎沈殿画分をそれぞれハエに投与して睡眠行動を評価した。その結果、破碎沈殿画分を除いて、3日目 ZT12-15 の睡眠量は有意に増加した（**Figure 1-8B**）。同様に、入眠潜時も破碎沈殿画分を除く、非破碎、破碎菌体、破碎上清画分の投与により有意に短縮した（**Figure 1-8C**）。これらの結果は、LP2227 の細胞内・細胞膜成分に睡眠促進効果の有効成分が含まれる可能性を示している。

本項における菌体が破碎できていることの確認は村上氏が、その他は著者が実施した。



**Figure 1-8. Supernatant of crushed LP2227 promoted sleep similar to that induced by intact LP2227.**

(A) Gram staining of the LP2227 samples before and after crushing. Violet cells represent uncrushed cells. (B and C) Amount of sleep during ZT12-15 on day 3 and (C) sleep latency on day 3.  $n = 94-96$  for each group. The Steel-Dwass-Critchlow-Fligner method was used for statistical analysis. Different letters indicate statistical differences between groups ( $p < 0.05$ ).

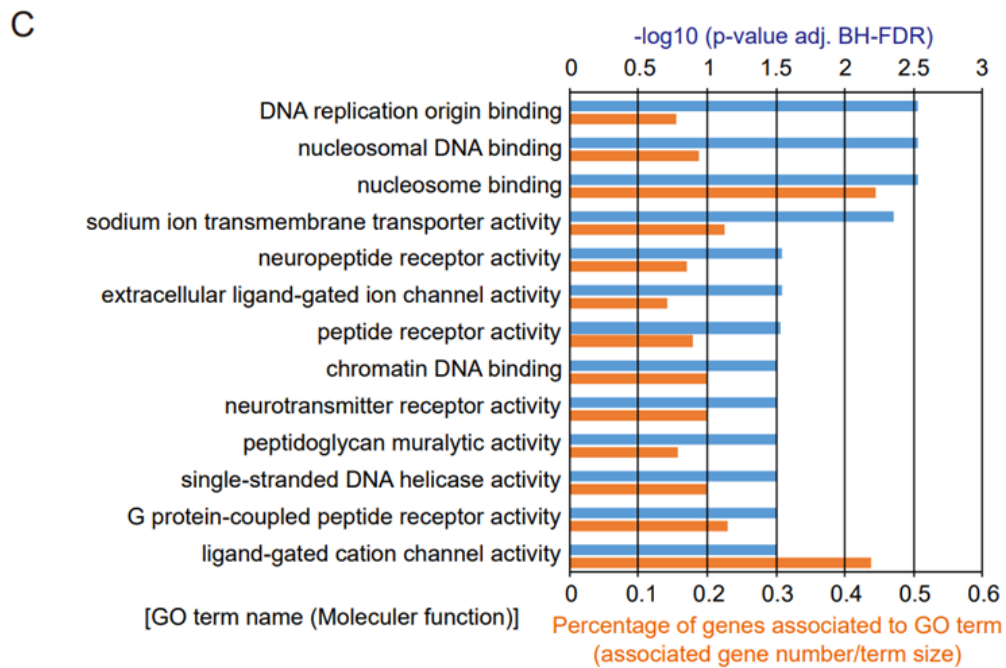
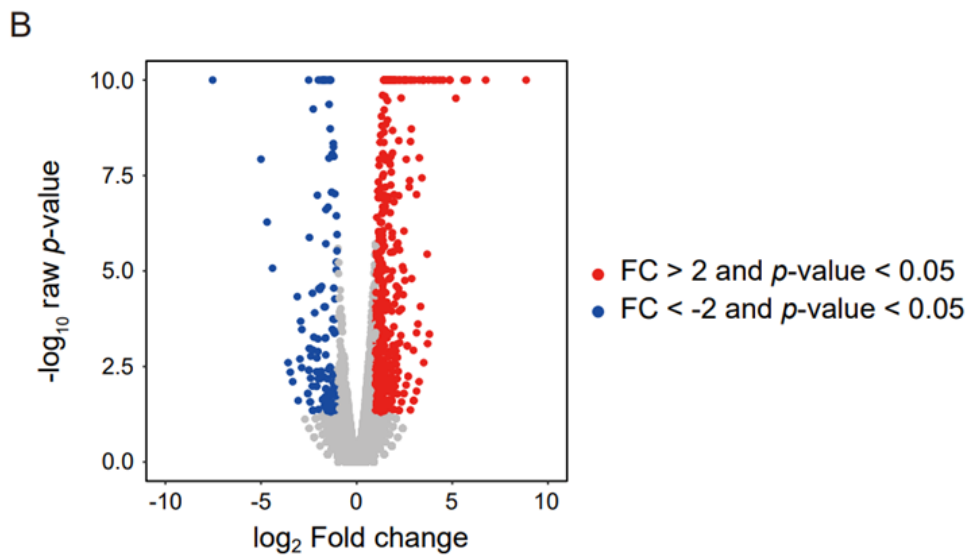
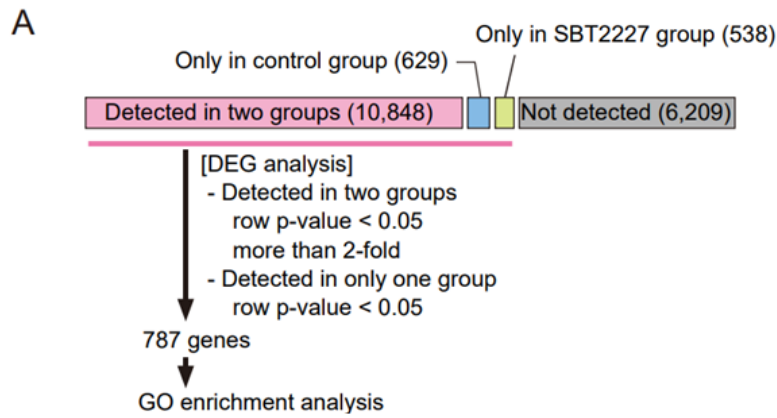
### 1-3-5. LP2227 の投与により遺伝子発現が変化した生物学的プロセス

腸には免疫応答細胞と腸内分泌細胞 (Enteroendocrine cell、EEC) が豊富に存在し、脳や腹部神経節と腸を繋ぐ神経回路がある。そのため、LP2227 に含まれる成分が消化吸収されて脳に直接作用する可能性はあるが、LP2227 の成分が腸に作用し、腸で起こった変化が免疫、内分泌、または神経回路を介して脳に影響を与える可能性もある。そこで、RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析により、LP2227 の投与による腸の遺伝子発現変化を調べた。

LP2227 による睡眠促進効果が主に表れる時間帯のうち ZT12-14 において、ハエの前腸、中腸、および後腸を含む腸を摘出し、その腸から抽出した mRNA を RNA シークエンスに供した。LP2227 群及びコントロール群の両群で発現を確認できた遺伝子の数は 10,848 遺伝子であった (**Figure 1-9A and B**)。そこに、どちらか一方の群でのみ発現を確認できた 1,167 遺伝子を加えた計 12,015 遺伝子について発現が変動している遺伝子を解析対象とし、787 遺伝子を発現が変動している遺伝子 (DEGs、Differentially expressed genes) とした (**Figure 1-9A**)。なお、DEGs のうち、LP2227 投与群で発現量が 2 倍以上または LP2227 群でのみ発現が発見された遺伝子の数は 555 で、コントロール群で発現量が 2 倍以上またはコントロール群でのみ発現が発見された遺伝子数は 232 であった。次に、これら 787 遺伝子がどのような分子機能に偏っているか特定するため、遺伝子オントロジー解析 (Gene Ontology (GO) enrichment analysis) をした。その結果、ヌクレオソーム/DNA 結合 (nucleosome/DNA binding)、ナトリウムイオン輸送体活性 (sodium ion transporter activity)、神経ペプチド受容体活性 (neuropeptide receptor activity)、およびペプチドグリカンの分解 (peptidoglycan muralytic activity) を含む、複数の GO のカテゴリーが発見された (**Figure 1-9B**)。CCHa1 などの腸内分泌細胞から分泌されるペプチドホルモンが脳の神経細胞に作用し、覚醒などのハエの行動を調節することが示されている (Titos & Rogulja, 2020)。そこで、腸内分泌細胞が産生するペプチドホルモンが LP2227 の睡眠促進効果を媒介する可能性があるという仮説を立て、これらの検出できた GO カテゴリーの中で神経ペプチド受容体活性に焦点を当てて研究を進めた。

本項は著者が実施した。





**Figure 1-9. RNA-seq-based transcriptome analysis indicated multiple biological pathways altered by the administration of LP2227.**

(A) A flow chart of transcriptome analysis is shown. (B) The 10,848 genes detected in both groups of flies fed the control and LP2227 foods were plotted in a volcano plot. The expression level of the LP2227 group relative to that of the control group is shown on the x-axis, and its *p*-value is shown on the y-axis. Genes detected in only one group cannot be plotted because the axes are logarithmic. (C) Statistically significant GO terms in the category of “Molecular Function” are shown with *p* value and enrichment score. Enrichment score was calculated as (number of genes associated with the GO term)/(number of all genes in the GO term).

### 1-3-6. 神経ペプチド F (Neuropeptide F) が LP2227 の睡眠促進効果に必要

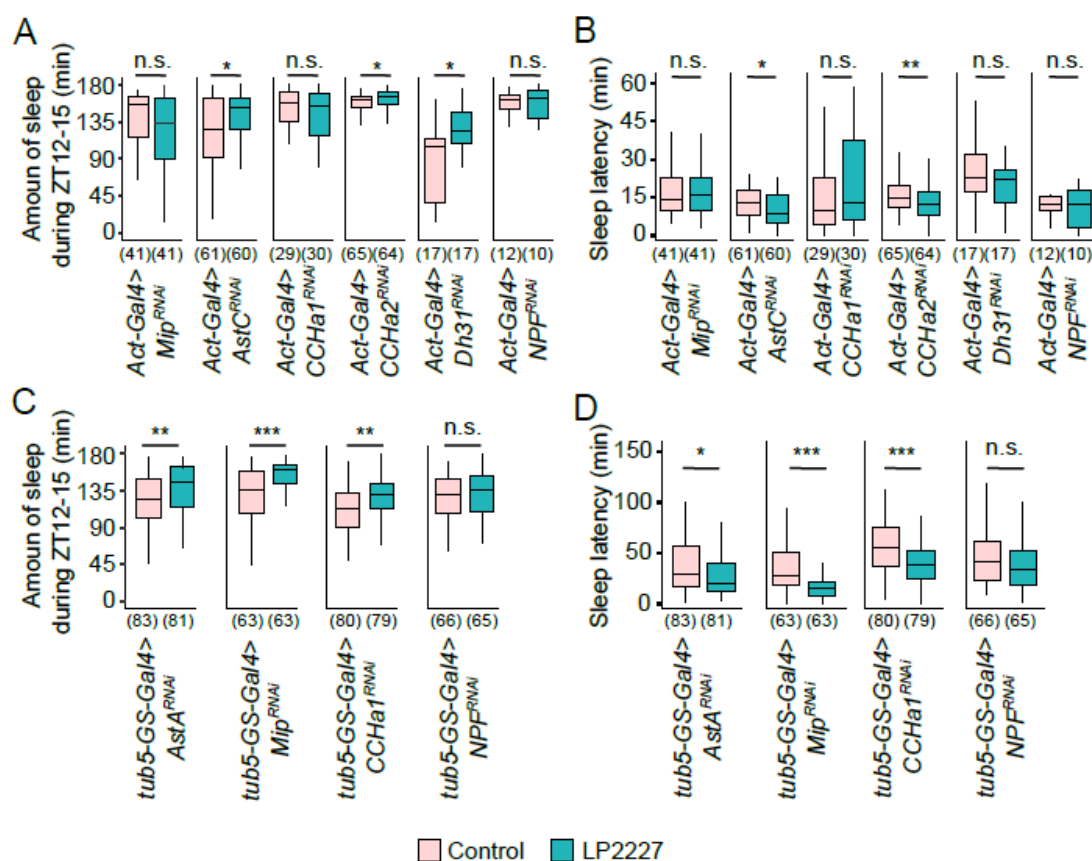
キイロショウジョウバエの EEC から分泌されるペプチドホルモンは 16 種類同定されている。これらの内、allatostatin A (AstA) と myoinhibiting peptide precursor (Mip)、allatostatin C (AstC)、CCHamide-1 (CCHa1)、CCHamide-2 (CCHa2)、diuretic hormone 31 (Dh31)、neuropeptide F (NPF) の 7 つは、*in situ* ハイブリダイゼーションまたは免疫染色により実際に発現していることが確認されている (Ji Chen et al., 2016)。また、これらホルモンは睡眠、覚醒、または概日リズムと関連していることも分かっている (Jiangtian Chen et al., 2016; Chung et al., 2017; Díaz et al., 2019; Fujiwara et al., 2018; He et al., 2013; Hermann et al., 2012; Kunst et al., 2014; Oh et al., 2014; Ren et al., 2015)。そこで私は、これら 7 つのペプチドホルモンについて LP2227 の睡眠促進作用への関与を評価した。

まず、*Act-Gal4<sup>25FOI</sup>* を各ペプチドホルモン遺伝子に対する RNAi 配列を有する系統と交配して得た、目的の遺伝子が恒常的にノックダウンされたハエに LP2227 を投与した。*Act-Gal4<sup>25FOI</sup> > AstA<sup>RNAi</sup>* は重度の致死性を示したため、評価することができなかった。睡眠測定 3 日目 ZT12-15 の睡眠量を定量的に比較したところ、次に示す系統は LP2227 を摂食することで睡眠量が有意に増加した：*Act-Gal4<sup>25FOI</sup> > AstC<sup>RNAi</sup>*、*Act-Gal4<sup>25FOI</sup> > CCHa2<sup>RNAi</sup>*、*Act-Gal4<sup>25FOI</sup> > Dh31<sup>RNAi</sup>* (**Figure 1-10A**)。対照的に、*Act-Gal4<sup>25FOI</sup> > Mip<sup>RNAi</sup>*、*Act-Gal4<sup>25FOI</sup> > CCHa1<sup>RNAi</sup>*、*Act-Gal4<sup>25FOI</sup> > NPF<sup>RNAi</sup>* は LP2227 を摂食しても睡眠量は増加しなかった (**Figure 1-10A**)。さらに、*AstC* または *CCHa2* をノックダウンした系統では LP2227 による入眠潜時の有意な短縮は認められたが、*Mip*、*CCHa1*、*Dh31*、*NPF* のノックダウン系統では認められなかった (**Figure 1-10B**)。使用した親系統全てにおいて、LP2227 による睡眠量の増加と入眠潜時の短縮を確認している (**Figure 1-11**)。これらの結果は、*Mip*、*CCHa1*、*NPF* が LP2227 の睡眠促進効果(睡眠量の増加と入眠潜時の短縮)が必要である可能性を示した。

前述したように *Act-Gal4<sup>25FOI</sup>* による *AstA* の恒常的ノックダウンはショウジョウバエの正常な発生を阻害した。そのため、*Mip*、*CCHa1*、*NPF* を恒常的にノックダウンしたハエについても発生段階の何らかの異常が LP2227 の睡眠促進効果の発現に影響した可能性がある。そこで、*AstA*、*Mip*、*CCHa1*、*NPF* について分子遺伝子学的な手法、GeneSwitch system (Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001)を用いて一時的に遺伝子発現を抑制した。これら遺伝子の発現を成虫期に一時的に抑制するため、*tub-GeneSwitch-Gal4* と各遺伝子の *UAS-RNAi* 系統のハエを掛け合わせて目的のハエを得た。作成したハエにプロモーター領域を活性化させる薬剤 RU486 を摂食させて RNAi を誘導すると、目的の遺伝子発現が抑制されることを確認した (**Figure 1-12**)。測定 3 日目 ZT12-15 の睡眠量は、*AstA*、*Mip*、*CCHa1* のそれぞれをノックダウンした系統で有意に増加したが、*NPF* ノックダウン系統では増加しなかった (**Figure 1-10C**)。加えて、入眠潜時の短縮も *NPF* ノックダウン系統でのみ認められなかった (**Figure 1-10D**)。なお、*tub-GeneSwitch-Gal4/UAS-NPF<sup>RNAi</sup>* に RU486 を含まない溶液を摂取させた対照群においては、*Canton-S<sup>2202u</sup>* に投与した時と同様に LP2227 による睡眠促進効果が現れることは確認できている (**Figure 1-13**)。これらの結果は、*NPF* が LP2227 の

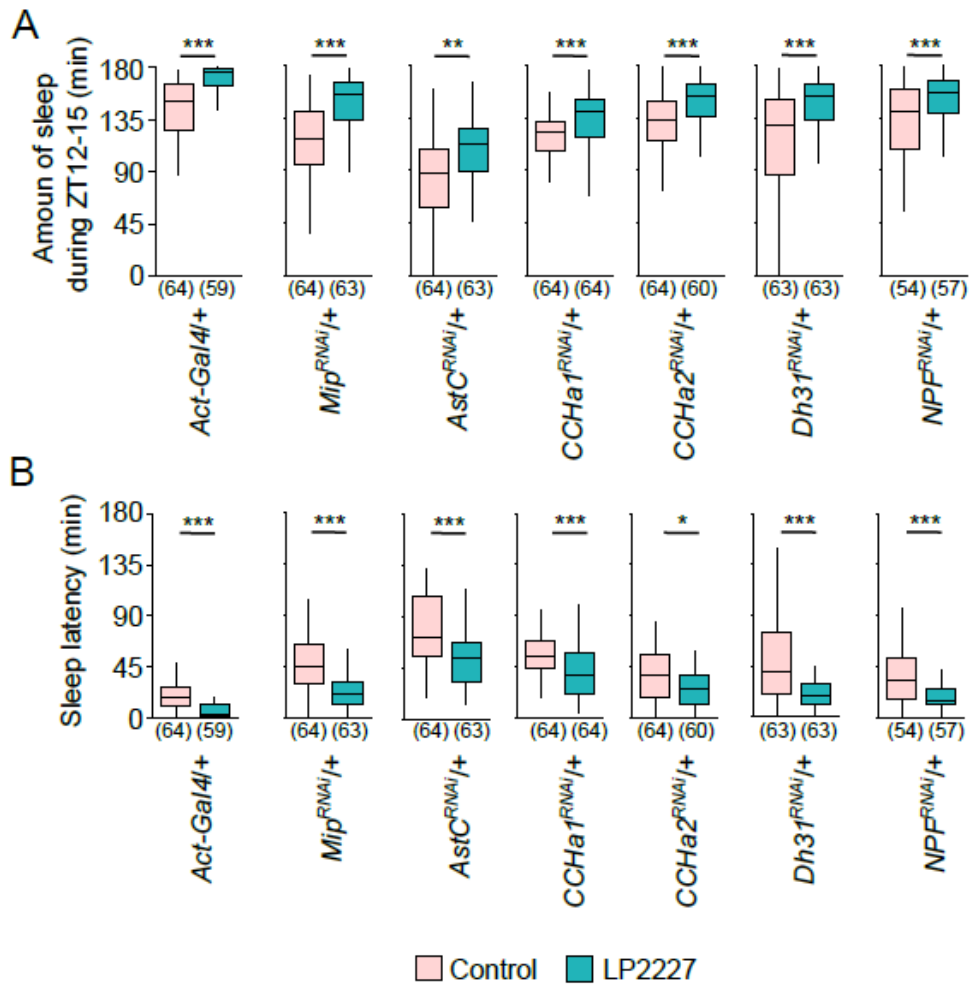
睡眠促進効果を媒介している可能性が高いことを示している。

本項は著者が実施した。



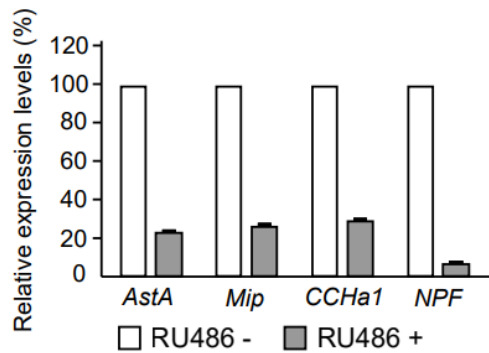
**Figure 1-10. Mini-screening of flies with gene knockdown of the peptide hormones expressed in the gut.**

(A and B) Knockdown was performed ubiquitously using Act-Gal4. (A) Amount of sleep during ZT12-15 on day 3. (B) Sleep latency on day 3. (C and D) Knockdown was performed ubiquitously and temporally using tub5-GS-Gal4. (C) Amount of sleep during ZT12-15 on day 3 and (D) sleep latency on day 3. The sample size is shown below each graph. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used for statistical analysis of the control group vs LP2227 administered group in each genotype. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. means not significant at  $p < 0.05$ .



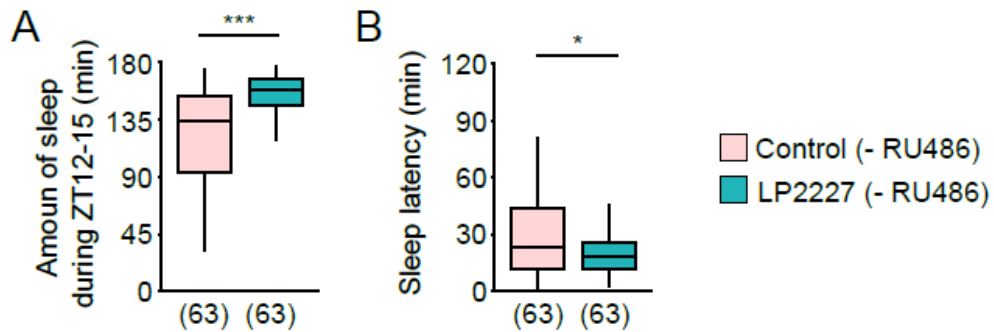
**Figure 1-11. LP2227 affected sleep in Gal4 and UAS parental strains.**

(A) Amount of sleep and (B) sleep latency were measured. Sample sizes are indicated below each graph. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was applied for statistical analysis in each genotype. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 1-12. In flies with both GeneSwitch and UAS-RNAi, the expression of target genes was suppressed by treatment with RU486.**

Gene expression levels were measured on the second day after administration of RU486.  $n = 3$ , Bar graphs show mean and standard deviation.



**Figure 1-13. Sleep-promoting effects of LP2227 were not suppressed in *tub5-GS-Gal4 > NPF<sup>RNAi</sup>* flies treated with RU486 solvent.**

(A) Amount of sleep (B) Sleep latency Sample sizes are indicated below each graph. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was applied for statistical analysis in each genotype. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 1-4. 考察

私は、キイロショウジョウバエの主要な腸内細菌である *Lactiplantibacillus plantarum* がキイロショウジョウバエの睡眠に及ぼす影響について調べ、LP2227 の摂食により睡眠が促進することを見出した。LP2227 はオートクレーブによる加熱処理後も睡眠促進効果を維持したことから、プロバイオティクスとして作用していないことが分かった。さらに、抗生物質の投与により腸内細菌を除去したハエにおいても LP2227 は睡眠を促進したことから、プレバイオティクスとしても作用していないことが示唆された。このことは、キイロショウジョウバエにおいて既存の腸内細菌は宿主の睡眠に大きな影響は及ぼしていないという報告と合致している (Jia et al., 2021; Selkrig et al., 2018)。これら摂取した菌が腸に定着して健康に寄与するプロバイオティクス、あるいは摂取した成分が既存の有用な腸内細菌を増殖または活性化することで健康に寄与するプレバイオティクス以外に、乳酸菌等の生物が産生した物質が腸内菌層を介さず摂食者の健康に寄与するバイオジェニック作用が知られている (Mitsuoka, 2000)。LP2227 はこのバイオジェニック作用により、つまり培養過程で産生した、あるいは外部環境から取り入れて菌体内に蓄積した成分により、ショウジョウバエの睡眠を促進すると考えられた。

さらに、LP2227 の有効成分について研究を進めた。LP2227 を破碎後、遠心分離して得た細胞質基質を含む菌体破碎上清がハエの睡眠を促進したことから、LP2227 の活性成分はこの上清画分に含まれることが分かった。また、加熱した LP2227 の検討から、加熱により変性するタンパク質や加水分解する DNA や RNA は有効成分の候補から除外できた。さらに、ペプチドグリカンや細胞壁成分も、これらが多く含まれる菌体破碎物の沈殿画分がハエの睡眠を促進しなかったため候補から除外できた。これらより、LP2227 の有効成分は熱安定性の高い水溶性の成分だと予測されるが、本研究では同定には至らなかった。菌体破碎上清に含まれる成分を網羅的に解析し、含まれる成分をハエに投与して睡眠への影響を調べることで有効成分を特定できるとは考えられるが、作業量を考えると現実的ではない。第2章に記載するように、LP2227 を含む乳酸菌とビフィズス菌についてハエの睡眠に及ぼす影響を幅広く調べたところ、睡眠促進作用が大きい菌種も、弱い又は認められない菌種もあった。そのため、睡眠を促進する異菌種間、あるいは、睡眠促進効果に差がある近縁種間で代謝産物を比較することが、睡眠促進の活性成分の特定に有効だろう。

RNA シークエンシングを利用した腸のトランスクリプトーム解析により、LP2227 の投与によって発現量が増加する遺伝子が多く含まれる経路をいくつか特定できた。Neuroactive peptide hormones は特定できた経路の一つである。摂食した乳酸菌の作用標的候補の一つは、乳酸菌の活性成分が直接接する腸の細胞集団であり、その集団の一つの細胞種が腸内分泌細胞 (EECs) である。EECs はペプチドホルモンを体液中に放出し (Ji Chen et al., 2016; Guo et al., 2019; Hung et al., 2020)、EECs から放出される *AstA* や *Mip*、*AstC*、*CCHa1*、*CCHa2*、

*Dh31*、*NPF* などのペプチドホルモンはハエの睡眠・覚醒行動や概日リズムに作用する (Jiangtian Chen et al., 2016; Chung et al., 2017; Díaz et al., 2019; Fujiwara et al., 2018; He et al.,

2013; Hermann et al., 2012; Kunst et al., 2014; Oh et al., 2014; Ren et al., 2015)。これらペプチドホルモンの中から LP2227 の睡眠促進効果を介在する分子を特定するため、RNA interference (Fire et al., 1998) と Gal4/UAS 法 (Fischer et al., 1988) を組み合わせてペプチドホルモンをコードする遺伝子の発現を抑制したハエを作成し、そのハエに LP2227 を摂食させて睡眠促進作用の影響を評価した。その結果、LP2227 の睡眠促進効果に必要な内分泌因子として NPF を見出した。

NPF は 36 アミノ酸で構成されるペプチドホルモンで、哺乳類の neuropeptide Y (NPY) と同性を有する (Brown et al., 1999)。NPF の受容体の NPFR は、抑制性 G タンパク質を活性化する G タンパク質共役受容体 (GPCR) である (Garczynski et al., 2002)。ショウジョウバエにおいて、NPF は摂食行動 (Q. Wu et al., 2005)、交尾行動 (Liu et al., 2019)、アルコール感知 (Wen et al., 2005)、攻撃行動 (Dierick & Greenspan, 2007)、記憶学習 (Krashes et al., 2009) など、様々な生理機能に関与している。睡眠・覚醒行動に関して、ゼブラフィッシュでは、NPY は覚醒を促進するノルアドレナリン作動系を阻害することにより睡眠を促進する (Singh et al., 2017)。哺乳類における NPY の睡眠促進効果はまだ議論の余地があり、NPY を静脈内に注射するとヒトで睡眠を促進したり (Antonijevic et al., 2000; Held et al., 2006)、げっ歯類で脳に NPY を注入すると睡眠が促進して運動が減少するとの報告がある一方 (Akanmu et al., 2006; Jolicœur et al., 1991)、逆の効果も報告されている (Szentirmai & Krueger, 2006; Ushimura et al., 2015)。ショウジョウバエの NPF も哺乳類同様の議論の余地がある。例えば NPF の過剰発現は睡眠を促進するが雄に限定されるとの報告や (He et al., 2013)、NPF 産生細胞の活性化は覚醒を促進するとの報告がある (Chung et al., 2017)。このように相反する効果が考えられる理由の 1 つとして、NPF と NPY が、作用する標的ニューロンによって睡眠行動に対して異なる制御をしている可能性が上げられている (Singh et al., 2017)。

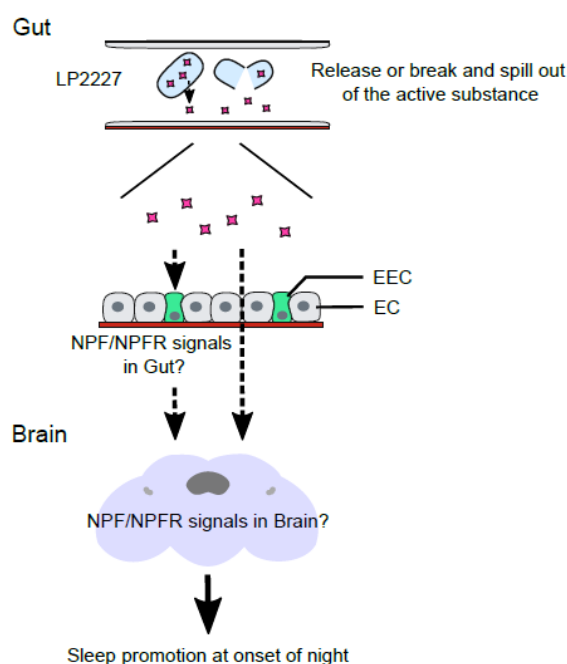
ショウジョウバエは NPF を神経細胞と中腸で発現している。これまでに、NPF 産生神経細胞を活性化すると摂食行動を促進すること (Chung et al., 2017)、中腸で産生される NPF は生殖幹細胞の増殖を調節する (Ameku et al., 2018) ことが報告されている。また、ショウジョウバエの睡眠は、朝の振動子 (オシレーター) と夕方の振動子の 2 つの振動子によって制御され、NPF を発現している Dorsal lateral neurons (LNds) と fifth small ventral lateral neurons (sLNv) は夕方の振動子の一部で、その神経活動は夕方に増加する (X. Liang et al., 2016)。LNds を構成する 6 つのニューロンのうち 1 つは NPF 陽性かつクリプトクロム (CRY) 陽性ニューロンであり (Yoshii et al., 2008)、Chung らは、CRY 陽性の NPF 産生細胞は覚醒を促進することを明らかにした (Chung et al., 2017)。しかしながら、どの部位の NPF/NPFR シグナルが、どのように睡眠制御に関与しているかについて不明な点が多い。LP2227 の作用機序を理解するためには、LP2227 の活性物質によって制御される NPF 産生細胞と、そのシグナルを受け取る NPFR 発現細胞の同定が必要である。今後、これにより NPF/NPFR シグナルと睡眠の関係も一部明らかになるだろう。

RNA シークエンシングにおいて、微生物の認識に関わる GO カテゴリーである



peptidoglycan muralytic activity が、LP2227 の投与によりエンリッチされたカテゴリーとして検出された。動物の免疫が活性化した状態だと、睡眠が増加することが哺乳類 (Krueger et al., 1982) とハエ (Kuo et al., 2010) とともに報告されている。LP2227 は細胞壁表面にペプチドグリカンを持っており、ペプチドグリカンは腸の免疫応答である Toll シグナル伝達経路によって認識される (Valanne et al., 2011)。そのため、私は当初 LP2227 の睡眠促進作用がペプチドグリカンにより惹起された免疫応答による可能性を推測していたが、ペプチドグリカン成分が豊富な LP2227 の破碎沈殿画分はハエの睡眠を促進させなかった (Figure 1-8)。したがって、LP2227 の睡眠への作用において免疫系の関与は考慮しなくて良い程度に低いと考えている。

本章の結論として、LP2227 の新しい生体作用として、キイロショウジョウバエに対する睡眠促進効果を発見した。また、LP2227 の有効成分は腸からの NPF を介して、または神経細胞の NPF を介して、睡眠促進効果を発揮することを見出した (Figure 1-14)。私は、今回作用経路として見出した NPF のオルソログである NPY を哺乳類が有することから、LP2227 が哺乳類でも睡眠促進効果を発揮することを期待している。LP2227 などの睡眠をはじめとする脳機能に作用する機能性乳酸菌の作用メカニズムの解明は、脳-腸-細菌相互作用の新しい側面に関する理解に役立つだろう。



**Figure 1-14. Model showing the biogenic action of the LP2227 on fly sleep**

The active substance of LP2227 is released from the cells, or the cells are digested and flow out into the gut tract. The active substance acts directly or indirectly on NPF-producing cells and finally acts on the brain neuronal circuits to exert the sleep-promoting effect.

## 第2章 キイロショウジョウバエを活用したヒトまたは食物由来の微生物の睡眠促進作用のスクリーニング

### 2-1. 序論

第1章で述べた通り、私はキイロショウジョウバエを用い、腸内細菌と睡眠の関係に着目して検討を開始し、*Lactiplantibacillus plantarum* がハエの睡眠を促進することを発見した。また、当該菌は腸に定着して効果を発現するプロバイオティクスとしてではなく、保有する成分が腸内細菌叢を介することなく生体に作用するバイオジェニクスとして作用していることを明らかにした。第1章で *L. plantarum* を検討した理由は、同菌種を含む既存の腸内細菌が睡眠に関与している可能性を踏まえてのものだったが、得られた結果からは腸内細菌としての *L. plantarum* は睡眠促進への寄与は低いことを示すものであった。つまり、*L. plantarum* が睡眠促進作用を発現するにあたって体内での生残性や体内への定着は考慮しなくてよく、*L. plantarum* と同様の成分を有する菌であればハエの睡眠を促進可能だと示された。*L. plantarum* は動物の消化管や糞、食肉、野菜、乳製品など様々なニッチに存在するグラム陽性の乳酸菌である (Siezen et al., 2010)。ヒトの腸内や食品に存在する微生物は他にも多くあるが、どのような種が、ハエの睡眠にどのような影響を与えるかは不明であった。

本研究の目的は、緒言に記載した通り、得られた知見を睡眠改善素材の開発に活用することを視野に入れた上で、ショウジョウバエの睡眠に対する腸内細菌あるいは経口摂取する微生物の及ぼす影響を明らかにすることにある。そこで本章では、ヒトや食品に由来する微生物 39 種類について、ショウジョウバエの睡眠に及ぼす影響を調査した。さらに、その結果を起点に同じ菌種だが睡眠促進作用の強さが異なる菌株を見出し、それら菌株をそれぞれ投与したハエのトランスクリプトーム解析を行うことで、睡眠促進作用と関連のある候補遺伝子を絞り込んだ。最終的には、候補遺伝子に変異の入ったハエを用いた行動試験を実施することで、評価した 39 種類の微生物のうち最も睡眠促進作用が大きかった菌が睡眠促進作用を発揮するために必要なハエ側の遺伝子を特定した。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 使用したキイロショウジョウバエの系統と維持条件

本章の研究ではキイロショウジョウバエを第1章と同様に標準的なコーンミール/酵母ベースの餌（50 g/L グルコース、45 g/L 酵母、40 g/L コーンフラワー、8 g/L 寒天、4 ml/L プロピオン酸、3 ml/L ボーキニン）を与え、温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $60 \pm 3\%$ 、12 時間ごとの明暗周期条件（12 時間 L/D）下で飼育した。*Canton-S<sup>2202u</sup>* を野生型系統として使用した。また、*InR* のヘテロ接合変異体（*InR<sup>E19/+</sup>*）を作成するために、*InR<sup>E19/TM2</sup>* (RRID:BDSC\_9646) をブルーミントンショウジョウバエストックセンターから入手し、*Canton-S<sup>2202u</sup>* と交配させた。実験には、羽化後 10 時間以内に二酸化炭素麻酔下で雌雄選別して回収した処女メスのみを使用した。回収したハエは餌の入ったバイアル 15~20 匹ずつ入れて実験に使用するまで維持飼育した。

### 2-2-2. 微生物サンプルの調製

本研究で使用した全ての微生物は雪印メグミルク株式会社から入手した。各微生物は **Table 2-1** に示す条件で培養し、遠心分離（ $7,000 \times g$ , 20 分,  $4^\circ\text{C}$ ）により回収した菌体を滅菌生理食塩水（0.9% NaCl）で 2 回洗浄した。行動スクリーニングに用いる微生物は 240 mL の培地で培養し、得られた菌体ペレットをトレハロース溶液に懸濁し、培養に用いた培地量の 10 分の 1 量に調整した（トレハロース終濃度 12.5%）。その菌体懸濁液を、6 本のクライオチューブに 4 mL ずつ分注し、 $4^\circ\text{C}$  で 2~5 時間インキュベートした後、液体窒素で急速凍結し、実験に使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。その他の実験には、滅菌生理食塩水で洗浄した菌体ペレットを滅菌蒸留水で再度洗浄した後、凍結乾燥し、実験に使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  で保存したものを使用した。

### 2-2-3. 睡眠測定

第1章にも記載した通り、ショウジョウバエの睡眠測定には *Drosophila activity monitoring system* (DAMs : Trikinetics, MA, USA) を使用した。羽化後 3~4 日目の処女メスのショウジョウバエを、コントロール餌または試験餌を一端に詰めた  $5 \times 65 \text{ mm}$  のガラスチューブに入れた後、もう一端に綿の栓をした。このガラスチューブを DAMs にセットした。DAMs を  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間 L/D（8~20 時を明期、20~翌 8 時を暗期）に設定したインキュベータに入れ、一晩新しい環境で馴化した後、翌朝 8 時からデータ収集を開始した。

計 39 種の微生物のスクリーニングと、加熱した BA2786 を与えたハエの睡眠行動を評価する際の、コントロール群の餌組成はトレハロース (6.25%)、スクロース (5.0%)、寒天 (1.0%) とし、試験群の餌は 2-2-2 に記載した菌体懸濁液（トレハロース終濃度 12.5%）をスクロース寒天溶液（スクロース 10.0%、バクトアガー 2.0%）と等量混合して調製した。なお、BA2786 の菌体懸濁液を恒温槽（HB-80, TAITEC Co., Saitama, Japan）で  $65^\circ\text{C}$  1 時間加熱することで、加熱死菌体を調製した。

その他の試験では、スクロース 5.0%、寒天 1.0%の溶液をコントロール餌とし、試験群の餌は凍結乾燥菌体をコントロール餌に約 1%混ぜることで調製した。

ショウジョウバエの行動量のデータは 1 分間隔で取得し、5 分以上不活動であった場合に“睡眠”と判定した。すべての行動パラメーターは統計解析ソフト R の Rethomics パッケージ (Geissmann et al., 2019) を使用して算出した。また、測定中に死亡したハエは解析から除外した。睡眠に関する指標は第 1 章と同様である。特段の断りが無い限り、3 日目の行動量のデータを解析に用いた。

### 2-2-3. 摂食量の測定

菌体を含む餌に対する摂食量の測定は、既報を参考に条件を一部改変して実施した (Ko et al., 2022; Shell et al., 2018; Q. Wu et al., 2020)。具体的には、菌体を含む試験食に青色色素 (1% w/v, Blue No. 1, Fujifilm Wako Pure Chemicals Corporation, Osaka, Japan) を混ぜ、それぞれ給餌用の容器 (10  $\mu$ L tip, Molecular BioProducts, CA, USA, Cat# 3500) に充填した。50 mL 容量のコニカルチューブ (Greiner, Kremsmünster, Austria, Cat# 227261) の蓋に穴を開け、その穴に餌を充填した給餌カップを挿入した。10 匹のハエをコニカルチューブに入れ、餌がセットされた蓋を閉めて 6 時間摂食させた。その後ハエを回収し、1 mL の超純水中で磨り潰して体内の色素を溶出した。また、別の 1 mL の超純水でハエを回収後のコニカルチューブ内壁を洗い、内壁に排泄された糞中の色素を溶出した。これら色素溶出液を混合し、分光光度計 (Infinite M Plex, Tecan, Switzerland) を用い 630 nm の吸光度を測定した。

### 2-2-3. 微生物の系統樹作成

微生物の 16S rRNA 配列を NCBI データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) から取得した。系統樹作成に使用した、行動スクリーニングに供した微生物の基準株の 16S rRNA 配列のアクセッションナンバーを **Table 2-1** に示す。MEGA X (Kumar et al., 2018) を用い、RNA 配列をアライメントし、近隣結合法で系統樹を作成した。

### 2-2-4. RNA シークエンシング解析

睡眠測定開始後 4 日目の ZT12~13 の間に、コントロール餌または試験餌を与えたハエから頭部を回収した。頭部のトータル RNA を RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して抽出した。RNA シークエンズライブラリの構築とシークエンシングは Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea) に委託し、Illumina NovaSeq6000 system で実施した。読み取ったフラグメントはキイロショウジョウバエのゲノムデータ (NCBI GCF\_000001215.4\_Release\_6\_plus\_ISO1\_MT) にマッピングし、StringTie (Pertea et al., 2015) を用いて再構築した。RNA 発現レベルの比較には、edgeR (Robinson et al., 2010) を用いて負の二項分布の正確検定を適用した。コントロール群と 2 つの試験群の全てで発現が確認された遺伝子から、コントロール群と試験群それぞれでの発現レベルを比較し、発現量の変化が

2倍以上で、かつ  $p < 0.05$  である遺伝子を抽出した。

#### 2-2-5. 統計解析

統計解析には R を用いた。全てのデータについて Shapiro-Wilk test で正規性を確認し、適した解析手法を適用した。Welch's  $t$ -test または Wilcoxon-Mann-Whitney test を繰り返す際には Bonferroni 法で  $p$  値を補正した。有意水準は 0.05 とした。箱ひげ図の箱では中央値と四分位範囲を、ひげでは外れ値を除いた最大および最少のデータポイントを表した。睡眠促進効果の大きさを評価するために、次式を使用して Wilcoxon-Mann-Whitney test で得られた  $z$  値から効果量  $r$  を算出した： $r = z / \sqrt{n}$ 。

**Table 2-1. List of bacterial strains used in the study**

Species name	Medium	Temperature	Oxygenated environment	16S rRNA accession number
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GAM+G*1	37°C	anaerobic	LC071806
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	GAM+G	37°C	anaerobic	LC071804
<i>Bifidobacterium breve</i>	GAM+G	37°C	anaerobic	LC071793
<i>Bifidobacterium faecale</i>	GAM+G	37°C	anaerobic	KF990498
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	GAM+G	37°C	anaerobic	LC071818
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	GAM+G	37°C	anaerobic	D86184
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	GAM+G	37°C	anaerobic	LC071796
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	GAM+G	37°C	anaerobic	LC071834
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	GAM+G	37°C	anaerobic	LC071798
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	MRS*2	37°C	aerobic	LC065035
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	MRS	37°C	aerobic	LC145553
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MRS	37°C	aerobic	LC064896
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS	37°C	aerobic	LC064893
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	MRS	37°C	aerobic	LC064891
<i>Lactobacillus crispatus</i>	MRS	37°C	aerobic	LC065039
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	MRS	37°C	aerobic	LC063162
<i>Lactobacillus gasseri</i>	MRS	37°C	aerobic	LC064892
<i>Lactobacillus helveticus</i>	MRS	37°C	aerobic	LC062899
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	MRS	37°C	aerobic	LC071811
<i>Latilactobacillus sakei</i>	MRS	37°C	aerobic	LC064899
<i>Lentilactobacillus kefir</i>	MRS	37°C	aerobic	LC145557
<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	MRS	37°C	aerobic	LC383822

<i>Levilactobacillus brevis</i>	MRS	37°C	aerobic	LC062897
<i>Ligilactobacillus acidipiscis</i>	MRS	37°C	aerobic	LC145575
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>	MRS	37°C	aerobic	LC071821
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MRS	37°C	aerobic	LC065036
<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	MRS	37°C	aerobic	AF126738
<i>Limosilactobacillus oris</i>	MRS	37°C	aerobic	LC097079
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	MRS	37°C	aerobic	LC145550
<i>Limosilactobacillus vaginalis</i>	MRS	37°C	aerobic	LC096217
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	M17*3	30°C	aerobic	AB100803
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	M17	30°C	aerobic	LC071827
<i>Streptococcus mitis</i>	MRS	37°C	aerobic	AF003929
<i>Streptococcus parauberis</i>	GAM+G	30°C	aerobic	NR_043001
<i>Streptococcus salivarius</i>	MRS	37°C	aerobic	LC071828
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M17+G*4	37°C	aerobic	AY188354
<i>Weissella cibaria</i>	MRS	37°C	aerobic	LC096236
<i>Weissella confusa</i>	MRS	37°C	aerobic	LC063164
<i>Weissella paramesenteroides</i>	MRS	30°C	aerobic	LC096224

---

\*1 GAM+G: Gifu Anaerobic Medium broth (NISSUI PHARMACEUTICAL CO.,LTD., Japan) + 1% Glucose

\*2 MRS: Man, Rogosa, and Sharpe broth (BD Biosciences, CA, USA)

\*3 M17: M17 Broth (BD Biosciences, CA, USA)

\*4 M17+G: M17 Broth (BD Biosciences, CA, USA) + 1% Glucose

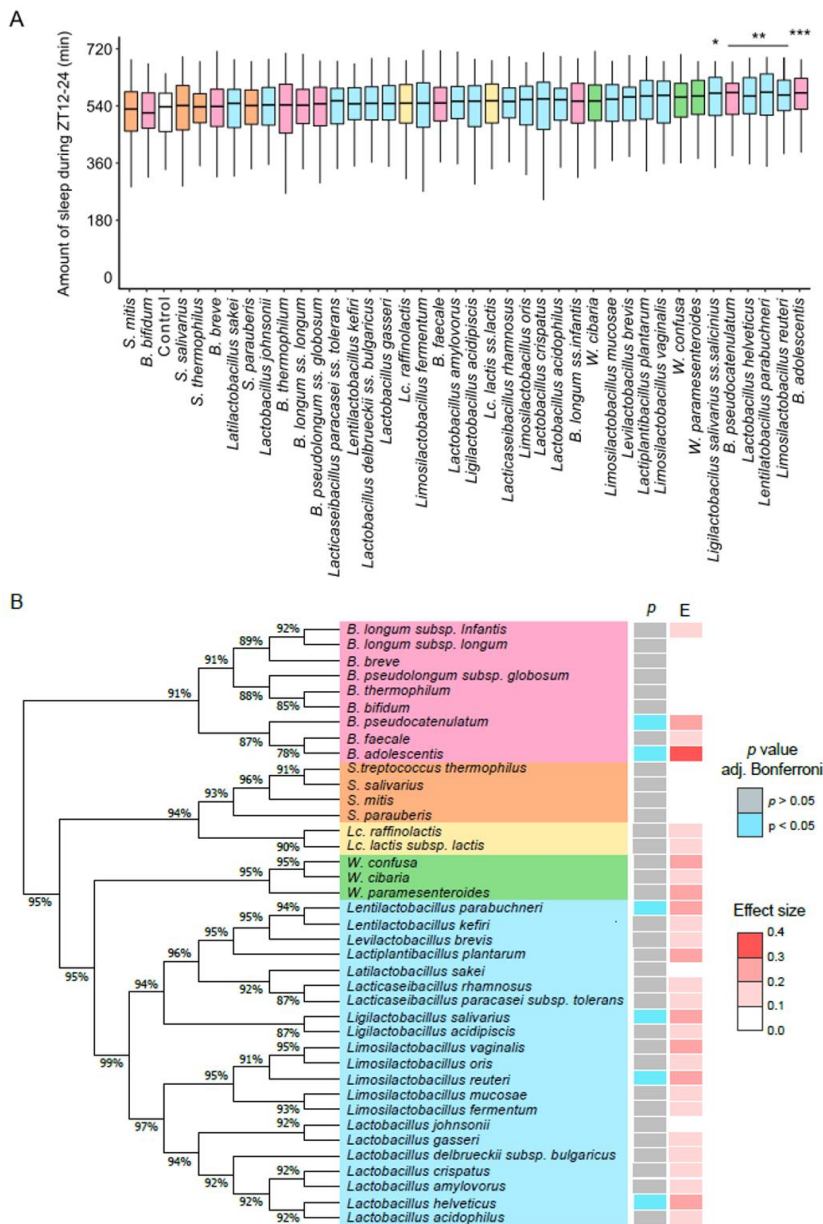
## 2-3. 結果

### 2-3-1. ヒト腸内または食品関連微生物 39 種類のハエの睡眠に対する効果検証

睡眠を促進する作用を有するヒト腸内または食品関連の微生物を選定するために、30 種類の乳酸菌と 9 種類のビフィズス菌それぞれを単独でハエに経口投与して行動を評価した。30 種類の乳酸菌は、*Lacticaseibacillus*、*Lactiplantibacillus*、*Lactobacillus*、*Latilactobacillus*、*Lentilactobacillus*、*Levilactobacillus*、*Ligilactobacillus*、*Limosilactobacillus*、*Weissella*、*Lactococcus*、*Streptococcus* のいずれかに属する。また、ビフィズス菌とは *Bifidobacterium* に属する菌を指す。それぞれの微生物を投与したショウジョウバについて主要な睡眠時間である夜間の睡眠量を分析したところ、6 種類の微生物において、微生物を含まない餌を摂取した対照群に比べて夜間睡眠量を有意に増加させることが明らかとなった (**Figure 2-1A**)。今回睡眠量を増加させた 6 種類の微生物のうち 4 種類は、*Limosilactobacillus reuteri*、*Lentilactobacillus parabuchneri*、*Lactobacillus helveticus*、*Ligilactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* であり、これらは 2020 年までの分類では *Lactobacillus* に属するものであった (Zheng et al., 2020)。また、残りの 2 菌種は *Bifidobacterium adolescentis* と *B. pseudocatenulatum* であった。

次に、評価した微生物の睡眠促進作用の大きさと微生物のゲノム情報に関連があるか調べるため、睡眠促進作用について効果量を算出して各菌種基準株の 16S rRNA 配列に基づく系統樹にプロットした (**Figure 2-1B**)。効果量が最も大きかった微生物は *B. adolescentis* であり ( $r = 0.31$ )、有意差が認められたもう一方のビフィズス菌は *B. pseudocatenulatum* であった。これらビフィズス菌 2 種も睡眠を有意に増加させた乳酸菌 4 菌種も、系統樹の特定の枝に集中してはいなかった。対照的に *Streptococcus* と *Lactococcus*、*Weissella* は評価した全菌株 (それぞれ 4、2、3 菌株) でハエの睡眠に有意な影響を与えなかった。これらの結果は、ヒトの腸内または食品関連微生物 39 種類の睡眠促進効果が、菌の属にある程度依存していることが示唆している。私は、このスクリーニング結果に基づいて *B. adolescentis* に注目し、その睡眠と覚醒への影響を詳細に調べた。

本項の実験に係る作業は村上氏と著者で均等に実施したが、解析と考察は著者が実施した。



**Figure 2-1. Behavioral screening of the effects of lactic acid bacteria (LAB) and *Bifidobacteria* on sleep in flies.**

(A) Amount of sleep between ZT12 and 24 on the third day of oral administration. (B) Relationship between the genetics of each bacterium and the magnitude of the sleep-promoting effect. Phylogenetic tree of bacteria based on 16S rRNA of their type-strain is shown, along with the *p* value of the amount of sleep between ZT12 and 24 on the third day and its effect size (*e*). Bootstrap values are indicated at each node on the phylogenetic tree. The experiments on  $n = 16$  flies/group/experiment were repeated six times and  $n = 96$  flies/group were obtained. For statistical analyses, the amount of sleep was compared with that in the control group. Statistical difference was determined using the Wilcoxon–Mann–Whitney test and adjusted with the Bonferroni correction. \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ .



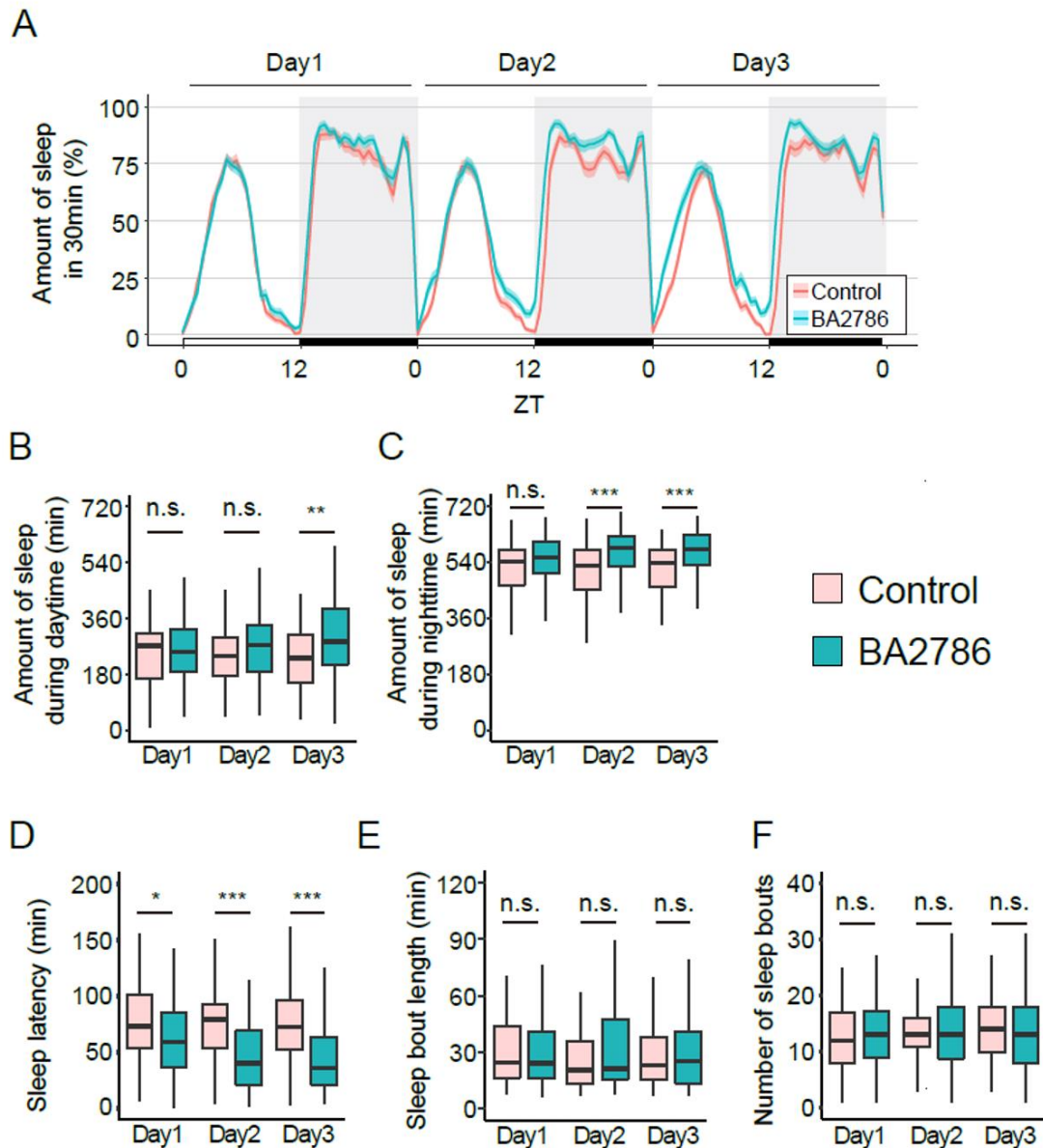
### 2-3-2. *B. adolescentis* の睡眠と覚醒への作用の特徴

スクリーニングに使用した *B. adolescentis* は SBT2786 株であり (以降、BA2786 と呼ぶ)、この菌を投与したハエの行動を詳細に調べた。BA2786 を摂取したハエの日中の睡眠量は 3 日目のみ増加し、夜間の睡眠量は 2 日目と 3 日目で増加した (Figure 2-2A-C)。また、BA2786 を摂取したハエでは 3 日間すべてで睡眠潜時が有意に短縮した (Figure 2-2D)。睡眠量は各睡眠バウトの長さを合計したものである。しかし、BA2786 を摂取したハエでは夜間睡眠量は増加したものの、睡眠バウトの長さや回数はコントロール群との間に有意差は認められなかった (Figure 2-2E and F)。この矛盾した現象を理解するために、睡眠バウトを一定時間範囲毎に区切り、最短の区分から最長の区分まで睡眠量を累積した (Figure 2-3)。その結果、半数以上の睡眠バウトが含まれる 40 分未満の区分では両グループ間の累積睡眠量に差は見られなかった。しかし、それ以降の長い区分まで見ると、約 300 分の睡眠バウトまでの睡眠量の積算値は BA2786 投与群で低く、300 分以降は BA2786 投与群で高い値を示した。この結果は、夜間の総睡眠量の増加が、長い睡眠バウトの増加によって引き起こされたことを示唆している。睡眠バウトの長さが長くなることは睡眠が統合されたことを、短くなることは睡眠が断片化していることを示す (Koh et al., 2006)。つまり、これらの結果は、BA2786 により睡眠が統合され、夜間の睡眠の総量が増加したことを示している。

次に、BA2786 の睡眠促進効果が、運動機能の低下などによって引き起こされる可能性も想定されるため、覚醒行動に対する BA2786 の効果を調べた。活動パターンのプロットから、BA2786 の投与がハエの活動を減少させることが示唆された (Figure 2-4A)。実際に、ハエの赤外線通過回数は、3 日目の昼間と、2 日目と 3 日目の夜間で有意に減少した (Figure 2-4B and C)。他の覚醒行動のパラメーターである活動指数 (覚醒時間 1 分間あたりの赤外線通過回数) を調べたところ、BA2786 の投与は 2 日目と 3 日目の夜間において活動指数を減少させたが、日中の覚醒活動指数に有意な変化を起こさなかった (Figure 2-4D and E)。これらの結果は、BA2786 による夜間の赤外線通過回数の減少は覚醒時間の減少だけでなく、覚醒時の活動レベルの低下によるものであることを示唆している。また主な活動時間である昼間の活動指数に変化は見られないことから、BA2786 がハエの運動機能を低下させたのではないことが示された。

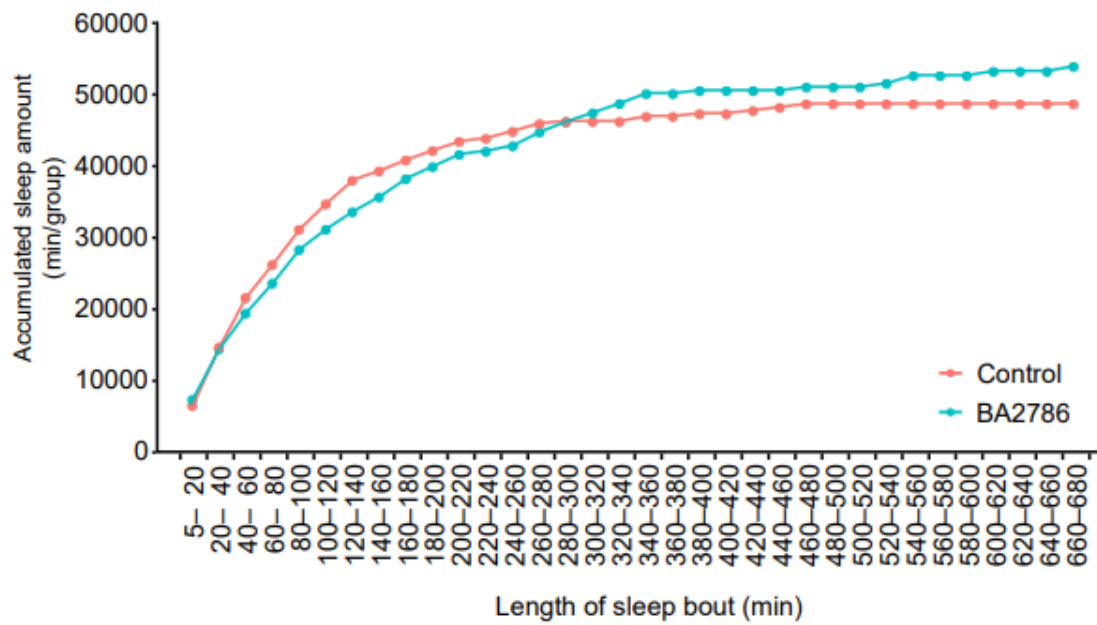
なお、BA2786 を 65°C で 1 時間加熱殺菌後 (< 100 cfu/mL; 検出限界未満) にハエに投与したところ、BA2786 の睡眠促進効果の代表値として測定した測定 3 日目の夜間の睡眠量と睡眠潜時はそれぞれ有意に増加および短縮した (Figure 2-5)。この結果は、ハエの睡眠を促進するために BA2786 が生菌である必要がないことを示した。

本項の実験に係る作業は村上氏と著者で実施したが、解析と考察は著者が行った。

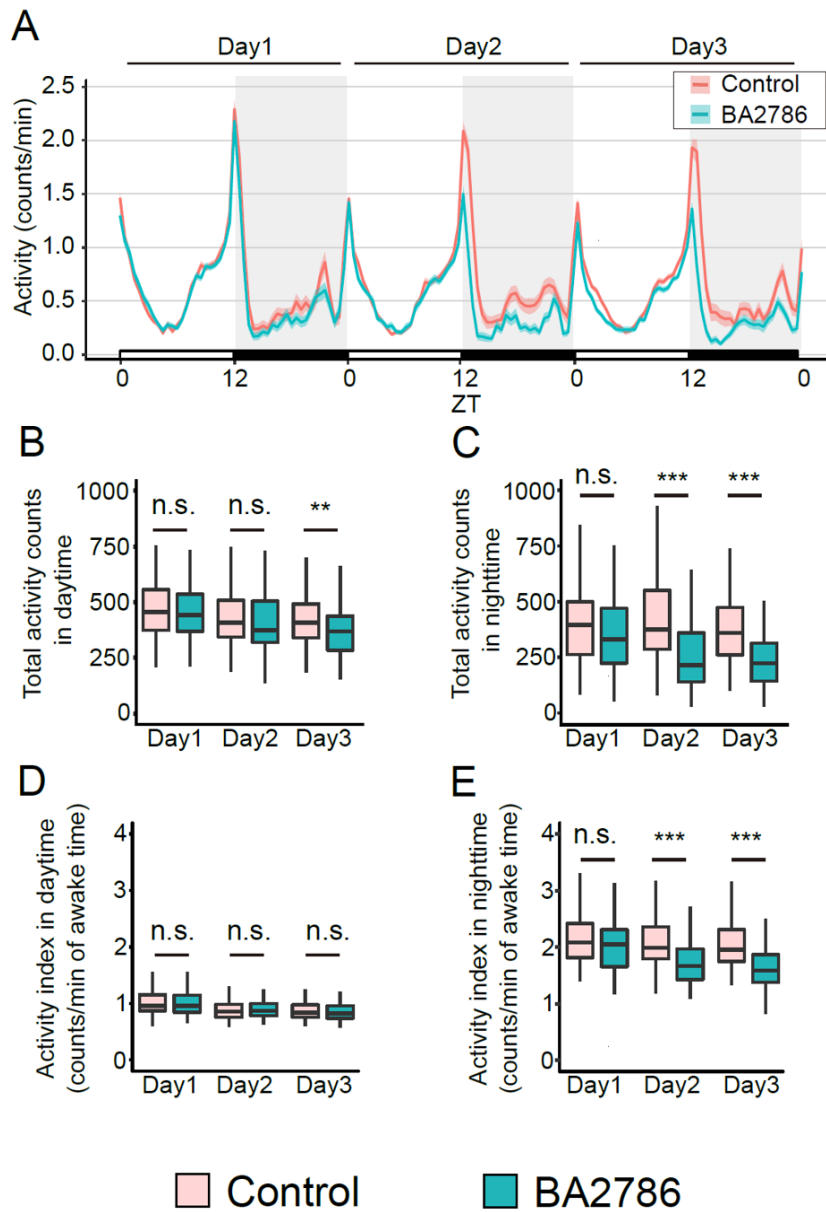


**Figure 2-2. Oral administration of BA2786 increased the amount of sleep at the onset of the night-time and decreased the sleep latency.**

(A) Sleep patterns of flies fed control (red) or BA2786 (green) food. Sleep patterns are indicated with mean  $\pm$  SEM. (B) Amount of sleep during the daytime (ZT0–12), (C) amount of sleep during the night-time (ZT12–24), (D) sleep latency, (E) sleep bout length, and (F) number of sleep bouts during the night-time ( $n = 96$  for each group). The Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for statistical analysis and adjusted with the Bonferroni correction. \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ; n.s., not significant.

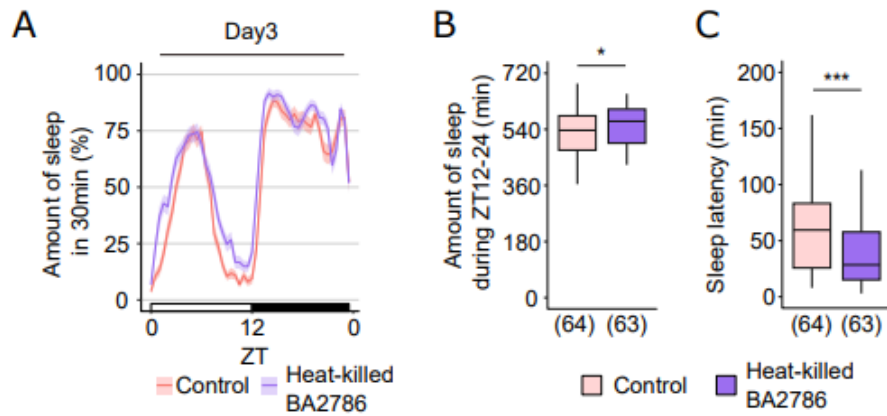


**Figure 2-3. Accumulated sleep amount for each range of sleep bout length during ZT12–24 on the third day.  $n = 96$  for each group.**



**Figure 2-4. Wakefulness was altered in BA2786-fed flies.**

(A) Activity patterns of flies on control (red) or BA2786 (green) food. (B) Activity counts during the daytime (ZT0–12), and (C) during the night-time (ZT12–24). (D) Activity index during the daytime, and (E) during the night-time ( $n = 96$  for each group). The Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for statistical analysis and adjusted with the Bonferroni correction.  $*p < .05$ ;  $**p < .01$ ;  $***p < .001$ ; n.s., not significant.



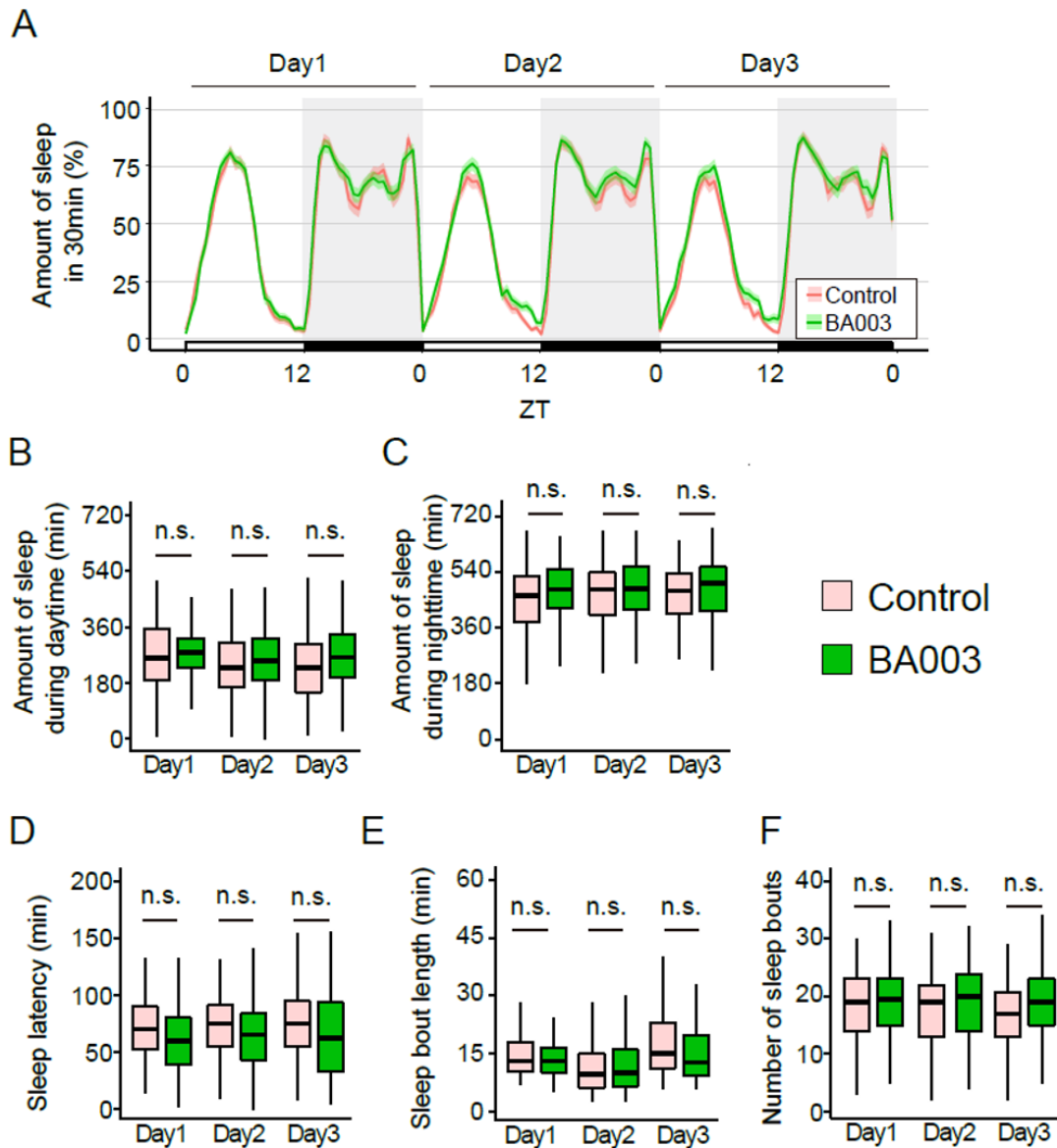
**Figure 2-5. Heat-killed BA2786 promoted sleep in flies.**

The effects of heat-killed BA2786 were tested in flies. (A) Sleep patterns of flies on the third day. Sleep patterns are indicated as mean  $\pm$  SEM. (B) Amount of sleep during ZT12–24 on day 3 and (C) sleep latency on the third day. The sample sizes are shown below each graph. The Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for statistical analysis.  $*p < 0.05$ ;  $***p < 0.001$ .

### 2-3-3. *B. adolescentis* BA003 の睡眠と覚醒への作用の特徴

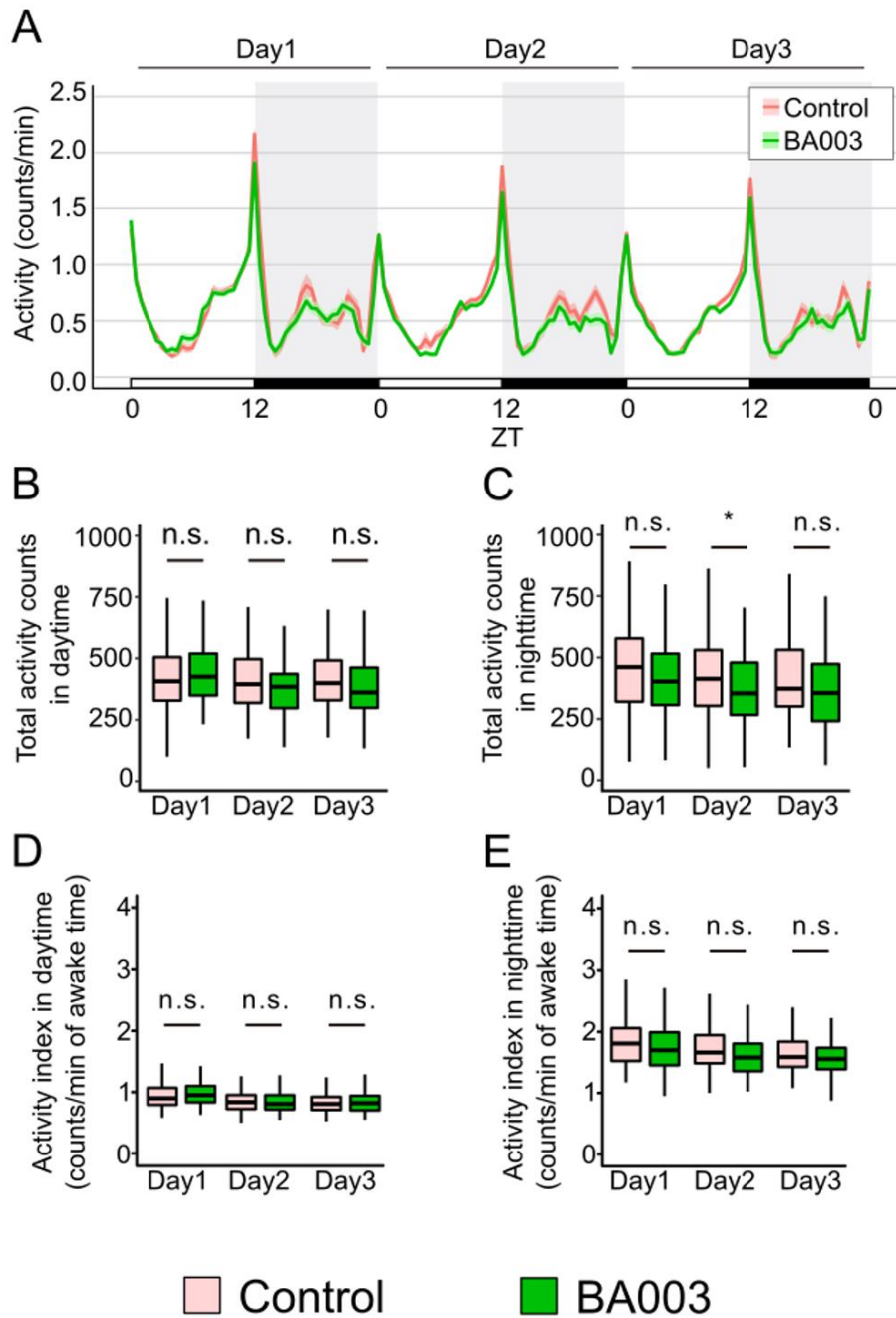
プロバイオティクスは、同じ菌種であっても菌株が異なれば宿主に対して異なる影響を与える可能性がある (Hill et al., 2014; McFarland et al., 2018)。そこで、BA2786 はプロバイオティクスではないが、BA2786 と同様にヒトの糞便から分離して系統化された *B. adolescentis* の別菌株である BA003 についてもショウジョウバエに経口投与して睡眠への影響を調べた。すると、夜間睡眠量を有意に増加させた BA2786 とは対照的に、BA003 を投与してもハエの睡眠パターンに顕著な変化は見られなかった (**Figure 2-6A**)。定量的に評価しても日中の睡眠量、夜間の睡眠量、睡眠潜時、睡眠バウトの長さ、睡眠バウトの回数に有意な違いは検出されなかった (**Figure 2-6B-F**)。同様に、活動パターンについても明確な変化は見られなかった (**Figure 2-7A**)。BA003 の投与により、2 日目夜間の活動量には有意な減少が認められたものの、他の時間帯の活動量や活動指数には有意な変化は認められなかった (**Figure 2-7B-E**)。このように、BA003 はショウジョウバエの睡眠行動にほとんど影響を与えなかった。この原因としてショウジョウバエが BA003 を摂取していない可能性も考えられたが、BA003 を含む餌と BA2786 を含む餌に対する摂食量に有意差はなかった (**Figure 2-8**)。つまり、BA003 は BA2786 と同じ種に属するが、ショウジョウバエの睡眠に対する作用は小さいことを示している。

本項の睡眠・覚醒行動に係る作業は村上氏と著者で分担し、摂食量評価は著者が実施した。結果の解析と考察は著者が行った。



**Figure 2-6. Oral administration of BA003 did not affect the fly sleep.**

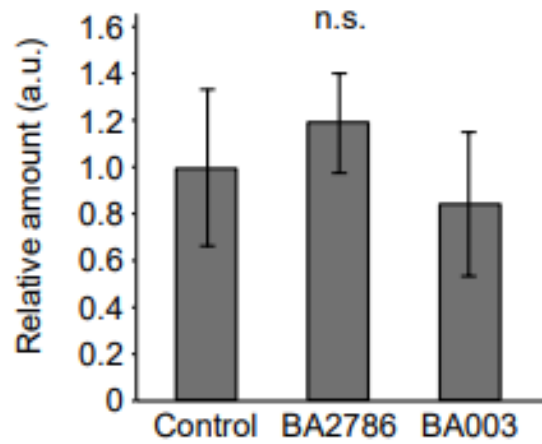
(A) Sleep patterns of flies fed control (red) or BA003 (green) food. Sleep patterns are indicated with mean  $\pm$  SEM. (B) Amount of sleep during the daytime (ZT0–12), (C) amount of sleep during the nighttime (ZT12–24), (D) sleep latency, (E) sleep bout length, and (F) number of sleep bouts during the night-time ( $n = 94$ – $95$  for each group). The Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for statistical analysis and adjusted with the Bonferroni correction. n.s., not significant.



**Figure 2-7. Wakefulness was mostly unaltered in flies fed BA003.**

(A) Activity patterns of flies fed control (red) or BA003 (green) food. (B) Activity counts during the daytime (ZT0–12), and (C) during the night-time (ZT12–24). (D) Activity index during the daytime, and (E) during the night-time ( $n = 94–95$  for each group). The Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for statistical analysis and adjusted with the Bonferroni correction.  $*p < .05$ ; n.s., not significant.





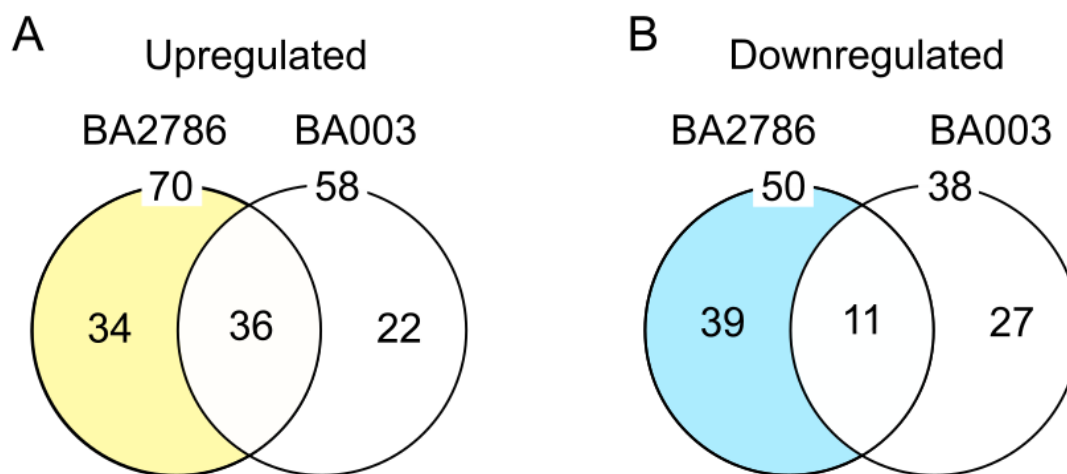
**Figure 2-8. Food consumption by flies of BA2786 and BA003 food was not different from that of the control food.**

The amount of food consumed by flies in 6 h was measured for each type of food. Bars represent mean  $\pm$  SD.  $n = 5$  for each group. The Tukey–Kramer test was applied for statistical analysis. n.s.; not significant.

#### 2-3-4. BA2786 または BA003 の摂食によるショウジョウバエ頭部の遺伝子発現変化

異なる菌を摂食したことによる表現型の差は、摂食によるハエの遺伝子発現の変化の差異による可能性がある。この仮定に基づき BA2786 の睡眠促進作用に関連する、ハエの遺伝子発現の変化を調べた。RNA シークエンシングを活用し、BA2786 または BA003 を摂食したハエ、および菌を含まない餌を摂食したハエの頭部のトランスクリプトームの特性を比較した。菌を含まない餌を摂食したハエと比較すると、発現量が2倍以上増加した ( $p < 0.05$ 、カイ二乗検定) 遺伝子の数は BA2786 摂取群で 70 個、BA003 摂取群で 58 個であった。また、発現量が低下した遺伝子の数は BA2786 摂取群で 50 個、BA003 摂取群で 38 個であった (Figure 2-9)。さらに、BA2786 を投与した群でのみ発現量が増加または低下した遺伝子は、それぞれ 34 個と 39 個であった (Figure 2-9、Table 2-2, 2-3)。BA2786 摂取群で発現上昇した遺伝子の一つにインスリン様受容体 (*Insulin-like receptor, InR*) があり、これはショウジョウバエの睡眠を促進する他の微生物、*Lactiplantibacillus plantarum* SBT2227 (第 1 章で睡眠促進作用を見出した乳酸菌、以下 LP2227 と呼ぶ) を投与したハエでも発現が上昇していた (Table 2-4, 2-5)。これらの結果より、私は *InR* に着目し、次に *InR* ヘテロ接合変異体を使用してハエの睡眠に対する BA2786 の影響を調べた。

本項は著者が実施した。



**Figure 2-9. Transcriptome-based analysis of the effects of BA2786 or BA003 in the fly head.**

(A, B) Venn diagram showing the number of genes whose expression level was changed relative to that in the control group. Genes with increased expression levels are shown in (A) and genes with decreased expression levels are shown in (B).

**Table 2-2.** Genes upregulated by the administration of BA2786 but not by that of BA003

Gene	Name	FLYBASE no.	mRNA expression level (relative to that in the control group)	
			BA2786	BA003
<i>cyclin B</i>		FBgn0000405	7.2	2.7
<i>G protein beta-subunit 13F</i>		FBgn0001105	2.4	1.1
<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>		FBgn0003067	2.2	1.7
<i>proliferating cell nuclear antigen</i>		FBgn0005655	8.0	3.0
<i>Odorant-binding protein 28a</i>		FBgn0011283	2.5	1.2
<i>cyclin B3</i>		FBgn0015625	3.0	2.2
<i>Pinocchio</i>		FBgn0016926	2.5	-1.0
<i>Odorant-binding protein 56a</i>		FBgn0034468	2.2	1.7
<i>Zye</i>		FBgn0036985	2.2	1.2
<i>meiosis regulator and mRNA stability factor 1</i>		FBgn0039972	2.6	2.2
<i>Attacin-B</i>		FBgn0041581	3.9	1.8
<i>Claspin</i>		FBgn0052251	3.4	1.3
<i>alpha-Tubulin at 67C</i>		FBgn0087040	2.9	-1.1
<i>uncoordinated 115b</i>		FBgn0260463	2.0	1.0
<i>pre-mod(mdg4)-C</i>		FBgn0266170	5.3	1.6
<i>Penduline</i>		FBgn0267727	6.7	2.6
<i>Insulin-like receptor</i>		FBgn0283499	2.1	1.0
<i>uncharacterized protein</i>		FBgn0028855	2.1	1.9
<i>uncharacterized protein</i>		FBgn0033374	2.3	1.6

<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0034440	2.3	-1.9
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0036979	5.3	3.3
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0037844	3.6	1.8
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0038099	3.4	2.0
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0051773	2.5	1.6
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0085194	2.3	1.9
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0264742	2.9	1.0
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0266434	3.2	1.7
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0266540	2.1	-2.6
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0267964	3.1	1.2
<i>small nucleolar RNA Me18S-G1358</i>	FBgn0286758	57.1	-1.1
<i>long non-coding RNA on the X 1</i>	FBgn0019661	2.7	1.3
<i>long non-coding RNA:CR44347</i>	FBgn0265447	3.2	1.1
<i>long non-coding RNA:CR45447</i>	FBgn0267003	4.7	3.9
<i>28S ribosomal RNA</i>	FBgn0267504	9.5	-1.7

---

**Table 2-3.** Genes downregulated by the administration of BA2786 but not by that of BA003

Gene	Name	FLYBASE no.	mRNA expression level (relative to that in the control group)	
			BA2786	BA003
	<i>small nuclear RNA U2 at 34AB a</i>	FBgn0004191	-6.6	-1.3
	<i>Corto</i>	FBgn0010313	-2.1	1.1
	<i>Chico</i>	FBgn0024248	-2.0	1.0
	<i>Turandot A</i>	FBgn0028396	-8.0	-1.0
	<i>chemosensory protein A 7a</i>	FBgn0029948	-4.3	-1.7
	<i>Turandot M</i>	FBgn0031701	-8.2	1.7
	<i>Hyccin</i>	FBgn0034269	-2.6	1.0
	<i>immune induced molecule 23</i>	FBgn0034328	-2.4	-2.0
	<i>Diedel</i>	FBgn0039666	-3.3	2.0
	<i>prolyl-4-hydroxylase-alpha NE1</i>	FBgn0039780	-4.4	-3.2
	<i>mediator complex subunit 26</i>	FBgn0039923	-2.5	1.1
	<i>Turandot X</i>	FBgn0044810	-2.2	1.3
	<i>Turandot C</i>	FBgn0044812	-17.5	1.0
	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E homologous protein</i>	FBgn0053100	-2.1	1.0
	<i>p24-related-2</i>	FBgn0053105	-19.1	-1.1
	<i>nimrod C4</i>	FBgn0260011	-2.6	-1.3
	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 3</i>	FBgn0263048	-2.4	-1.7
	<i>pre-mod(mdg4)-K</i>	FBgn0266173	-3.2	-2.6

<i>nicotinic acetylcholine receptor alpha4</i>	FBgn0266347	-2.4	1.1
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0000092	-2.3	-1.7
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0034515	-4.1	-1.6
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0035228	-4.5	-1.1
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0039945	-2.2	1.4
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0040637	-2.1	-1.4
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0050154	-2.8	-2.0
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0051806	-12.6	-2.1
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0051875	-6.2	-1.1
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0085193	-7.4	-1.4
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0085246	-8.6	-2.9
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0259202	-4.0	-1.1
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0259699	-2.9	-1.7
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0259709	-11.9	-1.4
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0259933	-2.8	-1.8
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0259989	-6.5	-2.7
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0260222	-5.0	-1.7
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0264743	-3.1	1.0
<i>long non-coding RNA:CR33987</i>	FBgn0053987	-4.1	-1.3
<i>long non-coding RNA:CR45204</i>	FBgn0266731	-5.2	-1.6
<i>pre-ribosomal RNA</i>	FBgn0267507	-318.9	-1.7

---

**Table 2-4.** Genes upregulated by the administration of LP2227 but not by that of BA003

Gene	name	FLYBASE no.	mRNA expression levels (relative to the control group)		p-value with Bonferroni correction	
			LP2227	BA003	LP2227	BA003
	<i>G protein beta-subunit 13F</i>	FBgn0001105	2.3	1.1	0.00	1.00
	<i>heat shock 70-kDa protein cognate 3</i>	FBgn0001218	2.1	1.0	0.00	1.00
	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	FBgn0005655	4.3	3.0	0.01	0.24
	<i>Odorant-binding protein 56a</i>	FBgn0034468	3.0	1.7	0.00	0.16
	<i>SCP-containing protein C</i>	FBgn0037879	2.6	2.0	0.03	0.49
	<i>snoRNA:Psi28S-1175c</i>	FBgn0083003	9.0	5.8	0.04	0.36
	<i>lemming B</i>	FBgn0085470	7.6	1.0	0.00	1.00
	<i>modigliani</i>	FBgn0261019	121.2	-1.1	0.00	1.00
	<i>pre-mod(mdg4)-J</i>	FBgn0266176	11.4	7.6	0.00	0.08
	<i>antisense RNA:CR45928</i>	FBgn0267590	10.4	-1.1	0.01	1.00
	<i>Insulin-like receptor</i>	FBgn0283499	2.3	1.0	0.00	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0030797	5.4	1.3	0.00	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0033693	12.7	-23.6	0.00	0.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0036856	9.5	-1.7	0.00	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0038160	3.1	1.7	0.00	0.06
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0085194	2.6	1.9	0.00	0.06
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0260238	14.3	2.3	0.00	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0260760	2.4	1.8	0.01	0.32
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0262102	3.4	-1.8	0.04	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0266490	7.7	-1.3	0.00	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0266540	2.0	-2.6	0.05	0.03
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0284223	2.0	-1.4	0.00	1.00
	<i>long non-coding RNA on the X 1</i>	FBgn0019661	6.6	1.3	0.00	1.00
	<i>long non-coding RNA:CR43334</i>	FBgn0286827	4.8	2.8	0.00	0.11
	<i>28S ribosomal RNA</i>	FBgn0267504	25.1	-1.7	0.00	0.02
	<i>28S ribosomal RNA pseudogene</i>	FBgn0267508	2.0	-1.5	0.00	0.53
	.	FBgn0013672	3.2	1.9	0.00	0.00

**Table 2-5.** Genes downregulated by the administration of LP2227 but not by that of BA003

Gene	name	FLYBASE no.	mRNA expression levels (relative to the control group)		p-value with Bonferroni correction	
			LP2227	BA003	LP2227	BA003
	<i>almondex</i>	FBgn0000077	-4.3	-1.1	0.00	1.00
	<i>abnormal spindle</i>	FBgn0000140	-9.5	-1.3	0.02	1.00
	<i>easter</i>	FBgn0000533	-2.2	-1.1	0.00	1.00
	<i>heat shock protein 22</i>	FBgn0001223	-19.0	1.1	0.00	1.00
	<i>drosocin</i>	FBgn0010388	-3.4	1.0	0.00	1.00
	<i>metchnikowin</i>	FBgn0014865	-2.5	1.2	0.00	1.00
	<i>dissatisfaction</i>	FBgn0015381	-2.7	-2.5	0.03	0.06
	<i>obstructor-B</i>	FBgn0027600	-3.0	-1.4	0.03	1.00
	<i>turandot A</i>	FBgn0028396	-4.0	-1.0	0.00	1.00
	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) MNLL subunit</i>	FBgn0029971	-5.4	-1.0	0.00	1.00
	<i>turandot M</i>	FBgn0031701	-5.1	1.7	0.00	0.03
	<i>immune induced molecule 23</i>	FBgn0034328	-2.2	-2.0	0.00	0.01
	<i>ammonium transporter</i>	FBgn0038309	-6.1	-2.0	0.01	0.81
	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E6</i>	FBgn0039622	-2.7	1.5	0.05	1.00
	<i>diedel</i>	FBgn0039666	-6.2	2.0	0.00	0.18
	<i>prolyl-4-hydroxylase-alpha NE1</i>	FBgn0039780	-4.1	-3.2	0.04	0.14
	<i>carbonic anhydrase 5</i>	FBgn0040629	-2.5	1.5	0.00	0.52
	<i>turandot X</i>	FBgn0044810	-2.5	1.3	0.00	1.00
	<i>turandot C</i>	FBgn0044812	-7.6	1.0	0.00	1.00
	<i>SWIM domain containing Srs2 interacting protein 1</i>	FBgn0085343	-31.2	-3.1	0.00	0.14
	<i>lemming A</i>	FBgn0250903	-3.7	1.2	0.00	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0031673	-2.1	-1.8	0.00	0.01
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0036481	-2.0	-1.1	0.02	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0039479	-3.5	1.1	0.00	1.00
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0039945	-2.4	1.4	0.00	0.85
	<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0050054	-3.9	1.0	0.00	1.00



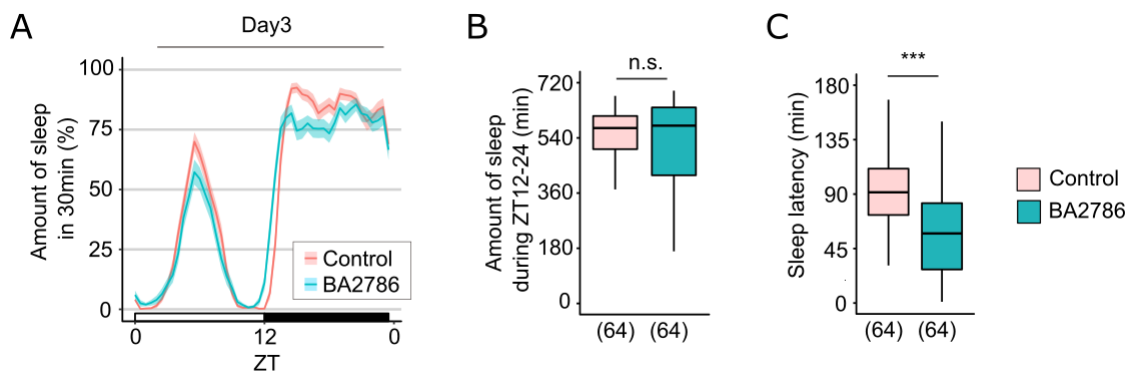
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0050274	-5.9	1.3	0.00	1.00
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0051274	-16.0	1.1	0.00	1.00
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0053964	-10.1	1.2	0.00	1.00
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0061360	-4.5	-1.0	0.00	1.00
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0259709	-2.8	-1.4	0.00	1.00
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0259720	-9.9	1.1	0.00	1.00
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0260222	-22.3	-1.7	0.00	1.00
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0262881	-4.6	2.0	0.01	0.23
<i>uncharacterized protein</i>	FBgn0266488	-21.5	2.2	0.00	0.00
<i>long non-coding RNA:CR33987</i>	FBgn0053987	-5.1	-1.3	0.02	1.00
<i>long non-coding RNA:CR44133</i>	FBgn0264982	-2.4	-1.0	0.00	1.00
<i>long non-coding RNA:CR45204</i>	FBgn0266731	-4.5	-1.6	0.00	0.40
<i>long non-coding RNA:CR45215</i>	FBgn0266742	-5.1	-2.7	0.04	0.47
<i>pre-ribosomal RNA</i>	FBgn0267507	-153.5	-1.7	0.00	0.02

---

### 2-3-5. BA2786 の睡眠促進作用発現には insulin-like receptor が必要

*InR* ヘテロ接合変異体や、ドミナントネガティブな形態の *InR* を発現したハエも、昼夜それぞれで眠る実験環境下におけるショウジョウバエの典型的な二相性の睡眠パターンを示すことがこれまでに報告されている (Cong et al., 2015; Yamaguchi et al., 2022)。そのため、少なくとも *InR* の機能が低下したショウジョウバエも、睡眠の基本的な機構を保持していると考えられる。そこで、BA2786 の睡眠促進作用における *InR* の関与を調査するため、BA2786 を *InR* ヘテロ接合変異体 (*InR<sup>E19</sup>/+*) に投与して睡眠行動を観察した。その結果、*InR<sup>E19</sup>/+* ハエにおいて、BA2786 の投与は夜間睡眠量を増加させなかった (Figure 2-10A and B)。一方、興味深いことに BA2786 は *InR<sup>E19</sup>/+* ハエでも睡眠潜時を有意に短縮させた (Figure 2-10C)。これらの結果より、*InR* は BA2786 の睡眠促進作用全体にはではなく、夜間睡眠量など一部の行動に限定的に影響していることが示唆された。

本項は著者が実施した。



**Figure 2-10. The effect of *InR* in the sleep-promoting effects of BA2786.**

(A) Sleep patterns on the third day of flies fed control (red) or BA2786 (green) food. Sleep patterns are indicated as mean  $\pm$  SEM. (B) Amount of sleep during ZT12–24 and (C) sleep latency on the third day. The sample sizes are shown below each graph. The Wilcoxon–Mann–Whitney test was used for statistical analysis. \*\*\* $p < .001$ ; n.s., not significant.

## 2-4. 考察

ショウジョウバエを用いたハイスループットな睡眠評価システムを活用し (Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000)、本研究では乳酸菌とビフィズス菌計 39 種類について睡眠促進作用を評価した。その結果、*Streptococcus* と *Lactococcus*、*Weissella* は評価した菌種いずれにおいても睡眠を有意に促進する作用は認められなかった。このうち *Weissella* の 2 種は有意ではないものの、わずかに睡眠量を増加させていたことから、今回我々が実施したラージスケールなスクリーニングにおいては作用が検出できなかったのだと考えられる。一方、*Streptococcus* と *Lactococcus* はハエの睡眠に対する影響は認められず、睡眠を促進する作用が弱いことが示唆された。

対照的に、*B. adolescentis* (BA2786)、*B. pseudocatenulatum*、*Lentilactobacillus parabuhneri*、*Ligilactobacillus salivarius*、*Limosilactobacillus reuteri*、および *Lactobacillus helveticus* は、有意に睡眠量を増加させた。興味深いことに、これらの微生物は遺伝的に近いわけではない。同様に、*Bifidobacterium* の中でも、BA2786 は睡眠を促進させたが *B. bifidum* は促進させない。さらに、*B. adolescentis* 内でも、BA2786 は睡眠を促進させたが BA003 は促進させなかった。つまり微生物の睡眠促進効果は、*Streptococcus* のように属レベルで効果が弱いだらう属も存在するが、特定の微生物群で進化的に保存された表現型ではなく、さまざまな微生物の属、種、株に広く分布していると考えられる。

BA2786 は夜間の睡眠を促進した一方、日中の行動にはあまり影響を与えなかった。さらに BA2786 は、睡眠潜時を有意に短縮させ、夜間の睡眠バウトの長さや回数や日中の活動指数は変化させなかった。これらの特徴は、LP2227 投与後のハエの睡眠行動に似ている (Ko et al., 2022)。ハエの睡眠は朝の睡眠と夕方の睡眠、夜間開始時の入眠、夜間後半の睡眠などいくつかの現象に分類でき、それぞれは異なるメカニズムによって調節されている (Agosto et al., 2008; Gmeiner et al., 2013; Xitong Liang et al., 2019)。BA2786 と LP2227 がショウジョウバエの睡眠に類似した表現型の引き起こすことは、これら 2 つの微生物がショウジョウバエの睡眠調節メカニズムの共通した部分に作用する可能性と、作用するメカニズムは異なるが偶然表現型が類似した可能性がある。さらに BA2786 と LP2227 の表現型の類似性を投与した微生物側から見ると、こちらも 2 つの可能性があり、1 つは菌ごとに活性物質が異なるが偶然類似した表現型を発現させる、もう 1 つは菌種が異なっても活性物質は同じである可能性である。睡眠促進作用を示す活性成分の同定は非常に興味深いテーマだが、本研究は BA2786 によるハエの睡眠調節のメカニズムに焦点を当てているため今回は実施しなかった。

作用メカニズムに焦点を当てた研究の中で、私は今回 BA2786 の投与により頭部の *InR* の発現亢進を見出した。Cong らは、*InR* 変異ショウジョウバエが野生型ハエよりも睡眠が少ないこと、*InR* の *Gal4* ドライバー系統である *GMR28E02-gal4* 系統を用いた機能獲得型の *InR* の過剰発現が親系統よりも睡眠の増加を引き起こすことを報告した (Cong et al., 2015)。Yamaguchi らは、脳内の概日ニューロンの 1 つである anterior dorsal neuron group 1 (DN1a)

と、概日ニューロンの出力領域の1つである *pars intercerebralis* (PI) におけるドミナントネガティブ型の *InR* の発現が、睡眠の減少を引き起こすことを報告した(Yamaguchi et al., 2022)。これらの結果は、BA2786 で観察された *InR* 発現の増加がハエの睡眠の促進に寄与している可能性を支持するものである。インスリン経路は、ショウジョウバエと哺乳類で非常に似ている (Álvarez-Rendón et al., 2018)。例えば、ヒトとハエのインスリン受容体において、対応する位置でアミノ酸が置換されると成長遅延を引き起こす (Brogiolo et al., 2001)。また、睡眠調節機構もヒトとハエで類似している。そのため、BA2786 がヒトのインスリンシグナル伝達にも作用した場合、ヒトでも睡眠を促進することが期待できる。

興味深いことに、BA2786 の睡眠促進効果のうち、野生型のハエで観察される睡眠量の増加は *InR* ヘテロ接合変異体では現れないが、睡眠潜時の短縮は両系統ともに観察された。これは、*InR* は直接的または間接的に睡眠量の増加に関与しているが、睡眠潜時の短縮には関与していないことを示している。このことは、野生型と *InR* ヘテロ接合変異体で BA2786 投与による睡眠潜時の短縮度合いに有意な差が無かったことから検証できた (**Figure 2-2D** の3日目夜のデータと **Figure 2-10C** のデータを比較した (two-factor aligned rank transform ANOVA、 $F(1, 316)=0.067$ 、 $p=0.80$ ))。つまり、睡眠潜時の短縮は、*InR* とは独立したメカニズムによって調節されている可能性が高い。

*InR* の睡眠への影響は発現部位によって異なる (Yamaguchi et al., 2022)。さらに、インスリンシグナル伝達は、FOXO による日中の活動の促進や、S6K による夜間の睡眠時間の短縮と睡眠の強化など、複数の経路を通じて睡眠/覚醒行動に異なる影響を与える (Metaxakis et al., 2014)。したがって、BA2786 の睡眠促進効果のメカニズムを解明するには、脳領域毎に、*InR* とその下流シグナルの睡眠に対する関与について詳細な研究が必要である。また、トランスクリプトーム解析により、BA2786 を与えられたハエでは *InR* の発現量が上昇し、その標的分子である *chico* の発現量は減少した。対照的に、LP2227 を与えられたハエでは *InR* の発現量が上昇し、*chico* の発現量は変化しなかった。これらの違いがあるにもかかわらず、ハエの睡眠行動に対する BA2786 と LP2227 の効果は類似していた。CHICO は *InR* によってリン酸化され、下流にシグナルを伝達する (Poltlove et al., 2000)。したがって、BA2786 の投与によって *chico* の発現が低下したとしても、下流のシグナル伝達に十分な量の CHICO が利用可能であった可能性はある。しかし、CHICO とは独立した経路を介した *InR* による睡眠行動の調節機構が存在するなど、他の可能性もある。今後、*InR* の下流シグナルの影響を調べることで、CHICO が睡眠調節にどのように関与しているかを明らかできるだろう。

BA2786 と BA003 を投与したハエのトランスクリプトームを比較すると、*InR* に加えて、*cyclin B*、*cyclin B3*、*proliferating cell nuclear antigen*、および *claspin* を含む、細胞周期に関連する遺伝子の発現が、BA2786 を与えられたハエで増加することが示された。ただし、睡眠を促進することが報告されている他の細胞周期調節因子である *cyclin A* は (Rogulja & Young, 2012)、本研究では発現量の変化は認められなかった。そのため、これら変化が見られた細胞周期関連遺伝子が BA2786 の睡眠促進効果に関与している可能性はあるものの、更なる検

証が必要である。対照的に、*Turandot* ファミリーに属する遺伝子は BA2786 を与えられたハエで発現が減少した。*Turandot* ファミリーの遺伝子は体液性ストレス応答因子と考えられており、例えば *Turandot A* は熱ストレス、細菌感染、拘束ストレスなど、さまざまなストレスによって発現が増加する (Ekengren & Hultmark, 2001; Seong et al., 2020)。ヒトでは、睡眠不足はストレスホルモンのコルチゾールを上昇させる (Leproult & Van Cauter, 2010)。対照的に、十分な睡眠はストレスホルモンのレベルを低下させる。従って、この研究で観察された BA2786 投与による *Turandot* ファミリー遺伝子の発現低下は、BA2786 を介した睡眠促進による結果起こった現象の可能性はある。

本研究では、睡眠促進作用の大きい菌株と小さい菌株を用い、睡眠促進作用に関与する可能性のある遺伝子を体系的に調査した。BA2786 と LP2227 のように、ハエの睡眠行動に対する影響は似ていたとしても、作用機序が異なる場合があることを明らかにした。今後、本研究で見出したインスリンシグナルと睡眠の関係に焦点を当てることで、睡眠に対する微生物の作用メカニズムをより深く理解できるようになるだろう。

## 総括

本研究では、モデル生物であるキロショウジョウバエを用い、ヒトの生活に密接に関わっている乳酸菌とビフィズス菌について、睡眠に対する影響とその作用機序について検討した。第1章では、腸内細菌と睡眠の関係に着目して *L. plantarum* を研究材料として選択し、その一つの菌株である LP2227 がハエの睡眠を促進すること、作用の発現に腸への定着は必須ではないことを見出した。具体的な成分まで特定することはできなかったが、破碎上清も、121°Cで15分というオートクレーブ処理をした死菌体もハエの睡眠を促進させたことから、熱安定性の高い細胞質又は細胞質基質に存在する物質が有効成分であると考えられた。また、ハエ側の作用機序については、腸のトランスクリプトーム解析の結果をもとに検討し、神経ペプチドの一つである NPF が LP2227 の作用発現に必要であることを見出した。

仮に同じようにハエの睡眠を促進する異なる種の菌、あるいは同種であってもハエの睡眠への影響が異なる菌を見いだせれば、作用機序や有効成分の特定に活用できる。このような考えに基づき、私は第2章において39種類もの乳酸菌、ビフィズス菌についてショウジョウバエの睡眠に及ぼす影響を調べ、第1章で検討した LP2227 と類似した、しかしより強い睡眠促進作用を示す *B. adolescentis* SBT2786 を見出した。さらに、*B. adolescentis* に属するものの、睡眠促進作用が弱い菌株 BA003 を見出した。これらを活用し、*InR* が BA2786 の夜間全体の睡眠量増加に関与していることを見出した。一方、夜間開始時の睡眠潜時短縮には関与していないことも分かった。

本研究は、主にショウジョウバエ側の作用機序に着目して進めたため、有効成分について深く調べていない。そのため、有効成分が単一成分であるか、複数成分であるか分かっていない。ハエの睡眠は朝の睡眠と夕方の睡眠、夜間開始時の入眠、夜間後半の睡眠などいくつかの現象に分類でき、それぞれは異なるメカニズムによって調節されていることを踏まえると (Agosto et al., 2008; Gmeiner et al., 2013; Xitong Liang et al., 2019)、本研究で見出した2つの菌はどちらも夜間開始時の入眠と夜間全体の睡眠量を調節しているため、ハエの複数の睡眠調節機構に作用していると考えられる。第2章において *InR* が BA2786 の夜間睡眠量の増加にのみ関与していたことも併せて考えると、菌が有する複数の成分の作用によりハエの睡眠が促進したと考えるのが妥当だろう。今後、菌が有する成分の比較解析を行うことで有効成分が同定されることを期待する。

今回作用機序を調べる中で関与を見出した *NPF* と *InR* は、どちらもオルソログがヒトに存在する。しかし、ショウジョウバエにおいてもヒトを含む哺乳類においても、それぞれが睡眠をどのように制御しているか明確にはされていない。今後、ショウジョウバエにおける LP2227 と BA2786 の作用機序と有効成分の特定及び *NPF* と *InR* が睡眠を制御する機構の解明が進むことにより、哺乳類におけるこれら乳酸菌、ビフィズス菌の有効性や作用機序及びこれまで明らかになっていない睡眠制御機構の解明が期待される。

なお、本研究には以下の限界がある。まず、第2章において実施した微生物39種のスク

リーニングにおいて、ハエに投与した微生物は一定量の培地で培養して得た菌全量であり、その菌数は投与した微生物間で一致していない。そのため睡眠促進作用が菌の質によるものか、菌の数によるものかを判断できない。次に、第1章と2章共に共通するものとして、雌のハエのみを試験に使用したことがある。これは、雄が雌よりもよく眠るため、微生物の睡眠促進作用を評価する系として使用することが困難なためである。しかし、NPFの発現やインスリンシグナル活性は性別によって異なることが知られているため (Lee et al., 2006; Millington et al., 2021)、性差を越えて本研究を一般化することはまだできない。NFPやインスリンシグナルなどの作用機序を更に深耕する将来の研究が、この限界に対処する一つの方法だろう。

年々、動物愛護の動きが高まっている。日本においても動物の愛護及び管理に関する法律において、動物を科学上の利用に供する場合において、動物に代わる代替法の利用 (Replacement)、使用動物数の削減 (Reduction)、実験動物の苦痛度軽減 (Refinement) の、いわゆる 3Rs の原則が示されている。本研究は、動物愛護の対象であるマウスやラット等の哺乳類ではなく、キイロショウジョウバエを用いて行った。睡眠に関する研究を推進する上でショウジョウバエは、広い飼育スペースが不要、世代交代が早い、多くの個体を簡単に入手可能、遺伝学的実験ツールが豊富、睡眠に関する知見が蓄積しているといったメリットが多数ある。実際に、キイロショウジョウバエを用いることで、私は39種類もの乳酸菌・ビフィズス菌のスクリーニングを比較的短期間で実現することができ、作用機序の一端も明らかにすることが出来た。しかし、これら実験上のメリットのみでなく、動物愛護の観点も踏まえて私はショウジョウバエを使用した。私の最終的な目的は、人々の睡眠における課題を一部でも解決する事である。ショウジョウバエを用いて、ショウジョウバエとヒトとで共通する睡眠制御機構に作用する乳酸菌・ビフィズス菌を見出すことで、従来多くの研究で行われていたげっ歯類等を用いた実験を削減が可能となるだろう。本研究は、そのような視点でも参考にして頂ければ幸いである。

### 利益相反の開示

本研究の著者は雪印メグミルク株式会社の社員であり、本研究は雪印メグミルク株式会社が東海大学機構名古屋大学に開設した産学共同研究講座「栄養神経科学講座」で実施された。



## 参考文献

- Agosto, J., Choi, J. C., Parisky, K. M., Stilwell, G., Rosbash, M., & Griffith, L. C. (2008). Modulation of GABAA receptor desensitization uncouples sleep onset and maintenance in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, *11*(3), 354–359. <https://doi.org/10.1038/nn2046>
- Akanmu, M. A., Ukponmwan, O. E., Katayama, Y., & Honda, K. (2006). Neuropeptide-Y Y2-receptor agonist, PYY3-36 promotes non-rapid eye movement sleep in rat. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.11.006>
- Álvarez-Rendón, J. P., Salceda, R., & Riesgo-Escovar, J. R. (2018). *Drosophila melanogaster* as a model for diabetes type 2 progression. *BioMed Research International*, *2018*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2018/1417528>
- Ameku, T., Yoshinari, Y., Texada, M. J., Kondo, S., Amezawa, K., Yoshizaki, G., Shimada-Niwa, Y., & Niwa, R. (2018). Midgut-derived neuropeptide F controls germline stem cell proliferation in a mating-dependent manner. *PLoS Biology*, *16*(9), e2005004. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005004>
- Andretic, R., & Shaw, P. J. (2005). Essentials of sleep recordings in *Drosophila*: Moving beyond sleep time. *Methods in Enzymology*, *393*(February), 759–772. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)93040-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)93040-1)
- Antonijevic, I. A., Murck, H., Bohlhalter, S., Frieboes, R. M., Holsboer, F., & Steiger, A. (2000). Neuropeptide Y promotes sleep and inhibits ACTH and cortisol release in young men. *Neuropharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00057-5)
- Atkin, T., Comai, S., & Gobbi, G. (2018). Drugs for insomnia beyond benzodiazepines: pharmacology, clinical applications, and discovery. *Pharmacological Reviews*, *70*(2), 197–245. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014381>
- Barathikannan, K., Chelliah, R., Rubab, M., Daliri, E. B.-M., Elahi, F., Kim, D.-H., Agastian, P., Oh, S.-Y., & Oh, D. H. (2019). Gut microbiome modulation based on probiotic application for anti-obesity: A review on efficacy and validation. *Microorganisms*, *7*(10), 456. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100456>
- Brandt, J., & Leong, C. (2017). Benzodiazepines and Z-drugs: An updated review of major adverse outcomes reported on in epidemiologic research. *Drugs in R&D*, *17*(4), 493–507. <https://doi.org/10.1007/s40268-017-0207-7>
- Broderick, N. A., & Lemaitre, B. (2012). Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. *Gut Microbes*, *3*(4), 307–321. <https://doi.org/10.4161/gmic.19896>
- Broggiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., & Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology*, *11*(4), 213–221. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00068-9)
- Brown, M. R., Crim, J. W., Arata, R. C., Cai, H. N., Chun, C., & Shen, P. (1999). Identification of a

- Drosophila brain-gut peptide related to the neuropeptide Y family. *Peptides*, 20(9), 1035–1042.  
[https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(99\)00097-2](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(99)00097-2)
- Cappuccio, F. P., & Miller, M. A. (2017). Sleep and Cardio-Metabolic Disease. *Current Cardiology Reports*, 19(11), 110. <https://doi.org/10.1007/s11886-017-0916-0>
- Chandler, J. A., Lang, J. M., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., & Kopp, A. (2011). Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genetics*, 7(9), e1002272. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002272>
- Chaput, J.-P., McHill, A. W., Cox, R. C., Broussard, J. L., Dutil, C., da Costa, B. G. G., Sampasa-Kanyinga, H., & Wright, K. P. (2023). The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity. *Nature Reviews. Endocrinology*, 19(2), 82–97. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00747-7>
- Chen, Ji, Kim, S.-M., & Kwon, J. Y. (2016). A systematic analysis of *Drosophila* regulatory peptide expression in enteroendocrine cells. *Molecules and Cells*, 39(4), 358–366.  
<https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0014>
- Chen, Jiangtian, Reiher, W., Hermann-Luibl, C., Sellami, A., Cognigni, P., Kondo, S., Helfrich-Förster, C., Veenstra, J. A., & Wegener, C. (2016). Allatostatin A signalling in *Drosophila* regulates feeding and sleep and is modulated by PDF. *PLoS Genetics*, 12(9), e1006346.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006346>
- Chung, B. Y., Ro, J., Hutter, S. A., Miller, K. M., Guduguntla, L. S., Kondo, S., & Pletcher, S. D. (2017). *Drosophila* neuropeptide F signaling independently regulates feeding and sleep-wake behavior. *Cell Reports*, 19(12), 2441–2450. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.085>
- Cong, X., Wang, H., Liu, Z., He, C., An, C., & Zhao, Z. (2015). Regulation of sleep by insulin-like peptide system in *Drosophila melanogaster*. *Sleep*, 38(7), 1075–1083.  
<https://doi.org/10.5665/sleep.4816>
- Díaz, M. M., Schlichting, M., Abruzzi, K. C., Long, X., & Rosbash, M. (2019). Allatostatin-C/AstC-R2 is a novel pathway to modulate the circadian activity pattern in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 29(1), 13-22.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.005>
- Dierick, H. A., & Greenspan, R. J. (2007). Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression. *Nature Genetics*, 39(5), 678–682. <https://doi.org/10.1038/ng2029>
- Ekengren, S., & Hultmark, D. (2001). A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(4), 998–1003.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5067>
- Erkosar, B., Storelli, G., Defaye, A., & Leulier, F. (2013). Host-intestinal microbiota mutualism: “Learning on the fly.” *Cell Host & Microbe*, 13(1), 8–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.004>
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G\*Power 3: a flexible statistical power

- analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2), 175–191. <https://doi.org/10.3758/bf03193146>
- Fernandez-Chiappe, F., Hermann-Luibl, C., Peteranderl, A., Reinhard, N., Senthilan, P. R., Hieke, M., Selcho, M., Yoshii, T., Shafer, O. T., Muraro, N. I., & Helfrich-Förster, C. (2020). Dopamine signaling in wake-promoting clock neurons is not required for the normal regulation of sleep in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 40(50), 9617–9633. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1488-20.2020>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T., & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*, 332(6167), 853–856. <https://doi.org/10.1038/332853a0>
- Fujiwara, Y., Hermann-Luibl, C., Katsura, M., Sekiguchi, M., Ida, T., Helfrich-Förster, C., & Yoshii, T. (2018). The CCHamide1 neuropeptide expressed in the anterior dorsal neuron 1 conveys a circadian signal to the ventral lateral neurons in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 9, 1276. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01276>
- Garczynski, S. F., Brown, M. R., Shen, P., Murray, T. F., & Crim, J. W. (2002). Characterization of a functional neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Peptides*, 23(4), 773–780. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(01\)00647-7](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(01)00647-7)
- Geissmann, Q., Rodriguez, L. G., Beckwith, E. J., & Gilestro, G. F. (2019). Rethomics: An R framework to analyse high-throughput behavioural data. *PLoS ONE*, 14(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209331>
- Gmeiner, F., Kołodziejczyk, A., Yoshii, T., Rieger, D., Nässel, D. R., & Helfrich-Förster, C. (2013). GABAB receptors play an essential role in maintaining sleep during the second half of the night in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 216(20), 3837–3843. <https://doi.org/10.1242/jeb.085563>
- Guo, X., Yin, C., Yang, F., Zhang, Y., Huang, H., Wang, J., Deng, B., Cai, T., Rao, Y., & Xi, R. (2019). The cellular diversity and transcription factor code of *Drosophila* enteroendocrine cells. *Cell Reports*, 29(12), 4172–4185.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.048>
- Hafner, M., Stepanek, M., Taylor, J., Troxel, W. M., & van Stolk, C. (2017). Why sleep matters-The economic costs of insufficient sleep: A cross-country comparative analysis. *Rand Health Quarterly*, 6(4), 11. <https://doi.org/10.7249/RR1791>
- He, C., Yang, Y., Zhang, M., Price, J. L., & Zhao, Z. (2013). Regulation of sleep by neuropeptide Y-like system in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074237>
- Held, K., Antonijevic, I., Murck, H., Kuenzel, H., & Steiger, A. (2006). Neuropeptide Y (NPY) shortens sleep latency but does not suppress ACTH and cortisol in depressed patients and normal controls.

- Psychoneuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.05.015>
- Hendricks, J. C., Finn, S. M., Panckeri, K. A., Chavkin, J., Williams, J. A., Sehgal, A., & Pack, A. I. (2000). Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*, *25*(1), 129–138. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80877-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80877-6)
- Hermann, C., Yoshii, T., Dusik, V., & Helfrich-Förster, C. (2012). Neuropeptide F immunoreactive clock neurons modify evening locomotor activity and free-running period in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*, *520*(5), 970–987. <https://doi.org/10.1002/cne.22742>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hu, Y., Sopko, R., Foos, M., Kelley, C., Flockhart, I., Ammeux, N., Wang, X., Perkins, L., Perrimon, N., & Mohr, S. E. (2013). FlyPrimerBank: An online database for *Drosophila melanogaster* gene expression analysis and knockdown evaluation of RNAi reagents. *G3 & Genes/Genomes/Genetics*, *3*(9), 1607–1616. <https://doi.org/10.1534/g3.113.007021>
- Huber, R., Hill, S. L., Holladay, C., Biesiadecki, M., Tononi, G., & Cirelli, C. (2004). Sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Sleep*, *27*(4), 628–639.
- Hung, R.-J., Hu, Y., Kirchner, R., Liu, Y., Xu, C., Comjean, A., Tattikota, S. G., Li, F., Song, W., Ho Sui, S., & Perrimon, N. (2020). A cell atlas of the adult *Drosophila* midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(3), 1514–1523. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916820117>
- Itani, O., Kaneita, Y., Munezawa, T., Mishima, K., Jike, M., Nakagome, S., Tokiya, M., & Ohida, T. (2016). Nationwide epidemiological study of insomnia in Japan. *Sleep Medicine*, *25*, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2016.05.013>
- Jia, Y., Jin, S., Hu, K., Geng, L., Han, C., Kang, R., Pang, Y., Ling, E., Tan, E. K., Pan, Y., & Liu, W. (2021). Gut microbiome modulates *Drosophila* aggression through octopamine signaling. *Nature Communications*, *12*(1), 2698. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23041-y>
- Jolicoeur, F. B., Michaud, J. N., Rivest, R., Menard, D., Gaudin, D., Fournier, A., & St-Pierre, S. (1991). Neurobehavioral profile of neuropeptide Y. *Brain Research Bulletin*. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90237-E](https://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90237-E)
- Jones, R. M., Luo, L., Ardita, C. S., Richardson, A. N., Kwon, Y. M., Mercante, J. W., Alam, A., Gates, C. L., Wu, H., Swanson, P. A., Lambeth, J. D., Denning, P. W., & Neish, A. S. (2013). Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *The EMBO Journal*, *32*(23), 3017–3028. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.224>
- Keene, A. C., & Duboue, E. R. (2018). The origins and evolution of sleep. *Journal of Experimental*

- Biology*, 221(11), jeb159533. <https://doi.org/10.1242/jeb.159533>
- Ko, T., Murakami, H., Kamikouchi, A., & Ishimoto, H. (2022). Biogenic action of *Lactobacillus plantarum* SBT2227 promotes sleep in *Drosophila melanogaster*. *iScience*, 25(7), 104626. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104626>
- Koh, K., Evans, J. M., Hendricks, J. C., & Sehgal, A. (2006). A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep:wake cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13843–13847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605903103>
- Krashes, M. J., DasGupta, S., Vreede, A., White, B., Armstrong, J. D., & Waddell, S. (2009). A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell*, 139(2), 416–427. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.035>
- Krueger, J. M., Pappenheimer, J. R., & Karnovsky, M. L. (1982). Sleep-promoting effects of muramyl peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(19), 6102–6106. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.6102>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kume, K., Kume, S., Park, S. K., Hirsh, J., & Jackson, F. R. (2005). Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *The Journal of Neuroscience*, 25(32), 7377–7384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2048-05.2005>
- Kunst, M., Hughes, M. E., Raccuglia, D., Felix, M., Li, M., Barnett, G., Duah, J., & Nitabach, M. N. (2014). Calcitonin gene-related peptide neurons mediate sleep-specific circadian output in *Drosophila*. *Current Biology : CB*, 24(22), 2652–2664. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.077>
- Kuo, T.-H., Pike, D. H., Beizaeipour, Z., & Williams, J. A. (2010). Sleep triggered by an immune response in *Drosophila* is regulated by the circadian clock and requires the NFkappaB Relish. *BMC Neuroscience*, 11, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-17>
- Lee, G., Bahn, J. H., & Park, J. H. (2006). Sex- and clock-controlled expression of the neuropeptide F gene in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12580–12585. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601171103>
- Leitão-Gonçalves, R., Carvalho-Santos, Z., Francisco, A. P., Fioreze, G. T., Anjos, M., Baltazar, C., Elias, A. P., Itskov, P. M., Piper, M. D. W., & Ribeiro, C. (2017). Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLoS Biology*, 15(4), e2000862. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000862>
- Leproult, R., & Van Cauter, E. (2010). Role of sleep and sleep loss in hormonal release and metabolism. *Endocrine Development*, 17, 11–21. <https://doi.org/10.1159/000262524>
- Liang, X., Holy, T. E., & Taghert, P. H. (2016). Synchronous *Drosophila* circadian pacemakers display nonsynchronous Ca<sup>2+</sup> rhythms in vivo. *Science*, 351(6276), 976–981.

- <https://doi.org/10.1126/science.aad3997>
- Liang, Xitong, Ho, M. C. W., Zhang, Y., Li, Y., Wu, M. N., Holy, T. E., & Taghert, P. H. (2019). Morning and evening circadian pacemakers independently drive premotor centers via a specific dopamine relay. *Neuron*, *102*(4), 843-857.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.028>
- Liu, W., Ganguly, A., Huang, J., Wang, Y., Ni, J. D., Gurav, A. S., Aguilar, M. A., & Montell, C. (2019). Neuropeptide F regulates courtship in *Drosophila* through a male-specific neuronal circuit. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.49574>
- Ly, S., Pack, A. I., & Naidoo, N. (2018). The neurobiological basis of sleep: Insights from *Drosophila*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *87*, 67–86. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.01.015>
- McFarland, L. V., Evans, C. T., & Goldstein, E. J. C. (2018). Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*, *5*, 124. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00124>
- Metaxakis, A., Tain, L. S., Grönke, S., Hendrich, O., Hinze, Y., Birras, U., & Partridge, L. (2014). Lowered insulin signalling ameliorates age-related sleep fragmentation in *Drosophila*. *PLoS Biology*, *12*(4), e1001824. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001824>
- Metchnikoff, E. (1907). *Essais optimistes*. Paris, A. Maloine.
- Millington, J. W., Brownrigg, G. P., Chao, C., Sun, Z., Basner-Collins, P. J., Wat, L. W., Hudry, B., Miguel-Aliaga, I., & Rideout, E. J. (2021). Female-biased upregulation of insulin pathway activity mediates the sex difference in *Drosophila* body size plasticity. *ELife*, *10*, e58341. <https://doi.org/10.7554/eLife.58341>
- Mitsuoka, T. (2000). Significance of Dietary Modulation of Intestinal Flora and Intestinal Environment. *Bioscience and Microflora*, *19*(1), 15–25. <https://doi.org/10.12938/bifidus1996.19.15>
- Nakamura, F., Ishida, Y., Aihara, K., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., Aoki, Y., Takehara, I., Takano, K., & Fujiwara, S. (2016). Effect of fragmented *Lactobacillus amylovorus* CP1563 on lipid metabolism in overweight and mildly obese individuals: a randomized controlled trial. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *27*, 30312. <https://doi.org/10.3402/mehd.v27.30312>
- Oh, Y., Yoon, S.-E. E., Zhang, Q., Chae, H.-S. S., Daubnerová, I., Shafer, O. T., Choe, J., & Kim, Y.-J. J. (2014). A homeostatic sleep-stabilizing pathway in *Drosophila* composed of the sex peptide receptor and its ligand, the myoinhibitory peptide. *PLoS Biology*, *12*(10), e1001974. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001974>
- Osterwalder, T., Yoon, K. S., White, B. H., & Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(22), 12596–12601. <https://doi.org/10.1073/pnas.221303298>
- Ozer, C., Etcibaşı, S., & Oztürk, L. (2014). Daytime sleepiness and sleep habits as risk factors of traffic accidents in a group of Turkish public transport drivers. *International Journal of Clinical and*

- Experimental Medicine*, 7(1), 268–273. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24482715>
- Pasolli, E., De Filippis, F., Mauriello, I. E., Cumbo, F., Walsh, A. M., Leech, J., Cotter, P. D., Segata, N., & Ercolini, D. (2020). Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. *Nature Communications*, 11(1), 2610. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16438-8>
- Perteua, M., Perteua, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T.-C., Mendell, J. T., & Salzberg, S. L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 33(3), 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
- Poltilove, R. M. K., Jacobs, A. R., Haft, C. R., Xu, P., & Taylor, S. I. (2000). Characterization of Drosophila insulin receptor substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 23346–23354. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003579200>
- Potdar, S., & Sheeba, V. (2018). Wakefulness is promoted during day time by PDFR signalling to dopaminergic neurons in Drosophila melanogaster. *ENeuro*, 5(4), 1–17. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0129-18.2018>
- Qiao, H., Keesey, I. W., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2019). Gut microbiota affects development and olfactory behavior in Drosophila melanogaster. *The Journal of Experimental Biology*, 222(5), jeb192500. <https://doi.org/10.1242/jeb.192500>
- Rasch, B., & Born, J. (2013). About sleep's role in memory. *Physiological Reviews*, 93(2), 681–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2012>
- Raven, F., Van der Zee, E. A., Meerlo, P., & Havekes, R. (2018). The role of sleep in regulating structural plasticity and synaptic strength: Implications for memory and cognitive function. *Sleep Medicine Reviews*, 39, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2017.05.002>
- Ren, G. R., Hauser, F., Rewitz, K. F., Kondo, S., Engelbrecht, A. F., Didriksen, A. K., Schjøtt, S. R., Sembach, F. E., Li, S., Sogaard, K. C., Søndergaard, L., & Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2015). CCHamide-2 Is an Orexigenic Brain-Gut Peptide in Drosophila. *PloS One*, 10(7), e0133017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133017>
- Reutrakul, S., & Van Cauter, E. (2018). Sleep influences on obesity, insulin resistance, and risk of type 2 diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 84, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.02.010>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rogulja, D., & Young, M. W. (2012). Control of sleep by cyclin A and its regulator. *Science*, 335(6076), 1617–1621. <https://doi.org/10.1126/science.1212476>
- Roman, G., Endo, K., Zong, L., & Davis, R. L. (2001). P{Switch}, a system for spatial and temporal control of gene expression in Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 98(22), 12602–12607.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.221303998>
- Schretter, C. E., Vielmetter, J., Bartos, I., Marka, Z., Marka, S., Argade, S., & Mazmanian, S. K. (2018). A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nature*, 563(7731), 402–406.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0634-9>
- Schwarzer, M., Makki, K., Storelli, G., Machuca-Gayet, I., Srutkova, D., Hermanova, P., Martino, M. E., Balmand, S., Hudcovic, T., Heddi, A., Rieusset, J., Kozakova, H., Vidal, H., & Leulier, F. (2016). *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science*, 351(6275), 854–857. <https://doi.org/10.1126/science.aad8588>
- Selkrig, J., Mohammad, F., Ng, S. H., Chua, J. Y., Tumkaya, T., Ho, J., Chiang, Y. N., Rieger, D., Pettersson, S., Helfrich-Förster, C., Yew, J. Y., & Claridge-Chang, A. (2018). The *Drosophila* microbiome has a limited influence on sleep, activity, and courtship behaviors. *Scientific Reports*, 8(1), 10646. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28764-5>
- Seong, K.-H., Ly, N. H., Katou, Y., Yokota, N., Nakato, R., Murakami, S., Hirayama, A., Fukuda, S., Kang, S., Soga, T., Shirahige, K., & Ishii, S. (2020). Paternal restraint stress affects offspring metabolism via ATF-2 dependent mechanisms in *Drosophila melanogaster* germ cells. *Communications Biology*, 3(1), 208. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0935-z>
- Shaw, P. J., Cirelli, C., Greenspan, R. J., & Tononi, G. (2000). Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5459), 1834–1837.  
<https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1834>
- Shell, B. C., Schmitt, R. E., Lee, K. M., Johnson, J. C., Chung, B. Y., Pletcher, S. D., & Grotewiel, M. (2018). Measurement of solid food intake in *Drosophila* via consumption-excretion of a dye tracer. *Scientific Reports*, 8(1), 11536. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29813-9>
- Shi, N., Li, N., Duan, X., & Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4, 14. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
- Siezen, R. J., Tzeneva, V. A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H. T. K., Rademaker, J. L. W., Starrenburg, M. J. C., Kleerebezem, M., Molenaar, D., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology*, 12(3), 758–773. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02119.x>
- Silva, V., Palacios-Muñoz, A., Okray, Z., Adair, K. L., Waddell, S., Douglas, A. E., & Ewer, J. (2020). The impact of the gut microbiome on memory and sleep in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 224(Pt 3). <https://doi.org/10.1242/jeb.233619>
- Singh, C., Rihel, J., & Prober, D. A. (2017). Neuropeptide Y Regulates Sleep by Modulating Noradrenergic Signaling. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.018>
- Storelli, G., Defaye, A., Erkosar, B., Hols, P., Royet, J., & Leulier, F. (2011). *Lactobacillus plantarum* promotes *drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent



- nutrient sensing. *Cell Metabolism*, 14(3), 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.012>
- Szentirmai, E., & Krueger, J. M. (2006). Central administration of neuropeptide Y induces wakefulness in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(2), R473-80. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00919.2005>
- Tiseo, C., Vacca, A., Felbush, A., Filimonova, T., Gai, A., Glazyrina, T., Hubalek, I. A., Marchenko, Y., Vereem, L. H., Piroso, S., Tkachev, A., Martelletti, P., & Sacco, S. (2020). Migraine and sleep disorders: a systematic review. *The Journal of Headache and Pain*, 21(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s10194-020-01192-5>
- Titos, I., & Rogulja, D. (2020). A gut-secreted peptide controls arousability through modulation of dopaminergic neurons in the brain. *BioRxiv*, 2020.08.31.275552. <https://doi.org/10.1101/2020.08.31.275552>
- Ushimura, A., Tsuji, T., Tanaka, S., Kogo, M., & Yamamoto, T. (2015). Neuropeptide-Y modulates eating patterns and masticatory muscle activity in rats. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.031>
- Valanne, S., Wang, J.-H., & Rämet, M. (2011). The Drosophila Toll signaling pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(2), 649–656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>
- Venu, I., Durisko, Z., Xu, J., & Dukas, R. (2014). Social attraction mediated by fruit flies' microbiome. *Journal of Experimental Biology*, 217(8), 1346–1352. <https://doi.org/10.1242/jeb.099648>
- Wen, T., Parrish, C. A., Xu, D., Wu, Q., & Shen, P. (2005). Drosophila neuropeptide F and its receptor, NPF1, define a signaling pathway that acutely modulates alcohol sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), 2141–2146. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406814102>
- Witkowski, M., Weeks, T. L., & Hazen, S. L. (2020). Gut microbiota and cardiovascular disease. *Circulation Research*, 127(4), 553–570. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316242>
- Wong, A. C.-N., Wang, Q.-P., Morimoto, J., Senior, A. M., Lihoreau, M., Neely, G. G., Simpson, S. J., & Ponton, F. (2017). Gut microbiota modifies olfactory-guided microbial preferences and foraging decisions in Drosophila. *Current Biology*, 27(15), 2397-2404.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.022>
- Wong, C. N. A., Ng, P., & Douglas, A. E. (2011). Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly Drosophila melanogaster. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1889–1900. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02511.x>
- Wu, M. N., Ho, K., Crocker, A., Yue, Z., Koh, K., & Sehgal, A. (2009). The effects of caffeine on sleep in Drosophila require PKA activity, but not the adenosine receptor. *Journal of Neuroscience*, 29(35), 11029–11037. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1653-09.2009>
- Wu, Q., Yu, G., Park, S. J., Gao, Y., Ja, W. W., & Yang, M. (2020). Excreta quantification (EX-Q) for longitudinal measurements of food intake in Drosophila. *iScience*, 23(1), 100776.

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100776>

Wu, Q., Zhao, Z., & Shen, P. (2005). Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. *Nature Neuroscience*, 8(10), 1350–1355.

<https://doi.org/10.1038/nn1540>

Yamaguchi, S. T., Tomita, J., & Kume, K. (2022). Insulin signaling in clock neurons regulates sleep in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 591, 44–49.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.100>

Yoshii, T., Todo, T., Wülbeck, C., Stanewsky, R., & Helfrich-Förster, C. (2008). Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 508(6), 952–966. <https://doi.org/10.1002/cne.21702>

Yuan, Q., Joiner, W. J., & Sehgal, A. (2006). A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A. *Current Biology*, 16(11), 1051–1062. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.032>

Zagórska, A., Marcinkowska, M., Jamrozik, M., Wiśniowska, B., & Paśko, P. (2020). From probiotics to psychobiotics – the gut-brain axis in psychiatric disorders. *Beneficial Microbes*, 11(8), 717–732.

<https://doi.org/10.3920/BM2020.0063>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

## 謝辞

本論文は、筆者が名古屋大学と雪印メグミルク株式会社が、名古屋大学大学院理学研究科に開設した産学協同研究講座栄養神経科学講座に在籍中の研究成果をまとめたものである。本学位論文の執筆にあたり懇切なるご指導とご高配を賜りました同研究科教授 上川内あづさ先生に深甚なる感謝の意を表します。名古屋市立大学薬学研究課教授 桑和彦先生並びに名古屋大学大学院理学研究科教授 日比正彦先生には副査としてご助言とご校閲を頂き、ここに深謝の意を表します。本研究を進めるにあたり、終始適切なお指導とご助言を頂きました当時名古屋大学大学院理学研究科特任准教授 石元広志先生に厚く御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり甚大なる協力を頂いた雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所 村上弘樹氏並びに同研究所主査 小林俊二郎氏に深く御礼申し上げます。本研究を進めるに当たり、適切なお指導とご助言を頂きました名古屋大学大学院理学研究科シニアリサーチフェロー 森郁恵先生、同研究科准教授 野間健太郎先生、同研究科講師 中野俊詩先生に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり、格別のご配慮を頂きました雪印メグミルク株式会社取締役常務執行役員 川崎功博博士、ミルクサイエンス研究所フェロー 小林敏也博士、執行役員ミルクサイエンス研究所長 中埜拓博士、ミルクサイエンス研究所上席研究員 加藤健博士、ミルクサイエンス研究所主査 森田如一博士、研究開発部副部長 今井宏氏に深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、キイロショウジョウバエシステムの維持や講座運営等にご協力頂いた技術補佐員の石川有紀さん、新井康代さんに深く御礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり多大なお協力を頂きました雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所及び研究開発部の皆様方並びに名古屋大学大学院理学研究科栄養神経科学講座の皆様方に厚く御礼申し上げます。