

遺伝子編集が困難な腸内細菌における代謝経路の解明

Decoding gut microbial pathways in genetically intractable strains

スタンフォード大学 關場 一磨

研究期間 2025 年 4 月 1 日～2025 年 12 月 19 日

滞在研究機関 Department of Pathology, Stanford University
Stanford, CA 94305, United States

共同研究者等 Dylan Dodd

区分 個人 B

Gut microbial small molecules present at high concentrations in human circulation and play critical roles in host physiology. However, for many gut bacteria that produce these metabolites, genetic manipulation remains challenging, limiting mechanistic studies at the gene level. In this study, we established an integrated platform to link bacterial genes with metabolic phenotypes using a genetically intractable gut bacterium. We generated a random mutant library using chemical mutagenesis. Individual mutants were cultured under anaerobic conditions, and culture supernatants were analyzed using high-throughput liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). Mutants exhibiting significant metabolic phenotype were subjected to next-generation sequencing to identify candidate genes associated with specific metabolite changes. This approach enables direct connections between bacterial genes and metabolic outputs without reliance on targeted genetic tools. Overall, this platform provides a scalable strategy to dissect metabolic pathways in genetically intractable gut microbes and expands opportunities for functional microbiome research.

研究目的

ヒトの腸管には約 1000 種類 約 100 兆個もの細菌が共生し、ヒトの疾患の病態生理に深く影響していると考えられる^[1,2]ものの、その分子機構は不明な点が多い。そうした中、腸内細菌叢は数百種類もの化合物を産生し、それが血中に蓄積することで全身に作用するということが分かってきた。所属研究室は腸内細菌の遺伝子編集で代謝物を制御し、病態を改善し得ること等を示してきた^[3]。このように腸内細菌代謝物は病態の解明および治療標的として重要と考えられるが問題は、その腸内細菌代謝経路のほとんどが不明であり、かつ腸内細菌代謝経路の同定手段が非常に限られているということである。CRISPR 技術を応用するための非相同末端結合は多くの細菌で保存されておらず、トランスポゾン変異が可能な細菌もごく一部に限られる^[4]。つまりほとんどの腸内細菌は遺伝学的に扱いにくく（genetically intractable）、たとえ病態に重要な菌株や化合物を同

定できても、その代謝経路の同定は困難で、病態の分子機構解明に至らない。実際、機能が同定された腸内細菌遺伝子は 2 割以下とされる。一部の細菌で代謝経路は明らかにされつつあるが、その手法は genetically intractable な菌株に適用できない^[5,6]。

そこで、本研究では、1) genetically intractable な腸内細菌にも適応可能な新たな代謝経路同定システムを開発し、2) ヒトの病態を制御するための有望な標的となる腸内細菌経路を同定することを目的とした。

研究経過

1) 化学変異によるランダム変異ライブラリーの樹立

・モデル細菌の選定：短鎖脂肪酸や分岐鎖脂肪酸、芳香族脂肪酸はいずれも腸内細菌代謝物として高濃度に血中に存在し、各々がヒトの病態生理に強く関わる^[3]。腸肝関連や腸脳関連などの言葉が表すよう

な、腸内細菌が及ぼす全身臓器での代謝能や免疫応答などの変化にこれらの小分子化合物が強く関わっている。本研究ではこれらの重要な化合物を代謝するが、genetically intractable であり遺伝子レベルでの研究はされていない *Blautia hydrogenotrophica*^[7] を最初のモデルとした。

・化学変異の条件検討：化学変異原による変異は基本的にランダムだが、変異原ごとに Hot spot があるとされるため、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Ethyl methanesulfonate といった複数の変異原で条件検討を行った。ここで、細菌 1 細胞あたりの変異遺伝子数が過多であるとその後代謝経路同定が困難となり、逆に過少であるとライブラリーの必要個体数が膨大となってしまう。そこで、化学変異原の暴露濃度と時間を段階的に変えて、適切な 1 細胞あたりの変異遺伝子数を目指した。変異遺伝子数の測定には、全ゲノムシーケンスを行った。

・変異ライブラリーの作製：決定した条件で化学変異を行った。所属研究室は 1 日 2,500 コロニーを嫌気条件下でピックアップするロボット (RapidPick, Hadoson, Springfield, NJ) を備えており、ライブラリーの作製にそれを用いた。

2) ハイスループット質量分析

作製した変異体は個別に嫌気性チャンバーで 37°C にて 24 時間培養し、培養液を回収した。回収した培養液は、内部標準となる同位体標識化合物を加えた上で、メタノール蛋白沈降後を行い、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS) に資し、培養液中の代謝物濃度を測定した。この際、事前にハイスループット質量分析の条件を検討するために genetically tractable な腸内細菌で、事前検討を行った。複数の異なる LC-MS 条件 (C18 positive underivatized, dansylation derivatized positive, and 3-nitrophenylhydrazine derivatized negative) を使用した。サンプルは冷蔵オートサンプラーを介して移動相に注入され、Agilent 1290 Infinity II UPLC によってクロマトグラフィー分離され、Agilent 6545XT Q-TOF で検出した。MS1 スペクトルは centroid mode で収集し、サンプルのピーク割り当ては Agilent Technologies の MassHunter Quantitative Analysis v.10.0 ソフトウェアを使用して、標準物質との retention time と accurate mass の比較で行った。化合物は、適切な内部標準を用いた同位体希釈質量分析法を使用して、真正標準

で作成された検量線から定量した。

3) 全ゲノム解析

代謝物濃度の変化が有意な変異株は、次世代シーケンスで変異遺伝子を特定した。これにより、化合物濃度変化と細菌遺伝子を機械的に結びつけることができる。現在はそのデータを詳細に解析中である。

考察

本研究では、これまで遺伝学的操作が困難であった腸内細菌を対象として、化学変異によるランダム変異ライブラリーとハイスループット質量分析を組み合わせた解析基盤を構築した。短鎖脂肪酸、分岐鎖脂肪酸、芳香族脂肪酸といった腸内細菌由来代謝物は、腸肝連関や腸脳連関を介して宿主の代謝・免疫・神経機能に深く関与することが知られているが、これらの代謝経路を担う細菌遺伝子の多くは未解明であった。本研究は、遺伝子改変技術に依存しないアプローチにより、こうした課題に対する新たな解析手段を試みたものである。

化学変異条件については、複数の変異原を用いて曝露条件を系統的に検討し、1 細胞あたりの変異遺伝子数を適切な制御を試みた。この点は、ランダム変異という性質上しばしば問題となる変異過多あるいはカバレッジ不足を回避する上で重要であり、今後他の genetically intractable な細菌へ応用可能な知見と考えられる。

さらに、個々の変異株培養上清を対象としたハイスループット LC-MS 解析により、代謝物プロファイルの変化を定量的に評価できる系を確立した。複数の前処理およびクロマトグラフィー条件を併用することで、多様な代謝物を同時に捉えることが可能となった。内部標準を用いた同位体希釈質量分析法により、定量性と再現性という点も考慮した。

現在は、本アプローチにより同定された候補遺伝子の機能的解釈や既知代謝経路との関連付けを含めた詳細解析を進めている段階であり、今後は代謝経路の再構築や、他菌種への保存性の検討へと発展させることが期待される。

参考文献

1. Qin J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65, 2010.
2. Lozupone CA, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230, 2012.
3. Dodd D et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature* 551, 648–652, 2017.
4. Waller CM et al. Toward a genetic tool development pipeline for host-associated bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 156–164, 2017
5. Liu Y et al. A widely distributed gene cluster compensates for uricase loss in hominids. *Cell* 186, 3400–3413.e20, 2023.
6. Liu Y et al. Clostridium sporogenes uses reductive Stickland metabolism in the gut to generate ATP and produce circulating metabolites. *Nat. Microbiol.* 7, 695–706, 2022.
7. Wang T et al. In vitro interactions between *Blautia hydrogenotrophica*, *Desulfovibrio piger* and *Methanobrevibacter smithii* under hydrogenotrophic conditions. *Gut Microbes.* 15, 2261784, 2023

研究の発表

口頭発表

1. Sekiba K, Hou BH, Chen H, Liu Y, Dodd D. Unbiased mapping of gut microbial pathways that contribute to intestinal health. Digestive Disease Week (DDW) 2023, Chicago, IL, USA, May 2023
2. Sekiba K, Hou BH, Chen H, Liu Y, Dodd D. Unbiased mapping of gut microbial pathways that contribute to human health. Stanford Microbiology & Immunology Wednesday Seminar, Stanford, CA, June 2023

ポスター発表

1. Sekiba K, Hou BH, Chen H, Liu Y, Zhou Z, Crawl-Bey A, Dodd D, A large-scale metabolomics screen to define pathways for microbiome-derived small molecules. AASLD The Liver Meeting 2024, San Diego, CA, Nov 2024

