

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401  
研究種目：基盤研究(A) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20H00562  
研究課題名(和文) マルチゲノミック解析による非結核性抗酸菌の環境適応機構解明と対応技術基盤構築

研究課題名(英文) Elucidation of environmental adaptation mechanism of non-tuberculous mycobacteria by multi-genomic analysis and establishment of protective basis against their infection

研究代表者  
丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)

広島大学・I D E C 国際連携機構：PHIS・教授

研究者番号：30423122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本における肺疾患の主要な原因であるMycobacterium aviumが日本の浴室内の特殊な環境に由来し、バイオエアロゾル感染を引き起こしている可能性があるとの仮説を立てて推進した。細菌株とゲノムデータを収集し、ゲノムDNAの抽出と配列決定の方法を確立した。100以上の完全なゲノムを解読し、Tn-seqとCRISPRiを用いた機能的ゲノム解析を行い、この細菌のバイオフィルム形成、薬剤耐性、ファージ感染性などの研究を進めた。一部の選択した菌株については、予備的なTn-seq実験を開始した。また、日本の浴槽における本菌の分布と量を調査したところ、欧米とは大きく異なっていた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本プロジェクトは、様々な環境のマイコバクテリウム・アビウムゲノム特性が明らかになるとともに、機能ゲノム解析手法の開発が進んだ。これは、本菌の生存戦略に関する重要な知見を提供し、治療法の開発に貢献すると考えられる。また、日本の浴室などの感染源を特定することで、予防策を講じることができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This JSPS Kakenhi research project aims to understand the survival mechanisms of Mycobacterium avium, a leading cause of lung disease in Japan. The team hypothesizes the bacterium originates from unique conditions in Japanese bathrooms, possibly causing bio-aerosol infections. The researchers are collecting bacterial strains and genomic data, and have established methods for extracting and sequencing genome DNA. They have sequenced over 100 complete genomes and are conducting functional genome analysis using Tn-seq and CRISPRi to study the bacterium's biofilm formation, drug resistance, and phage infectivity. Preliminary Tn-seq experiments have begun on selected strains. The team has also been investigating the distribution and quantity of this bacterium in Japanese bathtubs, finding its prevalence significantly differs from that in the US and Europe.

研究分野：Microbial Genomics and Ecology

キーワード：NTM Mycobacterium avium High throughput sequencer drinking water water bioaerosol

## 1. 研究開始当初の背景

難治性の慢性呼吸器感染症である肺 NTM 症 (Nontuberculous 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 (Emerg. Infect. Dis. 22: 1116-7. 2006)。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。また、NTM は生育が遅く遺伝子改変が困難であることから、明確な病原因子の同定ができていない。様々な環境に生息し、環境ごとのゲノム型が存在し、地域的にも、同一環境下においても、生息するゲノム型が異なっていることがわかってきた状況である。そのため、その感染ルートの確定に至っていないだけでなく、コレラ菌のように自然環境というその生息地における生残戦略などの、生態学的な研究が進んでいない。そのため、大きな特徴である遺伝子伝搬を介したモザイクゲノムがどこで生じているのかなど、多くが未知のままである。

*M. avium* には、多くの学術的な謎が残されている。なぜ *M. avium* は結核と類似した病態、肺疾患を示すにも関わらず、ヒト環境だけではなく幅広い自然に生息しているのか。なぜ、結核で有効な、第一選択治療薬であるイソニアジドが効かないなど、難治性なのか。結核のゲノムは、特定の反復配列や塩基多型などが主要なゲノムの違いになるにも関わらず、本 *M. avium* のゲノムは、ゲノム全体にわたり遺伝子伝搬を複数のゲノムグループと行い、モザイクゲノムを保有し、多様な外来因子としてのプラスミドを保有し、どのような薬剤耐性、病原性に寄与するのか。本研究では、難治性に寄与する薬剤耐性とバイオフィーム形成、自然界での生息状況である異なるクローン共存がなぜ起きているのか、を情報学的、実験的なアプローチで取り組む。

申請者は、上記のように病原細菌、ヒト環境に生息する A 群レンサ球菌、そして、自然環境に生息するコレラ菌が本来の自然生息地でどのように生活し、多様化してきたのかを研究してきた。その過程で、特に CRISPR、制限修飾系を始めとする細菌の防御機構に着目して、生存戦略の解明に取り組んできた結果、細菌種ごとの特異的な多様化機構、生存戦略を明らかにしてきたことが、本研究の立案に至った。

研究対象としている *M. avium* は日本だけではなく、世界的な注目を浴びつつある。国内では、今年度終了する日本医療研究開発機構 (AMED) の非結核性抗酸菌症のゲノム班は、申請者らのグループがその解析を担い、かつ、調整費により、貴重な完全配列大規模データを保有している。さらに、国際共同研究強化 A により、継続して機能ゲノム解析手法の確立をアメリカの共同研究者と続けており、既に日本で初めての抗酸菌でトランスポゾンシーケンスによる論文を発表している (mSystems 25: e00070-19. 2019)。申請者らのグループにより、本菌のモザイクゲノム特性 (Genome Biol Evol. 9:2403-2417. 2017)、そのゲノムグループ分類法 (BMC Genomics 20:752. 2019)、日本で分布の状況 (Infect Genet Evol. 74:103923. 2019) により発表を続けていることから他の追随を許さない状況にある。結核以上の難治性から、世界で最も影響を与えている一般的な医学誌 (N. Engl. J. Med.) の editor in chief である Eric Rubin 博士も本菌を用いた研究に着手しており、申請者は 2019 年 2 月に Rubin 博士を一週間招聘し、情報交換をすることができた。しかしながら、自然環境での共存機構に着目した研究を実施をしているグループは存在しない。

研究代表者の丸山は、本課題の開始の令和 2 年 4 月で 43 歳であったが、これまでに教養学 (学部)、薬学 (大学院)、農学 (ポスドク)、理工学 (助教)、歯学 (准教授)、医学 (准教授) と広い分野の研究科や附置研究所で、一貫して環境微生物学に関わる研究を続け、かつ、学際・国際的なフィールド研究、実験・情報学的な研究を経験している。そして、下記に述べるような研究実績、能力が認められて、令和元年より、広島大学の研究に関する総合的なマネジメントを行う研究推進機構の運営支援および研究マネジメント業務の中核を担う学術・社会連携室の教授となった。そして、新しい研究室 (環境遺伝生態学) を主宰するに至っている。

主要な研究フィールドであるチリでは、2022 年度まで、合計 5 年間の JST/JICA が支援する地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) の代表研究者となっていた。この研究では、伊勢志摩 サミットでも世界的に今後重要となる課題として取り上げられた、薬剤耐性細菌や赤潮に関わる病原微生物の環境内動態に関する研究を産官学で連携して取り組んでいる。また、科学研究費補助金基盤 B (海外学術調査) の代表として、日本医療研究開発機構 (AMED) の国際研究である感染症研究国際展開戦略プログラム (J-GRID、ベトナム拠点) の協力者として東南アジアのコレラをはじめとした薬剤耐性菌問題に取り組んでいるだけでなく、AMED の国内研究においても、「非結核性抗酸菌症の発生動向把握及び診断・治療法の開発に向けた研究」において分担を務め、東南アジアを含む世界的に重要な抗酸菌症のゲノム疫学研究を、「病原因子の環境遺伝生態学的視点」で取り組んでいた。すなわち、1) 自然環境中の細菌は培養できないことが当然である、2) 同じ種であっても生息環境によってゲノム型が異なる (これは例えば、食中毒における微生物汚染源の同定に利用される)、3) 同じ微生物種であっても生理状態によって表現型が異なる、4) 種間相互作用が存在している、を基軸に研究を進め、複合感染症ホロビオーム (存在する生物の総体) 解析を実施することで、病原細菌の分布とその遺伝子動態

だけでなく、微生物間相互作用を明らかにしてきた (Appl Environ Microbiol. (2003) 69:5023-8, Appl Environ Microbiol. (2006) 72:6248-56, Clin Microbiol Infect. (2014) 20:O309-17, Sci Rep. (2016) 6:30997, ISME J. (2015) 9:629-42, BMC Microbiol. (2016) 16:237 等)。

本研究遂行に必要な技術・知識は上記の研究課題で蓄積しており、その成果として、2014年から5年間で web of science 掲載の原著論文・総説が 61 報 (筆頭・責任著者が 22 報、平均 IF=3.9 (専門分野平均 IF=2.5))、日本語・英語の著書や総説を 7 報発表してきた。これらの成果が評価され、72 回もの招待講演 (半数以上が海外) を行っている。さらに、2014 年に手島精一記念研究賞 (共同)、2015 年に第 2 回日本微生物生態学会奨励賞受賞「医科微生物生態学の創成に関する研究」(単独)、2016 年に第 11 回ゲノム微生物学会奨励賞受賞「獲得免疫機構に着目した病原細菌のゲノム進化に関する研究」(単独)、2017 年に JPR 論文賞、Most-Cited Paper Awards 2017 (共同)、2019 年には、2019 年度 (平成 31 年度) クリタ水・環境科学研究優秀賞、を受賞している。

分担者の港は、ミネソタ大学から藤田医科大学に着任した。ミネソタ大学では、代表者である丸山と本研究課題でも使用するトランスポゾンシーケンスを結核で確立し、mSystems 誌 (発表時 IF=5.4) に論文を発表したばかりである。また本研究課題の基盤となる CRISPRi を代表者の丸山が代表の国際共同研究強化 A にて、共同で確立している。また、2018 年には、Nat Commun 誌の筆頭著者で発表するなど、勢いのある研究者である。

分担研究者の岩本と西内、協力者の矢野は、代表者とともに AMED の同じ班員として、定期的に面談し、特に西内は毎週スカイプで打ち合わせを実施する密接な関係にある。さらに、2017 年度以降に 3 または 4 報の国際誌への原著論文を発表し、プレスリリースも行っている。

分担研究者の藤吉は、代表者の丸山のプロジェクトで雇用されている若手研究者である。一貫して代表者と同研究分野で研鑽し、学振研究員 (DC1) を含めて多くの賞を受賞している。そして、3 年間で 4 報の共著を代表者と発表し、日常的にディスカッションしており、本研究課題においても、学生や院生、研究代表者とその他の分担・協力研究者との調整をしてきた。

研究代表者の丸山は、2019 年度より、広島大学の学術・社会連携室に環境遺伝生態学研究室を立ち上げ、主宰してきた。この学術・社会連携室においては、学部や大学院の講義、実習を含む教育業務が無く、入試や学科と研究科の委員会等も無いため、エフォートのほぼ全てを研究に当てることができる状況にある。さらに医系研究科、統合生命研究科に所属する学内研究者の協力により、丸山の研究に、留学生修士、留学生博士、日本人博士、社会人博士取得希望者の 4 名、また、他のプロジェクトで雇用している技術補佐員 1 名、事務補佐員 2 名、研究員 1 名が本プロジェクトへの参画を計画していた。

丸山は、これまで本課題が含まれる環境遺伝生態学に一貫して取り組んでおり、本研究に必要な実験・情報解析のためのオミクス解析技術、施設はすべて研究室内で保有している。例として次世代シーケンサーの Oxford Nanopore 社の GridION および MinION、Illumina 社 MiniSeq、大型計算機 (1TB メモリ、300TB HDD、144 core CPU など 4 台) を保有している。また、名誉教授を勤めるチリのランフロンテラ大学にも類似した研究環境 (Illumina 社の MiSeq や大型計算機) が利用可能な状況にある。また、顕微鏡や遺伝子導入機器も本課題で購入予定の顕微鏡モジュールを除きすべて代表者または分担者が保有している。サンガー DNA シーケンサーなど使用する可能性がある機器についても、「研究組織のマネジメントと一体となった新たな研究設備・機器共用システムの導入について」(平成 27 年 11 月科学技術・学術審議会先端研究基盤部会) において運用することとされている「研究組織単位の研究設備・機器の共用システム」等として利用可能であることを確認している。本研究課題実施中に分担者の西内のみ、定年退職予定があるが、本研究チームの研究員として雇用することですべてのエフォートを課題に投入することが可能であった。

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。しかし、NTM は生育が遅く遺伝子変異が困難であることから研究が進んでいない。そこで本研究課題は、日本で最も重要な肺 NTM 症の原因細菌である *Mycobacterium avium* を対象に、申請者の他種病原細菌ゲノム研究で導かれた 3 点: i) 弱病原性細菌株には見られない強病原性細菌株特異的な SNPs, ii) 強病原性細菌株特異的な外来性病原因子, iii) 外来遺伝因子に由来するメチル化に伴う病原遺伝子発現への影響を本菌でも情報学的に探索し、本種での特異性と共通性を見出す。そして、特に環境適応に重要なバイオフィーム形成能・薬剤耐性能に着目して、結核菌で確立したトランスポゾンシーケンシングや新規に特異的な遺伝子サイレンシングが可能な CRISPRi を含む分子生物学の手法を本菌に応用し、情報学的に見出された「病原性適応遺伝的多型」機能を実験的に証明する。さらに、得られる本ゲノム多型を用いた衛生微生物学的な簡易環境評価法基盤を構築する。これらを通じて、自然環境下で複数ゲノム型クローンの共存機構解明の一助を得ることができた。

## 2. 研究の目的

*M. avium* のバイオフィーム形成能・薬剤耐性能 (イソニアジド、クラリスロマイシン) に着目して、トランスポゾンシーケンシングや遺伝子抑制技術、CRISPRi を用いて、最新の情報・統計ゲノム解析で見出された「病原性適応遺伝的多型」の機能を実験的に証明する。さらに、この

ゲノム多型を標的とした multiplex in silico PCR により、簡易環境リスク評価法を提案する。

本研究は、代表者独自のレンサ球菌のゲノム解析や、本研究グループが世界に先駆けて発表してきた最新の結果に基づき立案しているものである (mSystems 25: e00070-19. 2019)、Genome Biol Evol. 9:2403-2417. 2017, BMC Genomics 20:752. 2019, Infect Genet Evol. 74:103923. 2019)。本菌の臨床分離株による比較ゲノム解析を実施しているものはあるものの、自然環境分離株に着目した解析は他のグループでは例はなく、生態学的なアプローチにより、その菌の生態自身を明らかにしようとする試みは、他の病原細菌種でも限定されている。さらに、同一自然環境から複数クローン株が分離されることは、同様に自然環境を本来の生息地とするコレラ菌でしか知られておらず、本研究グループの独自の未発表データであり、独自性が高い。また、本研究で使用する情報・統計解析は、申請者らが今年度まで実施中の日本医療研究開発機構 (AMED) で得られる 250 株もの完全長ゲノム配列データがあることで可能となることで発案できた、創造性の高いものであったと考える。

### 3. 研究の方法

以下の項目について検討を重ねてきた。

(A) アメリカで実施してきたトランスポゾンシーケンス、CRISPRi の系を *M. smegmatis* で実施し、日本での実験基盤を確立する。

(B) bioRxiv (doi: <https://doi.org/10.1101/708495> 2019) に従い、*M. avium* でのトランスポゾンシーケンスの系を確立する。

(C) (B)の系を用いて、表現型ごとの条件必須遺伝子を同定する。

(D) 7箇所から得られた異なる 24 株のクローンのゲノム配列決定を代表者が保有する illumina 社の MiniSeq によりショートリードを取得し、Nanopore 社の GridION でロングリードを取得して、決定する。パルスフィールドゲル電気泳動実験と整合性のあう Flye アセンブラで pilon 精密化ソフトウェアの条件を決定する。そして、ここまで使用されなかったショートリードにより、10kbp 以下のプラスミドの存在の有無を決定する。クローン間で、共存することが、環境適応に有利となるかを、KEGG 代謝パスウェイデータベース登録されているパスウェイを複数株で埋めることができるかを申請者が報告済みの方法を用いて可視化、評価する (ISME J. 9:629-42. 2015)。

(E) バイオフィーム形成、クラリスロマイシン・イソニアジド耐性で 2 群に分け、各群 50 株を用い、これらの表現型に関与するゲノム変異をゲノム連関解析 (Genome Wide Association Study; GWAS) で導き出す。最近、報告された Genome-wide epistasis and co-selection study (GWES, Nuc Acids Res, 47: e112. 2019) により、候補を絞り込む。さらに、virulence adaptive polymorphisms (VAPs) 解析 (Nat Microbiol. 2:16240. 2016) におけるタンパク質の同義置換に対する非同義置換比のしきい値を高めることで、実験的に実証する候補を数十まで絞り込む。(F) (E)と(C)に共通で得られる遺伝子変異の数とこれを in silico PCR で検出可能とするための前段階として、抗酸菌の分子疫学で用いられる Viable Number of Tandem Repeat (VNTR) 法で検討する。

(G) これまでのロングリードはその質が低いことが問題となっていたが、技術の改良により、これまでのようにショートリードがロングリードのみで十分な質が得られるという情報がある。そこで、これをいち早く検討し、その有用性を評価する。

(H) (F)にも記載したように、重要な表現型に関与することが判明したゲノム多型を multiplex in silico PCR 法を確立し、その変異数の多寡により、その環境の衛生微生物学的な安全性を評価可能とする。

\*時間が許す限り、(H)の標的、すなわち、*M. avium* の条件致死遺伝子が新薬、創薬の標的となりうるかを調査してきた。

開始前に想定された最も研究遂行上課題としては、上述の VAPS 解析で導かれる表現型に影響すると考えられる候補数が非常に多くなることが想定された。コレラ菌を用いた既報では環境と臨床株それぞれ 25 株のゲノム情報から同義置換ではなく非同義置換の株間での保存性の高さ、遺伝子内での非同義置換と同義置換の比の検定によって、実験的に実証する遺伝子を 5 遺伝子にまで絞り込むことに成功している (申請者らの A 群レンサ球菌の劇症型、非劇症型比較では 20 遺伝子)。ただし、絞り込みのための比のしきい値そして統計的な有意差の設定に根拠がない。そこで、本研究では、用いる菌株数を 50 株ずつとし、GWAS 解析さらに GWES 解析を併用することで、より客観的な候補の絞り込みを達成した。また、各解析のしきい値を下げていき、実験的に表現型に影響を与える遺伝子がどこまで表現型に影響を与えるのかを検討した。さらに、同一環境下から単離した異なるクローンのゲノム比較により、どの遺伝子領域が共有され、どの遺伝子領域が共有されていないのかを明らかにし、ヒト臨床株のみでは明らかにすることができない、複数クローン共生による環境適応機構の解明の一助と今後はしていく予定である。

分担体制は以下の通りであった。

Baughn 博士は、抗酸菌の一種である *M. tuberculosis* を用いてトランスポゾンシーケンシングを含む分子生物学の手法を確立しており、Minnesota 大学ゲノムセンターの Gohl 博士は本手法の情報解析手法を独自に確立してきたことから、申請者が国際共同研究強化で築いてきた共同研究基盤を本申請で *M. avium* で深化させる。藤田医科大学の港は、Baughn 博士と本手法および

CRISPRi を実施してきた経験を活かし、*M. avium* でのトランスポゾンシーケンスおよび CRISPRi の系の実験条件最適化を行う。矢野博士は、*M. avium* のゲノムモザイク構造を明らかにした実績を持ち、現在、特にプラスミドに着目した特性解明に取り組んでいる。本研究でも遺伝子伝搬において重要な表現型に着目していることから、互いにゲノム情報解析で協力してきた。大阪市大の西内は、長年に渡り、本菌の研究に取り組んできており、本菌のバイオフィーム形成条件の発見者でもある。そこで、本菌の培養とゲノム抽出に加えて、バイオフィーム形成能試験、情報的に得られたゲノム変異の解釈と実験証明前の候補選定を行った。京都大学の藤吉博士は、国内外でショートリード、ロングリード DNA シーケンサーを運用し、情報解析した。そこで、極めて高 GC 含量の本菌の高精度なゲノムおよびメチローム配列取得を行った。神戸市環境保健研究所の岩本博士も長年に渡り、抗酸菌研究に携わっており、多数の独自菌株を保有し、系統分類、分子疫学に精通している。そこで、同一箇所からの複数異なるクローン共存株単離とそのタイピング、そして、クラリスロマイシンとイソニアジドの薬剤感受性試験を実施した。代表者の丸山は、異なるゲノム多型解析法の実施と得られた候補の絞り込み、得られた表現型データとの統合を試みた。

#### 4. 研究成果

日本における肺疾患の主要な原因である *Mycobacterium avium* が日本の浴室内の特殊な環境に由来し、バイオエアロゾル感染を引き起こしている可能性があるとの仮説を立てて推進した。細菌株とゲノムデータを収集し、ゲノム DNA の抽出と配列決定の方法を確立した。100 以上の完全なゲノムを解読し、Tn-seq と CRISPRi を用いた機能的ゲノム解析を行い、この細菌のバイオフィーム形成、薬剤耐性、ファージ感染性などの研究を進めた。一部の選択した菌株については、予備的な Tn-seq 実験を開始した。また、日本の浴槽における本菌の分布と量を調査したところ、欧米とは大きく異なっていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ  
<https://mge.hiroshima-u.ac.jp>  
 ORCID  
<https://orcid.org/0000-0003-2347-616X>  
 CHOBE  
<https://chobe.hiroshima-u.ac.jp>  
 Google Scholar  
<https://scholar.google.co.jp/citations?user=HeDrKa4AAAAJ&hl=ja>  
 研究室ホームページ  
<https://mge.hiroshima-u.ac.jp>  
 Researchmap  
<https://researchmap.jp/read0091166/>  
 PubMed  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=maruyama+fumito+or+maruyama+f+and+nakagawa+i+or+maruyama+f+and+nonaka+l&sort=date>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                                 | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 西内 由紀子<br><br>(Nishiuchi Yukiko)<br><br>(00333526) | 広島大学・I D E C 国際連携機構：PHIS・特任准教授<br><br><br><br>(15401) |    |
| 研究分担者 | 港 雄介<br><br>(Minato Yusuke)<br><br>(10836620)      | 藤田医科大学・医学部・講師<br><br><br><br>(33916)                  |    |
| 研究分担者 | 藤吉 奏<br><br>(Fujiyoshi So)<br><br>(20805808)       | 広島大学・I D E C 国際連携機構：PHIS・助教<br><br><br><br>(15401)    |    |
| 研究分担者 | 岩本 朋忠<br><br>(Iwamoto Tomotada)<br><br>(70416402)  | 神戸市健康科学研究所・感染症部・部長<br><br><br><br>(84505)             |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|