

腸内細菌が脳機能に与える影響の解明

研究者 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授 倉石 貴透

〔研究の概要〕

腸内細菌が宿主の中枢神経系や行動に与える影響を解明するため、ショウジョウバエの無菌化技術を確立し、腸内細菌による攻撃行動の制御メカニズムを明らかにするために研究を行っている。乳酸菌が持つ特定の分子が攻撃行動を抑制する可能性を示し、乳酸菌変異株ライブラリーを用いた解析が進行中である。また、攻撃行動の定量化を自動化するため、輝度変化解析や DeepLabCut を用いた二匹間距離解析を統合した新たな手法を開発した。この手法は攻撃行動測定の効率化に貢献することが期待される。

〔研究経過および成果〕

腸内細菌が宿主の生理機能にさまざまな及ぼすことが近年次々と明らかになっている。世界的な腸内細菌研究は 21 世紀初頭に幕を開け、2008 年頃から米国 Human Microbiome Project や欧州 MetaHIT プロジェクトが開始されたことで研究の基盤整備が進み、飛躍的に腸内細菌研究が発展した。例えば、腸内細菌叢の乱れが、消化管感染症 (*J Infect Dis* 197:435-8 (2008))、肥満 (*Nature* 444:1027-31. (2006)) や糖尿病 (*Nature* 514:181-6. (2014))、肝がん (*Nature* 299:97-101 (2013)) などの疾患に関連することが明らかになった。さらに、自閉症 (*Cell* 155:1451-63. (2013)) などの中枢神経系機能にまで腸内細菌の影響が及ぶことが報告され、多くの研究者に衝撃を与えた。消化管や肝臓などの近傍臓器に腸内細菌が与える影響の分子メカニズムは解明が進んでいる。消化管感染症については、腸内細菌を利用した治療薬が 2022 年にオーストラリアで承認されるなど、臨床への応用に発展している。一方で、腸内細菌が中枢神経に影響を及ぼす機構はあまり明らかになっていない。本分野を総括する最近の総説に "Many essential questions regarding the gut-brain axis remain unanswered" と述べられているように、今後の進展が期待されている研究領域である (*Nature Review Microbe* 19:241-255 (2021))。哺乳類神経系の複雑さや、マウス個体を用いた実験の困難さが一因と考えられるため、

これまでにない実験系やモデル動物を用いた解析が待望されている。

一細胞レベルでの遺伝学的解析が可能なショウジョウバエは、神経科学における解析でモデル生物としての真価を発揮している。攻撃行動などの本能行動に関わる特定の神経回路も同定され、中枢神経系機能の生物学をリードしている。宿主と微生物の相互作用について、ハエ自然免疫系の活性化機構解析が 2011 年ノーベル医学生理学の対象となるなど、ショウジョウバエはモデル生物としての有用性を示している。ハエの腸内細菌研究も活発に行われているものの、哺乳類を用いた腸内細菌研究でデファクトスタンダードとして用いられている無菌アイソレータを用いた無菌動物の維持手法が確立されていないため、矛盾する結果が数多く報告されている状況にある (*Mbio* 9:854 (2018))。

日本における腸内細菌研究への本格的な国家支援は欧米と比較してやや遅れていたが、2016 年に AMED が「微生物叢」領域を立ち上げ、本邦の腸内細菌研究を広範にサポートした。我々は、腸管構造が哺乳動物と類似しているショウジョウバエを用いた腸内細菌研究を進めている。特定の腸内細菌と宿主との相互作用を調べるためには、腸内細菌叢を完全に排除した「無菌動物」を作成して維持する必要がある。さらに、無菌動物に特定の細菌を定着させた動物（ノトバイオート動物）を用いて解析する必要がある。そこで我々は「真

に無菌のショウジョウバエ」技術の確立に取り組んだ。そして、ハエの無菌化方法や飼育装置とエサ滅菌法を改良し、完全な無菌ハエを何世代にもわたって維持することに成功した。すなわち、世界初の無菌ハエ長期間維持技術を確立し、腸内細菌が宿主の本能行動や中枢神経系に与える影響を厳密に検証することを可能とした。

通常腸内菌叢を持つハエと無菌ハエの違いを探索するため、メタボローム解析を行った。その結果、昆虫の神経伝達物質であるオクトパミン（哺乳類のノルアドレナリンに相当）が無菌ハエで増加していることを見出した。オクトパミンはノルアドレナリンと同様に脳の全体に広く分布しており、攻撃行動や摂食行動などの本能行動を局所的な神経回路の活性化を通じて調節することが知られている（*Neuron* 95:1112-28.e7. (2017)）。そこで無菌ハエの行動アッセイを実施したところ、無菌ハエのオスでは攻撃行動が顕著に亢進していることが明らかになった。また、4種類あるオクトパミン受容体のうち、脳で攻撃行動の制御に関わる *Oamb* 受容体を欠損した無菌ハエでは、攻撃行動の亢進が見られなくなった。さらに、ショウジョウバエ腸内細菌の一種である乳酸菌（*Fructilactobacillus fructivorans* (Ff)）を定着させたノトバイオートハエでも、攻撃行動の亢進は抑制された。これらの結果から、腸内細菌である乳酸菌が中枢神経系へと影響を与え、*Oamb* 受容体を介した攻撃行動を抑制している可能性が示唆された（未発表）。そこで、乳酸菌が遠隔地の中枢神経系に作用して攻撃行動を制御するメカニズムを明らかにするために研究を進めている。

本研究のアプローチでは、乳酸菌が持つどの分子が攻撃行動の抑制に関わるか解明することを目指す。乳酸菌のみを定着させたノトバイオートハエにおいて、攻撃行動が通常菌叢ハエと同水準になることから、乳酸菌が持つ何らかの分子が宿主攻撃行動を抑制していると考えられる。unbiased なアプローチと、候補を絞ったアプローチの二つを実施している。

unbiased なアプローチとして、乳酸菌の大規模変異体ライブラリーを用いたスクリーニングを行う。乳酸菌の遺伝子をランダムに破壊した 2,000 株

程度の変異株を作出する。これらの変異株を用いてノトバイオートハエを作出し、攻撃行動アッセイを実施する。そして、無菌ハエで亢進している攻撃行動を抑制できない変異株を単離する。単離した変異株は、何らかの酵素遺伝子を欠損していると予測される。そこで、当該酵素変異によって産生されなくなる化合物を全ゲノムデータから予測する。また LC-MS/MS による変異株抽出液のメタボローム解析を行うことで、変異株で失われた化合物を同定する。最後に、当該化合物を無菌ハエに投与することで攻撃行動の亢進が抑制されるか検証する。

候補を絞った解析として、細菌細胞壁成分であるペプチドグリカンに注目する。ペプチドグリカンはショウジョウバエの腸管免疫を活性化する分子である（*Front Physiol* 4:375 (2013)）。加えて、各種腸内細菌に特有のわずかに構造が異なるペプチドグリカンが、宿主の免疫や寿命などの生理機能を特異的に調節することが報告されている（*PLoS Genet* 19:e1010709 (2023)）。そこで、乳酸菌のペプチドグリカンを調製して無菌ハエに投与することで攻撃行動の亢進が抑制されるか検証する。

以上の計画を実施するため、本研究では、攻撃行動の定量化を容易に行う方法の確立に取り組んだ。従来、攻撃行動の定量化は、2匹のオスを小さなチャンバーに入れ、行動をビデオ撮影して攻撃行動の回数をマニュアルでカウントするという労働集約的な方法で行われてきた。そこで本研究では、ビデオ撮影したオスの攻撃行動程度の評価を半自動化するため、コンピュータビジョンや深層学習の手法を用いた新たな解析手法の開発を試みた。

まず初めに、コンピュータビジョンの技術により、「動きの速さ」を数値化することで、攻撃行動を客観的に評価することを試みた。ショウジョウバエのオスは、攻撃行動時に素早い動きを示すという特徴を利用し、「動きの速さ」を定量化することで攻撃行動を検出できると考えた。これは防犯カメラが急な動きを検知して録画を開始する原理と類似している。

具体的な方法として、二匹のショウジョウバエオスの行動を動画撮影し、その動画から連続した静止画（フレーム）を抽出する。次に、カラー画像から青色成分のみを抽出する。この青色成分の選択は、ショウジョウ

バエの褐色の体色と青色成分との contrast が高いことに基づいている。全フレームの平均画像を作成し、各フレームから差し引くことで、背景(常に同じ場所にある物体)を除去し、動いている部分のみを強調する。

動きの検出のため、処理した画像に閾値を設定し、二値化(白黒)画像を作成する。そして、連続するフレーム間で画像の違いを計算し、その違いの大きさを数値化して CSV ファイルに記録する。この数値が大きい時間帯が、激しい動き(=潜在的な攻撃行動)の発生を示唆すると考えられる。

本手法(以後、輝度変化解析)により、10 個程度の動画を解析した結果、確かに攻撃行動時には輝度変化が大きくなり、攻撃行動を部分的に定量できた。しかし、攻撃行動とは無関係な羽ばたき行動や素早い移動においても輝度変化が大きくなるため、輝度変化解析のみでは攻撃行動の定量化に限界があることが明らかとなった。

そこで次に、全く異なるアプローチとして、深層学習を用いた物体追跡技術により、二匹のショウジョウバエオス間の距離を計測し、その距離が近くなった場合を攻撃行動として判定する手法の開発を試みた。物体追跡には、近年、生物学研究で注目を集めている DeepLabCut (*Nat Neurosci* 21:1281–1289 (2018)) を採用した。

DeepLabCut は、畳み込みニューラルネットワークを基盤とした機械学習フレームワークであり、少数のトレーニングデータで効率的に学習を行う転移学習アプローチを特徴とする。人間の姿勢推定タスクで事前学習された深層残差ネットワーク(ResNet)を基盤とし、これを目的の動物種や追跡対象に適応させる再学習により、数十フレーム程度の手動ラベリングのみで高精度なトラッキングシステムを構築できる。すなわち、一度モデルを作成すれば、次回以降は撮影した動画を自動的にトラッキングできるため、動物行動解析の効率を飛躍的に向上させることができる。

本研究では、この DeepLabCut を使って、ショウジョウバエの動画トラッキングシステムを構築し、二匹間の距離を算出することに成功した(以後、二匹間距離解析)。しかし、攻撃行動以外の理由(偶発的な接近など)でも二匹の距離が近くなる場合があり、二匹間距離解析のみでは攻撃行動の正確な定量化は困難であることが判明した。

これらの結果を踏まえ、輝度変化解析と二匹間距離解析を組み合わせた統合解析手法を開発した。具体的には、輝度変化(ΔI)を x 軸、2 個体間の距離(D)を y 軸として、各 time frame のデータを xy 平面上にプロットした。予想通り、攻撃行動時のデータ点は、xy 平面の右下領域(高 ΔI 、低 D)に集中する傾向を示した。

そこで、x 軸、y 軸それぞれに閾値(x_t , y_t)を設定し、 $\Delta I > x_t$ かつ $D < y_t$ を満たす time frame を攻撃行動(+)と判定した。全 time frame に対する攻撃行動(+)の time frame 数の割合を算出することで、攻撃行動の定量化を試みた。その結果、検証用の 10 個程度の動画において、本手法による判定と手動判定との間に高い相関が得られ、攻撃行動測定の自動化が技術的に可能であることが示唆された。

今後は、より多様な行動パターンを含む多数の動画データセットを用いて本手法の有効性を検証し、機械学習手法の導入による閾値の最適化なども検討することで、より信頼性の高い攻撃行動測定の自動化手法を確立したい。

〔発表論文〕

該当なし