

生活習慣病にかかわる腸内細菌由来血中循環化合物の 新規同定と機序解明

關 場 一 磨* Dylan Dodd*

DISCOVERY OF CIRCULATING GUT MICROBIAL METABOLITES THAT CONTRIBUTE TO HUMAN HEALTH

Kazuma Sekiba and Dylan Dodd

Key words: gut microbiome, host-microbe interaction, metabolomics.

緒 言

生活習慣病の進展に腸内細菌叢の乱れが深くかかわっているとされるが、その分子機序は不明なところが多い。そうしたなか、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・循環することで全身に作用する¹⁾ということがわかってきた。しかし、従来のメタボロミクスでは、リファレンスの乏しさから多くの腸内細菌由来化合物が解析の対象から除外されてしまっている。そこで、本研究では、独自の腸内細菌由来化合物 data library をリファレンスとして public metabolome database を再解析することで、従来は解析から除外されていた化合物を拾い上げ、生活習慣病にかかわる腸内細菌由来血中循環化合物を新規に同定し、生活習慣病における宿主-腸内細菌相互作用を分子レベルで新たに定義することを目指した。

方 法

A. 研究倫理コンプライアンス

本研究のすべての実験は倫理規制に準拠して行

われた。動物実験は、スタンフォード大学実験動物管理委員会が承認したプロトコルに従って実施された（承認番号：33299）。菌株培養実験は、スタンフォード大学バイオセーフティ管理委員会が承認したプロトコルに従って実施された（承認番号：APB2650）。

B. Bioinformatics

メタボロームデータ⁴⁾は MS-DIAL を用いて処理した。具体的には、LC-MS/MS の生データを Abf (Analysis Base File) Converter を用いて .abf 形式に変換した。変換されたファイルは MS-DIAL にインポートし、代謝物の特徴抽出、アライメント、推定注釈を実施した。MS-DIAL でのデータ処理後、手動でピークを確認し、誤検出の代謝物特徴を排除した。次いで、代謝物のアノテーションは MS-Finder を用いて実施した。各代謝物には、当研究室ライブラリとの MS2 スペクトル類似性に基づき、質量誤差および MS2 マッチングスコアを割り当てた。同定された代謝物のうち、最も質量誤差が小さく、MS2 マッチングスコアが高いものを選択した。

C. 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS)

この研究では、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 internal standard 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。

D. 腸内細菌の培養条件

すべての嫌気性細菌は、5% 水素、10% 二酸化炭素、85% 窒素ガスを使用した Coy type B 嫌気性チャンバー内で 37°C にて培養した。嫌気性ガス注入器を使用して、水素レベルを 3.3% に維持した。すべての培地とプラスチック容器は、使用前に最低 24 時間、嫌気性チャンバーで事前に還元した。遺伝子操作の大腸菌は、LB 培地を使用して好気条件下で培養した。

E. 腸内細菌の CRISPR 遺伝子編集

標的遺伝子を標的とした CRISPR プラスミド DNA²⁾ を bacterial transconjugation によって腸内細菌 Y に導入した。まず、プラスミドを電気穿孔法により *E. coli* CA434 株に導入し、Chloramphenicol を含む LB 寒天培地で形質転換体を選択した。CRISPR プラスミドを含む *E. coli* CA434 株の培養液を PBS で洗浄し、細胞ペレットを腸内細菌 Y の培養液に再懸濁した。細胞混合懸濁液は、D-cycloserine および thiamphenicol を添加した RCM 寒天培地上で選択した。その後、分離した単一コロニーを RCM 液体培地に接種し、同じ抗生物質を添加して一晩培養した。

培養液は theophylline を含む RCM 寒天培地に塗布した。約 24 時間後に出現したコロニーを選択し、PCR 法にて標的遺伝子のノックアウトを確

認した。

F. 動物実験

マウスは Taconic Biosciences (*Mus musculus*, Tac:SW) から入手し、無菌アイソレーター (CBC, Madison, WI, USA) で飼育された、雄または雌のノトバイオオート Swiss Webster 無菌マウス (8~12 週齢) で実施した。マウスは、温度が 20~22°C、湿度が 40~60% に制御された 12 時間の明暗サイクルの施設で、標準飼料 (LabDie, カタログ番号 5 K67) と滅菌水で飼育し、それらは自由摂取とした。野生型または変異型腸内細菌移植は、経口投与 (300 μ L、約 1×10^8 CFU) により細菌を導入した。血液サンプルは顔面静脈から採取し、最終濃度が約 15 mM になるように抗凝固剤として濃縮 EDTA ナトリウムを含むチューブに約 100 μ L の血液を採取した。10°C で 15 分間、1500 g で遠心分離した後、血漿を新しいチューブに移した。新鮮な糞便ペレットは個々のマウスから直接採取した。実験終了時に、二酸化炭素窒息および頸椎脱臼により屠殺したマウスから盲腸の内容物を採取した。すべてのサンプルは -80°C で保存した。

G. 統計解析

すべての統計解析は R (version 4.2.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて実施した。サンプルサイズは統計手法によって事前に決定したものではない。サンプルサイズは動物の出産数、および性別と年齢を実験内で均等にすることを考慮して選択した。解析からデータを除外することは行わなかった。LC-MS 解析では、サンプルは注入および分析前にランダム化した。すべての動物実験において、研究デザインを知らない研究者が同腹仔をグループ分けし、実験開始前にランダムに治療群に割り当てた。

結 果

原著論文発表前であり、同定化合物や同定腸内細菌の名称など詳細については伏せることを承知いただく。

A. Original data library を用いた public data の再解析

生活習慣病にかかわる腸内細菌由来化合物を新規に同定するために、public database を再解析し

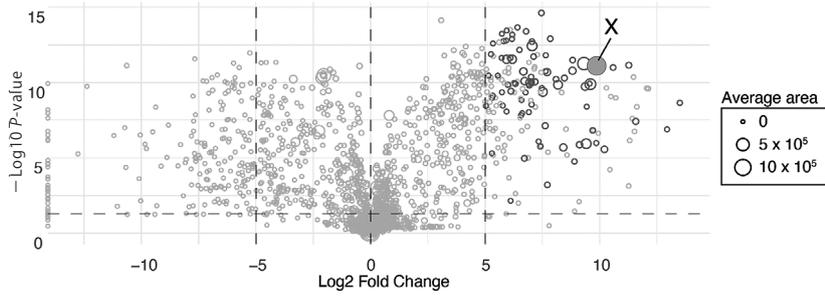


図1. 化合物 X の同定

Fig.1. Identification of compound X.

Volcano plot highlighting significant differences in gut microbial metabolites between metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) patients and healthy controls. Compound X was identified as significantly decreased in MASLD patients ($P < 0.05$, fold change ≥ 32 , ion counts area in healthy patients $\geq 5 \times 10^5$).

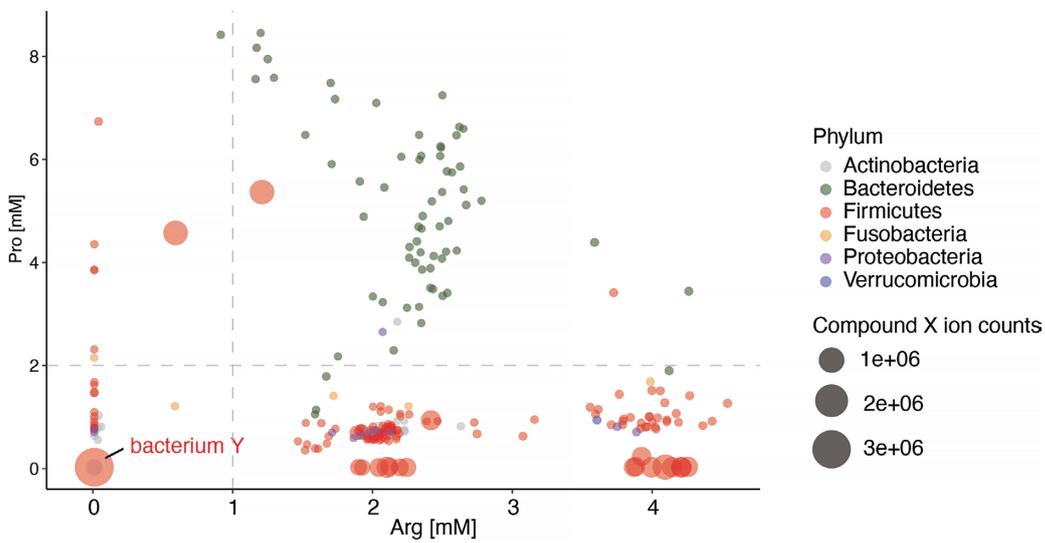


図2. 腸内細菌 Y は化合物 X を産生する

Fig.2. Identification of gut microbiota Y as a producer of compound X.

Quantification of compound X production and proline (Pro) and arginine (Arg) consumption by gut microbiota strains in the library, highlighting gut microbiota Y as a key producer.

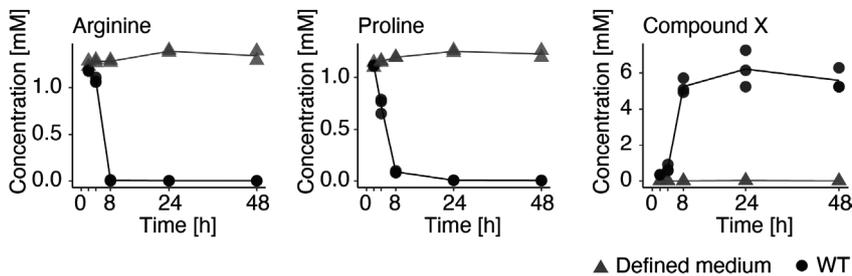


図3. 規定培地において腸内細菌 Y は化合物 X を産生する

Fig.3. *In vitro* confirmation of compound X production by gut microbiota Y in defined medium.

Gut microbiota Y ($n = 3$) and was cultured in defined medium, and the culture medium was collected at T = 0, 2, 4, 8, 24, and 48 hours. The concentration of arginine, proline, and X was determined by LC-MS.

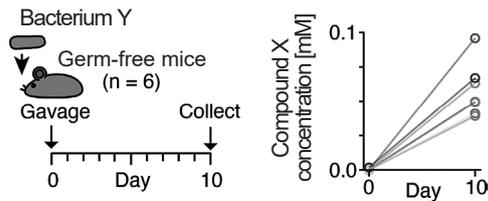


図4. マウスにおいて腸内細菌 Y は化合物 X を産生する
Fig.4. *In vivo* confirmation of compound X production by gut microbiota Y.

Gut microbiota Y was transplanted into germ-free mice (n = 6). Compound X was undetectable in germ-free mice prior to transplantation. After 10 days from the transplantation, compound X was detected in the serum of the mice.

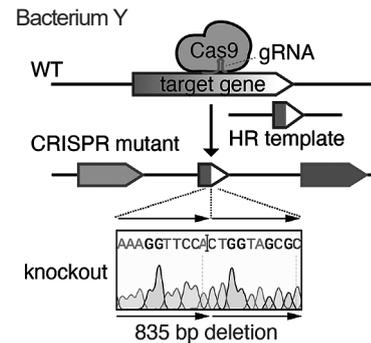


図5. CRISPR 技術による同定化合物 X 産生責任遺伝子 Z のノックアウト

Fig.5. CRISPR knockout of the gene Z that is responsible for compound X production.

The gut microbial gene Z, identified as being involved in the metabolism of compound X, was knocked out using CRISPR technology. The successful knockout of gene Z was confirmed by DNA sequencing. WT; wild type, HR; homologous recombination.

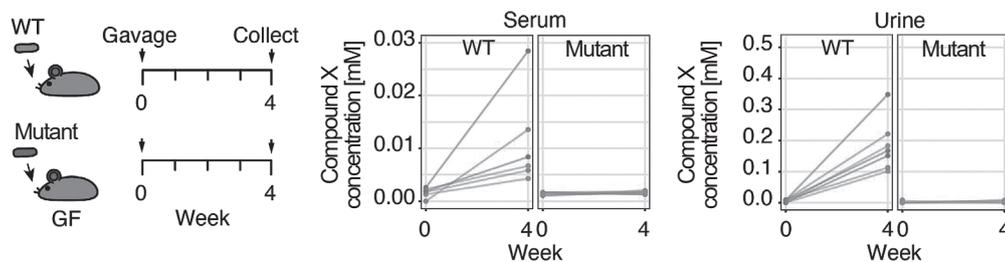


図6. 遺伝子 Z ノックアウト変異体は化合物 X を産生しない

Fig.6. Gene Z knockout mutant does not produce compound X.

Germ-free mice (n = 6) were transplanted with either wild-type (WT) gut microbiota Y or the CRISPR knockout mutant lacking gene Z. Four weeks post-transplantation, compound X was detected in the serum and urine of the WT group but was absent in the knockout group.

た。通常のメタボローム解析ではリファレンスが限られており、90%以上が junk として無視されているが、当研究室が独自に作製した腸内細菌ライブラリーとそれが産生する化合物ライブラリーの大規模データセットを用いて再解析することで、病態にかかわる新たな化合物とその責任腸内細菌を同定した。ここではまず、運動不足とも関連が強い生活習慣病患者、特に代謝機能障害関連脂肪性肝疾患 (MASLD) のデータ⁴⁾に着目し、MASLD 罹患者で有意に血中濃度が低下している腸内細菌由来化合物を検出したところ化合物 X が候補として検出された (図1)。

次いで、同定した化合物を産生する腸内細菌を自身のデータセットから同定した。化合物 X はアルギニン、オルニチンに由来すると考えられたため、それらを消費し、かつ化合物 X を産生する腸内細菌を絞り込んだところ、腸内細菌 Y が

候補として検出された (図2)。これを裏付けるために、腸内細菌 Y を規定培地で再度培養し、化合物 X および周辺化合物を測定したところ、周辺化合物の消費および化合物 X の産生が確認できた (図3)。

B. 無菌マウスを用いた同定化合物の作用機序解明

ここまでの解析で得られた同定化合物産生腸内細菌 Y が宿主に与える影響を調べるために、同定化合物産生腸内細菌 Y を無菌マウスへ移植した。化合物 X は宿主由来ではないため、無菌マウスでは検出されないが、腸内細菌 Y の移植後10日で化合物 X を血中に認められた (図4)。

C. 遺伝子編集による同定化合物の作用機序解明

次いで、化合物 X の宿主内での産生をコントロールするために、同定した化合物の代謝にかか

わる腸内細菌遺伝子 Z を CRISPR 技術でノックアウトした (図 5)。ノックアウト腸内細菌を規定培地で培養すると、化合物 X の産生消失を認めた。

このノックアウト腸内細菌もしくは野生型腸内細菌 Y を無菌マウスに移植することで、より自然な条件で化合物 X の有無による宿主の変化を評価できると考えた。実際に、野生型腸内細菌 Y 移植群では化合物 X の産生を認めたが、ノックアウト腸内細菌移植群では化合物 X の産生を認めなかった (図 6)。この際、肝臓組織を採取しており、現在はその解析を進めている。

考 察

ヒトの腸管には約 1000 種類・100 兆個もの細菌が共生し、ヒトの病態生理に大きく影響している。特に、その分子機構として、腸内細菌叢が産生する数百種類もの化合物が注目されており、腸内細菌由来血中循環化合物を制御することは、ヒトの健康を改善する promising なアプローチになると考えられている³⁾。そうした観点から、ヒトのメタボローム解析が進んできているが、問題は腸内細菌由来血中循環化合物 library の乏しさから、解析から除外されてしまっている化合物が無数にある⁵⁾ ということである。本研究は、そうした問題点を解決すべく、独自の大規模リファレンスデータを用いて、従来は同定不可能であったヒトの疾患にかかわる腸内細菌由来血中循環化合物を新たに同定しようとしたものである。今回、新たに化合物 X およびその産生腸内細菌 Y を同定した。更に、化合物 X の産生能を消去した変異型腸内細菌の作製にも成功したことで、今後は、化合物 X のヒトの疾患における宿主-腸内細菌相互作用の分子メカニズムを新たに定義できると考える。更に、本研究手法はその他の疾患にも拡く適応可能であり、腸内細菌から一般の健康を考えるうえで重要な研究になると考える。

総 括

本研究は、腸内細菌由来血中循環化合物のリ

ファレンスデータ不足という課題を克服し、ヒトの疾患にかかわる新規化合物 X およびその産生腸内細菌 Y を同定するという成果を挙げた。化合物 X は MASLD 罹患者で有意に血中濃度が低下している腸内細菌由来化合物であり、その同定は罹患者数が増えている MASLD の病態生理に新たな知見をもたらす。更に、こうした成果は、ヒトの疾患の病態生理学的理解を深化させるだけでなく、腸内細菌叢を基盤とした新しい医療アプローチの可能性を示す。また、変異型腸内細菌の作製に成功したことは、腸内細菌がヒトの疾患に与える影響を分子レベルで解明するための強力なツールとなり得る。本研究の成果は、腸内細菌叢とヒトの健康との関係を解明するための新たな視点を提供するだけでなく、他疾患にも応用可能な汎用的なアプローチを提案するものである。化合物 X と宿主の関係については、今後の追加検討が必要であるが、こうした成果は腸内細菌を標的とした新たな治療法や予防法の開発に寄与するものだと考える。

謝 辞

本研究にあたり寛大な援助をいただきました公益財団法人明治安田厚生事業団に深く御礼申し上げます。また、研究の指導・協力をいただきましたスタンフォード大学ドッド研究室および関係各位に感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Belkaid Y, et al. (2014): Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, **157**, 121-141.
- 2) Cañadas IC, et al. (2019): RiboCas: a universal CRISPR-based editing tool for *Clostridium*. *ACS Synth Biol*, **8**, 1379-1390.
- 3) Dodd D, et al. (2017): A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature*, **551**, 648-652.
- 4) Oh TG, et al. (2020): A universal gut-microbiome-derived signature predicts cirrhosis. *Cell Metab*, **32**, 878-888.e6.
- 5) Schiffman C, et al. (2019): Filtering procedures for untargeted LC-MS metabolomics data. *BMC Bioinformatics*, **20**, 334.