

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590164

研究課題名(和文)非結核性抗酸菌の比較ゲノム学的解析とその臨床応用

研究課題名(英文)Comparative genome analysis of nontuberculous mycobacteria and its clinical application

研究代表者

打矢 恵一 (UCHIYA, Kei-ichi)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70168714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、肺Mycobacterium avium症患者由来株であるM. avium TH135株のゲノムの全塩基配列を決定した。さらに、この菌株において新規プラスミド(pMAH135)の存在を明らかにした。pMAH135のサイズは194,711 bpであり、一部病原性や薬剤耐性に関わる遺伝子群がコードされていた。分離株を用いてpMAH135の存在を調べた結果、HIV陽性患者由来株に比べて肺M. avium症患者由来株に多く存在した。しかし、ブタ由来株にはほとんど存在しなかった。以上の結果から、pMAH135は肺M. avium症の発症に加えて、宿主特異性に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To explore the bacterial factors that affect the pathological state of disease caused by Mycobacterium avium, we determined the complete genome sequence of strain TH135 isolated from a patient with pulmonary M. avium disease, and further demonstrated the presence of a novel plasmid, pMAH135. This plasmid consists of 194,711 nucleotides and has 164 coding sequences, some of which encode proteins involved in the pathogenicity of mycobacteria and their resistance to antimicrobial agents. The screening of M. avium isolates from humans and pigs for genes located on pMAH135 revealed that these genes are more commonly detected in isolates from patients with pulmonary M. avium disease than in HIV-positive patients. However, the genes were almost entirely absent in isolates from pigs, suggesting that pMAH135 influences not only the pathological manifestations of M. avium disease, but also the host specificity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Mycobacterium avium 肺M. avium症 ゲノム解析 新規プラスミド 感染様式

1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria: NTM) による感染症において、我が国では *Mycobacterium avium* complex (MAC) による感染症が NTM 症の大半を占めている。MAC 症は、*M. avium* と *M. intracellulare* による2つの近縁の NTM による感染症の総称である。我が国での MAC 症の罹患率は、1970 年代には人口 10 万人あたり 0.82 であったが、最近の疫学調査では 6.0~8.0 と大幅に増加しており、米国 (2.0) やヨーロッパ諸国 (0.2~1.0) に比べて顕著に高い。

MAC 症の感染様式は、経腸感染と経気道感染の大きく2つに分けられる。経腸感染は、細菌が腸管の上皮細胞より侵入してリンパ組織を經由して全身に広がり、感染者のほとんどは HIV 感染などに伴う免疫不全状態において全身播種性の疾患を引き起こす。これとは対照的に経気道感染は、経気道的に侵入した細菌が肺のマクロファージ中で生存し肺に炎症が起きることにより、肺 MAC 症を引き起こす。このような感染様式の違いが何に起因しているか不明である。さらに、*M. avium* はブタに対しても経腸感染するが、ヒトに感染する菌株との違いについては明らかでない。

MAC 症の治療に関して、現状として完治せしめるような治療薬はない。治療は長期間にわたり、中には治療を行っても進行性に悪化していく症例もある。また免疫不全や基礎疾患をもたなくても転帰不良となる症例が見られることから、宿主側の要因だけではなく病原体側の病原性の違いに起因していると考えられるが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MAC 症の感染様式および病態について不明な点を解明することであり、さらにそれを基盤として難治化傾向にある MAC 症の予防および治療に応用することである。

3. 研究の方法

(1) 肺 MAC 症患者分離株 (経気道感染由来) のゲノム解析: 肺 MAC 症患者分離株 (経気道感染由来) と HIV 陽性患者分離株 (経腸感染由来) は、ゲノムの特徴に基づいた VNTR (variable numbers of tandem repeats) 型別解析法により識別することができたので、MAC 症の感染様式の違いは細菌の遺伝学的な相違に起因している可能性が強く示唆された。そこで、これまで報告が無かった肺 MAC 症患者由来の *M. avium* TH135 株 (経気道感染由来) の全ゲノム解析を行い、すでに米国でゲノム解読されている HIV 陽性患者由来の *M. avium* 104 株 (経腸感染由来株) と以下のように *in silico* 解析用ソフトを用いて詳細に比較・検討することにより、感染様式の違いに起因している要因を明らかにする。*M. avium* TH135 株のゲノム解析は、次世代シーケンサーである Genome Analyzer (イルミ

ナ社) および Genome sequencer FLX system (ロシュ社) により解析を行った。また未解読な部分は、プライマーを設計してキャピラリーシーケンサーにより塩基配列を決定し完全な解読を行った。ORF 領域の予測は、アノテーションソフト Glimmer 3.02 を用いて ORF の検索を行う。ゲノムの比較は、遺伝子解析ソフトである *in silico* molecular cloning ver 4.1 や MUMmer 3.22 を用いてゲノム解読株である *M. avium* 104 株に対してマッピングを行うとともに、各菌株に特異的な配列を調べた。さらにゲノム比較ソフト Genome Matcher を用いて詳細にゲノムの比較を行った。

(2) 新規プラスミドの解析: *M. avium* TH135 株 (経気道感染由来) のゲノム解析により、染色体遺伝子とは異なる環状遺伝子の存在が示されデータベース検索の結果、これまでに報告がない新規プラスミドの可能性が示された。一般にプラスミド上には、病原性遺伝子をはじめ薬剤耐性に関与している遺伝子群の存在が考えられることから、(1) に述べた *in silico* 解析の方法に準じて解析を行い新規プラスミドの特徴、ORF 等の検索、さらに病原性遺伝子など特徴ある遺伝子の同定を行った。さらに、プラスミドの存在をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) と特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法により調べた。培養した菌体を低融点アガロースゲルに包埋した後、リゾチームとプロテイナーゼ K 処理を行うことにより菌体から DNA を溶出した。その後、S1 ヌクレアーゼ処理することにより、スーパーコイル状のプラスミドを直線状にして PFGE 解析を行った。さらに、プラスミドのバンドが見られた菌株については、プラスミド上の特定遺伝子を用いた特異的プローブを作製し、DIG システム (ロシュ) によるサザンハイブリダイゼーション法を行うことにより確認した。

4. 研究成果

(1) 肺 MAC 症患者由来 *M. avium* TH135 株 (経気道感染由来) のゲノム解析とゲノム解読株 (経腸感染由来) との比較・検討: これまで報告が無かった肺 MAC 症患者由来株 (経気道感染由来) である *M. avium* TH135 株のゲノム解析を行った結果、全塩基配列を決定することができた。ゲノムサイズは 4,951,217 bp であり、ゲノム解析株である *M. avium* 104 株 (経腸感染由来株) に比べて 524,274 bp 短かった。GC% は 69.32% であり、coding sequences は 4636、tRNA 遺伝子は 46、rRNA operon は 1 存在していた。両ゲノムの比較を行った結果、共通遺伝子は 3855、TH135 株に特異的な遺伝子は 888、104 株に特異的な遺伝子は 1265 であった。また、両ゲノムには特異的な領域が多く存在し、それらの領域の GC% は染色体全体のそれに比べて低かった。さらに、これらの領域の両端にはファージ由来のインテグラーゼあるいはトランス

ポゾン由来のトランスポザゼなどのリコンビナーゼが存在していた。このような結果から、これらの領域は進化の過程で horizontal transfer によって染色体に組み込まれたと考えられた。このような両ゲノムに特異的な領域には、病原性に関与している多くの遺伝子の存在が見られた。そして、*M. avium* TH135 株のゲノムに特異的な遺伝子の保有状況について臨床分離株を用いて調べた結果、HIV 陽性患者由来株に比べて、肺 MAC 症患者由来株に多く存在していた。一方、*M. avium* 104 株特異的領域に存在している遺伝子の保有状況を調べた結果、HIV 陽性患者由来株に多く存在していた。このように経気道感染と経腸感染を引き起こす要因となる遺伝子の検索を行うことができた。以上の結果から、経気道感染と経腸感染を引き起こす *M. avium* は遺伝学的に異なっていることが示され、この違いが感染様式に反映されている可能性が強く示唆された。

(2) 新規プラスミド (pMAH135) の全塩基配列の決定およびその確認: pMAH135 のサイズは 194,711 bp であり、coding sequences は 164, tRNA 遺伝子は 1, Insertion sequence は 6 存在していた。GC% は 66.5% であり、ゲノム DNA の GC% (69.3%) に比べて低く、これは pMAH135 が進化の過程で外部から取り込まれたことを意味している。さらに、pMAH135 はこれまで報告された *M. avium* 由来のプラスミドとは、その相同性において全くことなる新規のプラスミドであった。pMAH135 の存在を PFGE と特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法により調べた結果、環状のプラスミドであることが確認された。pMAH135 にコードされている遺伝子の特徴を調べた結果、鉄の取り込みを行う mycobactin の合成に関わる因子、病原因子の分泌に関わる Type VII 分泌装置、さらに薬剤の排出ポンプをコードしている遺伝子の存在が明らかとなった。前者 2 つは MAC 菌の病原性に関与、そして後者は抗菌薬を含む薬剤の耐性に関与することから、pMAH135 の重要性が示唆された。

(3) pMAH135 の特徴: *M. avium* の分離株を用いて、pMAH135 の存在を以下のように調べた。pMAH135 上にコードされている遺伝子の存在について特異的プライマーを用いた PCR 法によりスクリーニングを行った後、陽性株について pMAH135 の存在を PFGE と特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法により調べた。その結果、HIV 陽性患者由来株に比べて、肺 MAC 症患者由来株に多く存在した。しかし、ブタ由来株にはほとんど存在しなかった。また、*M. avium* 分離株の VNTR 解析を行った結果、pMAH135 を保有している菌株は特定のクラスターを形成した。以上の結果から、pMAH135 は肺 MAC 症の発症に加えて、宿主特異性に関与していることが示唆された。さらに、pMAH135 を保有する菌株は、特定の VNTR genotype を示したことは興

味深い結果である。

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)

[雑誌論文](計 12 件)

Kei-ichi Uchiya, Hiroyasu Takahashi, Taku Nakagawa, Tetsuya Yagi, Makoto Moriyama, Takayuki Inagaki, Kazuya Ichikawa, Toshiaki Nikai, Kenji Ogawa: Characterization of a novel plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. PLoS One, 査読有, 10, 2015, e0117797, DOI:10.1371/journal.pone.0117797. eCollection 2015.

Shu Taga, Tetsuya Yagi, Kei-ichi Uchiya, Yuichi Shibata, Hiromitsu Hamaura, Yaku Nakagawa, Yuta Hayashi, Toshiaki Nikai, and Kenji Ogawa: Recurrence of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease due to endogenous reactivation. JMM Case Reports, 査読有, 1, 2014, 1-4. Yumiko Komori, Eri Murakami, Kei-ichi Uchiya, Tunemasa Nonogaki and Toshiaki Nikai: Okinalysin, a novel P-I metalloproteinase from *Ovophis okinavensis*: biological properties and effect on vascular endothelial cells. Toxins, 査読有, 6, 2014, 2594-2604, DOI:10.3390/toxins6092594.

稲垣孝行, 中川 拓, 前田伸司, 村瀬良朗, 市川和哉, 森山 誠, 打矢恵一, 八木哲也, 二改俊章, 小川賢二: 初回肺結核治療中において短期間に多剤耐性化した結核菌の遺伝子解析-臨床分離株を用いて-. 結核, 査読有, 88, 2013, 595-604, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23986941>

Mayuko Sakuma, Katsumi Imada, Yoshiyuki Okumura, Kei-ichi Uchiya, Nobuo Yamashita, Kenji Ogawa, Atsushi Hijikata, Tsuyoshi Shirai, Michio Honma, Toshiaki Nikai: X-ray structure analysis and characterization of AFUEI, an elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*. J. Biol. Chem., 査読有, 288, 2013, 17451-17459, DOI:10.1074/jbc.M112.433987. Epub 2013 May 2.

Kei-ichi Uchiya, Hiroyasu Takahashi, Tetsuya yagi, Makoto Moriyama, Takayuki Inagaki, Kazuya Ichikawa, Taku Nakagawa, Toshiaki Nikai, Kenji Ogawa: Comparative genome analysis of *Mycobacterium avium* revealed genetic diversity in strains that cause pulmonary and disseminated disease.

PLoS One, 査読有, 8, 2013, e71831, DOI:10.1371/journal.pone.0071831. eCollection 2013.
Yoshiyuki Okumura, Makoto Suzukawa, Kei-ichi Uchiya, Kenji Ogawa, Yumiko Komori, Nobuo Yamashita, Toshiaki Nikai: Characterization and identification of partial amino acid sequence of a novel elastase inhibitor, asnidin from *Aspergillus nidulans*. Med. Mycol. J., 査読有, 2013, 279-284, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995417>
森山 誠, 中村博厚, 打矢恵一, 二改俊章: 臨床使用消毒薬からの細菌の検出と同定. 名城大学総合研究所総合学術研究論文集, 査読有, 12, 2013, 111-118, <http://www.meijo-u.ac.jp/research/institute/ri/result/publication/#content12>
Kei-ichi Uchiya and Toshiaki Nikai: *Salmonella*: strategies for survival. Toxin Rev., 査読有, 31, 2012, 1-10, DOI:10.3109/15569543.2012.697971
新美政樹, 打矢恵一, 八木哲也, 高橋弘泰, 黒河和宏, 市川和哉, 稲垣孝行, 森山 誠, 二改俊章, 林 悠太, 中川 拓, 小川賢二: 日本人肺 MAC 症患者由来株と韓国人肺 MAC 症患者由来株の遺伝学的特徴の違い. 結核, 査読有, 87, 2012, 461-467, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22834098>
黒河和宏, 打矢恵一, 八木哲也, 高橋弘泰, 新美政樹, 市川和哉, 稲垣孝行, 森山 誠, 二改俊章, 林 悠太, 中川 拓, 小川賢二: *Mycobacterium avium* の新規 Variable number tandem repeat 領域の有用性の検討. 結核, 査読有, 87, 2012, 461-467, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993890>
中川 拓, 高橋弘泰, 市川和哉, 稲垣孝行, 打矢恵一, 二改俊章, 八木哲也, 小川賢二: 日本における肺 *M. avium* 症の臨床像と菌遺伝子に関する多施設共同研究. 結核, 査読有, 87, 2013, 687-695, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23367826>

[学会発表](計 20 件)

打矢恵一: シンポジウム 非結核性抗酸菌感染症基礎研究の最新の知見と今後の方向性 - 肺 MAC 症患者由来のゲノム解析と病原因子の検討 -, 第 90 回日本結核病学会総会、平成 27 年 3 月 27 日、長崎岡本 陽、藪谷充孝、打矢恵一、二改俊章: セレウス菌の嘔吐毒セレウリドの毒力はカチオン比に影響を受ける、第 88 回日本細菌学会総会、平成 27 年 3 月 28 日、

岐阜

小森由美子、櫻井梨絵、鎌倉里恵、多湖美登里、石川泰成、打矢恵一、二改俊章: コンタクトレンズの適正使用に関する調査、日本薬学会第 135 年会、平成 27 年 3 月 26 日、神戸
打矢恵一、小川賢二、二改俊章: 肺 MAC 症患者由来、*Mycobacterium avium* が保有する新規プラスミド、第 51 回日本細菌学会中部支部総会、平成 26 年 10 月 18 日、金沢
櫻井梨絵、鎌倉里恵、多湖美登里、小森由美子、打矢恵一、石川泰成、二改俊章: コンタクトレンズの適正使用に関する調査、第 60 回日本薬学会東海支部総会・大会、平成 26 年 7 月 5 日、鈴鹿
多賀 収、打矢恵一、酒井紫乃、橘 史緒、二改俊章、小川賢二: 肺 MAC 症患者由来および自宅浴室由来 MAC 菌分離株の variable-number tandem-repeat (VNTR) 型別解析パターンに関する検討、第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会、平成 26 年 6 月 20 日、福岡
山下伸雄、奥村欣由、打矢恵一、小川賢二、鶴田宏樹、明石貴裕、二改俊章: 麹菌 *Aspergillus oryzae* のエラストラーゼインヒビター様タンパク質の単離、2014 年度 日本農芸化学会大会、平成 26 年 3 月 29 日、東京
Kei-ichi Uchiya and Toshiaki Nikai: Comparative genome analysis of *Mycobacterium avium* strains that cause different MAC disease. 第 87 回日本細菌学会総会、平成 26 年 3 月 28 日、東京濱浦弘光、打矢恵一、森山 誠、稲垣孝行、八木哲也、市川和哉、中川 拓、二改俊章、小川賢二: *Mycobacterium avium* の Variable Number Tandem Repeat 型別解析と薬剤感受性との関係、第 67 回国立病院総合医学会、平成 25 年 11 月 9 日、金沢
柴田祐一、多賀 収、打矢恵一、森山 誠、稲垣孝行、八木哲也、市川和哉、林 悠太、二改俊章、小川賢二: VNTR (Variable Number Tandem Repeat) 型別解析及びプロミクス NTM を用いた *Mycobacterium avium* の喀痰及び環境分離株の性質の検討、第 67 回国立病院総合医学会、平成 25 年 11 月 9 日、金沢
Mayuko Sakuma, Katsumi Imada, Yoshiyuki Okumura, Kei-ichi Uchiya, Atsushi Hijikata, Tsuyoshi Shirai, Toshiaki Nikai, and Michio Homma: Structural similarity of AFUEI, an elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, and the potato I family inhibitors from plants. 第 51 回日本生物物理学会年会、平成 25 年 10 月 30 日、京都

柴田祐一、打矢恵一、森山 誠、小川賢二、二改俊章：肺 MAC 症患者からの *Mycobacterium avium* のゲノム解析、第 50 回日本細菌学会中部支部総会、平成 25 年 10 月 19 日、蒲郡
 Mayuko Sakuma, Katsumi Imada, Yoshiyuki Okumura, Kei-ichi Uchiya, Atsushi Hijikata, Tsuyoshi Shirai, Michio Homma, and Toshiaki Nikai: X-ray structure analysis of AFUEI, an elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*. 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology. 平成 25 年 5 月 28 日、名古屋
 田中映美、福 大哉、打矢恵一、二改俊章、長谷川万里子、林 悠太、垂水 修、中川 拓、山田憲隆、小川賢二：肺 *Mycobacterium avium* complex 症における Variable Number Tandem Repeat 型別解析法の臨床への応用、第 66 回 国立病院総合医学会総会、平成 24 年 11 月 17 日、神戸
 福 大哉、打矢恵一、二改俊章、田中映美、林 悠太、中川 拓、山田憲隆、垂水 修、長谷川万里子、小川賢二、第 66 回 国立病院総合医学会総会、平成 24 年 11 月 17 日、神戸
 濱浦弘光、福 大哉、打矢恵一、田中映美、森山 誠、小川賢二、二改俊章：*Mycobacterium avium* の *mmpL* 遺伝子と薬剤耐性との関係、第 49 回日本細菌学会中部支部総会、平成 24 年 11 月 9 日、金沢
打矢恵一、二改俊章：サルモネラの病原性における細胞内カルシウムイオンの重要性、フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、平成 24 年 10 月 25 日、名古屋
 山田義明、奥村欣由、打矢恵一、小川賢二、佐久間麻由子、今田勝巳、山下伸雄、本間道夫、二改俊章：*Aspergillus flavus* および *A. fumigatus* の産生するエラストーゼインヒビター “asfin” の性質と X 線構造解析、第 6 回アスペルギルス研究会、平成 24 年 9 月 1 日、東京
 村上恵梨、小森由美子、打矢恵一、野々垣常正、二改俊章：ヒメハブ（沖縄）毒由来の新規出血因子の性質と部分一次構造、第 58 回日本薬学会東海支部総会、平成 24 年 7 月 7 日、静岡
 森山 誠、田中映美、打矢恵一、小川賢二、二改俊章：*Mycobacterium avium* の分子疫学解析法の臨床における有用性の検討、第 58 回日本薬学会東海支部総会、平成 24 年 7 月 7 日、静岡

〔図書〕(計 1 件)

打矢恵一 (分担) 南江堂、肺 MAC 症診療 Up to Date - 非結核性抗酸菌症のすべて -、2013、39-40 .

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

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

取得状況 (計 件)

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

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

打矢 恵一 (UCHIYA, Kei-ichi)
 名城大学・薬学部・准教授
 研究者番号：70168714

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：