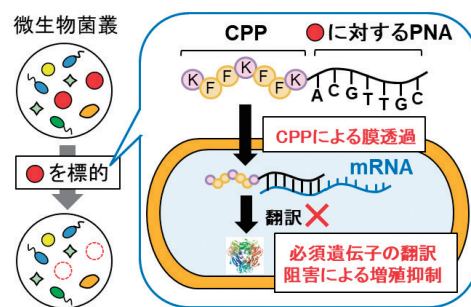


はじめに

ヒトの腸内には1,000種、100兆もの微生物が存在し、「菌叢」と呼ばれる生態系を築く。次世代シーケンサーの登場により、菌叢中の微生物ゲノムを丸ごと解析し、微生物組成を調べることが可能になった。その結果、健康者と病状者が持つ菌叢の微生物バランスを比較することで、疾患の発症/抑制に関わる微生物を推定することが可能になった。次なる課題は、疾患の発症/抑制に関わる微生物を特定し、菌叢機能を制御することであるが、数多の微生物が存在する菌叢において個々の微生物の動態を調べることは難しい。遺伝子破壊による機能損失から微生物が持つ遺伝子機能を解明するがごとく、微生物の不活化によって菌叢が有する個々の微生物機能を解明できないだろうか?このような目論見のもと、本研究では、菌叢中の標的微生物のみを死滅させる技術の開発を行った。

ペプチド核酸を用いた菌叢改変技術の開発

菌叢を減算的に改変するには、標的微生物に静菌的あるいは殺菌的に働く何かしらの物質を菌叢に加えると良い。その候補として、まず初めに、DNAの主鎖構造をペプチドで置換したペプチド核酸(PNA)に着目した。PNAはDNAより生体安定性が高く、一本鎖のDNAやRNAと結合できる。また、塩基性のアミノ酸を多く含む細胞膜透過性ペプチド(CPP)と融合することで微生物細胞内への送達も可能である¹。そこで、*Escherichia coli*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas fluorescens*、*Lactiplantibacillus plantarum*からなる人工菌叢において、*E. coli*や*P. putida*が持つ必須遺伝子のmRNAに相補なPNAを人工菌叢に添加した結果、標的微生物の増殖抑制に成功した(図1)²。しかし、CPPの膜透過性が不十分なことから送達可能なPNAの鎖長は10塩基程度にとどまり、十分な配列特異性を付与することができなかった。



バクテリオファージを用いた菌叢改変技術の開発

そこで、より特異性の高い菌叢改変技術の開発を目指しバクテリオファージに着目した。ファージは細菌に対して宿主特異的に感染するウイルスであり、その宿主特異性は種や株レベルで発揮されることもある。また、ファージは宿主内で自己の複製を作りながら宿主を溶菌するため、「増殖可能な殺菌剤」として利用できる。このようなファージの特性を活かし、*E. coli*、*P. putida*、*Bacillus subtilis*、*L. plantarum*からなる人工菌叢において標的菌のみを死滅させることができるかを検証した。各微生物に感染するファージを土壌や下水から単離した後、人工菌叢にこれらのファージを添加した結果、標的とする微生物のみを特異的に溶菌することに成功し、菌叢改変のコンセプトを実証することができた³。

このようなアプローチを実菌叢へと適用するためには、狙った微生物のファージを迅速に取得する必要がある。環境サンプルからのファージの単離は運任せの要素もあり、必ずしも標的微生物に感染するファージが単離できるとは限らない。面白いことにファージの中には自身のゲノムを宿主微生物のゲノムに溶原化させるものもある。これは微生物ゲノムの中にその微生物に感染するファージの設計図が記録されていることを示す。従って、この設計図に則ってファージを人工合成できれば、ファージを探索せずとも入手できると考えた。そこで、λファージが溶原化した大腸菌のゲノムからファージを合成できるかを検証した(図2)。λ溶原化株のゲノムよりλファージのDNAを複数断片にわけてPCR増幅し、これをλ非感染株に導入した。この際、λ非感染株に相同組換え酵素を発現させておくことで、*in vivo*でDNA断片を連結し、全長のファージDNAをアセンブルすることができる⁴。これによりファージに感染した状態を疑似的に作り出し、ファージを人工合成できることがわかった。こうして人工合成したファージは天然のファージと同様に菌叢改変へ利用することが可能であった(図2)³。

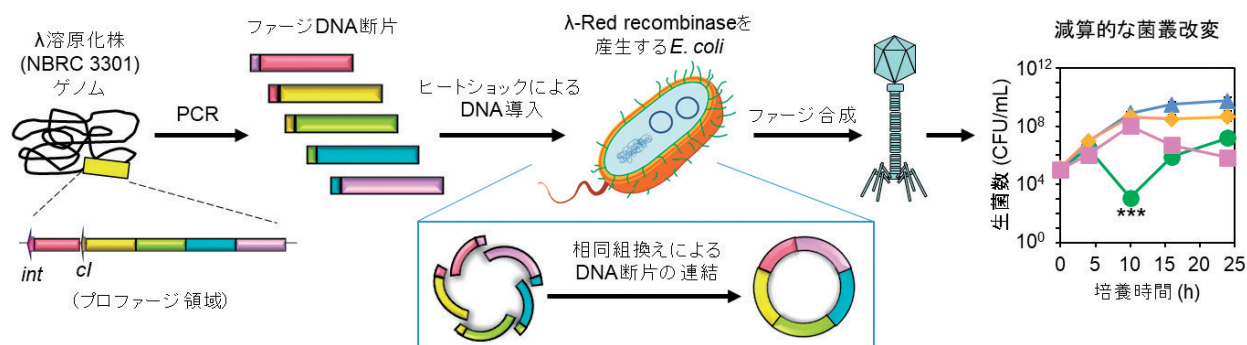


図2 プロファージを設計図としたファージの人工合成
丸、三角、菱形、四角のシンボルはそれぞれ*E. coli*、*P. putida*、*B. subtilis*、*L. plantarum*を示す。

今後の展望

上記の結果は、1,000種の腸内細菌に感染するファージを獲得できれば、菌叢を自在に改変できる可能性を提示している。従って、今後は「ワンサウザンドファージ獲得プロジェクト」と銘打って、任意の腸内細菌に感染するファージの合成を目指す。また、ファージから溶菌能力を欠失させ、ゲノム編集能を搭載することで、菌叢中の狙った微生物の機能を*in situ*で改変する技術の開発も試みる。このような技術が開発した暁には菌叢の機能解明や制御に必要な菌叢をオンデマンドに作出することが可能となり、「合成生態学」とも呼ぶべき新たな学問体系の創出につながるだろう。

謝辞

本研究は、大阪大学、および関西大学で行われました。研究の遂行にあたり、本田孝祐教授(大阪大学)、および岩木宏明教授(関西大学)をはじめ、大阪大学生物工学国際交流センター分子微生物学研究室と関西大学化学生命工学部環境微生物工学研究員のスタッフの皆様、学生の皆様に多大なるご支援・ご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Good, L. et al. *Nat. Biotechnol.* **19**, 360-364 (2001)
2. Hizume, T. et al. *Front. Microbiol.* **14**, 1321428 (2024)
3. Tanaka, T. et al. *Front. Microbiol.* **15**, 1403903 (2024)
4. Cheng, L. et al. *Cell Rep. Methods* **2**, 100217 (2022)

略歴

2004年 3月 神戸大学 工学部 応用化学科 卒業
2006年 3月 神戸大学大学院 自然科学研究科 応用化学専攻 博士前期課程修了
2008年 4月 日本学術振興会 特別研究員DC2
2009年 3月 神戸大学大学院 自然科学研究科 分子物質科学専攻 博士後期課程修了・博士(工学)
2009年 4月 日本水産株式会社(現・株式会社ニッスイ) 中央研究所 研究員
2011年 4月 大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 特任助教
2011年11月 大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 助教
2020年 4月 大阪大学 生物工学国際交流センター 助教
2022年 4月～ 関西大学 化学生命工学部 准教授(現在に至る)

Introduction

The human gut hosts about 1,000 species and 100 trillion microorganisms, forming a complex microbiome. Next-generation sequencing enables comprehensive microbial genome analysis, revealing microbiome composition. Comparing healthy and diseased individuals has helped identify microbes linked to disease onset and suppression. The next challenge is to reveal the role of these microbes and regulate microbiome function. However, analyzing individual species within such a vast ecosystem is difficult. Just as gene disruption reveals gene function, could microbial inactivation clarify individual roles within the microbiome? This study aimed to develop a technology to selectively eliminate target microorganisms in microbiome.

Microbiome engineering using peptide nucleic acids

To modify the microbiota subtractively, an agent acting bacteriostatically or bactericidally on target microorganisms can be added. We first focused on peptide nucleic acids (PNA), where the DNA backbone is replaced by peptides. PNAs are more stable than DNA and bind to single-stranded DNA or RNA. By fusing with cell-penetrating peptides (CPPs) rich in basic amino acids, PNAs can be delivered into microbial cells¹. In an artificial microbiome of *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Lactiplantibacillus plantarum*, adding PNAs complementary to the mRNA of essential genes in *E. coli* and *P. putida* successfully inhibited target growth (Fig. 1)². However, due to insufficient CPP membrane permeability, PNA chains delivered were limited to around 10 bases, lacking enough sequence specificity.

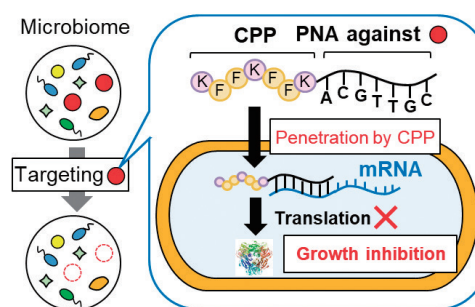


Fig. 1 PNA-based microbiome engineering

Precise microbiome engineering using bacteriophages

To develop a more specific microbiome modification technique, we focused on bacteriophages. Phages are viruses that infect bacteria in a host-specific manner, and their host specificity can be observed at the species or strain level. Additionally, phages replicate within the host and lyse it, making them "replicating bactericidal agents." Leveraging these properties, we examined whether it was possible to specifically kill only the target bacteria in an artificial microbiome consisting of *E. coli*, *P. putida*, *Bacillus subtilis*, and *L. plantarum*. After isolating phages that infect each microorganism from soil and wastewater, these phages were added to the artificial microbiome. As a result, we successfully lysed only the target microorganism, demonstrating the concept of microbiome modification³.

To apply this approach to real microbiome, it is necessary to quickly obtain phages that target the desired microorganisms. The isolation of phages from environmental samples is somewhat random, and there is no guarantee that phages infecting the target microorganisms will be isolated. Interestingly, some phages integrate their genome into the host microorganism's genome, indicating that the blueprint for the phage infecting that microorganism is recorded within its genome. Therefore, if phages could be synthesized based on this blueprint, it would be possible to obtain them without searching for them. We then tested whether it was possible to synthesize phages from the genome of *E. coli* lysogenized with λ phage (Fig. 2). The DNA fragments comprising λ phage were amplified from the genome of the λ lysogenized strain and they were introduced into a λ non-infective strain. By expressing homologous recombination enzymes in the λ non-infective strain, the DNA fragments are assembled *in vivo* and the full-length phage DNA can be obtained⁴. This allowed us to mimic a phage-infected state and to artificially synthesize phages. By using the artificially synthesized phages, the artificial microbiome could be successfully modified just like natural phages (Fig. 2)³.

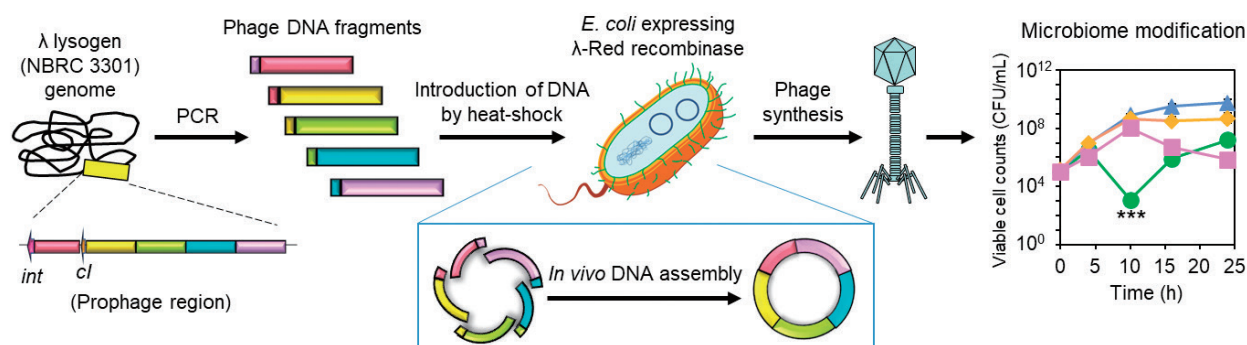


Fig. 2 Artificial synthesis of the phage using the prophage as blueprint. Circles, triangles, diamonds, and squares indicate *E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, and *L. plantarum*, respectively.

Perspectives

The above results suggest the possibility of freely modifying the microbiome if phages that infect 1,000 species of gut bacteria can be acquired. Based on this idea, we will launch the "1,000 Phage Acquisition Project". Additionally, by removing the lytic ability from phages and incorporating genome editing capabilities, we also plan to develop technology for *in situ* modification of the functions of target microorganisms within the microbiome. Once such technologies are developed, it will be possible to generate on-demand microbiomes for functional analysis and control, leading to the creation of a new academic field that could be called "synthetic ecology."

Acknowledgements

This research was conducted at Osaka University and Kansai University. I would like to express my sincere gratitude to Professor Kohsuke Honda (Osaka University) and Professor Hiroaki Iwaki (Kansai University), as well as to the staff and students of Laboratory of Molecular Microbiology at International Center for Biotechnology, Osaka University, and Laboratory of Environmental Microbial Engineering at the Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, for their tremendous support and cooperation.

Reference

1. Good, L. *et al. Nat. Biotechnol.* **19**, 360-364 (2001)
2. Hizume, T. *et al. Front. Microbiol.* **14**, 1321428 (2024)
3. Tanaka, T. *et al. Front. Microbiol.* **15**, 1403903 (2024)
4. Cheng, L. *et al. Cell Rep. Methods* **2**, 100217 (2022)

Brief Biography

- March 2004** B.S. in Department of Chemical Science and Engineering, Faculty of Engineering, Kobe University
- March 2006** M.S. in Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Science and Technology, Kobe University
- April 2008** JSPS research fellow (DC2)
- March 2009** Ph.D. in Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University
- April 2009** Researcher, Central Research Laboratory, Nippon Suisan Kaisha Ltd.
- April 2011** Assistant Professor, Graduate School of Engineering, Osaka University
- April 2022-** Associate Professor, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University