

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21275

研究課題名（和文）マイクロバイオータの減算的デザイン技術の開発

研究課題名（英文）Development of methodology for subtractive design of microbiota

研究代表者

本田 孝祐（Honda, Kohsuke）

大阪大学・生物工学国際交流センター・教授

研究者番号：90403162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、微生物群集（菌叢）を構成する細菌のうち、特定の属や種の細菌に対してのみ特異的に細胞死を誘導し、菌叢の構成菌種を減算的に制御する技術の開発に取り組んだ。研究開始当初、cell penetration peptide (CPP)を付与したCasヌクレアーゼによる細胞死誘導を試みたが、十分な効果を確認するには至らなかった。そこで、Casヌクレアーゼよりも大幅に小さな分子であるペプチド核酸（PNA）を用いた細胞死誘導に取り組んだ。この結果、2～8 μMのCPP融合PNAによって大腸菌やPseudomonas属細菌に対して、細菌選択性を伴った細胞死誘導効果を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト共生微生物群集研究の発展などを契機に、近年、微生物群集（菌叢）の機能に注目が集まっている。当該分野では、純粋培養した微生物種を組み合わせることで作成された人工菌叢を用いる再構成的研究によって、一定の成果が得られつつあるが、減算的アプローチによる菌叢解析技術、すなわち既存の既存の菌叢から特定の微生物種だけを取り除くための有効な方法論が存在しなかった。本研究で開発されたCPP融合ペプチド核酸による選択的細胞死誘導技術は、こうした現状を打破する基盤技術のひとつと位置づけられ、菌叢中の微生物間相互作用の直接的観察を可能にするなど、当該分野に大きなインパクトをもたらすものとなりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed at the development of a novel molecular tool which can induce cell death only to specific genera and species of bacteria among various bacteria composing of a microbial consortium (microbiota). We first tried to inactivate an essential gene of target bacteria by delivering a Cas nuclease into the cell using cell penetration peptides (CPP). However, we could not observe the penetration of the CPP-fused Cas nuclease into the cells probably due to the large size of the fusion protein. Accordingly, we employed peptide nucleic acid (PNA), which is a much smaller molecule than Cas nuclease, and introduced them in bacterial cells using CPP. Consequently, we confirmed that a 2-8 μM of CPP-fused PNA induced specific cell death to Escherichia coli and Pseudomonas putida in artificial microbiota.

研究分野：応用微生物学

キーワード：菌叢解析 ペプチド核酸 細胞膜透過ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然界に存在する全ての生物は、他の生物との間に捕食・寄生・共生といった相互作用を成し、巨大なエコシステムを形づくっている。肉眼には見えない微生物もその例外ではなく、これらが群集となり形成するエコシステムの働きは、地球上の元素循環の駆動力ともなっている。近年、腸内細菌叢などのヒト共生微生物群集が我々の健康に極めて大きな影響を及ぼす事実が知られ始めたことなどを契機に、微生物群集(マイクロバイオータもしくは菌叢とも呼ばれる)の振る舞いを各種のオミクス技術を利用して解析・理解しようという研究が活発化している。特に次世代シーケンサーの登場とそれに伴うメタゲノム解析技術の発展は、純粋培養系に立脚したこれまでの微生物学では垣間見ることのできなかつた自然環境中における微生物の多様性とそれらの存在形態を明らかにしつつある。しかしオミクス解析は、多数の微生物の挙動を俯瞰するうえでは有力である一方、マイクロバイオータを構成する個別の微生物の機能にまで踏み込んだ解析を行うことは得手としない。純粋培養した微生物種を組み合わせ、実験室内でマイクロバイオータを再現することで、それぞれの微生物の機能を探る再構成的研究も進められているが、本アプローチの解析対象は、実験室内で培養可能な微生物のみに限られる。自然界に存在する微生物のうち、実験室内で培養できる株は全体の1%にも満たないことは、当該分野では広く知られる事実である。自然環境やヒト腸内環境などにおける微生物間相互作用の実態を解明するためには、難培養・未培養微生物を含む多様なマイクロバイオータの構成微生物に対し、細胞レベル・分子レベルで介入可能な新たな基盤技術の開発が必須である。

2. 研究の目的

こうした背景のもと、本研究では、減算的アプローチによるマイクロバイオータの解析技術、すなわち既存のマイクロバイオータから任意の微生物種だけを選択的に取り除くための方法論を開発することを目的とする。当該技術がマイクロバイオータ研究に及ぼすインパクトは、遺伝子組換え技術(標的遺伝子のノックアウト技術など)の登場が、単独種の生物を研究対象とした古典的生物学に対してもたらしたそれと同等に大きなものになると期待される。

3. 研究の方法

マイクロバイオータを構成する微生物種は極めて多種多様であるが、本研究ではその大半を占めると考えられる細菌に焦点を当て、任意の標的細菌のみに特異的な細胞死を誘導する技術の開発を試みた。標的とする菌株に特異的な細胞死誘導分子を作成し、これらを簡便な方法で細胞内へと導入することを基本戦略とし、細胞死誘導分子としては、Casヌクレアーゼおよびペプチド核酸の2つをとりあげた。またこれらを細胞内に導入するためのツールとしては、細胞透過ペプチド (cell penetration peptide; CPP) を用いた。

4. 研究成果

(1) CPPの選抜

既報にて細菌や植物細胞へのタンパク質導入が報告されている4種類のCPPを用い、大腸菌をモデル細菌としたタンパク質導入実験を行った。耐熱性緑色蛍光タンパク質(TGP)のN末端にそれぞれのCPPを付与した融合タンパク質を組換え大腸菌にて発現させ、70、30分間の熱処理によりこれを簡易精製したものを大腸菌懸濁液に添加し、42にて一晩インキュベートした。集菌、洗浄後の菌体を超音波破碎し、回収されたTGPの蛍光強度を測定することで、各CPPのタンパク質輸送能力を評価した。この結果、HIV-1 TAT proteinに由来するCPP(アミノ酸配列の最初の3文字をとり、RKK-Pepと称する)を付与したTGPを用いた際に最も高い蛍光強度が観察された(表1)。また環境サンプルから無作為に単離した細菌3株についてもRKK-Pepと融合したTGPの導入効果を検証したところ、導入効率に違いは見られたものの、いずれもコントロールに比べて高い蛍光強度が観察された。これらの結果から、以下の検討ではRKK-PepをCPPとして利用することとした。

表1 本研究で試験した CPP と大腸菌への TGP 導入効率

Name	Sequence	Origin	Relative fluorescence intensity (%) *
RKK	RKKRRQRRR	HIV-1 TAT protein	1.7
RQI	RQIKIWFPNRRMKWKK	Antennapedia of Drosophila	0.2
KHK	KHKHKHKHKHKHKHKHKH	Synthetic peptide	0.2
GLF	GLFKALLKLLKSLWKLLLLKA	Amphipathic peptide	1.1

* 菌体を CPP 融合 TGP とインキュベートした後、菌体破碎により回収された TGP の蛍光強度を、実験に用いたそれぞれの CPP 融合 TGP の蛍光の総量でノーマライズした。CPP を有さない TGP を用いたネガティブコントロール実験で得られた値は 0.1% 以下であった。

(2) Cas12f1 の機能検証

標的とする細菌に特異的な細胞死を誘導できる分子として CRISPR-Cas に着目した。原核生物の多くは Casヌクレアーゼによる DNA 二重鎖切断を修復するための機構を持たない。そのため標的細菌の生育に必須な遺伝子を CRISPR-Cas のターゲットとすることで、これを不可逆的に切断し、細胞死に至らしめることができる。一方、一般的に広く用いられる Casヌクレアーゼである *Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 は、約 160 kDa の大きな酵素タンパク質であり、細胞内導入には物理的な困難が伴うと予想された。そこで本研究では、ミニチュア Cas として知られる Cas12f1 (Harrington et al 2018) を用いることとし、大腸菌での機能検証を行った。大腸菌ゲノム上の 5 つの遺伝子を標的としたノックアウト実験を行ったところ、いずれに対しても Cas12f1 は汎用ヌクレアーゼである Cas9 と同等以上のノックアウト効率を示すことができた。

以上の結果に基づき、RKK-Pep を用いた Cas12f1 の大腸菌内への導入実験を実施した。N 末端側から順に、RKK-Pep、TGP、Cas12f1 を連結させた融合タンパク質を作成し、RKK-Pep 融合 TGP と同様の細胞内導入実験に供した。しかしながら、RKK-Pep 融合 TGP で観察されたような細胞内への蛍光シグナルの移行を確認することはできなかった。

(3) RKK-Pep 融合アンチペプチド核酸による選択的細胞死の誘導

ここまでの結果より、RKK-Pep を用いたタンパク質の細胞内への輸送は、対象とするタンパク質のサイズにより大きく制限を受けることが示唆された。そこで研究戦略の見直しを行い、標的細菌に対して選択的細胞死を誘導可能な別の分子ツールとして Cas12f1 よりもはるかに小さな分子サイズを持つアンチセンスペプチド核酸 (アンチセンス PNA) を取り上げることとした。PNA とは、DNA の糖リン酸からなる主鎖構造を N-(2-aminoethyl)glycine ポリマーで置換した核酸類似体である (Nielsen et al. 1991)。PNA は非天然構造を有するため、ヌクレアーゼに対して耐性を有する。このため、微生物の必須遺伝子の mRNA 配列に相補なアンチセンス PNA を当該微生物に導入することで、その発現を抑制し、細胞死を誘導することが可能である (Good and Nielsen 1998)。本研究では、大腸菌に加え、*Pseudomonas putida* をモデル標的細菌として設定し、これらに対する選択的細胞死誘導を試みた。大腸菌、*P. putida* の生育必須遺伝子として、*acpP*、*ftsZ* を選択し、これらの遺伝子の転写産物上のリボソーム結合部位を標的とするアンチセンス PNA を設計した (それぞれ EcPNA、PpPNA と命名した)。各 PNA の N 末端側に RKK-Pep を融合した人工ペプチドを合成し、これらの細胞毒性を試験した。毒性試験には、大腸菌、*P. putida* のほか、*P. putida* と同属異種である *P. fluorescence*、およびグラム陽性細菌である *Lactiplantibacillus plantarum* を指標菌として用いた。生細胞数を 99.9% 以下にまで低下させる PNA 濃度を minimum inhibitory concentration (MIC) と定義し、この値を比較することで各細菌に対する毒性を定量評価した。RKK-Pep 融合 EcPNA は、大腸菌に対して MIC = 2 μM の毒性を示した。また、*P. putida* にも毒性を示したが、その MIC は 8 μM と大腸菌に比べれば緩やかな毒性であった。一方、RKK-Pep 融合 PpPNA は、*P. putida* に対して MIC = 2 μM、大腸菌に対して 10 μM の毒性を示した。いずれの PNA も *P. fluorescence*、*L. plantarum* に対しては、少なくとも 10 μM までの範囲で顕著な生育阻害は示さなかった。以上の結果より、本研究で作成した RKK-Pep 融合 PNA は一定の選択性をもって標的細菌に対する細胞死誘導効果を示すことが確認された。

これらの結果を踏まえ、人為的に構築したモデル菌叢中での選択的細胞死誘導効果を検証した。それぞれ個別に前培養した大腸菌、*P. putida*、*P. fluorescence*、*L. plantarum* を初発細胞濃度 1×10^5 CFU/ml となるように M9 合成培地に植菌した。ここに 2 μM の RKK-Pep 融合 EcPNA もしくは 6 μM の RKK-Pep 融合 PpPNA を添加し、各菌株の生菌数をコロニーカウントにより経時的に定量した。結果は図 1 に示すとおり、期待どおり、EcPNA 添加時には大腸菌が、PpPNA 添加時には *P. putida* の生菌体濃度の低下がみられた。またこれらの菌株の減少に伴い、*L. plantarum* の菌体濃度が低下する様子も確認された。*L. plantarum* は、アミノ酸要求性の高い株であり、M9 合成培地では単独で生育することができない。すなわち本実験で用いた菌叢中で *L. plantarum* は、大腸菌や *P. putida* などが生産したアミノ酸などの代謝物を取り込むことで生菌数を維持していると推察され、本実験の観察結果もこの推察をサポートするものとなっている。一方、*P. fluorescence* の生菌数はいずれの PNA を添加した場合にも、非添加時に比べ優位に上昇してい

た。これは、本株が菌叢中において、大腸菌や *P. putida* と何らかの競合関係にあり、競合細菌の減少によってその生育が増強されたためと考えることができる。このように本研究で開発された選択的細胞死誘導技術（以下、CPP-PNA 法と呼ぶ）は、菌叢中の微生物間の相互作用を解明するためのツールとして有用なものとなることが示された。

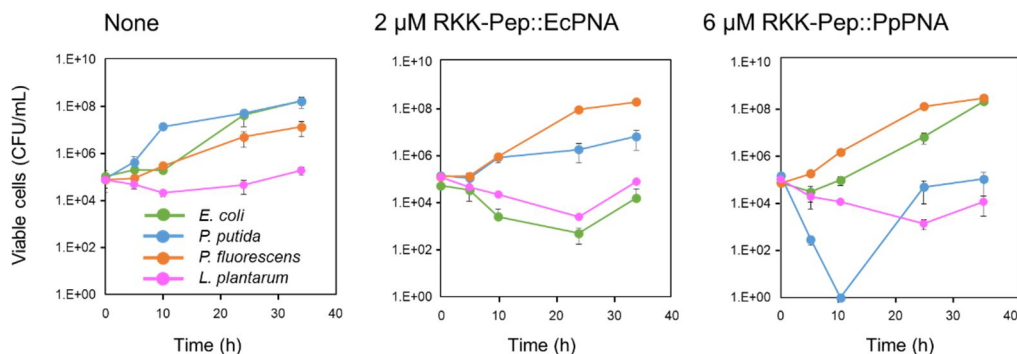


図1 RKK ペプチド融合 PNA 添加による菌叢中の細菌種の変化。左：PNA 比添加、中：2 μM RKK-Pep 融合 EcPNA 添加時、右：6 μM RKK-Pep 融合 PpPNA 添加時

菌叢の構成微生物を属種選択的に制御可能な技術は、世界的に見ても報告例が少ない。数少ない例のひとつとして、接合伝達とゲノム編集ツールを用いた事例が本研究の実施期間中に報告されている (Rubin et al. 2022)。本法を用いれば、菌叢中の標的細菌のゲノム編集が可能となり、CPP-PNA 法では実現不能な遺伝子導入や欠損など、細胞死にとどまらない様々な制御が可能となる。一方で、Rubin らの手法で標的とできるのは接合伝達でレシピエントとなれる特定の細菌に限られ、標的細菌のスペクトルの広さでは CPP-PNA 法に軍配があがる。菌叢機能への注目が高まるにつれ、今後様々なメリット・デメリットを有した菌叢改変技術が開発され、これらは研究の目的によって使い分けられていくものと予想される。CPP-PNA 法はその一角を占めるものとして活用されていると同時に、菌叢改変技術の先駆けのひとつとして、後発研究の着想の礎にもなっていくものなるであろう。

引用文献

- 1) Good L, Nielsen PE (1998) Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 2073–2076
- 2) Harrington LB, Burstein D, Chen JS, Paez-Espino D, Ma E, Witte IP, Cofsky JC, Kyrpides NC, Banfield JF, Doudna JA, and Doudna JA (2018) Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. Science, 362:839-842
- 3) Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (1991) Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. Science, 254:1497-1500
- 4) Rubin BE, Diamond S, Cress BF, Crits-Christoph A, Lou YC, Borges AL, Shivram H, He C, Xu M, Zhou Z, Smith SJ, Rovinsky R, Smock DCJ, Tang K, Owens TK, Krishnappa N, Sachdeva R, Barrangou R, Deutschbauer A, Banfield JF, Doudna JA (2022) Species- and site-specific genome editing in complex bacterial communities. Nat Microbiol, 7: 34-47

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenji Okano, Yu Sato, Tatsuya Hizume, Kohsuke Honda	4. 巻 132
2. 論文標題 Genome editing by miniature CRISPR/Cas12f1 enzyme in Escherichia coli.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 120-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.04.009	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 日詰 達哉, 岡野 憲司, 佐藤 悠, 本田 孝祐
2. 発表標題 アンチセンスペプチド核酸を用いたマイクロバイオータ改変技術の開発
3. 学会等名 第73回日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日詰達哉, 岡野憲司, 佐藤 悠, 本田孝祐
2. 発表標題 ミニチュア CRISPR/Cas12f1酵素を用いたゲノム編集技術の開発
3. 学会等名 日本生物工学会関西支部 学生オンライン発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡野憲司、日詰達哉、佐藤悠、岩木宏明、本田孝祐
2. 発表標題 アンチセンスペプチド核酸を用いた減算的な菌叢改変手法の開発
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野憲司、日詰達哉、佐藤悠、岩木宏明、本田孝祐
2. 発表標題 Subtractive modification of artificial microbiota using antisense peptide nucleic acid
3. 学会等名 The 27th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (国際学会)
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
連携研究者	岡野 憲司 (Okano Kenji) (40623335)	関西大学・化学生命工学部・准教授 (34416)	

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
---------	---------