

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08505

研究課題名（和文）リアルタイム真菌種同定方法の開発とクリニカルメタゲノミクスへの応用

研究課題名（英文）Development of a real-time fungal species identification method and clinical fungal metagenomics

研究代表者

元岡 大祐（Motooka, Daisuke）

大阪大学・微生物病研究所・講師

研究者番号：10636830

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：メタゲノム解析法により原因不明疾患の患者の臨床検体から網羅的かつ迅速な病原体の検出・同定を行うクリニカルメタゲノミクスの精度、感度を向上させ、感染症の原因を解明することを目的とする。中でも菌類、特に真菌類の検出および正確な種同定は難しいとされているため、本研究ではゲノム情報を用いた正確な真菌種・株同定法を構築した。さらに、臨床検体への応用性について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新興・再興感染症は、いつどこで発生するか予想することは難しく、発生した場合に早期に診断、治療を行う体制を構築するかが重要である。その対策として、網羅的に病原体を探索できるメタゲノム解析法（クリニカルメタゲノミクス）は病原体に関する前情報が不要であり有用である。本研究では、真菌のrRNA全長を用いた種同定法を構築し、従来のITS1やITS2領域を使用した解析より正確かつ迅速な同定ができるようになった。

研究成果の概要（英文）：This research focuses on elucidating the causes of idiopathic diseases by employing metagenomic analysis for the comprehensive and rapid detection and identification of pathogens in clinical specimens. A particular emphasis is placed on the challenging task of fungal detection and precise species identification. To address this, we developed a novel methodology for fungal species and strain identification. Specifically, we established a species identification technique utilizing the full-length ribosomal RNA (rRNA) of fungi, which demonstrated superior accuracy and efficiency compared to the traditional ITS1 region-based analysis. Furthermore, the applicability of this advanced method to clinical specimens was evaluated using the DNA from T. asahi positive specimens.

研究分野：ゲノム解析

キーワード：メタゲノミクス

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、感染症が疑われる臨床検体からの網羅的病原体探索法として、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析がクリニカルメタゲノミクスと呼ばれ用いられてつつある。しかし、臨床検体中に含まれる核酸のうち病原体由来のものは、多くの場合 0.1%に満たず、シーケンスをしても十分な感度での検出ができないことも多い。ウイルスは部分配列が得られるだけで当該ウイルスの存在が示唆される一方で、細菌や真菌については部分配列だけでは、病原性微生物であるのかがわからず、病原菌株に特異的な領域がシーケンスできたり、毒素遺伝子など病原性にかかわる遺伝子がシーケンスできない限り、病原体の同定には至らず、シーケンスデプスを上げるしかなかった。また、メタゲノム解析における病原体同定は、ゲノムデータベースに依存した解析手法であるため、ゲノムデータベースに情報が少ない真菌の正確な同定が難しい。真菌感染症は、皮膚のみならず、免疫低下時の呼吸器感染症などで重篤な疾患を引き起こすため、臨床検体からの直接的な真菌の同定法の開発、真菌種・株の正確な同定法が必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

真菌感染の検査は、菌体数は  $\beta$ -D-グルカンの定量によって推定され、その真菌種の同定は、単離培養後の形態観察や、あらゆる真菌が共通してもつ配列(rRNA)の一部である ITS 領域などのシーケンスによって行われている。しかし、これらの手法により同一種であると認識されている真菌の中に病原性が異なる真菌が存在することも知られており、より正確かつ簡便に真菌を同定できる方法が必要である。

## 3. 研究の方法

真菌のリアルタイム菌種同定方法の開発、低コスト化、解析の高速化に向けて、図1に示した方法により、あらゆる真菌が共通してもつ配列をターゲットに CRISPR/Cas9 システムを用いて真菌ゲノムの一部を切り出し、リアルタイムに長鎖のシーケンスが可能である Nanopore シーケンサーと組み合わせることで、種同定に利用できる配列のみをシーケンスする方法の確立を試みた。

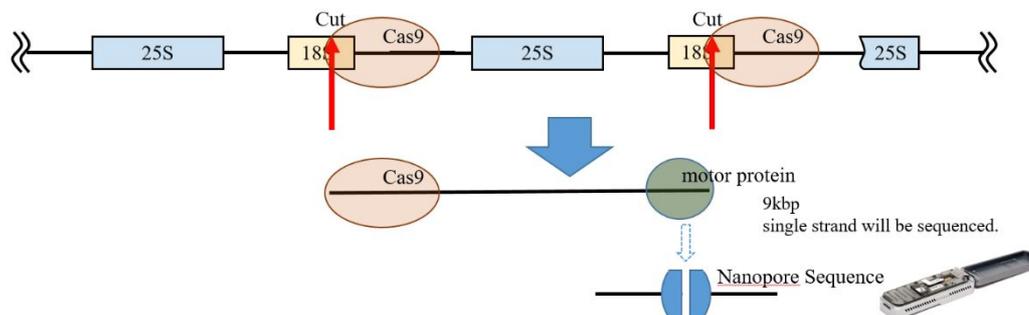


図1. 真菌 rRNA 全長シーケンスのイメージ

### 真菌共通配列と種同定に適した配列の選定

あらゆる真菌に対して同じプロトコルで実施するため、全真菌に共通した配列を探索する。その際、切り出してきた配列内に種に特徴的な配列を持つ必要があるため、18S と 25S の間の領域を含むようにデザインした。

### 様々な真菌での検討

標的とした配列があらゆる真菌に対応できるかを確認するために、様々なヒトと関係のある真菌を集め、ゲノムシーケンスを行い、本手法に使えるデータベースを構築するとともに本手法を用いて全長 rRNA シーケンスを行った。

### 臨床検体からの直接的な真菌種同定

本手法では真核生物が対象にシーケンスされる予定であり、臨床検体中に含まれるヒト由来核酸もシーケンスされる可能性がある。その他にも純培養状態とは異なることが想定されるため、効率的に真菌の配列のみを解読する方法を構築する必要がある。まずは感染症疑いの臨床検体から真菌感染症の検体を ITS1 メタゲノム解析により探索し、解析に適した検体を選定した。その後、全長 rRNA シーケンスを行い、検出および種同定ができるかを検証した。

#### 4. 研究成果

まず、CRISPR/Cas9 システムが認識する配列として、全真菌に共通した配列の探索を行った。その際、切り出してきた配列内に種に特徴的な配列を持つ必要があるため、18S と 25S の間の領域を含むようし、rRNA 全長が切り出されるようにデザインした。塩基配列の保存度から 18S rRNA 領域に 2 つ、25S rRNA 領域に 3 つの共通配列 (gRNA) を選定した。S. cerevisiae を用いて、各 gRNA の特異度を評価した。具体的には、培養株より取得したゲノム DNA に対して、デザインしておいた共通配列を用いた CRISPR/Cas9 システムを実施した後、Nanopore シーケンサーを用いた方法により rRNA 領域選択的な長鎖シーケンスを実施した。最も効率よく切断できたもので、図 2 のように約 9 kbp の全長を解読することに成功した。

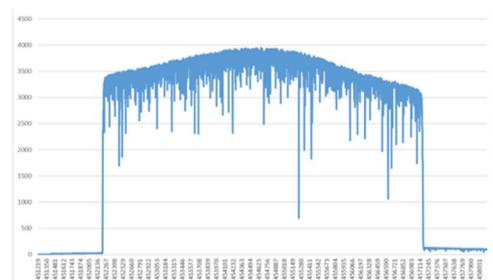


図 2. S.cerevisiae の rRNA である 9kb だけがカバレッジが得られている

次に他の真菌へのこれら手法の適用性を調べるために、Rhodotorula mucilaginosa、Rhizopus microsporus、Acremonium alternatum、Penicillium citrinum、Lichtheimia corymbifera、Candida glabrata などの様々な種をバイオリソースより取り寄せ、同様に rRNA 特異的シーケンスを行った。いずれも rRNA 全長の配列を得ることに成功し、S. cerevisiae 以外の真菌においても有効であることを確認した。また取得したそれぞれの真菌の rRNA 全長配列を比較すると、現在真菌の分類に一般的に用いられている rRNA 領域の一部である ITS 領域の配列のみならず、18S 領域や 25S 領域に含まれる一部の配列や、それ以外の領域においても違いがみられ、種特異的な配列認識ができることを確認した。

次いで、臨床検体からの直接同定に取り組むために、真菌感染が疑われる臨床検体を元にメタゲノム解析を行い、適切な検体の選別を行った。その結果、白血病治療中の患者の肝膿瘍に対して、真菌 ITS1 メタゲノム解析を行うことで、トリコスポロンアサヒを検出した。そこで本症例の DNA を用いて、Nanopore シーケンサーによる真菌 rRNA の全長シーケンスに取り組んだが、図 3 に示すように全リードの 99%以上がヒト由来のリードとなり、真菌の解析に足りうる十分なリードが得られず、臨床検体からの直接的な同定にはより一層の効率化が必要であることがわかった。

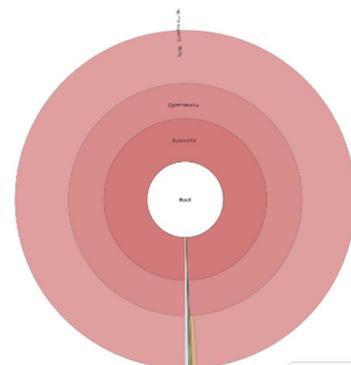


図 3. リードを生物種ごとにアノテーションした結果。99%がヒト(赤色)にアサイン

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi Eizo, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Miyoshi Shin-ichi, Chowdhury Goutam, Mukhopadhyay Asish K., Dutta Shanta, Morita Daichi, Iida Tetsuya, Okamoto Keinosuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Metagenomic analysis of diarrheal stools in Kolkata, India, indicates the possibility of subclinical infection of <i>Vibrio cholerae</i> O1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-24167-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Maeda Yuichi, Motooka Daisuke, Kawasaki Takahiro, Oki Hiroya, Noda Yoshimi, Adachi Yuichi, Niitsu Takayuki, Okamoto Shota, Tanaka Kentaro, Fukushima Kiyoharu, Amiya Saori, Hara Reina, Oguro-Igashira Eri, Matsuki Takanori, Hirata Haruhiko, Takeda Yoshito, Kida Hiroshi, Kumanogoh Atsushi, Nakamura Shota, Takeda Kiyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Longitudinal alterations of the gut mycobiota and microbiota on COVID-19 severity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-022-07358-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Umeda Kaoru, Ono Hisaya K., Wada Takayuki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Nakamura Hiromi, Hu Dong-Liang	4. 巻 357
2. 論文標題 High production of egc2-related staphylococcal enterotoxins caused a food poisoning outbreak	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 109366 ~ 109366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109366	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kameoka Shoichiro, Motooka Daisuke, Watanabe Satoshi, Kubo Ryuichi, Jung Nicolas, Midorikawa Yuki, Shinozaki Natsuko O., Sawai Yu, Takeda Aya K., Nakamura Shota	4. 巻 22
2. 論文標題 Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1-V2 and V3-V4 primer sets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-021-07746-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okii Hiroya, Niwa Ryotaro, Pranee Somboonthum, Motooka Daisuke, Onda Yoshiyuki, Nakata Jun, Nakajima Hiroko, Oka Yoshihiro, Sugiyama Haruo, Yoshii Yuka, Anzai Naoyuki, Nakamura Shota, Iida Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of causative fungus from sterile abscess using metagenomics followed by in situ hybridization	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Access Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/acmi.0.000779.v2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 元岡大祐、前田悠一、沖大也、田中健太郎、猪頭英里、平田陽彦、木田博、熊ノ郷淳、中村昇太、竹田潔
2. 発表標題 Longitudinal alterations of the gut microbiota and mycobiota on COVID-19 severity
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 元岡 大祐
2. 発表標題 腸内細菌叢・真菌叢の変化と健康について
3. 学会等名 第4回C01学術交流会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------