

平成 31 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05501

研究課題名(和文) ゲノム連鎖とエピゲノムがもたらすA群レンサ球菌の系統進化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of genomic diversification in Group A Streptococci based on GWAS and epigenome

研究代表者

丸山 史人 (MARUYAMA, FUMITO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30423122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌の「株特異的病原性発揮機構」の解明を目指し、i) 劇症型株に特異的に保存されている新規SNPsを多数同定し、ii) 劇症型特異的に優占するファージと外来性病原因子や、iii) ファージ由来メチラーゼによるメチル化パターンが病原因子により異なることを見出した。また、本種の多様化においては、原核生物の獲得免疫システム(CRISPR)と病原因子の運搬役であるバクテリオファージの関わりが主要な役割を果たし、CRISPRの欠失が一つの種内を大きく2つのグループに分ける要因になっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の知見は、次の研究に継続、発展させる。難治性の慢性呼吸器感染症である肺NTM症(Notuberculous mycobacteria, NTM)は、先進諸国を中心に患者数が急増しており、国内の罹患率が世界一高いことから公衆衛生上の対策が急務である。特に本菌の対策において、迅速な治療が求められない安定型に対して、予後の経過が思わしくない進行型の原因解明が求められている。しかし、NTMは生育が遅く遺伝子改変が困難であることから研究が進んでいない。本研究でも共通の成果が得られる可能性があり、本課題の成果が多くの研究の基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Aiming at elucidation of "strain-specific pathogenicity exertion mechanism" of group A Streptococcus, i) we identified a large number of novel SNPs specifically conserved in virulent strains, ii) virulent-type-specific phage and the foreign pathogenic elements and iii) phage-derived methylase resulted in the difference of methylation pattern in virulence genes. In addition, in the diversification of this species, the relationship between the prokaryote acquired immune system (CRISPR) and the bacteriophage that is the carrier of the pathogenic factor plays a major role, and deletion of the CRISPR largely affects one within two species. It clarified that it may become a factor to divide into two groups: virulent and non-virulent clone.

研究分野：環境遺伝生態学

キーワード：比較ゲノム 進化 多様性

1. 研究開始当初の背景

ヒトには多種多様な細菌が生息しており、両者は互いに有益な共生関係を築いている。しかしながら、この中には日和見感染症を引き起こす種のみならず、病原性を示す細菌も潜在している。例えば、結核菌は33%、ピロリ菌や黄色ブドウ球菌は50%のヒトが無症候性キャリアである。中でも、ヒトのみに生息している病原細菌であるA群レンサ球菌(Group A Streptococcus, 以下 GAS と示す)は、症状を全く引き起こさない場合や、咽頭炎、扁桃炎といった軽症から(世界で年間6億人)、稀に致死率が30%を超える劇症型感染症(世界で年間50万人)を引き起こす臨床的にも重要な病原細菌である。我々独自の疫学調査(未公表)では、90%以上の健康な成人がGASのキャリアであることがわかっている。このことから、本菌の特徴は、ヒトに高度に適応しているにも関わらず、時として劇症型化することにより、この劇症化メカニズムを解明することが本菌感染症の制御には必須であると考えられる。また、日本において今年度8月時点で過去最多279名もの劇症型疾患が報告されており、その解明は喫緊の課題であるといえる。

これまで、GASによる劇症型感染症の発症メカニズムを解明するために、細菌の全ゲノム解読および比較ゲノム解析、病原因子の機能解析、また、宿主側の免疫機構解析が進められてきた。こうした研究から、本菌はゲノムサイズが小さい割に多くの病原遺伝子を保有していること、また、病原関連遺伝子の二成分制御システムにおける一塩基多型(SNP)が劇症化の一因ではないかと報告されている(PLoS Pathog., 2009等)。しかし、本遺伝子のSNPだけでは劇症株の一部しか説明できていない。

また、先行研究においては、特定の系統群に属する劇症型株のみを用いた比較解析により得られた知見に留まっているのが現状である。ただし、特定の型であっても系統的に祖先型とは異なり、「現在蔓延している型は単一のクローンが10-20年間で急速に拡散したものであり、短期間で優占クローンの入れ替わりが起きている」という成果について(PNAS, 2014; mBio, 2015)、その原因究明は学術的、疫学的観点からも興味深い。

2. 研究の目的

GASによる劇症型感染症の原因を究明するには、CRISPR欠損型においては劇症型株が多く含まれること、急速な単一クローンの拡散の解明が重要な課題として残されており、これを本課題の目的とする。すなわち、i) 劇症型株特異的遺伝子は存在しないため、劇症型特異的SNPsの関与、ii) フェージによってもたらされる外来性の病原因子の組み合わせ、iii) フェージ由来メチラーゼによるメチル化に伴う病原遺伝子発現への影響を明らかにする(病原性大腸菌では全遺伝子の1/3に影響を与えることが報告された, Nat Biotechnol. 2012)。

3. 研究の方法

A群レンサ球菌1,000株程度のゲノムデータを予備データ(259株)と同様にして比較ゲノム解析とDNA塩基多型の解析を実施した(配列のアセンブル、アノテーション後に、相同遺伝子のクラスタリング、系統樹作成、臨床症状特異的な塩基多型の検出)。

高病原性株とそれ以外に特異的な多型、高病原性株集団に特異的な遺伝子を統計的に明らかにした(FineStructure, phyCを用いる: Yahara K. Mol Biol Evol. 2013, Chen P. Curr Opin Microbiol. 2015)。

予備データのようにA群レンサ球菌は、可動性因子上に多くの制限修飾系を有し、メチロームプロファイルが異なっていると考えられた。そこで、予備データの6株に加えて、近縁種かつ可動性因子上のメチラーゼが異なる2菌株4セットの合計8菌株を選定し、メチローム解析を実施した。メチローム配列取得については、申請者らが抽出したゲノムDNAについて、ライブラリの作製(インサート長20 kbp程度)、Pacific Biosciences PacBio RS II (P6C4 chemistry)での配列取得を1試料につき500 Mb以上の配列を取得した(5mCを含むメチル化部位の検出のため下記ゲノムサイズのx250以上)。メチローム配列取得は大阪大学大学院医学系研究科最先端医療イノベーションセンターに委託した。H29においても、2菌株4セットの合計8菌株について同様のメチローム解析を実施した。特にメチラーゼ種に多様性が高いType IIに着目した。

全A群レンサ球菌株のフェージ、Integrative and conjugative elements (ICE)をコドン使用頻度等を用いて情報的に予測し、染色体上と可動性因子上の制限修飾因子をRebaseを用いて予測した(<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>)。

A群レンサ球菌は、ゲノム内の可動性因子(CRISPR)を段階的に変化させることで、分化し、高病原性株が出現していることがわかった。しかし、259株では、段階的な変化が未知な箇所が見られたことから、1,000株のデータおよび必要な追加ゲノムシーケンスをIllumina MiSeqシーケンサー1ランで行った(MiSeq Reagent v3; 300 bp x 2)。系統樹の主要分岐箇所全てを実施するため40株分のドラフトゲノム配列を取得した。

近縁種である豚レンサ球菌の例を示している。本菌では、CRISPRのみならず、制限修飾因子、トキシナンチトキシニンなどの細菌の可動性因子の抑制因子の系統分化への寄与が明らかとな

った。A 群レンサ球菌においても可動性因子とその抑制因子の系統分化への寄与の解明を試みた。

抽出した RNA について、cDNA、ライブラリの作製（インサート長 500–800 bp 程度）、Illumina MiSeq での配列取得を 1 試料につき 1 Gb 以上実施した（101 bp paired-end で 10M reads 以上が quality filtering 後に残る十分量、16 株で再現性を 3 回取るため、合計 48 試料）。

異なる可動性因子（特にファージ）がもたらすメチロームの違い、そしてトランスクリプトームに影響を与えることが、段階的な系統進化、しいては A 群レンサ球菌の高病原化をもたらしている因子を、ゲノム連関解析により統計的に有意な部位の抽出を試みた。

4. 研究成果

従来、考慮されてこなかった非劇症型株を多数用いた合計 259 株の比較ゲノム解析を実施し、以下の新たな知見が得られた（図 2）。I) 本種の多様化においては、原核生物の獲得免疫システム（CRISPR）と病原因子の運搬役であるバクテリオファージの関わりが主要な役割を果たし、CRISPR の欠失が一つの種内を大きく 2 つのグループに分ける要因になることが分かった。II) また、各グループの特徴として、CRISPR を保有するグループはゲノムを構成する遺伝子数がほぼ一定で保守的であるのに対し、CRISPR を欠損したグループはゲノム上に多様なファージの出入りがあり、種としては多数の遺伝子種を保有するが、全株共有の遺伝子種は CRISPR 保有型に比べ少なくなっていた。すなわち、「ファージを介したゲノム縮小という新規ゲノム進化機構」の存在を明らかにすることができた。さらに、III) 劇症型株に特異的に保存されている新規 SNPs を多数同定することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 37 件)

1. °Y. Minato, D. M. Gohl, J. M. Thiede, J. M. Chacón, W. R. Harcombe, F. Maruyama, *A. D. Baughn. Genome-wide assessment of Mycobacterium tuberculosis conditionally essential metabolic pathways. **bioRxiv**. doi: <https://doi.org/10.1101/534289> 2019. (査読有) IF=NA.
2. °K. Núñez-Montero, C. Lamilla, M. Abanto, F. Maruyama, M. A. Jorquera, A. Santos, J. Martínez-Urtaza, L. Barrientos*. Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. **Sci. Rep. in press**. 2019. (査読有) IF=4.122
3. °*D. Tanaka, K. Sato, M. Goto, S. Fujiyoshi, F. Maruyama, S. Takato, T. Shimada, A. Sakatoku, K. Aoki, S. Nakamura. Airborne microbial communities at high-altitude and suburban sites in Toyama, Japan suggest a new perspective for bioprospecting. **Front. Bioeng. Biotechnol.** 7:12. doi: 10.3389/fbioe.2019.00012. 2019. (査読有) IF=NA.
4. °*Y. Furuta, H. Harima, E. Ito, F. Maruyama, N. Ohnishi, K. Osaki, H. Ogawa, D. Squarre, B. Hang'ombe, H. Higashi. Loss of bacitracin resistance due to a large genomic deletion among *Bacillus anthracis* strains. **mSystems** 3. pii: e00182-18. 2018. (査読有) IF=5.750
5. °T. Okubo, °M. Yossapol, F. Maruyama, E. M. Wampande, S. Kakooza, K. Ohya, S. Tsuchida, T. Asai, J. D. Kabasa, *K. Ushida. Phenotypic and genotypic analyses of antimicrobial-resistant bacteria in livestock in Uganda. **Transboundary Emerg. Dis.** doi: 10.1111/tbed.13024. 2018. (査読有) IF=3.504
6. °T. Ito, a K. Sawai, M. Kawai, K. Nozaki, K. Otsu, H. Fukushi, *K. Ohya, F. Maruyama. Draft genome sequences of *Mycobacterium senuensis* strain GF74 and *Mycobacterium colombiense* strain GF28 and GF76, isolated from a swine farm in Japan. **Microbiol Resour Announc** 7:e00936-18. 2018. (査読有) IF=NA
7. °*L. Nonaka, T. Yamamoto, F. Maruyama, Y. Hirose, Y. Onishi, T. Kobayashi, S. Suzuki, N. Nomura, M. Masuda, *H. Yano. Interplay of a non-conjugative integrative element and a conjugative plasmid in the spread of antibiotic resistance via suicidal plasmid transfer from an aquaculture *Vibrio* isolate. **PLoS One** 13(6):e0198613. 2018. (査読有) IF=2.776
8. °T. Ito, F. Maruyama, K. Sawai, K. Nozaki, K. Otsu, *K. Ohya. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium virginiense* Strain GF75 Isolated from the Mud of a Swine Farm in Japan. **Genome Announc.** 6. pii: e00362-18. 2018. (査読有) IF=NA
9. °Y. Sugimoto, F. Maruyama, *S. Suzuki. Draft Genome Sequence of a *Shewanella halifaxensis* Strain Isolated from the Intestine of Marine Red Seabream (*Pagrus major*): Coding Integrative Conjugative Element with Macrolide Resistance Genes. **Genome Announc.** 6. pii: e00297-18. 2018. (査読有) IF=NA
10. °F. P. Cid, F. Maruyama, K. Murase, S. P. Graether, G. Larama, L. A. Bravo, *M. A. Jorquera. Draft genome sequences of bacteria isolated from the *Deschampsia antarctica* phyllosphere. **Extremophiles** doi: 10.1007/s00792-018-1015-x. 2018. (査読有) IF=2.000
11. °*K. Okada, W. Wongboot, S. Chantaroj, W. Natakathung, A. Roobthaisong, W. Kamjumphol, F. Maruyama, T. Takemura, I. Nakagawa, M. Ohnishi, S. Hamada. *Vibrio cholerae* embraces two

- major evolutionary traits as revealed by targeted gene sequencing.
Sci. Rep. 12:e0184720. 2018. (査読有) IF=4.122
12. °N. Tajima, Y. Kanesaki, S. Sato, H. Yoshikawa, F. Maruyama, K. Kurokawa, H. Ohta, T. Nishizawa, M. Asayama, *N. Sato. Complete genome sequence of *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. ABRG5-3, a non-heterocystous cyanobacterium isolated from Japanese freshwater.
Genome Announc. 6: pii: e01608-17. 2018. (査読有) IF=NA
 13. °S. Arai, H. Kim, T. Watanabe, M. Tohya, E. Suzuki, K. Ishida-Kuroki, F. Maruyama, K. Murase, I. Nakagawa, *T. Sekizaki. Assessment of pig saliva as a *Streptococcus suis* reservoir and potential source of infection on farms by use of a novel quantitative polymerase chain reaction assay.
Am. J. Vet. Res. 79:941-948. 2018. (査読有) IF=0.833
 14. °H. Yano, *T. Iwamoto, Y. Nishiuchi, C. Nakajima, D. Starkova, I. Mokrousov, O. Narvskaya, S. Yoshida, K. Arikawa, N. Nakanishi, K. Osaki, I. Nakagawa, M. Ato, Y. Suzuki, *F. Maruyama. Population structure and local adaptation of MAC lung disease agent *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.
Genome Biol. Evol. 9:2403-2417. 2017. (査読有) IF=3.940
 15. °*T. Watanabe, M. Shibasaki, F. Maruyama, T. Sekizaki, I. Nakagawa. Investigation of potential targets of Porphyromonas CRISPRs among the genomes of *Porphyromonas* species.
PLoS One. 12:e0183752. 2017. (査読有) IF=2.776
 16. °S. Tsuchida, °F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, A. Toyoda, M. Ohkuma, K. Ushida. Genomic characteristics of *Bifidobacterium thermacidophilum* pig isolates and wild boar isolates reveal the unique presence of a putative mobile genetic element with *tetW* for pig farm isolates.
Front. Microb. doi: 10.3389/fmicb.2017.01540. 2017. (査読有) IF=4.019
 17. °T. Takemura, °K. Murase, °F. Maruyama, °T. L. Tran, A. Ota, I. Nakagawa, D. T. Nguyen, T. C. Ngo, T. H. Nguyen, A. Tokizawa, M. Morita, M. Ohnishi, B. M. Nguyen, *T. Yamashiro. Genetic diversity of environmental *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Northern Vietnam.
Infect. Genet. Evol. 54:146-151. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.017. 2017. (査読有) IF=2.55
 18. °M. Okura, T. Nozawa, T. Watanabe, K. Murase, I. Nakagawa, D. Takamatsu, M. Osaki, T. Sekizaki, M. Gottschalk, S. Hamada, *F. Maruyama. A locus encoding variable defence systems against invading DNA identified in *Streptococcus suis*.
Genome Biol. Evol. doi: 10.1093/gbe/evx062. 2017. (査読有) IF=3.940
 19. °A. Roobthaisong, C. Aikawa, T. Nozawa, F. Maruyama, *I. Nakagawa. YvqEC/CovRS of Group A Streptococcus Play a Pivotal Role in Viability and Phenotypic Adaptations to Multiple Environmental Stresses.
PLoS One. 12:e0170612. 2017. (査読有) IF=2.776
 20. °H. Kachi, °N. Maruyama, *F. Maruyama, T. Shiba, T. Watanabe, A. Goda, K. Murase, Y. Michi, Y. Takeuchi, Y. Izumi, S. Yamaguchi, I. Nakagawa. Active microbiota show specific correlations in peri-implantitis and periodontitis.
J. Stomatol. Soc. 84:25-35. 2017. (査読有) IF=NA
 21. °F. Maruyama and *S. Ueki. Evolution and phylogeny of large DNA viruses, *Mimiviridae* and *Phycodnaviridae* including newly characterized *Heterosigma akashiwo* virus.
Front. Microbiol. 7:1942. 2016. (査読有) IF=4.019
 22. °T. Kulkarni, C. Aikawa, T. Nozawa, K. Murase, *F. Maruyama, I. Nakagawa. DNA-based culture-independent analysis detects the presence of Group A Streptococcus in throat samples.
BMC Microbiol. 16:237. 2016. (査読有) IF=2.829
 23. °T. Shiba, °T. Watanabe, H. Kachi, T. Koyanagi, N. Maruyama, K. Murase, *Y. Takeuchi, *F. Maruyama, Y. Izumi, I. Nakagawa. Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms. * press release あり
Sci. Rep. 6:30997. 2016. (査読有) IF=4.122
 24. °M. Tohya, T. Watanabe, *F. Maruyama, S. Arai, A. Ota, T. B. T. Athey, N. Fittipaldi, I. Nakagawa, *T. Sekizaki. Comparative genome analyses of *Streptococcus suis* isolates from endocarditis demonstrate persistence of dual phenotypic clones.
PLoS One 11:e0159558. 2016. (査読有) IF=2.776
 25. °*M. A. Jorquera, F. Maruyama, A. Ogram, O. Navarrete, L. Lagos, N. Inostroza, J. Acuña, J. Rilling, M. Mora. Rhizobacterial community structures associated with native plants grown in Chilean extreme environments.
Microb. Ecol. 72:633-646. 2016. (査読有) IF=3.614
 26. °L. Lagos, J. J. Acuña, F. Maruyama, A. Ogram, M. Mora, *M. A. Jorquera. Effect of phosphorus addition on the total bacterial communities and alkaline phosphomonoesterase-harboring bacterial populations in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* var. Nui)
Biol. Fertil. Soils. 52:1007-1019. 2016. (査読有) IF=3.808
 27. °*N. Tajima, K. Saito, S. Sato, F. Maruyama, M. Ichinomiya, S. Yoshikawa, K. Kurokawa, H. Ohta, S. Tabata, A. Kuwata, N. Sato. Sequencing and analysis of the complete organellar genomes of Parmales, a closely related group to Bacillariophyta (diatoms).
Curr. Genet. 62:887-896. 2016. (査読有) IF=3.574
 28. °*T. Kubota, T. Kobayashi, T. Nunoura, F. Maruyama, S. Deguchi. Enantioselective utilization of D-amino acids by deep-sea microorganisms. * press release あり
Front. Microbiol. 7:511. 2016. (査読有) IF=4.019

29. °T. Furusawa, *H. Iwano, H. Higuchi, M. Usui, F. Maruyama, I. Nakagawa, H. Yokota, Y. Tamura. Complete genome sequencing of the broad-host-range *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ΦR18 and ΦS12-1. **Genome Announc.** 4:e00041-16. 2016. (査読有) IF=NA
30. °J.I. Rillinga, J.A. Acuña, P. Nannipieri, F. Cassan, F. Maruyama, M.A. Jorquera*. Current opinion on methods and perspectives for tracking and monitoring of plant growth-promoting bacteria. **Soil Biology & Biochemistry.** doi:j.soilbio.2018.12.012. 2018. (査読有) IF=4.926
31. °T. Ito, M. Okura, *F. Maruyama. Acquired and innate immunity in prokaryotes define their evolutionary story **DNA traffic in the environment, Springer.** 47-75. 2019. (査読有) IF=NA
32. °芝多佳彦、藤吉奏、須藤毅頭、竹内康雄、*丸山史人. 口腔内における複合微生物感染症のホロゲノム動態を時空間的に理解する. **最新医学** 73(4): 509-522, 2018. (査読無) IF=NA
33. °S. Fujiyoshi, D. Tanaka, *F. Maruyama. Transmission of airborne bacteria across built environments and its measurement standards: a review. **Front. Microbiol.** 8:2336. doi: 10.3389/fmicb.2017.02336. 2017. (査読有) IF=4.019
34. °*芝多佳彦、竹内康雄、渡辺孝康、小柳達郎、丸山緑子、加地博一、村瀬一典、丸山史人、中川一路、和泉雄一. インプラント周囲炎と歯周炎の違いを科学する ～口腔細菌生態系の解明へ、メタトランスクリプトーム解析からのアプローチ～. **歯界展望** 129:823 -826. 2017. (査読無) IF=NA
35. °*Y. Nishiuchi, T. Iwamoto, *F. Maruyama. Infection sources of a common nontuberculous mycobacterial pathogen, *Mycobacterium avium* complex. **Front. Med.** doi: 10.3389/fmed.2017.00027 2017. (査読有) IF=NA
36. °藤吉奏、村瀬一典、*丸山史人. マイクロバイオーム研究からホロビオーム研究への新展開. **生体の科学** 68:97-101. 2017. (査読無) IF=NA
37. °*F. Maruyama, T. Watanabe, *I. Nakagawa. *Streptococcus pyogenes*, Basic Biology to Clinical Manifestations **NIH NCBI Bookshelf** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333426/> 2016. (査読有) IF=NA

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

ResearchGate:

https://www.researchgate.net/profile/Fumito_Maruyama/publications

FaceBook:

<https://www.facebook.com/MicrobGenoEcol/>

NCBI PubMed:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=maruyama+fumito+or+maruyama+f+and+nakagawa+i+or+maruyama+f+and+nonaka+l>

Google Scholar:

<https://scholar.google.co.jp/citations?user=HeDrKa4AAAAJ&hl=ja>

Loop:

<http://loop.frontiersin.org/people/20823/overview>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小椋 義俊

ローマ字氏名：Ogura Yoshitoshi

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40363585

研究分担者氏名：村瀬 一典

ローマ字氏名：Murase Kazunori

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：研究員

研究者番号（8桁）：40710869

研究分担者氏名：中川 一路

ローマ字氏名：Ogura Yoshitoshi

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：70294113

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。