

世界初 無菌メダカの作出に成功！

メダカ免疫システムの正常な機能には腸内細菌と腸の相互作用が必要であることを発見

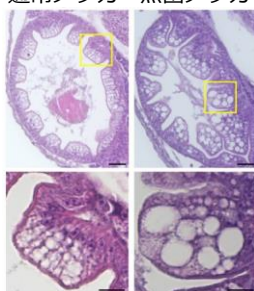
近年、私たちの健康維持における「腸活」の重要性が謳われており、様々な種類の腸内細菌やそれらのバランスが免疫力の維持に関わることが明らかになっています。腸内細菌が正常な免疫機能の維持に関与していることは魚類でも予想されていましたが、実際に検証するには体内に腸内細菌が存在しない「無菌メダカ」を作出しなければならないという壁がありました。このような背景の中、宇都宮大学地域創生科学研究科博士前期課程1年の坂口ひよりさん（栃木県立大田原女子高等学校卒）とバイオサイエンス教育研究センターの岩波礼将特任准教授を中心とした研究グループは、無菌状態でメダカ幼魚を育てることに世界で初めて成功し、腸内細菌が腸管の発達と免疫システムの正常な機能に必要であることを証明しました。

本研究成果は9月12日付で国際学術誌 *Frontiers in Immunology* に掲載されました（オンライン版）。

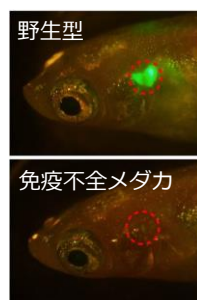
通常、メダカは孵化すると同時に周りの細菌を口にすることで腸内細菌叢が形成されます。一方、坂口さんらはメダカの卵を無菌状態で孵化させ、滅菌済みの餌を与えることで無菌メダカを作出しました。通常の条件下で飼育し腸内細菌が存在するメダカと無菌メダカを比較した結果、無菌メダカでは生

体防御応答に関わる遺伝子群の働き（発現）が低下しており、腸管上皮細胞の発達異常が見られました。したがって、綺麗すぎる環境で育つメダカは免疫機能が成熟しないことが明らかになりました。

通常メダカ 無菌メダカ



無菌メダカでは、吸収性空胞の肥大を伴う腸管の成熟異常が見られる。



Tリンパ球とナチュラルキラー細胞を欠く免疫不全メダカの樹立（左）とその腸内細菌叢におけるアエロモナス科細菌の割合の顕著な増加（右）。

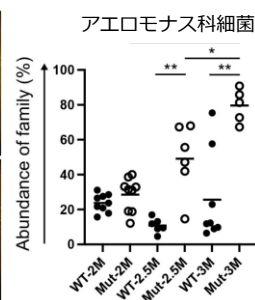


図1 無菌メダカと免疫不全メダカを用いた研究の概要

次にメダカの免疫システムが腸内細菌に与える影響を調べるため、腸内細菌を含めた水中の微生物に対応できるリンパ球を持たない免疫不全メダカを用いて実験を行いました。その結果、免疫不全メダカでは特定の細菌だけが顕著に増加することで腸内細菌のバランスが徐々に失われたことから、メダカの免疫システムは正常な腸内細菌のバランスの維持に必要であることが明らかになりました。以上の結果から、メダカの免疫機能と腸内細菌は相互に影響を及ぼしあうことが明らかになりました。腸内細菌とメダカの免疫機能の関係を示した今回の研究成果は、共生進化の理解に役立つ学術的意義に加え、水産業や養殖業において魚類の健康維持にも応用できることが期待されます。

■ 研究の背景

腸内細菌のバランスはヒトの健康の維持に重要であり、また免疫機能の低下が腸内細菌のバランスに影響を与えることが知られてきています。このことは魚類においても同様であると考えられますが、実験的な証明はこれまでにあまりなされていません。そこで宇都宮大学の研究グループは、遺伝子操作のしやすい小型魚類モデルのひとつであるメダカを用いて免疫系と腸内細菌叢の相互作用について調査しました。

■ 研究方法

ヒトの免疫不全症の原因遺伝子として知られる *IL2RG* 遺伝子と相同なメダカ *il2rg* 遺伝子を破壊したゲノム編集（注1）メダカを作出し、免疫系の中心的な役割を果たすTリンパ球とナチュラルキラー細胞を持たない免疫不全メダカを作成しました。この免疫不全メダカでの腸内細菌の構成を、時期を追って野生型と比較しました。一方、メダカ卵を無菌状態で育成することにより孵化後も細菌やウイルスとの接触のない germfree メダカ幼魚を作成し、その腸管の様子と遺伝子発現解析を行いました。

■ 研究成果

ゲノム編集技術により作成した *il2rg* 変異メダカではTリンパ球やナチュラルキラー細胞の発生異常が見られ（図2）、免疫不全の表現型を示しました。野生型とこの免疫不全メダカの腸内細菌の構成を、時期を追って比較したところ、野生型は2ヶ月齢から3ヶ月齢まで菌種の構成に変化が見られなかったのに対し、免疫不全メダカでは2ヶ月齢では野生型と差がなか

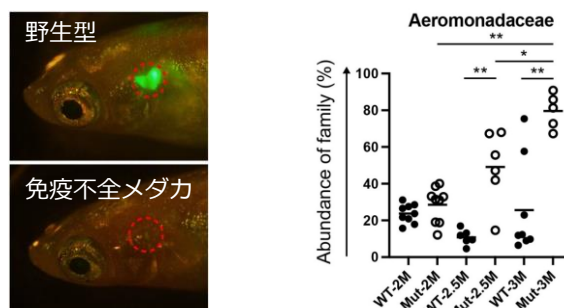


図2 Tリンパ球とナチュラルキラー細胞を欠く免疫不全メダカの樹立と（左）、その腸内細菌叢におけるAeromonadaceae科細菌の割合の顕著な増加（右）。

ったものの、2.5ヶ月齢以降に徐々に菌種の多様性の低下が見られました。特にアエロモナス科の細菌の割合が他を圧倒していることが分かりました。メダカ腸管のアエロモナス菌は日和見菌であるものの、体外から感染させると肝臓や脾臓の炎症を引き起こしました。このことから、メダカの免疫系は成魚における正常な腸内細菌のバランスの維持に必要であることが明らかになりました。

一方、細菌やウイルスとの接触のない germfree メダカ幼魚を世界で初めて作成しました。germfree メダカでは通常的环境下のメダカと比較して、腸管上皮細胞の発達異常が見られ（図3）、また生体防御応答に関わる遺伝子群の発現低下が見られました。この遺伝子群には細菌細胞壁に存在するLPS（注2）の刺激により発現誘導される遺伝子が多く含まれ、特に抗微生物ペプチド hepcidin をコードする遺伝子の発現は germfree メダカにおいては通常的环境下のメダカの約 1/500 にまで低下しました。これらの結果から、メダカ免疫系の成熟には腸内細菌と腸管上皮細胞の相互作用が必要であることが明らかになりました。

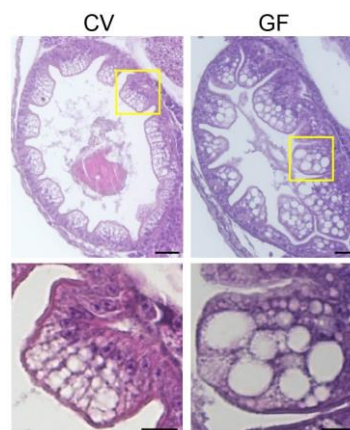


図3 germfreeメダカ腸管の成熟異常。通常飼育幼魚（CV）と比較してgermfree幼魚（GF）では吸収性空砲の肥大が見られる。

■波及効果、今後の予定

本研究では免疫不全メダカの樹立と germfree メダカの作成を通じて、免疫系と腸内細菌との相互作用を明らかにしました。この知見を魚類全般に適用し、水産・養殖での腸内細菌バランス制御を介した魚類の健康に応用できると期待されます。

■研究プロジェクトについて

科学研究費助成事業基盤Cの支援を受けて実施しました。

■用語説明

注1 ゲノム編集

ゲノム内の DNA 配列を特異的に切断して変異や塩基配列の置き換えを行う技術。従来の遺伝子組換えに代わり、基礎生物学だけでなく農業や水産業でも応用が進んでいる。

注2 LPS

リポポリサッカライド（糖脂質）。グラム陰性細菌の細胞壁に存在し、免疫応答を引き起こす。

■論文情報

論文名 : Maturation of the medaka immune system depends on reciprocal interactions between the microbiota and the intestinal tract (メダカ免疫システムが正常に機能するには腸内細菌叢と腸管の相互作用が必要である)

著者 : Hiyori Sakaguchi, Yuna Sato, Ryo Matsumoto, Joe Gomikawa, Namie Yoshida, Tomohiro Suzuki, Masaru Matsuda, Norimasa Iwanami

掲載誌 : Frontiers in Immunology

URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1259519/full>

■英文概要

The interactions between the host immune system and intestinal microorganisms have been studied in many animals, including fish. However, a detailed analysis has not been performed in medaka, an established fish model for biological studies. Here, we investigated the effect of immunodeficiency on the microbiota composition and the effect of gut bacteria on intestinal epithelial development and immune responses in medaka. Chronological analysis of the intestinal microbiota of *interleukin 2 receptor subunit gamma (il2rg)* mutant medaka showed a gradual decrease in the evenness of operational taxonomic units, mainly caused by the increased abundance of the Aeromonadaceae family. Exposure of wild-type medaka to high doses of an intestine-derived opportunistic bacterium of the Aeromonadaceae family induced an inflammatory response, suggesting a harmful effect on adult *il2rg* mutants. In addition, we established germ-free conditions in larval medaka and observed large absorptive vacuoles in intestinal epithelial cells, indicating a block in epithelial maturation. Transcriptome analysis revealed a decrease in the expression of genes involved in the defense response, including the antimicrobial peptide gene *hepcidin*, whose expression is induced by lipopolysaccharide stimulation in normal larvae. These results show that reciprocal interactions between the microbiome and the intestinal tract are required for the maturation of the medaka immune system.

本件に関する問合せ

(研究内容について)

国立大学法人 宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター

教授 松田勝 / 特任准教授 岩波礼将

TEL:028-649-5527 FAX:028-649-8651 E-mail: matsuda@cc.utsunomiya-u.ac.jp

(報道対応)

国立大学法人 宇都宮大学 広報室(広報係)

TEL:028-649-5201 FAX:028-649-5026 E-mail: kkouhou@miya.jm.utsunomiya-u.ac.jp