

研究終了報告書

「(レドックス環境応答能を持つ歯周病細菌由来の膜小胞)」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：岡本章玄

1. 研究のねらい

病原性細菌の群衆が形成するバイオフィームは、医療や生態学の観点から重要な研究対象であり長年研究が行われてきた。しかし、内部の嫌気空間における細菌の代謝や共生機序は明らかになっていない。例えば、バイオフィーム内部は高い還元状態が保たれているために細菌代謝は抑制されるはずであるが、近年のメタトランスクリプトーム解析から病原性細菌は高い活性を保ちバイオフィームを成長・成熟化させていることが明らかになっている。本研究では、バイオフィーム内部の還元エネルギーを外部へと伝達する「細胞間電子移動」を提案し、その機構解明を試みる。研究代表者らは、最近になって歯垢バイオフィームを形成する主要な病原細菌が、細胞内から外へと電子を伝達する「細胞外電子移動 (Extracellular Electron Transport, EET)」能を有する電気細菌であることを明らかにした。電気細菌は、細胞膜を貫通するヘム鉄やフラビンなどの複数の酸化還元中心を有する膜タンパク質複合体を利用して EET を行う。また、直径 50 ~ 200 nm 程度の細菌膜小胞 (Membrane Vesicle, MV) を細胞膜を変形させることで産生、数珠状に連結させることで電線様に働くナノワイヤーを形成し、細胞間電子移動に用いていることが知られている。ここで、MV は歯垢バイオフィーム形成においても重要な因子の1つであり、細菌間でバインダーとして働くことでバイオフィーム形成を促進する。しかし、バイオフィーム内の病原細菌が電気細菌であることを考えると、MV は細胞間電子移動を媒介する機能を有している可能性が考えられる。そこで本研究では、ヒト口腔内から採取したバイオフィームにおいて MV が細胞間電子移動を媒介する仮説を *in vivo*、*in vitro* 系において検証することを目的とした。バイオフィームが活性化する機構を物理化学的に解明することができれば、殺菌技術や薬剤探索へと資することが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、まずヒト口腔内の歯垢バイオフィーム内において MV を介した細胞間電子移動の必要条件となるレドックス特性を持つ MV の存在を検証した。メタプロテオームを用いることで検出された酵素を遺伝子へ帰属できる。しかし、MV 産生細菌の候補が特定できていない状態では、遺伝子候補が膨大になるため帰属することが難しい。MV 研究は主に培養株において行われており、ヒトの体液中から MV を精製し内包物質を解析した例は国内外でも極めて少なく、ヒト体内で MV を産生する細菌についての情報は皆無であった。これは、MV 内部の DNA 量は極めて少量で、メタゲノム解析に用いるには、大量のヒトサンプルが必要であるということに原因の1つがある。そこで本研究では、MV 内部の DNA 配列を1粒子レベルで解析する手法を開発し[特許 1-3]、バイオフィーム内で DNA を内包している MV を産生した細菌群を特定した。細菌群の特定を行った上でメタプロテオーム解析を行うと、従来の一般的な細菌のタンパク質データベースに比べて、10倍以上の細菌由来タンパク質を同定すること

に成功した。高検出タンパク質の中には、MV 産生細菌の中でも優先種が有するレドックス酵素が検出された。この結果は、レドックス特性を有する MV が歯垢バイオフィーム内に存在していることを示している。また、この株と系統学的な近縁種である培養株は、類似酵素と MV を産生する電気細菌であることを確認した。そこで、この培養株をモデル菌として MV 添加によるバイオフィーム導電性への効果に関して、楕形電極を用いた電気化学測定で検討した。MV 産生が加速される条件において形成されたバイオフィームにおいては、通常の培養条件の 10 倍以上の高い導電電流が観測された。さらに、MV が電極と細菌間の電子移動を加速させる効果が確かめられた。以上の結果は、細菌が MV を介した電子移動を介してバイオフィームの導電性を高めていることを示している。バイオフィームが EET を介した長距離電子移動によって活性化する本機構は、病原細菌の不活化や検出、さらに感染症への新しい治療法や薬剤の開発へもつながる成果である。さらに、MV 内 DNA の解析の結果、特定ゲノム領域の濃縮が起こっている現象を細菌叢、培養株の系で確認しており、MV のバイオブシーとしての高いポテンシャルも明らかとなった。

(2) 詳細

テーマ(1) 歯垢バイオフィーム内におけるレドックス MV の探索

ヒト体内に存在する膨大な細菌種から MV 産生菌を特定するために、MV 内部の DNA 配列を網羅的に解析することが有効なアプローチの一つとなる。一方で、MV 内部に存在する微量な DNA を解析するための有効な手法は確立されておらず、MV 内部の DNA の特性については長く不明であった。そこで、岡本らは、MV 内部の DNA 配列を1粒子レベルで網羅的に解析する技術 Single-Microbial-Vesicle-Genomics, SMVG を開発し、独自のデータ解析技術によって、唾液由来 MV に内包される DNA を解析した (図 1) [特許 1,2,3]。16s rRNA が 10%程度の MV でしか検出れず、配列情報全体を利用することで MV 産生細菌情報を高解像度に得ることに成功した。MV DNA を産生元の細菌ゲノムに対してマッピングしたところ、内包されていた DNA は特定のゲノム領域に偏って存在することが明らかとなった。

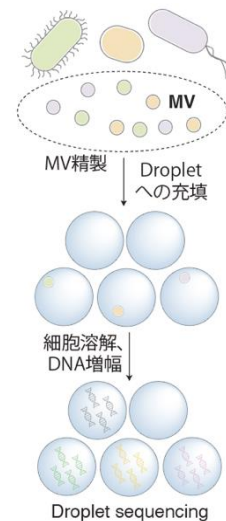


図 1. SMVG の概要

検出された数 kbp の DNA 配列を基に健常者と歯周病患者間での DNA 帰属プロファイルの比較を行ったところ、細菌叢の DNA プロファイルに比べて MV DNA プロファイルの方が、健常者と歯周病患者間での差がより顕著であり(図2)、MV 由来 DNA プロファイルが歯周病の判別により有効に機能する可能性が示唆された。また、また、同種の細菌に由来する MV であっても、歯周病患者と健常者によって、内包される DNA 配列に違いがあることも明らかになった。宿主の健康状態によって濃縮領域が異なる DNA 配列の存在は、MV が疾患診断での有望なバイ

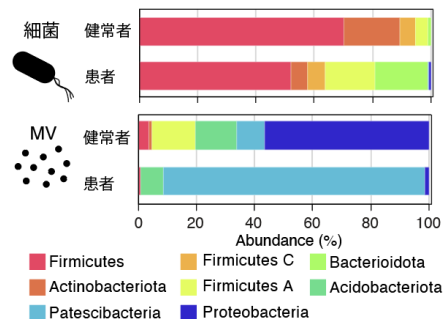


図 2. 細菌・MV での DNA プロファイルの比較結果

オマーカーとなり得ることを明確に示唆している（論文投稿中）。様々なヒトサンプル（解析バトル）では、2 期生の江口先生と解析を行っており、細菌由来 DNA 検出に成功している。

次に、歯垢バイオフィーム内の MV に対して、メタプロテオーム解析を実施した。メタプロテオーム解析では、解析対象とする細菌叢プロファイルをあらかじめ見積もり、最適化されたデータベースを構築しておくことが鍵となる。一方で、歯垢バイオフィームに存在する MV 産生菌を絞り込む有効な手法

は確立されていなかった。そこで、SMVG を使って、歯垢バイオフィーム内の MV プロファイルを解析し、その情報を基にして独自のデータベースを構築した。その結果、一般的な細菌由来タンパク質データベースを用いた際よりも、10 倍以上より多様な細菌種に由来するタンパク質を同定することに成功した（図 3）。高検出タンパク質の中には、MV 産生細菌の中でも優先種が有するレドックス酵素が検出された。この結果は、レドックス特性を有する MV が歯垢バイオフィーム内に存在していることを示している。また、こうした、MV 由来タンパク質の中には、歯周病の原因菌と同属の細菌に由来するものが含まれていることも明らかとなり（*Capnocytophaga* 等 図 3）、これらの細菌が MV を介して、歯周病の発症、進行に寄与している可能性も示唆された。このような疾患に影響を与える MV の同定は、バイオインフォマティクスを駆使した DNA プロファイリングやそれに基づく生化学的解析を一貫して行うことで初めて実現可能となるため、我々のグループでしか成し得なかった研究であると自負している。

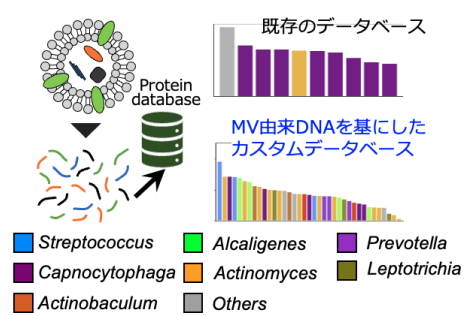


図 3. MVDNA 情報を基にしたメタプロテオーム解析の結果。縦軸は各タンパク質のシグナル強度を、色は由来する細菌群を示す。

テーマ(2)発電メカニズムやバイオフィーム導電性における MV 機能の解明

細菌叢の中から網羅的に電気細菌を探索するために、ヒト唾液サンプルを用いた電気化学実験と 16SrRNA 菌叢解析を行った。既に岡本らが電気細菌として報告している *C. ochracea* に加えて、*X* 株といった、口腔内、腸内に存在する病原性細菌の発電能が示唆された。多くの口内、腸内細菌は、アミノ酸代謝能を持つことが知られており、これらの細菌も同様にアミノ酸代謝能の高い菌種であることが指摘されている。そこで、アミノ酸の一種であるヒスチジン添加時に、他の口内細菌との発電量を比較したところ、*X* 株が他の歯周病細菌に類を見ない、非常に大きな電流生成を見せることが判明した(他菌の 10-100 倍)。さらに、プロテオーム解析、直接的な MV 数の比較から、*X* 株が発電条件で MV を多量に分泌することを突き止めた。そこで、回収した MV を、*X* 株に添加したところ、MV が *X* 株の電流生成を促進した。更に、*X* 株の電流生成条件においてメタ遺伝子発現解析から、ヒスチジンをを用いた発電時にはフラボプロテインと鉄イオンポンプが高い発現を示すことを見出した。体内での主な鉄分子は血液由来と考えられるため、血液由来の鉄成分であるヘミンを多く添加した培養条件で収集した MV を用いて、電流生成への影響を検討した。すると、非常に強い促進効果が得られた。以上の結果は、*X* 株は、菌がヒスチジン代謝中に得た余剰電子を、血液由来の鉄成分を含む MV を介して細胞外に放出することで電流生成を行なっていることを示している。

3. 今後の展開

本研究から歯周病患者特有の MV 由来 DNA 配列を特定することに成功した。また、こうした DNA 配列が MV で検出されやすかった背景に、1) 口腔細菌叢に比べ MV 産生菌プロファイルが宿主の健康状態を反映しやすいこと、2) MV が特定ゲノム領域の DNA 配列を内包しやすいことが関連していることを突き止めた。これらは MV 由来 DNA が有望なバイオマーカーとしての性質を有することを示している。今後は我々が開発した解析パイプラインを幅広い疾患やサンプルに適用し、疾患患者特有の MV マーカー遺伝子配列を特定していくことで、MV と PCR や RT-qPCR を組み合わせた高感度かつ簡易的な診断技術へと展開可能であると考えている。現在、すでにノバセラム株式会社と共同研究を進めており、倫理承認を得ておりヒト担癌患者由来のサンプルを用いた実験を始めており、1 年以内でバイオマーカーとして実用性判断を行えると考えている。

4. 自己評価

研究目的の達成状況:当初困難が予想されていたヒトバイオフィルムサンプルにおける MV 産生菌の特定が、新たに開発した技術によって大きく進展し、研究テーマ全体に相乗効果をもたらした。それによって、「バイオフィルム内における MV を介した細胞間電子移動」という当初の目的は達成され、がん化か口腔以外の細菌叢における MV 研究といった予想以上の発展に至った。特に、複数の成果が多岐にわたって特許や企業との共同研究へと広がったことは特筆すべき本研究の特徴であると考えている。バイオフィルム内の細菌活性をイメージングする系実験計画に関しては、コロナ禍によって大幅に遅延が生じたが、サンプル処理を終えて、測定を行う準備が整っており、残りの期間で結果を得られと期待している。また、論文に関しても現在準備中のものが多数あり、順次発表していく。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況):

本研究計画は、博士課程の学生 2 名とポスドク研究員 1 名と進めた。また、同領域内のさきがけ、CREST における共同研究が年々広がり、多くの先生方にお力添えを頂いた。特に 2 期性の今見先生 (RIKEN) には、プロテオーム解析を進めていただき、さらに的確なアドバイスを頂いたことで研究が大きく加速された。研究費執行は問題なく行えた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果:

上述したように本研究計画は、先駆的な目的基礎研究として、社会・経済の変革をもたらす科学技術イノベーションの源泉となる、新たな科学知識に基づく創造的な革新的技術のシーズ(新技術シーズ)を世界に先駆けて創出することが出来たと自負している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:24件

1. D. Naradasu, W. Miran, S. Sharma, S. Takenawa, T. Soma, N. Nomura, M. Toyofuku, A. Okamoto*, "Biogenesis of Outer Membrane Vesicles Concentrates the Unsaturated Fatty Acid of

Phosphatidylinositol in *Capnocytophaga ochracea*” Front. Microbiol., 12, 682685 (2021).

細菌外膜ベシクル(OMV)は、細菌が放出する球状の脂質二重層ナノ構造体であり、細胞凝集や細胞間情報伝達を介して口腔バイオフィーム形成を促進する。近年の研究により、*Capnocytophaga ochracea*は口腔バイオフィームの主要メンバーであることが明らかになっているが、そのOMV産生に関しては知られていない。本研究では、*C. ochracea*のOMVの生合成において、phosphatidylinositolの一部の不飽和脂肪酸はOMVに特異的に存在し、外膜にはほとんど存在しないことを明らかにした。このことから、*C. ochracea*のOMVは細胞溶解などのランダムなプロセスではなく、プレビングによって膜の特定の領域から生成されることが示された。

2. D. Naradasu, A. Guionet, W. Miran, A. Okamoto*, “Microbial current production from *Streptococcus mutans* correlates with biofilm metabolic activity”, Biosensors and Bioelectronics, 112236 (2020).

病原細菌はバイオフィームを形成すると、浮遊状態に比べて薬剤に対する耐性が高まり、殺菌が難しくなる。このようなバイオフィームの頑健性は、その構成微生物の活発な代謝と関連しているため、バイオフィームの代謝活性を直接定量するアッセイの確立は、抗バイオフィーム薬剤や技術の開発にとって重要である。最近、グラム陽性菌において細胞外電子輸送(EET)を介した電流産生能が発見され、これがバイオフィームの代謝活性と相関しているとの仮説が立てられた。本研究では、口腔病原体 *Streptococcus mutans* のバイオフィームからの電流産生によって代謝活性を *in situ* で電気化学的に評価できることを実証した。これまで電気微生物学の応用先は、エネルギーや環境分野に限られていたが、本論文によって医療分野への応用が初めて提案され、その高い分析手法としての高いポテンシャルが示された。

3. W. Miran, W. Huang, X. Long, G. Imamura, A. Okamoto*, “Multivariate landscapes constructed by Bayesian estimation over five hundred microbial electrochemical time profiles”, Patterns, 3, 100610, 1-9 (2022).

微生物発電は様々な条件により影響を受けるため、従来の経験的・理論的なアプローチでは微生物発電を理解し、制御することは困難である。そのため、大量の計測結果を活用するデータ科学の活用が期待されている。しかし、データ科学を適用するために必要な誤差の小さく、明確に条件付けされた「高品質なデータ」を大量に電気化学で取得するには、コストや測定の問題があり、これまで実現できていなかった。本研究では、従来の数百倍のデータを生み出す革新的な電気化学デバイスを開発し、計測した大量のデータを解析・活用することで、微生物発電が広い電位範囲で効率を維持できる現象を発見、その分子メカニズムを解明した。微生物電気化学分野における大量の計測データを活用した研究手法の有効性が実証されたことで、開発したハイスループット測定系は、基礎的な電気微生物学研究的の進展に今後大きく寄与すると期待できる。これまで解析技術に留まっていた電気化学計測を、スクリーニングや条件検討、さらにはデータ科学において活用可能であることを実証した。当成果によって、本研究計画におけるMV産生細菌の電気化学測定が大幅に加速された。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:5 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(国際会議 Keynote 講演)

1. A Okamoto, “Outer membrane vesicle released from electrogenic pathogen”, Virtual Pacificchem 2021: A Creative Vision for the Future, 2021/12/16-21
2. A Okamoto, "Activation of microbial metabolism in periodontal pathogens by redox-active membrane vesicle”, The 2021 IADR/AADR/CADR General Session, 2021/7/21-/2021/7/24
3. A Okamoto, “Interplay of low electron export and redox-repressor rex in modulation of pathogen’s metabolism a new form for antibiotic assessment”, 1st virtual meeting ISMET 2020, International Society for Microbial Electrochemistry and Technology Global Conference2020,2020/10/7－2020/10/9

(受賞)

Catalist Award 2020/10/15 全米医学アカデミー (NAM)

「Healthy Longevity Grand Challenge (HLGC)」The Catalyst Awards

“Microbial electricity generation from saliva tells your oral health condition: Electrochemical sensor targeting periodontal pathogen in saliva for the longevity of healthy age”

(プレスリリース)

1. NIMS 公式プレスリリース 2022/10/25 「データ科学でハッキリ見えた微生物発電」
～微生物燃料電池や生分解性材料のデータ駆動研究に向けて
2. NIMS 公式プレスリリース 2020/2/14 「鉄腐食細菌は黒サビを使って腐食を加速させていた」
～特殊な酵素なしでも電子を引き抜く細菌能力を発見 新たな防食材料の開発に期待～