

腸内細菌から産生される超硫黄分子の病態生理学的意義の解明

Elucidation of the pathophysiological significance of supersulfur molecules produced by intestinal bacteria

大阪公立大学	西山 和宏
研究期間	2024年10月1日～2025年9月1日
滞在研究機関	Weill Department of Medicine Weill Cornell Medicine Belfer Research Building 413 East 69th Street New York, NY 10021
共同研究者等	Prof. Chun-Jun (CJ) Guo
区分	個人 B

Sulfur atoms are known to form catenations (long chain bonds between the same elements) alone, forming a variety of highly reactive supersulfur molecules. Supersulfur molecules have antioxidant and anti-inflammatory properties, and have been shown to play an essential role in energy metabolism in mitochondria, indicating that they are extremely important for mammalian. Supersulfur molecules are thought to be produced by the intestinal microbiome and sulfur metabolism in the body from the sulfur source contained in dietary components. The full extent of the production and metabolism of supersulfur molecules in the intestinal microbiome has not been revealed. This study aimed to clarify the role of the supersulfur molecules produced by intestinal microbiome in mammalian using genetic modification technology (Cell 2022, Science 2019) developed by Dr. Chun-Jun Guo, a host researcher. In this study, no gene disruption strains with reduced supersulfur production ability could be established. It is possible that the antioxidant supersulfur molecules are essential for growth in *Bacteroides vulgatus*, anaerobic bacteria. In the future, we plan to clarify the role of the supersulfur produced by intestinal microbiome in mammalian by using the established supersulfur overexpressing strain.

研究目的

硫黄原子は単独でカテナーション（同一元素同士の長鎖状の結合）を形成し、反応性に富んだ多様な超硫黄分子を形成することが知られている。超硫黄分子は、抗酸化作用や抗炎症作用を持つとともに、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝において必須の役割を担うことが明らかにされ、生体にとって非常に重要であることが示された。超硫黄分子は食事成分中に含まれる硫黄源から腸内細菌叢（ラクノスピラ科やミノコッカス科など）や生体内の硫黄代謝によって産生されると考えられている。生体側の超硫黄分子の産生・代謝はノックアウトマウスや硫黄代謝物の測定技術の発達により詳細な解析がなされているが、腸内細菌叢における超硫黄分子の産生・代謝の全容についてはほとんど明らかになっていな

い。その原因の一つに非モデル細菌を多く含む、腸内細菌叢の遺伝子改変技術が発展していないことが考えられた。そこで本研究では、受け入れ研究先である Chun-Jun Guo 博士が開発した腸内細菌叢の遺伝子改変技術 (Cell 2022, Science 2019) を用いて、腸内細菌が産生する超硫黄分子の生体における役割の解明を明らかにすることを目的とした。

研究経過

【方法】

まず、LC/MS および超硫黄分子プローブを用いて、各腸内細菌から産生され、培養上清中に放出される超硫黄分子を測定した。具体的には、各腸内細菌 (*Bacteroides vulgatus*, *Blautia Hansenii*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium bolteae*, *Ruminococcus gnavus*)

を、Mega 培地、RCM 培地、CMC 培地にそれぞれ 24 時間培養後、遠心し、上清を除去後、100mM シスチンを含む HBSS に再懸濁した。その後、37°C で 30 分間培養後の上清を用いて、産生された超硫黄分子を測定した。次に、超硫黄分子の産生が確認された *Bacteroides vulgatus* において、これまで人およびマウスで超硫黄産生が報告されている酵素 (CARS2、CSE、CBS) と相同性を持つ遺伝子を特定した。その内、CARS については、MetaQuery を用いて糞便中の発現量と疾患との関連について検討した。加えて、Biocycle を使用し、シスチン・システイン代謝に関連する遺伝子も特定した。これらの遺伝子に対して、破壊を行うこととし、遺伝子破壊用のベクターを構築した。具体的には、標的となる遺伝子の一部 (1000 bp 程度) を PCR 法にて、増幅後、pExchanger ベクターに gilson assemble により組み込んだ。完成した各遺伝子を破壊するためのベクターを大腸菌 (s17-1 λpir) との接合により、*Bacteroides vulgatus* に、導入した。*Bacteroides vulgatus* の単一コロニーを 3mL の液体培地に接種し、嫌気条件下で 37°C で培養した。遺伝子破壊用のベクターを保持する大腸菌 S17 を、カルベニシリン (100 μg/mL) を添加した LB 培地に接種し、37°C、220 rpm で好気振盪培養した。約 12 ~16 時間後、大腸菌 S17 の OD600 が 0.8~1.0 に達した時点で、大腸菌 S17 培養液 6 mL を 1500 g で 2 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットを 3 mL の PBS 緩衝液で 2 回洗浄した。洗浄した大腸菌 S17 細胞ペレットを、*Bacteroides vulgatus* の一晚培養液 3 mL に再懸濁し、ピペッティングで穏やかに混合した。混合物を 0.2 μm フィルターで濾過した。濾過液は廃棄した。ドナー細胞とレシピエントの細胞が混ざったフィルターを、TSAB 寒天培地の表面に (細胞表面を下にして) 置いた。培地は 37°C のインキュベーター内で好氣的に培養した。37°C で 24 時間好氣的に培養した後、フィルターを 2 mL の予め嫌気的条件下に置いた液体培地 (Mega 培地) に浸した。フィルター上の細胞を、穏やかにボルテックスミキサーで培地に再懸濁した。混合物を嫌気チャンバーに移し、100 μL を、200 μg/mL ゲンタマイシン+15 μg/mL チアンフェニコールを含む TSAB 寒天培地に塗布した。標的株のコロニーは通常、36~48 時間後に出現した。4 つのコロニーを拾い上げ、200 μg/mL ゲンタマイシン+15 μg/mL チアンフェニコールを含む TSAB 寒天培地に再塗布し、単一コロニーを単離

した。単離した単一コロニーを、ゲンタマイシン 200 μg/mL およびチアンフェニコール 15 μg/mL を添加した 3mL の液体培地に接種した。12 時間後、instagene matrix を用いてゲノム DNA を抽出した。その後、特異的なプライマーを用いて診断 PCR を実施した。

加えて、標的遺伝子の CDS を PCR 法にて、増幅後 pExchanger ベクターに *Bacteroides* 属の強力なプロモーターである pBT1311 を組み込んだ過剰発現用ベクターに gilson assemble により組み込んだ。完成したベクターを大腸菌 (s17-1 λpir) との接合により、*Bacteroides vulgatus* に導入し、標的遺伝子の過剰発現株を樹立した。

今回作製した各株について、Mega 培地に 24 時間培養後、遠心し、上清を除去後、100mM シスチンを含む HBSS に再懸濁した。その後、37°C で 30 分間培養後の上清を用いて、産生された超硫黄分子を測定した。

【結果】

超硫黄産生菌として報告されている菌種のうち 6 菌種で測定を実施したところ、*Clostridium bolteae*、*Bacteroides vulgatus*、*Ruminococcus gnavus* などが高い超硫黄産生能を持つことが明らかとなった。また、Mega 培地中で培養した時に最も超硫黄の産生量が増加した。また、MetaQuery を使用してヒト腸管の便メタゲノムにおける CARS の存在量を確認したところ、炎症性腸疾患の中でもクローン病において超硫黄分子産生酵素の存在量が上昇していることも明らかとなった。続いて、*Bacteroides vulgatus* を標的として、遺伝子破壊を実施した。超硫黄産生酵素の候補遺伝子として CARS、MalY (CSE、CBS の相同遺伝子)、BVU_RS06885、BVU_RS11395 遺伝子を破壊したところ、CARS および BVU_RS06885 を遺伝子破壊すると、菌の生育が認められなかった。また、MalY、BVU_RS11395 を遺伝子破壊しても超硫黄の産生能に変化は認められなかった。そこで、CARS の過剰発現ベクターを作成し、遺伝子導入を実施した。CARS を過剰発現させた *Bacteroides vulgatus* は、野生型と比較して、超硫黄の産生量が増加した。

考察

今回、超硫黄産生能が減少した遺伝子破壊株は樹立できなかった。特に、大腸菌でも超硫黄産生を担う CARS を破壊すると、菌の発育が認められなかつ

たことから、嫌気性菌である *Bacteroides vulgatus* では、抗酸化能を持つ超硫黄分子が生育に必須である可能性も考えられる。今後は、樹立した CARS 過剰発現株をマウスに植菌することで、腸内細菌が産生する超硫黄の生体における役割を明らかにする予定である。

研究の発表

口頭発表

1. 学術変革領域 (A) 「硫黄生物学」
月例領域プロGRESSミーティング 2025 年 1 月 6
日

誌上発表

なし