

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713060

研究課題名(和文)細菌感染および免疫システムオートファジーに関わる遺伝子発現ネットワークの解明

研究課題名(英文)Transcriptome of bacteria during host infection against autophagy

研究代表者

丸山 史人(Maruyama, Fumito)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30423122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：i) A群レンサ球菌はひとつの種ではあるものの、CRISPRにより、ファージの数、種類を制限することで、亜種化が進んでいることが明らかとなった、ii) 本種は、CRISPRを段階的に脱落させ、最終的には利他的なファージによるCRISPRシステムの完全除去が行われることで、自由に多様なファージを取り入れる株が出現していること、iii) 劇症型(coreが小さい)、非劇症型株(coreが大きい)は系統によらず、特異的なSNPが関与する可能性、が示された。

研究成果の概要(英文)：There are three major findings as follows: i) *Streptococcus pyogenes* are diversified into two subspecies using CRISPR by restriction of number and kind of phage invasion into genome, ii) One subspecies may appear by step-wise deletion of CRISPR and final complete deletion of CRISPR/cas system by an altruistic phage, iii) virulent type of this bacteria carries smaller genome size compared to the avirulent type, which is not related to phylogeny but related to specific SNPs that could determine the virulence.

研究分野：環境遺伝生態学

キーワード：トランスクリプトーム ゲノム レンサ球菌 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

ヒトの主要な病原性細菌である A 群レンサ球菌 (Group A Streptococcus; GAS) は、ヒトにおいて多彩な病態を示し、まったく症状を示さない不顕性感染や化膿性炎症から、致死率の極めて高い劇症型 A 群レンサ球菌感染症の起原菌となる。このような多彩な疾患を引き起こし、例年のように流行を引き起こすことから、その疾患発症機構の解明に向けて多くの研究が推進されている。

その一環として、当研究室で決定した劇症型感染症由来の SSI-1 株を含め (Genome Res., 2003,13:1042-55) これまでに 14 株ものゲノム情報が決定されている。さらに、申請者らが臨床分離株 52 株のドラフトゲノムの取得・解析を行った結果 (未公表) GAS ゲノムの最大約 1/5 が細菌のウイルスであるバクテリオファージ (ファージ) 由来であること、また各菌株特異的な遺伝子群の多くがファージ由来であり、ほぼすべてのファージに病原性遺伝子群が存在することが明らかとなった。丸山はこのファージ獲得に関して、ファージなどの外来性遺伝因子に対する獲得免疫機構を担う Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR) 領域との関係性に着目した解析を行ってきた。その結果、種全体としては CRISPR によるファージへの抵抗性を保持しているが、同属の他種よりもその活性は弱く、CRISPR を欠失して数多くのファージを獲得している株 (上記の SSI-1 株など) の存在などが明らかとなった (PLoS One, 2011, 6:e19543., BMC Genomics, 2009, 10:358)。加えて、70 株を用いた多株比較ゲノム解析から、本菌においては CRISPR 欠失により多種多様なファージを獲得している系統がある一方、CRISPR を保持する株では、獲得するファージの「種類」を規定する系統がある可能性が示された (未公表)。いずれの場合においても、A 群レンサ球菌のゲノム進化においてファージの寄与が非常に高いことは明らかである。

一方、A 群レンサ球菌は感染時、ヒト上皮細胞内へ侵入するが、侵入した菌の大部分は細胞内のオートファジーと呼ばれる機構によって分解・除去される。オートファジーに免疫機能があることを当研究室が初めて報告するとともに (Science, 2004,306:1037-40) 細胞による侵入細菌の認識機構の研究を進めることで、その制御に関わる因子群を明らかにしてきた (PLoS Pathog, 2010,5:e1000670., Cell Microbiol, 2012, 14:1149-65)。

その後、細胞内へ侵入した一部の細菌はオートファジーによる分解を逃れていること、逃れた菌はオートファジーによる「異物としての認識」を受けていないというデータを得ている (未公表)。そこで、感染細胞内の GAS について ORF マイクロアレイ、タイリングアレイによる発現解析を行った結果、病原遺

伝子や機能未知遺伝子の他、ファージの組込みや転移に關与する遺伝子群の発現が感染によって亢進しており、これはオートファジーの存在の有無でも大きく異なっていた (未公表)。また、ファージ由来のインテグラーゼ遺伝子を欠損した変異株では、ファージ由来遺伝子だけでなく、ゲノム上の様々な遺伝子の発現が通常の培地のものとは大きく変化していた (未公表)。以上の予備データから、本菌は細胞内へ侵入後、一部はオートファジーにより除去されてしまうものの、残りの一部の菌は細胞内環境に「適応」することにより、細胞内生存を可能としたと考えられる。上記の宿主侵入後にファージ遺伝子群が活性化するという結果に加え、本菌のファージがヒト上皮細胞の存在下で誘導され (Infect. Immun., 2003, 71:7079) 誘導されたファージが形質導入能を持つこと (Infect. Immun., 2003, 71:3782) が報告されていることから、本菌は細胞内でファージの誘導・獲得を介したゲノム多様化を行い、感染時には、動的な遺伝子発現変化により適応しているのではないかと考えた。さらに、GAS の発現変化に対抗する宿主のオートファジー関連遺伝子群の発現制御機構、寄生菌-宿主遺伝子発現ネットワークを明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

前述の構想を踏まえ、本研究では細胞内寄生性細菌である GAS のファージに着目した細胞内での多様化・生存戦略の解明と細胞内の免疫システムオートファジーの遺伝子発現制御ネットワークの解明に焦点を絞り、3 年間で次の研究を計画した。I) GAS 大量ゲノム情報を用いて、特にファージと CRISPR との関係性から本菌の多様化・進化機構を明らかにする。II) 感染後経時的な GAS と宿主の同時トランスクリプトーム解析 (RNA-seq, TSS [Transcription Start Site]-seq) により、遺伝子発現ネットワークをオートファジーとの関わりを明らかにし、菌側の生存および宿主側の感染防御に重要な因子を同定する (感染時特異的な新規 non-coding RNA、antisense RNA、転写開始点なども決定する)。III) ジャーファメンターを用いた細胞内環境再現実験系 (I, II より予測された重要な遺伝子に影響を与える化学因子を用いる) で GAS の細胞内生存戦略機構を発現レベルで実証するとともに、連続培養を継続することによりゲノム多様化を再現することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために以下の 3 項目を実施した。

I) A 群レンサ球菌の大量ゲノム配列を用いて多株ゲノム解析および臨床データとの重相関解析により、多様化モデルの構築と進化実験のためのパラメータ選定。

II) ジャーファーマンターを用いた高精度トランスクリプトーム、転写開始点解析および細菌・宿主同時トランスクリプトームによる遺伝子ネットワークの解明。

III) ジャーファーマンターを用いた細胞内環境再現実験による A 群レンサ球菌の細胞内生存戦略機構の解明 (短期間での遺伝子発現解析および長期間でのゲノム進化実験)。

4. 研究成果

丸山は3年間連続で新学術領域「ゲノム支援」を受けることで、本若手研究(A)で得られる当初の予想を上回る成果が得られた。

本来の計画は次の通りである。GenBank等より、全ての GAS 配列データと種々のメタデータ(生育条件、単離元、臨床データなど)を取得する(ゲノム支援により現在、897株分のデータを保有)。これらを元にデータベースを構築する。特に Mタンパク質は100種類以上あり、病原性にも関与していることから重要性が高い。そこで型の異なる90株程度のA群レンサ球菌株からゲノム配列を取得する。そして、メタデータによる分類に加え、すべての GAS が共通して保有する遺伝子セット(Core-genome)や GAS 全体で一株でも保有する遺伝子セット(Pan-genome)を決定する。本菌で重要なゲノム再編成のパターンや、本菌の病原因子をコードするバクテリオファージ(ファージ)の排除システムである CRISPR についても予測を加えることで本種の多様化機構を明らかにする、というものであった。

ゲノム支援の結果、従来の計画では困難であった以下の知見が得られた。まず、本種の多様化においては、獲得免疫システムである CRISPR とファージが主要な役割を果たし、種内で2つのグループが存在することがわかった。そして、これには CRISPR の欠失が重要であることがわかった。また、それぞれの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り、一方、CRISPR を欠損したグループは多様なファージが出入りし、Pan-genome が大きく、さらに Core-genome サイズが CRISPR 保有型に比べ小さくなっていた。すなわち、「ファージを介したゲノム縮小という新奇ゲノム進化機構」の存在を明らかにすることができた。

しかし、CRISPR 欠損型には劇症型株が多く含まれる原因の解明が重要な課題として残されている。この原因としては3つの可能性が考えられる。すなわち、i) 劇症型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) ファージによってもたらされる病原因子の組み合わせ、iii) ファージがもたらすメチラーゼによるメチル化の病原遺伝子発現への影響である。

現在、追加でゲノム支援を受けることが出来たため、上記 ii), iii) のメチローム、トランスクリプトーム、網羅的 TSS 情報を得る

ことができたため、GAS ゲノム内のファージがもたらす本菌の病原性を規定するエピジェネティックな影響が明らかにする試みを進めている。

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 30件)

1. °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.* In press 2016 (査読有)

2. °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.* In press 2016 (査読有)

3. °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 R18 and S12-1. *Genome Announc.* In press 2016 (査読有)

4. °T. Wada, °F. Maruyama, T. Iwamoto, S. Maeda, T. Yamamoto, I. Nakagawa, S. Yamamoto, *N. Ohara. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Guérin (BCG) tuberculosis vaccine. °Equal contribution * press release あり *Sci. Rep.* 5:17827. 2015 (査読有)

5. °H. Kato, °H. Mori, F. Maruyama, A. Toyoda, K. Ohshima, R. Endo, G. Fuchu, M. Miyakoshi, A. Dozono, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, M. Hattori, A. Fujiyama, K. Kurokawa, and *M. Tsuda. Time Series Metagenomic Analysis Reveals Robustness of Soil Microbiome against Chemical Disturbance. *DNA Res. pii: dsv023.* 2015 (査読有)

6. °*K. Ushida, S. Tsuchida, Y. Ogura, A. Toyoda and F. Maruyama. Domestication and cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of *Suidae*. *Anim. Sci. J.* DOI: 10.1111/asj.12492. 2015

(査読有)

7. °Y. Matsumura, H. Al-saari, K. Kuga, Y. Inohara, S. Mino, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabee, *T. Sawabe. Identification of a gene cluster responsible for hydrogen evolution in *Vibrio tritonius* strain AM2 with transcriptional analyses. *Int. J. Hydrogen Energy* 40: 9137-9146. 2015 (査読有)
8. °*K. Okada, W. Natakuathung, M. Na-Ubol, A. Roobthaisong, F. Maruyama, I. Nakagawa, S. Chantaroj, S. Hamada. *Vibrio cholerae* 01 TSY216 consists of three megabase-sized circular replicons. *Emerg. Infect. Dis.* DOI: 10.3201/eid2107.141055. 2015 (査読有)
9. °K. Minegishi, °T. Watanabe, A. Furukawa, K. Uchida, Y. Suzuki, T. Akashi, *F. Maruyama, I. Nakagawa, *Y. Eishi. Genetic profiles of *Propionibacterium acnes* and identification of a unique transposon with novel insertion sequences in sarcoid and non-sarcoid isolates. *Sci. Rep.* 5: 9832. 2015 (査読有)
10. °*L. Nonaka, F. Maruyama, S. Suzuki, M. Masuda. Novel macrolide resistance genes, *mef* (C) and *mph* (G), carried by plasmids from *Vibrio* and *Photobacterium* isolated from sediment and seawater of a coastal aquaculture site. *editors choice *Let. Appl. Microbiol.* doi: 10.1111/lam.12414. 2015 (査読有)
11. °N. Maruyama, *F. Maruyama, *Y. Takeuchi, C. Aikawa, Y. Izumi, I. Nakagawa. Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Sci. Rep.* 4:6602. 2014 (査読有)
12. °A. Endo, T. Watanabe, N. Ogata, T. Nozawa, C. Aikawa, S. Arakawa, *F. Maruyama, Y. Izumi, I. Nakagawa. Comparative genome analysis and identification of competitive and cooperative interactions in a polymicrobial disease *ISME J.* 9:629-642. 2015. (査読有)
13. °R. Nomoto, F. Maruyama, S. Ishida, M. Tohya, T. Sekizaki, *R. Osawa. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi:10.1099/ijs.0.067116-0. 2014. (査読有)
14. °B. Haobam, °*T. Nozawa, A. Minowa-Nozawa, M. Tanaka, S. Oda, T. Watanabe, C. Aikawa, F. Maruyama, I. Nakagawa. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A *Streptococcus* invasion. *Cell. Microbiol.* doi: 10.1111/cmi.12329. 2014. (査読有)
15. °*T. Segawa, °S. Ishii, N. Ohte, A. Akiyoshi, A. Yamada, F. Maruyama, Z. Li, °Y. Hongoh, and N. Takeuchi. The nitrogen cycle in cryoconites: naturally occurring nitrification-denitrification granules on a glacier. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.12543. 2014. (査読有)
16. °L. Lagos, *M. A. Jorquera, F. Maruyama, D. E. Crowley, F. Cid, M. L. Mora. Bacterial community structures in rhizosphere microsites of ryegrass grown in volcanic soils as revealed by pyrosequencing. *Biol. Fertil. Soils.* doi:10.1007/s00374-014-0939-2. 2014. (査読有)
17. °K. Hori, F. Maruyama, T. Fujisawa, T. Togashi, N. Yamamoto, M. Seo, S. Sato, T. Yamada, H. Mori, N. Tajima, T. Moriyama, M. Ikeuchi, M. Watanabe, H. Wada, K. Kobayashi, M. Saito, T. Masuda, Y. Sasaki-Sekimoto, K. Mashiguchi, K. Awai, M. Shimojima, S. Masuda, M. Iwai, T. Nobusawa, T. Narise, S. Kondo, H. Saito, R. Sato, M. Murakawa, Y. Ihara, Y. Oshima, K. Ohtaka, M. Satoh, K. Sonobe, M. Ishii, R. Ohtani, M. Kanamori, R. Honoki, D. Miyazaki, H. Mochizuki, J. Umetsu, K. Higashi, D. Shibata, Y. Kamiya, N. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, S. Ida, K. Kurokawa, *H. Ohta. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. 手島論文賞* press releaseあり *Nature Commun.* 5:3978. 2014 (査読有)
18. °*K. Okada, M. Na Ubol, W. Natakuathung, A. Roobthaisong, F. Maruyama, I. Nakagawa, S. Chantaroj, S. Hamada. Comparative genomic characterization of a Thailand-Myanmar isolate, MS6, of *Vibrio cholerae* 01 El Tor,

which is phylogenetically related to a "US Gulf Coast" clone.

PLoS One 9:e98120. 2014. (査読有)

19. °*L. Nonaka, F. Maruyama, Y. Onishi, T. Kobayashi, Y. Ogura, T. Hayashi, S. Suzuki, M. Masuda. Various pAQU plasmids possibly contribute to disseminate tetracycline resistance gene tet(M) among marine bacterial community. *Front. Microbiol.* 5:152. 2014. (査読有)

20. °Tajima N, Sato S, Maruyama F, Kurokawa K, Ohta H, Tabata S, Sekine K, Moriyama T, *Sato N. Analysis of the complete plastid genome of the unicellular red alga *Porphyridium purpureum*. *J. Plant Res.* 127:389-397. 2014. (査読有)

21. °N. Ohnishi, F. Maruyama, H. Ogawa, H. Kachi, S. Yamada, D. Fujikura, I. Nakagawa, M. B. Hang 'ombe, Y. Thomas, A. S. Mweene, and *H. Higashi. Genome Sequence of *Bacillus anthracis* outbreak strain in Zambia, 2011. *Genome Announc.* 6: e00116-114, 2014. (査読有)

22. °M. Okura, C. Lachance, M. Osaki, T. Sekizaki, F. Maruyama, T. Nozawa, I. Nakagawa, S. Hamada, C. Rossignol, M. Gottschalk, and *D. Takamatsu. Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol.* 52:1714-1719. 2014. (査読有)

23. °H. Mori, °F. Maruyama, °H. Kato, A. Toyoda, A. Dozono, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, A. Fujiyama, *M. Tsuda, and *K. Kurokawa. Design and Experimental Application of a Novel Non-Degenerate Universal Primer Set that Amplify Prokaryotic 16S rRNA Genes with a Low Possibility to Amplify Eukaryotic rRNA Genes. *DNA Res.* 21:217-227. 2013. (査読有)

24. °*T. Sawabe, Y. Ogura, Y. Matsumura, G. Feng, AKM R. Amin, S. Mino, S. Nakagawa, T. Sawabe, R. Kumar, Y. Fukui, M. Satomi, R. Matsushima, F. L. Thompson, B. G. Gil, R. C., F. Maruyama, K. Kurokawa and T. Hayashi. Updating the *Vibrio* Clades Defined by Multilocus Sequence Phylogeny: Proposal of Eight New Clades, and the Description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front. Microbiol.* 4:414. 2013. (査読有)

25. ° A. Goda, °F. Maruyama, *Y. Michi, I. Nakagawa, and K. Harada. Analysis of the factors affecting the formation of the microbiome associated with chronic osteomyelitis of the jaw. *Clin. Microbiol. Infect.* 20:0309-0317. 2014. (査読有)

26. °*S. Masuda, K. Hori, F. Maruyama, S. Ren, S. Sugimoto, N. Yamamoto, H. Mori, T. Yamada, S. Sato, S. Tabata, H. Ohta, K. Kurokawa. Whole-Genome Sequence of the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* strain W4. *Genome Announc.* 1:e00577-13. 2013. (査読有)

27. °T. Watanabe, T. Nozawa, C. Aikawa, A. Amano, *F. Maruyama, and I. Nakagawa. CRISPR regulation of intra-species diversification by limiting IS transposition and inter-cellular recombination. *Genome Biol. Evol.* 5:1099-1114. 2013. (査読有)

28. *D. Takamatsu and *F. Maruyama. Diversity and Universality of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters in *Streptococcus suis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:2493. 2013. (査読無)

29. °M. Okura, *D. Takamatsu, *F. Maruyama, T. Nozawa, I. Nakagawa, M. Osaki, T. Sekizaki, M. Gottschalk, Y. Kumagai, and S. Hamada. Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters from All Serotypes of *Streptococcus suis*: Potential Mechanisms for the Generation of Capsular Variation. *co-corresponding author. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:2796-2806. 2013. (査読有)

30. °K. Minegishi, °C. Aikawa, A. Furukawa, T. Watanabe, T. Nakano, Y. Ogura, Y. Ohtsubo, K. Kurokawa, T. Hayashi, *F. Maruyama, I. Nakagawa, Y. Eishi. Complete genome sequence of *Propionibacterium acnes* isolate from sarcoidosis patient. ° Equal contribution. *Genome Announc.* 1:e00016-12. 2013. (査読有)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 7件)

1. °渡辺孝康, 村瀬一典, 中川一路,

*丸山史人. 原核生物の獲得免疫に見られる新機構から紐解かれてきたゲノム進化. 化学療法の領域 31: 118-128. 2015 (査読無)

2. °L. Lagos, F. Maruyama, P. Nannipieri, M. Luz Mora, A. Ogram, *M.A. Jorquera. Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini-review. J. Soil Sci. Plant Nutr. 15: 504-523. 2015 (査読有)

3. °相川知宏、丸山史人、*中川一路. 2015. CRISPR/Cas システム：微生物における新規機能とゲノム編集適用例 乳酸菌学会誌 26: 14-21. 2015 (査読有)

4. °庄子幹郎、竹下徹、丸山史人、稲葉裕明、今井健一、*松尾美樹. 2015. 口腔細菌研究の新展開 日本細菌学雑誌 70:333-8. 2015 (査読有)

5. °*F. Maruyama, T. Watanabe, *I. Nakagawa. Streptococcus pyogenes, Basic Biology to Clinical Manifestations”. NIH NCBI Bookshelf, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333426/>. 2015 (査読有)

6. °*安倍裕順、相川知宏、中鉢淳、宮腰昌利、*丸山史人. 2014. 感染特異的遺伝子発現ネットワークからの新展開 日本細菌学雑誌 69:539-46. (査読有)

7. °渡辺孝康、中川一路、*丸山史人. 2013. 原核生物の新規な獲得免疫機構 CRISPR/Cas システム. 化学と生物. 51: 440-443. (査読有)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

無し

取得状況 (計 0 件)

無し

〔その他〕

ホームページ等

ResearchGate:

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

PubMed:

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

GoogleScholar:

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

Loop:

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

FaceBook:

<https://www.facebook.com/Microbial-Genomics-and-Ecology-135689926563239/?ref=bookmarks>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 3 0 4 2 3 1 2 2

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し