

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310144

研究課題名(和文) polymicrobial diseaseのメタゲノム解析とその臨床応用

研究課題名(英文) Metagenome analysis of polymicrobial diseases and its application to clinical fields

研究代表者

林 哲也 (HAYASHI, Tetsuya)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：10173014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,700,000円、(間接経費) 4,710,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ趾乳頭腫症は難培養菌を含む複数の細菌による感染症であり、新しい疾患概念である polymicrobial diseaseの1つである。本研究では、メタゲノム解析用のDNA抽出法やアッセンブラーの開発とこれらを用いた本症病変のメタゲノム解析により参照メタゲノム配列の取得に成功し、主要起因菌群のゲノムが再構成できる見通しとなった。唯一培養可能な *Treponema phagedenis* については、本症由来株とヒト由来標準株の完全配列、5株の本症由来株の高精度概要配列を取得し、IS・MITEの爆発的な増加、ファージ獲得、IS・MITEによるゲノム再編成等を介した本菌の進化・多様化過程を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Papillomatous digital dermatitis (PDD) is caused by multiple bacteria including non-cultivable species, and is one of the polymicrobial diseases, a new category of infectious diseases. In this project, we developed a protocol for DNA extraction and a genome sequence assembler, both suitable for metagenome analysis of PDD. By using them, we obtained high quality reference metagenome sequences that can be used to reconstitute the genomes of major causative agents of PDD. As for *Treponema phagedenis*, a uniquely cultivable PDD-related species, we determined the complete genome sequences of one PDD-derived strain and one human-derived standard strain and, in addition, the high quality draft sequences of 5 PDD-derived strains. By comparing these genomes, we revealed unique mechanisms of evolution and diversification of this microbe via explosive amplification of IS and MITE elements, multiple phage infections, and extensive genome rearrangements mediated by these mobile genetic elements.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ゲノム解析 polymicrobial disease メタゲノム解析 ウシ趾乳頭腫症 比較ゲノム 難培養細菌 次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

急速な微生物ゲノム解析の進展により、主要な病原微生物の全ゲノム情報が明らかとなり、各病原菌の研究が一気に進展した。さらに、本研究課題の開始当時、新世代シーケンサの登場により、メタゲノム解析による微生物集団のゲノム情報の取得も容易となり、集団としての微生物の機能や役割、その集団組成の変化に伴う機能の変化に関する研究も本格的に始まりつつあるという状況にあった。同時に、微生物集団中に存在する難培養微生物に関する研究の重要性にも大きな関心が集まりつつあった。

感染症研究においても、複数の病原菌が同時に感染しておきる疾患（複合感染症）という概念から一歩進んで、微生物集団そのものが原因となって惹起される疾患の存在についての議論が始まり、このような疾患に対して **polymicrobial disease** という名称が使われるようになった、しかし、その実体が明確となったものはなかった。

ウシの趾乳頭腫症 **Papillomatous Digital Dermatitis** (以下、PDD) は、歯周病や細菌性膿症などとともに、代表的な **polymicrobial disease** の1つとみなされ、難培養性細菌を含む複数の細菌による感染症であると当時から考えられていた。本症は、1974年以降、世界各国で多発しており、国内でも北海道から始まり、全国に発生が拡大していた。本症では、急性期には赤変した扁平な潰瘍を形成し、慢性期にはヒゲイボと呼ばれる腫瘤が形成されるが、病変部に激しい疼痛を伴うために罹患牛では過度のストレスによる体重減少や泌乳量低下などを引き起こす。また、一度発生した牛舎においては発生が繰り返され、根絶が困難であることから、畜産業関連では経済的損失の大きい感染症の1つとして問題視されている。

本課題の研究代表である林と分担研究者である三澤は、本研究課題開始の数年前より

本症の起因菌群の同定等を目指した共同研究を行っており、16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析により、複数のトレポネーマ属細菌とバクテロイデスに関連した未知菌種が、本症罹患部位に常に存在することを明らかにしつつあった。起因菌の分離培養に関しても、PDD 病変に常に存在する最優勢菌種の1つである *Treponema phagedenis* の分離・培養法を確立し、日本各地の農場で発生した PDD より本菌を安定的に分離することに成功していた。さらに、三澤が中心となって *T. phagedenis* の抗原性解析などを進めるとともに、林が中心となって PDD 由来株 (YG3903R 株) 全ゲノム解析を進めていた。しかし、本菌のゲノム中には繰り返し配列が大量に存在するために多大な労力と時間を要し、全塩基配列の決定に成功したものの、複雑な繰り返し配列の分析や遺伝子の同定とアノテーションはまだ未完成であった。

以上のように、PDD の原因菌種（候補）の中で *T. phagedenis* に関する解析はある程度進展していたが、*T. phagedenis* 以外の菌種の分離培養にまったく目処が立っていなかった。このような状況において、本症に対する唯一有効なアプローチは、メタゲノム解析であると考えられた。特に、主要な菌種の1つ (*T. phagedenis*) の配列が決定できていること、本菌以外の優勢菌種が4～5菌種程度と推定されること、ウシのゲノム配列が公表されたこと、などの条件が整っており、メタゲノム解析によって、PDD 起因菌群のゲノム情報を取得できると考えられた。

## 2. 研究の目的

前項に記載したような背景を基に、本研究では、メタゲノム解析を中心としたアプローチにより、PDD の原因菌群の同定とその生物学的性状を明らかにし、**polymicrobial disease** としての PDD の本質を解明することを目指した。さらに、個別菌のゲノム解析及びメタ

ゲノム解析から得られるゲノム情報を基に、難培養菌の分離・培養法の確立と早期診断やサーベイランスのための迅速検出系の開発、起因菌群の常在部位と感染経路の解明などを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 日本各地の農場からの PDD サンプルの収集と 16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析（口蹄疫発生後の集団発生を受けて、宮崎県内での集中的なサンプル収集を追加：次項参照）。

(2) 次世代シーケンサを用いた典型的 PDD 病変のメタゲノム解析、主要病原菌種の高精度配列の取得（メタゲノム配列からのゲノム再構成）、その配列情報からの PDD 起因菌群の細菌学的性状の解明（メタゲノム解析用 DNA 抽出法の開発とメタゲノム解析用アッセンブルプログラムの開発を追加：次項参照）。

(3) 由来の異なる PDD サンプルのメタゲノム解析による PDD の多様性解析（病変に存在する菌種バリエーションの解析）。

(4) 培養可能菌 (*T. phagedenis*) の個別ゲノム解析による菌株間ゲノム多様性解析とその遺伝子改変系の作成。

(5) マウス・ウサギ等を用いた動物実験モデルの作成。

### 4. 研究成果

(1) PDD サンプルの収集：当初の予定では、日本各地の農場からの 6 サンプル程度をメタゲノム解析用に収集する予定であった。しかし、研究途中で、宮崎県で口蹄疫（2010 年に発生）が終結後に、県外から仔ウシを導入した地域において PDD が集団発生していることが判明した。そのため、その侵入・感染経路の解明等を優先課題とすることとし、宮崎県内から 40 検体を収集した。これらのサンプルの中から、病変のサイズ・肉眼所見等を基に典型的な PDD サンプルを選定し、さら

に、16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析の結果を基に、メタゲノム解析用サンプルを 2 検体選定した（2 番目は後から追加；次項参照）。

(2) メタゲノム解析：サンプル 1（鹿児島県の農場由来）を用いて、細菌 DNA がエンリッチされた DNA 標品調整法の開発を行った。本法を用いて DNA を調整し、ポピュレーション解析を再度実施して問題のないことを確認した上で、次世代シーケンサを用いたメタゲノム解析を開始した。具体的には、イルミナ MiSeq を用いて、12 ラン分のペアエンド (PE) シーケンシングと 5 ラン分のメイトペア (MP：1 kb および 2 kb の MP) シーケンシングを実施し、さらにロシユ 454 を用いて 5 ラン分の MP (4 kb および 8 kb の MP) シーケンシングを実施した。その結果、90 Gb 以上の配列データを取得した。シーケンシングと平行して、東京工業大学の伊藤グループと共同で、メタゲノム解析用アッセンブルプログラムの開発を行った。上記のメタゲノムリードから、ウシゲノムにマップされるリードを除去した後に、アッセンブルを行い、49000 の scaffold (>1 kb; 最長で 1724 kb) を得た。得られた scaffold のクラスタリングにより、類似の重複度と GC 含量を有する scaffold 群を同定した（メジャークラスターとしては約 15）。それぞれのクラスターは、各種トレポネーマ (*T. phagedenis* を含む)、バクテロイデス関連菌種、ポルフィロモナス属などが含まれ、16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析の結果とほぼ一致した。

以上の解析を進める中で、宮崎県内での PDD 集団発生が判明し、その侵入・感染経路の解明等を優先課題としたこと、アッセンブルプログラムの改良が進んで、イルミナデータの方がより効率的にアッセンブリできるようになったこと、サンプル 1 の細菌 DNA 含有率が低く（20%弱）、MP シーケンシング用のライブラリー調整が難しかったこと

などが判明してきた。そのため、宮崎県内での PDD 集団発生由来サンプルの 1 つ (サンプル 2) を新たな解析対象として、2 回目のメタゲノム解析を開始した。サンプル 2 からは、細菌 DNA の割合が約 70% という高品質の DNA 標品が調整でき、2 種類の PE および 4 種類の MP ライブラリーを作成し、イルミナ MiSeq を用いてシーケンシングを実施することができた。最終的に、約 100 Gb の配列データを取得し、ウシ由来リード等を除去した後、改良版プログラムを用いてアッセンブルを行い、約 22 万の scaffold (>0.5 kb; 最長で 2166 kb : 全長が 499 Mb) を得た。サンプル 1 と同様に、scaffold のクラスタリングにより、類似の重複度と GC 含量を有する scaffold 群を同定し、現在、メジャークラスターについて、フィニッシングを開始したところである。この作業が進めば、主要菌種 (上位 10 菌種が目標) のゲノムをメタゲノム配列から再構成できると期待される。また、今回開発したメタゲノム解析用アッセンブルプログラムは、様々なメタゲノム解析に広く利用できる。

(3) PDD のバリエーション解析 : 由来の異なる PDD サンプルのメタゲノム解析を行い、PDD のバリエーション (病変に存在する菌種のバリエーション) の解析を行う予定であったが、前項に記載したように、主たる解析サンプルを、サンプル 1 からサンプル 2 に変更したため、サンプル 2 を参照配列として、サンプル 1 (データ取得済み) の比較解析を実施できる状況になった。実際の比較解析は、サンプル 2 の解析が完了した段階で実施することになるが、共通に存在する菌種等の情報が得られると期待できる。なお、第 3 のサンプルとして、サンプル 2 とは別の宮崎 PDD 集団発生由来サンプルの解析を検討している。

(4) 培養可能菌 (*T. phagedenis*) のゲノム解析 : 完全配列を決定済みであった YG3903R

株のゲノム配列の詳細な解析を進めるとともに、ヒト由来の本菌種標準株 (ATCC35405 株) の完全配列を決定した。さらに、分離地域・年の異なる PDD 由来株 (5 株) の概要配列を取得し、一部の菌株に関しては部分的なフィニッシング作業を行った。YG3903R 株と ATCC35405 株のゲノム比較、及び他のトレボネーマ属細菌とのゲノム比較を行い、以下の知見を得た。

- ① ゲノムサイズは 3.0~3.5 Mb で、ある程度のバリエーションがある。
- ② PDD 由来菌株は標準株とは明らかに異なる系統に属する。
- ③ IS や MITE と呼ばれる転移性遺伝因子が爆発的に増加しており (特に MITE で 600 コピー以上)、激しいゲノム再編成を引き起こしている。MITE が、このように爆発的に増加している例は他になく、MITE 配列自体も極めてユニークな形で多様化していることが明らかになった。
- ④ 4 種類のファージが PDD 系統にも標準株にも共通に存在する。その保有 (あるいはファージ上の遺伝子) が本菌の存続になんらかのメリットをもたらしている可能性が示唆される。
- ⑤ ファージ上には MITE が存在しないことなどから、IS・MITE の獲得と MITE の爆発的なコピー数増加が、本菌の進化過程の一時期にのみ起きたことなどが示唆され、本菌の進化・多様化・ゲノム再編の過程が明らかになった (論文作成中)。

なお、プラスミドが存在しないことが判明したなどから、遺伝子改変系の作成には着手できなかったが、同定した 4 種類のプロファージは遺伝子改変系のツールとして利用できる可能性が高い。

(5) 動物実験モデルの作成 : PDD サンプルの乳剤や培養した *T. phagedenis* を用いて、マウス・ラット・モルモット・ウサギ等を用いた感染実験を試みたが、現在の所、感染が成

立していない。接種部位や接種条件等に関して、まだ検討の余地はあるが、ウシを使った感染実験を実施せざるを得ない可能性が高い。

(6) その他、メタゲノム配列から再構成したゲノム情報を基盤として、①代謝パスウェイの *in silico* 解析に基づいた未培養起因菌の分離・培養系の確立、②原因菌種群の迅速検出系の確立、③ウシでの常在部位、農場等での分布、感染経路の解析などを計画していたが、メタゲノム配列からのゲノム再構成があまりにも大きな学問的挑戦であったため、実施には至らなかった。これらの課題に関しては、ゲノム再構成が完成した段階で、改めて挑戦したいと考えている。

#### 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)

[雑誌論文] (計5件)

- ① K. Kamei, M. Asakura, S. Somroop, A. Hinenoya, A. Nagita, N. Misawa, M. Matsuda, S. Nakagawa, S. Yamasaki: A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.*, 査読有 2014, DOI: 10.1099/jmm.0.071498-0.
- ② E. Kakizaki, Y. Ogura, S. Kozawa, S. Nishida, T. Uchiyama, T. Hayashi, N. Yukawa: Detection of diverse aquatic microbes in blood and organs of drowning victims: First metagenomic approach using high-throughput 454-pyrosequencing. *Forensic Sci. Int.*, 査読有 220: 135-146, 2012.
- ③ N. Saito, A. Hida, Y. Koide, T. Ooka, Y. Ichikawa, J. Shimizu, A. Mukasa, H. Nakatomi, S. Hatakeyama, T. Hayashi, S. Tsuji: Culture-negative brain abscess with *Streptococcus intermedius* infection with diagnosis established by direct nucleotide

sequence analysis of the 16S ribosomal RNA gene. *Intern. Med.*, 査読有 51(2): 211-216, 2012.

- ④ K.B. Islam, S. Fukiya, M. Hagio, N. Fujii, S. Ishizuka, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, A. Yokota: Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, 査読有 141(5): 1773-1781, 2011.
- ⑤ M. Naito, K. Sato, M. Shoji, H. Yukitake, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Nakayama: Characterisation of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. *Microbiology*, 査読有 157: 2022-2032, 2011.

[学会発表] (計12件)

- ① 後藤恭宏, 林哲也 (ワークショップ) : 難培養菌群による polymicrobial disease へのゲノムからのアプローチ. 第87回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2014, 東京.
- ② 山崎渉, 谷口喬子, 後藤恭宏, 林哲也, 三澤尚明 : 牛趾皮膚炎病変部の治療前後における細菌叢の比較解析. 第87回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2014, 東京.
- ③ 後藤恭宏, 山崎和子, 小椋義俊, 大岡唯祐, 桂啓介, 矢野貴久, 大島健志朗, 服部正平, 三澤尚明, 林哲也 : ウシとヒト由来 *Treponema phagedenis* のゲノム比較. 第8回日本ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2014, 東京.
- ④ 林哲也 (シンポジウム) : 細菌のゲノム解析とその臨床応用 ~次世代シーケンサの時代を迎えて~. 第61回日本化学療法学会西日本支部総会, 11/6-8, 2013, 大阪市.
- ⑤ 千葉香菜子, 眞鍋弘行, 山本匠, 花田直子, 三澤尚明, 佐藤繁, 岡田啓司 : 趾皮膚炎罹患牛の歩様と病態の関係. 第156回日本獣医学会学術集会, 9/21-23, 2013, 岐阜市.
- ⑥ 後藤恭宏, 山崎和子, 小椋義俊, 大岡唯祐,

- 桂啓介, 矢野貴久, 大島健志朗, 服部正平, 三澤尚明, 林哲也: Polymicrobial disease であるウシ趾乳頭腫症から分離された *Treponema phagedenis* のゲノムおよびヒト由来株とのゲノム比較解析. 第 66 回日本細菌学会九州支部総会, 9/6-7, 2013, 長崎市.
- ⑦ 後藤恭宏, 山崎和子, 小椋義俊, 大岡唯祐, 矢野貴久, 大島健志朗, 服部正平, 三澤尚明, 林哲也: ウシ趾乳頭腫症由来株 *Treponema phagedenis* とヒト由来株の比較ゲノム解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉市.
- ⑧ 後藤恭宏, 山崎和子, 小椋義俊, 大岡唯祐, 矢野貴久, 大島健志朗, 服部正平, 三澤尚明, 林哲也: ウシ趾乳頭腫症病変部から分離された *Treponema phagedenis* のゲノム解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/8-10, 2013, 滋賀県長浜市.
- ⑨ 林哲也 (特別講演): ゲノム解析技術の急速な進化がもたらすゲノム研究の新たな展開. 日本科学哲学学会第 45 回 (2012 年) 大会, 11/10-11, 2012, 宮崎市.
- ⑩ 後藤恭宏, 山崎和子, 小椋義俊, 大岡唯祐, 矢野貴久, 大島健志朗, 服部正平, 三澤尚明, 林哲也: ウシ趾乳頭腫症由来 *Treponema phagedenis* のゲノム特性と比較ゲノム解析. 第 85 回日本細菌学会総会. 3/27-29, 2012, 長崎.
- ⑪ 福田圭祐, 後藤恭宏, 林哲也, 谷口喬子, 山崎渉, 吉谷一紀, 三澤尚明: 家兎における牛の趾乳頭腫症病変モデル作出の試み. 第152回日本獣医学科学術集会. 9/19-21, 2011, 堺市.
- ⑫ Y. Gotoh, K. Yamazaki, Y. Ogura, T. Ooka, T. Yano, K. Oshima, M. Hattori, N. Misawa, T. Hayashi: Genome sequence analysis of *Treponema phagedenis* isolated from bovine papillomatous digital dermatitis (PDD). IUMS 2011 (第 84 回日本細菌学会総会), 9/6-10, 2011, Sapporo.

[図書] (計 3 件)

- ① 小椋義俊, 林哲也: 第4章 新規ゲノム配列決定編 細菌ゲノム. 細胞工学別冊 次世代シーケンサー 目的別アドバンストメソッド, 監修 菅野純夫/鈴木穰, pp120-129, 2012年9月, 秀潤社, 全252頁.
- ② 小椋義俊, 林哲也: 6.1 病原菌と常在菌の境界 (第 6 章腸内共生系の破綻と疾病). pp207-219, 腸内共生系のバイオサイエンス, 財団法人日本ビフィズス菌センター編, 2011年5月, 丸善出版, 東京, 全292頁.
- ③ 三澤尚明: 動物の感染症第三版, 明石博臣, 他編, pp131, 2011年5月, 近代出版, 全299頁.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 哲也 (HAYASHI Tetsuya)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授  
研究者番号: 10173014

### (2) 研究分担者

三澤 尚明 (MISAWA Naoaki)  
宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・教授  
研究者番号: 20229678

### (3) 連携研究者

大岡 唯祐 (OOKA Tadasuke)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号: 50363594

### (4) 研究協力者

後藤 恭宏 (GOTOH Yasuhiro)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号: 20558358

伊藤 武彦 (ITOH Takehiko)  
東京工業大学・生命理工学研究科・教授  
研究者番号: 90501106

谷口 喬子 (TANIGUCHI Takako)  
宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・特任助教  
研究者番号: 50500097

山崎 渉 (YAMAZAKI Wataru)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号: 70393262