

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15136

研究課題名(和文)慢性下気道感染症患者の気管支洗浄液から検出された新規微生物の遺伝子解析

研究課題名(英文)Genetic analysis of novel microorganisms detected from bronchial lavage fluid of patients with chronic lower respiratory tract infection

研究代表者

福田 和正 (FUKUDA, KAZUMASA)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：40389424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性下気道感染症由来の気管支洗浄液(BALF)検体から検出された新規微生物IOLAを単離することなく、ゲノム解析に成功した。IOLAのゲノムは極めて小さく(303,838bp)、CDSが310個しかないこと、細胞壁合成に関与する遺伝子がゲノム上に見つからないこと等が明らかになった。また、16S、23S rRNA遺伝子、および29種のユニバーサルタンパク分子の系統解析の結果から、IOLAは門のレベルで新規な細菌であることが明らかになった。IOLA特異的PCRの解析結果から、IOLAは細菌感染症の患者からのみ統計的に有意に検出され、感染性を有する新しい系統の細菌であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The genomic sequence of a novel microorganism IOLA detected from a bronchial lavage fluid (BALF) specimen derived from a chronic lower respiratory tract infection patient was determined without isolating of IOLA with culture methods. The genome of IOLA is extremely small (303,838 bp), and there are only 310 CDSs. The genes involved in cell wall synthesis were not found on the genome. In addition, the phylogenetic analysis of 16S, 23S rRNA gene and 29 universal protein molecules revealed that IOLA is a novel bacterium at phylum level. The results of IOLA specific PCR analyses showed that IOLA was statistically significantly detected only from patients with bacterial infections. IOLA should be categorized in a new lineage of bacteria and would be recognized as an infectious organism, not as a commensal bacterium of human.

研究分野：病原微生物学

キーワード：新規感染性微生物 ゲノム解析 呼吸器感染症

### 1. 研究開始当初の背景

呼吸器関連疾患患者の BALF 検体の細菌叢解析の過程で、複数(6 検体)の下気道感染症患者由来の BALF 検体から未知微生物 (IOLA) の 16S rRNA 遺伝子が検出された。この配列と類似性を示す配列は公的データベース上に 8 配列登録されているが、いずれも部分配列であり、生物種の記載は uncultured bacterium であった。このうち 6 つの配列はアメリカの嚢胞性繊維症患者の BALF から検出されたものであり(Harris JK. et al. PNAS 2007. 104 (51), 20529-20533)、また、残りの 2 つはイギリスの喘息と慢性閉塞性肺疾患患者から検出されたものであった。興味深いことに、8 配列全てが呼吸器疾患の患者から検出されたものであった。我々は FISH 等の手法により IOLA が約 1 $\mu$ m 程度の球状の細菌様微生物であること、および 16S rRNA 遺伝子全長を含む約 19kb の部分ゲノム断片配列を決定し、IOLA が遺伝子的に全く新しい微生物であることを明らかにした。(Fukuda K. et al. PLOS ONE. 2014. 9(7): e103646) 以上のことから、IOLA は未知の微生物であり、呼吸器疾患との深い関連性を有していることが強く示唆された。

### 2. 研究の目的

新たな病原体の発見や、病態と細菌叢の相關に関する詳細な知見を得る為に、様々な臨床検体を対象とした 16S rRNA 遺伝子シーケンスに基づく網羅的細菌叢解析を行っている。その過程で、慢性下気道感染症患者由来の気管支洗浄液 (BALF) 検体から、既知菌種との相同性が 80%未満の極めてユニークな 16S rRNA 遺伝子シーケンスが得られた。我々は本配列を有する微生物を Infectious Organism Lurking in human Airways(IOLA) と命名した。この配列は細菌叢において最も多く検出されたものであり、本症例における起炎菌と疑われたが、本配列の相同性検索からは近縁の細菌を推定することが出来なかった。IOLA は未だに培養法による分離が成功していない未知の微生物である。この配列を有する生物の正体について分子生物学的手法により知見を得、慢性下気道感染を含む原因が明らかでない呼吸器疾患へのこの未知の微生物の関与について明らかにする。

### 3. 研究の方法

材料: 2010 年以降に産業医科大学呼吸器内科および関連病院で採取された呼吸器関連疾患患者の臨床検体 (BALF480 検体、喀痰 43 検体、合計 523 検体) を用いた。BALF および喀痰は、唾液の混入を極力避けて採取した。採取方法および DNA の抽出は既報の方法に従った (Yamasaki K. et al. PLOS ONE. 2013. 8: e63103)。細菌感染症検体と非細菌感染症検体の分類は、エチジウムプロミド蛍光染色法による細菌数 (cells/1ml 検体) と、抽出した DNA を鋳型とした 16S rRNA gene

universal primer を用いた PCR の増幅の有無によりおこなった。

(1) IOLAゲノム解析: IOLAの16S rRNA遺伝子が検出されたBALF400 $\mu$ lをPBS 1200 $\mu$ lに懸濁した。Total 1600 $\mu$ lをMinisalt 1.2 $\mu$ mフィルター(Sartorius)で濾過した。ろ液を1.2 $\mu$ mメッシュフィルター(Advantec)で濾過し、PBS 1000 $\mu$ lで2回洗浄した。ろ紙を濾過物とともに2%SDS含有TEバッファ1000 $\mu$ lに入れ10分間転倒混和した。ろ紙を除いた後、PCI処理を2回行い、上清をMicrocon PCRデバイス(Millipore)で精製し、20 $\mu$ lのTEバッファで置換した。精製したDNA溶液をIllustra Genomiphi DNA Amplification Kit (GE healthcare life sciences)用いて全ゲノム増幅を行った。増幅したDNAを用いIllumina (Illumina)でPaired-end及びMate pair sequencingを行った。配列のアセンブルは、Platanus、SPAdes、およびATSQを用いて行った。Gap1は、PCRで増幅後、サンガー法で塩基配列を決定した。アノテーションはMiGAP、IMCソフトおよびNCBI Blastを用いて行った。ゲノム解析で得られた塩基配列及びアミノ酸配列に基づく系統樹(ML法)は、MEGA6.06ソフトウェアを用いて作成した。

(2) IOLA 特異的 PCR: 各検体から得られた DNA 溶液を鋳型として、細菌 16S rRNA 遺伝子用ユニバーサルプライマーE341F と E907R を用いて 1st PCR 反応を行った。反応条件は、96 で 5 分間の後、96 で 30 秒間、53 で 30 秒間、72 で 1 分間を 25 サイクル行った。72 で 5 分間の処理後、反応液 2 $\mu$ l を 18 $\mu$ l の TE バッファで 10 倍希釈した。10 倍希釈液 1 $\mu$ l を鋳型として 2 回目の PCR を行った。プライマーは IOLA 特異的プライマー IOLA-F1 および IOLA-R0 を用い、96 で 5 分間の後、96 で 30 秒間、56 で 30 秒間、72 で 1 分間を 30 サイクル行った。72 で 7 分間の処理後、反応液 4 $\mu$ l を 2%アガロースゲル電気泳動に用いた。細菌感染症患者および非細菌感染症患者における IOLA 検出の有為差検定は、フィッシャーの直接確率計算法を用いた。

### 4. 研究成果

(1) IOLA のゲノム解析: ヒト由来 DNA 及び IOLA 以外の細菌を含む数 ml の BALF 検体から IOLA ゲノム DNA を選択的に濃縮し、トータル 303,838bp の環状ゲノム配列 (平均 coverage 約 52) 情報を得た (図 1)。GC 含量は 20.7% であった。310 の CDS、34 の tRNA 遺伝子、および、16SrRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子がそれぞれ 1 つずつ存在した。310 の CDS のうち、148CDS についてはリファレンスシーケンスとの相同性によりアノテーションした。IOLA のゲノムに存在する Clusters of Orthologous Group (COG) のカテゴリー分類別の遺伝子数は、大腸菌の必須遺伝子セットと比較して、細胞壁や膜の生合成(M)、細胞

周期の制御(D)、脂質の輸送や代謝(I)、補酵素の輸送や代謝(H)に関わる遺伝子数が顕著に少なかった。IOLA はペプチドグリカン等の細胞壁成分の合成代謝に関与する遺伝子がなく、*Mycoplasma* 等と同様に細胞壁を有しない微生物であると考えられた。

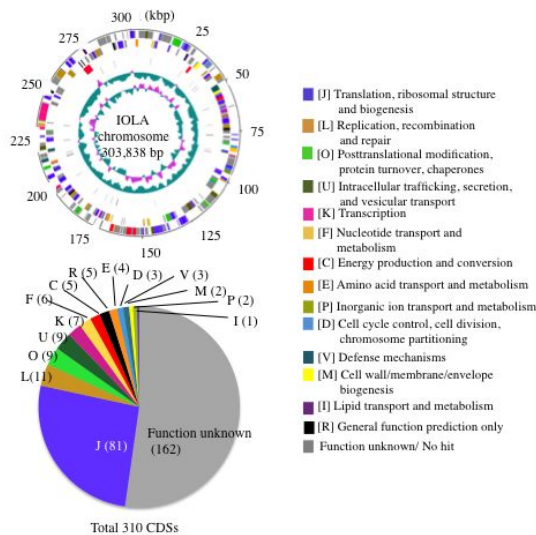


図1 IOLA ゲノム解析結果

IOLA と 31 門を網羅する 70 菌種の 16S 及び 23S rRNA 遺伝子を用いた系統樹を作成したところ、どちらもプロテオバクテリアの上流から分岐しているものの、配列が既知の分類群とは大きく異なることが明らかになった。また、ユニバーサルプロテインセット (Ciccarelli FD. et al. Science 2006. 311, 1283-1287, ) のアミノ酸配列に基づく系統樹では (本来は 31 分子であるが、IOLA では 2 つ未同定遺伝子がある) IOLA は真核生物や古細菌よりも細菌に近いところで分岐していた (図 2)。もっとも近い分岐は *Mycoplasma* 属を含む *Tenericutes* 門であったが、配列の違いは真核生物や古細菌よりも大きいことが明らかになった (図 2)。

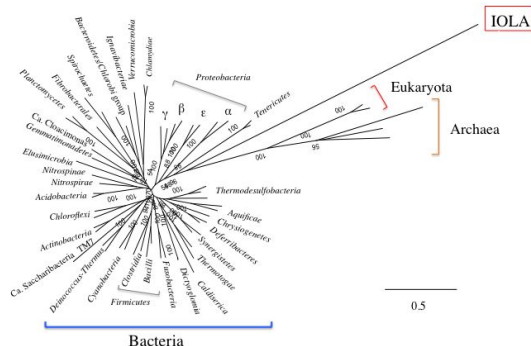


図2 ユニバーサルタンパク (29 分子) 連結アミノ酸配列に基づく系統樹

(2) IOLA 16S rRNA 遺伝子の検出: 480 検体の BALF、および 43 検体の気管支吸引痰から抽出した DNA を鋳型として IOLA 16S rRNA 遺伝子の部分配列の増幅を試みた。IOLA 特異的 PCR 法 (検出感度: 数コピー以上/反応) で、細菌感染症群 348 検体 (BALF) から 12 検体で IOLA 16S rRNA 遺伝子が増幅された。非細菌感染症群 (132 検体) からは増幅されなかった。また、気管支吸引痰 (43 検体) のうち 2 検体から IOLA 16S rRNA 遺伝子が増幅された。フィッシャーの正確検定の結果、両側検定  $p=0.047$ 、片側検定  $p=0.02$  であり、IOLA 16S は細菌感染症の BALF から有意に検出されることが明らかになった。

IOLA が検出された 14 検体について、ゲノム配列上約 25kbp 間隔の 12 箇所 (サイズ: 約 1000bp) を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。12 の塩基配列を連続配列長 12,410bp) して系統樹を作成したところ、同一患者から採取時期を異にして得られた 4 配列は全て同一であったが、各患者間において IOLA の配列は全て異なった (図 3)。IOLA のゲノム配列には違いは小さいがバリエーションがあり、各々の患者に異なる IOLA 株が感染していることが明らかになった。

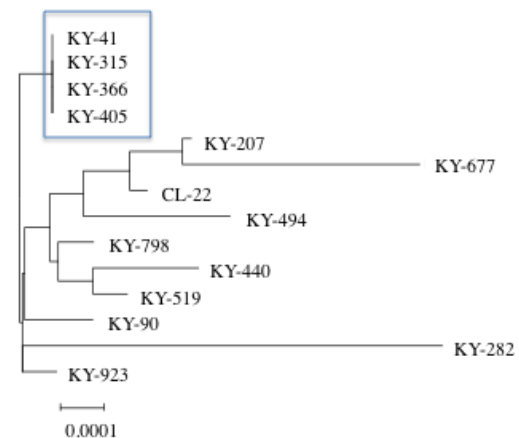


図3 IOLA 部分ゲノム配列 (12,410bp) の多様性

本研究において、IOLA は非常に小さなゲノムを有する微生物であり、門のレベルで新規な細菌の一種であることが明らかになった。303,838bp というサイズは、人工培地で培養可能な最も小さいゲノムを有する細菌である *Mycoplasma genitalium* の約半分の大きさで、偏性細胞内寄生菌である *Carsonella* のゲノムサイズの約 2 倍に相当する。162 個の CDS については機能未知であるが、アノテーションできた遺伝子には、ミニマルコア遺伝子として候補に上がる遺伝子の多くが含まれていた。また、IOLA のゲノム上には、ペプチドグリカン等の細菌の細胞壁成分の合成・代謝遺伝子は見つかっておらず、IOLA は *Mycoplasma* のような培養法やグラム染色による検出が困難な細菌様微生物である可能性が強く示唆された。

今回調査した全 523 検体のうち 2.7% (14 検体) から IOLA 16S rRNA 遺伝子が検出され

たことから、IOLA が検出される患者は希なケースであると考えられる。本研究においては、IOLA 陽性検体が 14 検体と少なく、IOLA が検出される患者の特徴を把握するまでには至らなかったが、IOLA は、細菌感染症群からのみ統計的に有為に検出されており、ヒトに常在するものではなく、感染性を示す新規な細菌であると考えられる。

病原性に関しては不明瞭であるが、IOLA は細菌性肺炎 7 例、慢性下気道感染 4 例、肺化膿症、NTM、気管支炎がそれぞれ 1 例と呼吸器疾患を呈する患者からのみ検出されており、IOLA の呼吸器感染症への関連性については、より詳細に調査する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

福田和正, 小椋義俊, 山崎啓, 川波敏則, 小川みどり, 林哲也, 齋藤光正, 谷口初美: ヒトの気道に潜む新規微生物のゲノム解析 (第 89 回日本細菌学会総会 招待講演, 大阪国際交流センター, 大阪府大阪市, 2016 年 3 月 24 日)

福田和正, 小川みどり, 川波敏則, 山崎啓, 齋藤光正: 新規細菌様微生物 (IOLA) の呼吸器臨床検体における検出率と遺伝的多様性 (第 68 回日本細菌学会九州支部総会, 別府コンベンションプラザ, 大分県別府市, 2015 年 9 月 4 日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 和正 (FUKUDA, Kazumasa)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40389424

### (2) 研究分担者

小川 みどり (OGAWA, Midori)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 40320345

### (3) 連携研究者

山崎 啓 (YAMASAKI, Kei)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50441861