

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15441

研究課題名（和文）膜小胞を介した新規腸内ファージ伝播様式の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel mode of intestinal phage propagation via membrane vesicles

研究代表者

森永 花菜（Morinaga, Kana）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・学振特別研究員

研究者番号：60869692

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腸内ファージは腸内細菌叢と多様な相互作用をしていることが、環境ゲノム解析から明らかになりつつある。しかしながら、腸内環境において、実際にファージが宿主細菌とどのような相互作用をしているのかについては、多くが謎に包まれている。近年の研究により、腸内細菌が生産するメンブレンベシクル（MV）に、ファージの一種が内包されて伝播する可能性を見出した。そこで本研究では、腸内環境においてMVに内包されるファージが実際に存在するのか、どのような宿主細菌と相互作用するのかを解明する。さらに、MVが腸内ファージの感染能に与える影響を解き明かすことで、ファージと宿主細菌との新規相互作用様式の全容の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ファージと腸内細菌の相互作用を、宿主細菌が生産するMVという新たなファクターの関与を交えて独自の立ち位置で進める。本研究を証明することができれば、新しい腸内ファージの宿主細菌との相互作用様式を提唱することとなる。

また、近年、脂質人工膜であるリポソームを、ドラッグデリバリーシステムに利用する応用研究が活発に行われている。本研究において、リポソームの類似物質であるMVを、ファージの輸送ツールとして腸内環境制御へ応用し、ファージを、標的となる細菌に特異的に伝達することが可能となれば、疾患の治療や予防、さらには腸内フローラのバイオコントロールに資する研究基盤の構築に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Environmental genomics is beginning to reveal that intestinal phages interact with the intestinal microbiota in diverse ways. However, much remains to be elucidated about how phages interact with host bacteria in the intestinal environment. Recent studies have shown that phages may be internalized and propagated within membrane vesicles (MVs) produced by intestinal bacteria. In this study, we will elucidate whether phage encapsulated in MVs actually exist in the intestinal environment and what kind of host bacteria they interact with. Furthermore, by elucidating the effect of MVs on the infectivity of intestinal phage, we aim to elucidate the full extent of the novel interaction mode between phage and host bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ファージ 腸内細菌 メンブレンベシクル

1. 研究開始当初の背景

昨今の環境ゲノム解析技術の進展により、腸内フローラと健康や疾患の関連性が次々に解明されつつある中で、腸内環境には多様性に富んだ多くのファージが存在することも判明している。ファージは腸内細菌との相互作用によりヒトの健康状態に影響を及ぼす可能性が予見されている一方で、ファージが腸内でどのように伝播し、どのように目的の細菌に感染するのか、という基礎的知見は乏しい。

近年の研究において、腸内細菌の細胞内で増幅するファージの一種が、宿主細菌によって生産された膜小胞（メンブレンベシクル; MV）に内包されて放出され、伝播する、という新しいファージの伝播様式が存在しているのではないかと可能性を見出した。腸内環境においても、そのような MV にファージが内包され伝達されるならば、腸内ファージが高効率に宿主細菌に感染するなど、今まで予想しえなかった腸内ファージと宿主細菌との相互作用が存在する可能性が考えられる。宿主細菌を溶菌するファージが、細菌の生産する MV に内包されて腸内で伝播するという報告はこれまでに全く例がなく、本現象が腸内において普遍的に存在することが確かめられれば、その多くが謎であった腸内における微生物間相互作用の実態に一步迫ることが期待される。

2. 研究の目的

腸内ファージは腸内細菌叢と多様な相互作用をしていることが、環境ゲノム解析から明らかになりつつあり、腸内ファージの挙動が注目されている。しかしながら、腸内環境において、実際にファージが宿主細菌とどのような相互作用をしているのかについては未だ多くが謎に包まれている。近年、一種の腸内細菌において、細菌が生産する MV にファージが内包されて伝播し、宿主細菌に感染する、という全く新しいファージの伝播様式が存在する可能性が見いだされた。そこで本研究では、腸内環境において、MV に内包されるファージが実際に存在しているのか、また、どのような宿主細菌と相互作用するのかを明らかにする。さらに、MV が腸内ファージの感染能に与える影響を解き明かすことで、腸内ファージと宿主細菌との新規相互作用様式の全容を解明し、謎に包まれた腸内ファージの振る舞いの実態に迫る。

3. 研究の方法

(1) まず、腸内 MV 生産菌の特定と、MV 内包ファージの遺伝学的特徴の解明を目指す。最新の環境ゲノム解析技術を駆使し、MV の生産者と、MV に内包されるファージの遺伝学的特徴をゲノムワイドに高解像度で解き明かす。具体的には、マウス糞便から、食物残渣及び微生物を除去し、超遠心機を用いた密度勾配遠心法により MV を回収・精製する。マウス糞便から精製した MV 中には MV を生産した細菌の遺伝子も内包されていることが予想されるため、メタゲノム解析を行い、MV 生産菌を推定する。さらに、MV 内包ファージの遺伝学的特徴を明らかにする。また、ファージのゲノム上に存在するファージの宿主細菌由来の配列と、推定した MV 生産者の結果を照らし合わせることで、MV を生産したファージの宿主細菌を推定する。

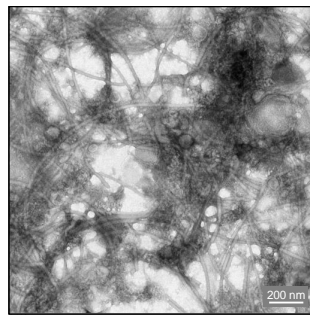
(2) 続いて、MV が腸内ファージの感染能に与える影響の解明を目指す。MV に含まれるファージが実際に感染能を有するのか、また、フリーの状態のファージと比較し、MV に内包されることで宿主細菌との相互作用は変化するのかを実験的に検証する。腸内ファージ解析を困難にする原因は、宿主となる絶対嫌気性腸内細菌を寒天培地で増殖させるための条件・技術が確立されていないことである。本研究では、無酸素条件下で、絶対嫌気性細菌を寒天培地一面に生やす独自の技術を用い、マウス糞便由来のファージ溶液と宿主細菌を無酸素条件下で平板培地に塗布し、プラークを形成させることで、腸内ファージの純粋分離に挑戦する。宿主細菌には、ヒトの健康や疾患に関与することが明らかになっている腸内細菌を用いる。具体的には、疾患（肥満・糖尿病等）の起原菌として特定されている *Clostridium* 属細菌や *Lachnospiraceae* 科細菌群、さらに、プロバイオティクスに有効とされる乳酸菌類を用いる。分離したファージを用いて、ファージが MV に内包されて伝播するのか、さらには、MV によって、ファージと宿主細菌との相互作用（付着性、感染性など）に変化が生まれるのかを実験的に証明する。

4. 研究成果

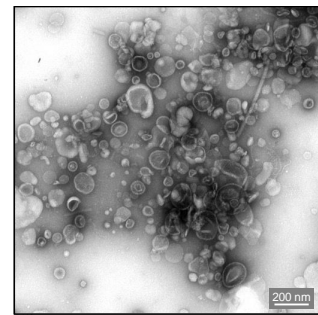
(1) まず、マウス糞便より MV を回収・精製する手法の確立に着手した。単一種の細菌培養液からの MV 回収は広く行われている。一方で、マウス糞便等の、細菌やマウス由来細胞、マウスの食物残渣等多様な物質が混ざった環境から MV を回収する方法に関する知見は少なく、またサンプル源ごとに回収方法を検討する必要がある。本研究では、まず、マウス糞便をバッファーで懸濁し、懸濁液を遠心して菌体を沈殿させたのち、上清を 0.22 μm のフィルターに通すことで、菌体や食物残渣等を除去した。菌体を除去した MV を含む溶液を超遠心機で遠心することによって、マウス腸内細菌由来 MV を回収した (図 1 左)。回収した MV には、鞭毛などの不純物が含まれていることが予想されたため、さらに、酵素処理や密度勾配遠心を行うことで、MV を精製し

た。精製した MV を電子顕微鏡により観察した結果、不純物の少ない MV が精製されていることが明らかになった (図 1 右)。さらに、本手法を用いることで、多様な系統のマウス糞便から MV を回収することに成功した。このことによって、MV 内のファージの存在をマウス系統間で比較することが可能になった。

続いて、マウス糞便より精製した MV に対して、次世代シーケンサーを用いて、MV を生産する細菌種の推定及び、MV に含まれるファージを含む核酸の情報を得ることとした。複数の系統のマウス糞便より MV を回収し、DNA を抽出後、ショットガンメタゲノムにより、MV 内の核酸情報を解析した。同時に、MV 回収源のマウス糞便の核酸情報を取得し、MV 内の核酸情報と比較した。まず、実験に用いた全系統のマウス糞便核酸より、糞便に含まれる細菌



マウス糞便上清から回収したMV



回収したMVを種々の処理で精製した画分

図1. マウス糞便から回収・精製したMV

のゲノム (Metagenome-Assembled Genome、MAG) を構築したところ、172 個の MAG を構築することに成功した。各糞便に含まれる細菌の割合及び、MV 内に内包された核酸の由来細菌 (MV 生産菌) を推定するため、構築した MAG に対して、各シーケンス結果をマッピングした。その結果、糞便を構成する細菌の中でも、特定の細菌種が MV を生産していることが明らかとなった。興味深いことに、糞便を構成する細菌種は、マウスの系統によって大きく異なる一方で、MV は、マウスの系統によらず、共通した系統の細菌が生産することが示唆された。

さらに、糞便及び MV から得られたシーケンス結果を用いて、各サンプルにファージがどれだけ存在しているのかを解析した。各サンプルに含まれるファージの割合は、ファージをコードする配列数を、細菌を含む全配列数で割ることで算出した。その結果、糞便に含まれるファージ配列の割合に比べて、MV に含まれるファージの割合が高い傾向にあることが明らかになった。さらに、MV 内包ファージの種類を解析したところ、MV には、多様な種類のファージ遺伝子が含まれていることが明らかとなった。これらのことより、腸内のような環境中でも、ファージが MV に内包されて伝播している可能性が示唆された。

(2) 続いて、MV が腸内ファージの感染能に与える影響を明らかにすることを目的とした。まず、研究に用いるファージの分離に取り組んだ。ファージの分離には、多様な種類の宿主細菌を分離し、ハンドリングすることが重要と考えたため、始めに、ファージの宿主細菌として使用する腸内細菌ライブラリーの拡充を試みた。まず、マウス糞便より、複数種の培地を用いて、嫌気性細菌を分離した。約 2,000 株の嫌気性腸内細菌のコロニーを取得し、細菌種を同定したところ、100 種を超える細菌種の分離に成功した。その中でも、新規性の高い 2 株においては、新属新種として提唱するに至った。その他の新規性の高い細菌に関しても、今後、生理・生化学的性状を解析することで、新属新種として提唱する予定である。

続いて、これらの細菌に感染するファージの分離を目指した。細菌を無酸素条件下で平板培地に塗布し、プラークを形成させることで、ファージの純粋分離を行うことを想定していたため、分離した絶対嫌気性細菌を平板培地で生育させる条件を検討した。嫌気度を保つため、培地条件や、プレートの作製条件など、各工程の条件検討を行なった結果、複数種の絶対嫌気性細菌において、平板培地で生育させることに成功した。また、嫌気性細菌に感染するファージは、プラークを形成しない種類も存在することが想定されたため、プラーク法と同時並行で、液体培地を用いたファージの分離にも着手した。これらの手法を駆使することによって、新規ファージを分離することに成功した。分離したファージは、プラークを形成せずに、宿主細菌内で増幅するというユニークな形質を示すことが明らかとなった。

さらに、ファージには、宿主に感染し、溶菌を繰り返す溶菌ファージと、宿主細菌のゲノム上に存在し、特定の条件下で発現し、宿主細菌を溶菌する溶源ファージが存在する。溶菌ファージの取得に加え、ゲノム上にファージをコードする分離株の探索も試みた。まず、新属または新種と推定される分離株の全ゲノムシーケンスを行なった。構築したゲノム上に、ファージ配列が存在するのかを予測したところ、複数種の分離株のゲノム上にファージがコードされていることが明らかとなった。また、そのうち数種類においては、ファージが培養液中に放出されている可能性が示唆された。本研究において、複数種の溶菌ファージ及び溶源ファージを取得するに至った。現在、これらの宿主細菌の生産する MV に関して、詳細に解析を進めている。今後、これらの腸内細菌が生産する MV とファージとの関係性について詳細に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morinaga Kana, Kusada Hiroyuki, Watanabe Miho, Tamaki Hideyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1004, an Aminopeptidase-Producing Lactic Acid Bacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00641-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00641-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morinaga Kana, Kusada Hiroyuki, Watanabe Miho, Tamaki Hideyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Anaerostipes caccae</i> Strain L1-92T, a Butyrate-Producing Bacterium Isolated from Human Feces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00056-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00056-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morinaga Kana, Kusada Hiroyuki, Tamaki Hideyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Bile Salt Hydrolases with Extended Substrate Specificity Confer a High Level of Resistance to Bile Toxicity on Atopobiaceae Bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10980 ~ 10980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231810980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morinaga Kana, Kusada Hiroyuki, Sakamoto Sachiko, Murakami Takumi, Toyoda Atsushi, Mori Hiroshi, Meng Xian-Ying, Takashino Motoko, Murotomi Kazutoshi, Tamaki Hideyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 <i>Granulimonas faecalis</i> gen. nov., sp. nov., and <i>Leptogranulimonas caecicola</i> gen. nov., sp. nov., novel lactate-producing Atopobiaceae bacteria isolated from mouse intestines, and an emended description of the family Atopobiaceae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishioka Tomoki、Morinaga Kana、Tamaki Hideyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Dyella</i> sp. Strain GSA-30, a Predominant Endophytic Bacterium of <i>Dendrobium</i> Plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01338-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.01338-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishioka Tomoki、Morinaga Kana、Tamaki Hideyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Flavobacterium</i> sp. Strain GSB-24, Isolated from inside <i>Dendrobium</i> Roots	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01343-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.01343-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kana Morinaga, Toshiki Nagakubo, Tatsuya Yamamoto, Nobuhiko Nomura and Masanori Toyofuku
2. 発表標題 Interspecies bacterial communication through membrane vesicles
3. 学会等名 EMBO, The Company of Biologists Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森永花菜, 草田裕之, 坂本幸子, 村上匠, 豊田敦, 森由史, 孟憲英, 高篠素子, 室富和俊, 玉木秀幸.
2. 発表標題 マウス腸内に棲息する未知嫌気性腸内細菌の単離と系統・生理学的特性の解明
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森永花菜, 草田裕之, 坂本幸子, 村上匠, 豊田敦, 森宙史, 孟憲英, 高篠素子, 室富和俊, 玉木秀幸.
2. 発表標題 マウス腸内から単離した未知嫌気性細菌の系統と生理機能の解明
3. 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関