

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670776

研究課題名(和文) ヒト第二のゲノムである常在細菌叢の「記憶」と「老化」の制御と再構築

研究課題名(英文) Regulation and reconstruction of acquired memories in human microbiota

## 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの細菌叢が保有するバクテリオファージなどへの獲得免疫機構であるCRISPRの分布や構成が、細菌叢の頑強性を制御しているものと仮定し、このCRISPR領域を調べた。その結果として、CRISPRはバクテリオファージと相反する、共存することはできないと考えられていたが、実際には幅広い細菌種のバクテリオファージにCRISPRが分布していることが明らかとなった。これは、新しい細菌叢の頑強性を明らかとしていくうえで新しい概念を導入することが必要であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Distribution and structure of the CRISPR, acquired immune mechanisms of bacteria, to bacteriophages, in human microbial flora are assumed that controls the robustness of its flora. As a result, CRISPR unexpectedly exist on the bacteriophage, which has been thought to not be able to coexist. It was revealed that CRISPR are distributed actually in broad range of bacterial species. This indicates that it is necessary to introduce a new concept in helping to continue to clear the robustness of the bacterial flora.

研究分野：環境遺伝生態学

キーワード：バクテリオファージ CRISPR 微生物生態学

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトには、体を構成する細胞・遺伝子数をはるかに上回る数の細菌が生息し、健康に大きく影響を与えることから、このゲノムの総体(メタゲノム)は、「ヒトの第二のゲノム」と呼ばれる。これらの細菌は(バクテリア)ファージ、プラスミドなどの可動性因子により頻りに遺伝子を交換することから、遺伝子の移動についても研究が世界的に推進されている。申請者らは以前より、遺伝子の移動を定量する手法を開発し (Appl Environ Microbiol, 2003, 2005, 2006; Microb Environ, 2008)、さらに、この移動を制限する機構、かつ、細菌の獲得免疫として知られる Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) を研究してきた (PLoS One, 2011)。さらに、細菌叢を理解する基盤となる個別細菌ゲノムの解析を行い (BMC Genomics, 2009; J Bacteriol, 2011, 2012a, 2012b, Genome Announcements, in press; DNA Res, 2011)、細菌叢の可視化・解析手法 (BMC bioinfo, 2010; Front Microbiol, 2010) に取り組む一方で、病原細菌とヒトとの相互作用を明らかにすべく、細菌感染時特異的オートファジー機構の解明に取り組んでいる (Cell Microbiol, 2010, 2012; J Biol Chem, 2010)。

これらの経験を元に、経時的な細菌叢のメタゲノム解析に取り組んだところ、群集内の細菌種は外界ストレスに迅速に対応して構成を変化させるが、ファージによる溶菌を通じて群集組成を元の状態に戻す、頑強性を示すことがわかってきた(投稿中)。同時に、CRISPR 内に新たな免疫を即座に獲得することがわかった。このことから、同じストレスに再び晒された場合には、細菌叢が同じファージにより溶菌しなくなるために元の状態に戻るのに時間がかかると考えられる。また、子供を除くヒトの腸内細菌叢の機能遺伝子組成はほぼ変わらないが (Nature, 2009, 457:480)、病原細菌に対する抵抗性は、例えば、老化に応じて大きく異なる。そこで、申請者は、ヒト自体の免疫だけではなく、細菌ゲノムの非遺伝子領域にある CRISPR 組成の違いがこの差に関与するのではないかと考え、本申請に至った。

本研究では、i) 獲得免疫を担う CRISPR の、群集レベルでの多様性が失われた状態を細菌叢の老化と考へて、これを定義する。この老化した細菌叢は外来ストレスに対する抵抗性が弱く、細菌群集構造が容易に破綻することを実証する。さらに、ii) ストレス因子を与える、つまり、群集の攪乱によって、細菌群集構造が変動するものの、同じ種類の攪乱には迅速に細菌叢が適応できるようになるという、群集の記憶としても CRISPR が機能することを示す。そして、期間内に可能があれば、老化していない細菌叢を定義すると共に、この細菌叢を制御し、再構築を行うことで、そのニッチとなる宿主の寿命そのも

の「加齢を防ぐ」構成を編み出し、また、感染症などへの抵抗性を向上させることが可能かを検証する。

本研究で明らかにしようとしている細菌叢の「記憶」そして「老化」は、これまでにない新しい概念を提示しようとする挑戦的な課題である。しかし、これを達成することができた場合には、適切な頑強性・可塑性を有する細菌叢の創成が可能となる。すなわち、細菌群集の頑強性を基準にした、ヒトの細菌叢診断法が開発が可能となり、人工的に混合した細菌叢を用いることで、病態に応じた安全で有効性の高い治療の実現および高齢者、患者の長寿命化、QOL の向上を見込むことができる。このように本研究は、新たな学問分野を創成するだけでなく、学問的・社会的に意義深い。

## 2. 研究の目的

本研究では、i) 獲得免疫を担う CRISPR の、群集レベルでの多様性が失われた状態を細菌叢の老化と考へて、これを定義する。この老化した細菌叢は外来ストレスに対する抵抗性が弱く、細菌群集構造が容易に破綻することを実証する。さらに、ii) ストレス因子を与える、つまり、群集の攪乱によって、細菌群集構造が変動するものの、同じ種類の攪乱には迅速に細菌叢が適応できるようになるという、群集の記憶としても CRISPR が機能することを示す。そして、期間内に可能があれば、老化していない細菌叢を定義すると共に、この細菌叢を制御し、再構築を行うことで、そのニッチとなる宿主の寿命そのものの「加齢を防ぐ」構成を編み出し、また、感染症などへの抵抗性を向上させることが可能かを検証する。

ヒト環境において細菌叢は、ビタミンの産生や病原菌からの防御、宿主の免疫の活性化をするといった重要な機能を果たす。その全体像の解明に向けて、USA、EU、及び中国のグループは、昨年までの3年間で120億円の規模でヒトメタゲノム研究を進めてきた。しかし、本研究で提唱する細菌叢の CRISPR が「記憶」となるということについては、未だ着想されていない。この概念のみならず、CRISPR の細菌群集の頑強性への関与や、頑強性とファージとの関係についても、明らかでない。

ヒト微生物において、環境であるヒトが老化するにもかかわらず、種や遺伝子の種類の解析のみから、細菌叢は成人では変化しないと考えられている。しかし、申請者らは、経時的なメタゲノム解析の予備データから、この記憶領域は激しく変動し、長期にわたる細菌叢の安定化、栄養環境の悪化の結果、記憶の多様性は失われると考へている。すなわち、種組成、遺伝子組成は変化しないにも関わらず、細菌叢のストレスに対する頑強性と可塑性は失われる、つまり細菌叢の「老化」が起きると着想した。そのため、本研究の細菌叢

の記憶と老化を世界に先駆けて宣言、定義し、宿主に対するこれらの影響を調べるといふ取り組みは、完全に新規なものである。

集団(細菌叢)ではなく、一種類のモデル細菌を用いた生化学的な研究は、細菌の記憶か細菌の老化の一方であれば、2-3例の報告がある。しかしながら、単一細菌種のみで行なわれていることから、申請者らのように複数の細菌種にまたがるような「群集の記憶と老化」と結びつけ、発想・実施することは困難であると考えている。すなわち、細菌叢は無数の細菌種が同時に存在し、相互作用していること、そして、生息するヒト環境も変動し続けて、老化していくという時空間的なダイナミクスまでを考慮して初めて定義し、実施が可能となる。そのため、本課題は、斬新なアイデアであるだけでなく、極めてチャレンジングであるといえる。

本研究で提案する細菌叢の「記憶」そして「老化」の定義が達成された場合、種々の応用が考えられる。細菌叢からの単離株を混合することで、組換え体を含まない細菌混合薬の開発が期待できる。これは、例えば、感染症の予防や慢性的な感染症において、抗生物質に依存しない治療へ応用可能だと考えられる。プロバイオティクスにおける乳酸菌の接種は有名であるものの、一般的に、どのような環境においても外来種は一過性にしか働かず、定着させて効果を発揮し続けることは難しい。この原因は明らかではないが、申請者らはファージの関与を疑っており、その一端が本研究で明らかになると考えている。また、例えば、ヒト青年期に健康時の自己細菌叢を保存し、必要な細菌群集混合体を老年期に接種するという手段により、より自分に定着しやすい自己細菌叢を用いるという新規治療法開発も考えられる。このように、大きく社会に貢献する可能性を秘めているだけでなく、主に個別の細菌種や分子に着目して行なわれてきた病原細菌学、プロ(プレ)バイオティクスや、現在の細菌叢組成の記述、メタゲノム解析を通じた遺伝子のカタログ化研究が多いヒト環境微生物学にブレークスルーをもたらすことができる。すなわち、これまで、分断されていた「個」と「集団」の研究分野をつなぐ架け橋となると考えられる。これにより、「ヒトゲノム」研究と「第2のヒトゲノム」研究が有機的に融合し、構成的な理解が可能となり、微生物が常在している状態を包括的に捉えるという意味で、新しいヒト生物学がはじまるものと期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために以下の3項目を実施することとした。

i) (メタ)ゲノムデータベースの網羅的なファージ、CRISPR、メタデータの重相関解析により、実験標的となりうるパラメータを選定する。

ii) 実験動物を用いた細菌叢の宿主の寿命に対する影響と連続同一ストレスに対する細菌叢とCRISPRの動態解析によって、「記憶」としての機能を証明する。

iii) 細菌叢およびCRISPRの多様性指数(種類の豊富さと均一性を考慮したもの)を組み合わせて、数理モデル化することで、細菌叢の「老化」を定義、制御方法を考案する。

期間内に可能であれば iv) 細菌叢由来の細菌を組み合わせることにより、老化した細菌叢の若返りが可能か、つまり細菌感染に対する抵抗性の回復が可能か(再構築)を検討する。

以下に、各詳細な方法を示す。

1. GenBankのftpサイトより、全(ドラフト)ゲノム解析が行なわれている細菌、古細菌、プラスミド、ファージの配列データ、さらにShort Read Archiveを中心とした、ヒトに関わるメタゲノムデータ(ファージのメタゲノムを含む)の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。

2. 上記1.で取得したメタデータごとに情報を分類し(分類基準を設定する)データベースを構築する。従来の分類では、ファージやCRISPRを考慮していないので、データにバイアスのあるファージメタゲノムなどでは、実験手法についても分類する。また、配列取得方法により、非遺伝子領域のCRISPR予測に影響があると考えられるため、これも分類する。

3. 配列データについて、(ファージ)メタゲノムについては、MetaVelvetなどのメタゲノム専用のアセンブラーにより、コンティグを作成する。そして、ファージ以外のゲノムやコンティグ配列については、ファージ領域を予測する。さらに、これらからCRISPR領域の予測を行う。CRISPRについては、取り込まれている外来因子の種類や量を明らかにする。

4. 予備的知見から、既に複数の細菌種のプロファージ領域にCRISPRが存在することを発見している。そこで、このCRISPRが機能するのか、すなわち、本研究で考慮する必要があるのかを明らかにする(既に菌株は購入し、実験を進めている)。

5. 8週齢の無菌マウス購入し、飼育を開始する。8週から10週齢のマウスから糞便を採取し、保存する。約1年後、飼育を継続していたマウスに対し、保存していた若齢マウス由来の糞便を経口で接種する。マウスは、東京大学内の動物実験センター内で、飼育を続ける。その後、寿命まで、経時的にマウスが排泄する糞便を採取・保管する。

6. 上記2.と3.のデータ、すなわち、ゲノム、メタゲノムデータ内の細菌、ファージ、CRISPRの量や多様性、メタデータ(宿主の年齢やBMIなども含む)を利用して重相関解析を行う(これらの変数を用いて多項式

を作成し、各係数を算出する)。これにより、実験的な実証に利用可能なパラメータを選定する (CRISPR の量や多様性に、影響するメタデータ)。

7. 上記 4. および下記 8. の結果を受けて、細菌叢の CRISPR が「記憶」として働くかどうかを確かめる。つまり、連続同一ストレスにより、細菌叢の量・種構成が元の状態への回復がストレスを与えるほどより遅れることと、CRISPR 内にストレス下で増加した種を減少させるファージの配列の取込みを Illumina GAIIx により配列を取得し (3 ヶ月に一度サンプリングする、3 種類 x7 の 21 サンプルを 1 回の run で行う)、メタゲノム解析 (アセンブル、遺伝子予測、ファージ予測、CRISPR 予測、細菌叢解析) して、明らかとする。

8. 約 1 年後のマウス老年期から、2 つのグループに分けて、そのまま飼育するグループと、保管しておいたそれまでの糞便 (同じ個体由来、または違う個体由来についてもグループを分ける予定) を接種するグループに分ける。また、連続同一ストレス実験では、静菌性と殺菌性の抗生物質を使用する。細菌叢の解析だけではなく、マウスの寿命、血液成分なども解析する。

9. 上記 6. および 7. の結果を利用して、数理モデルを構築する。6. で選定したパラメータを変数として、マウスのコントロール群と、i) 保管していた糞を食べさせたグループ、ii) 連続して同一のストレス (抗生物質) を与えたグループの細菌叢、ファージ、CRISPR の種類、量、および、これらのマウスの寿命や血液成分の値を説明可能な数式を編み出す。これにより、どのような条件下の細菌叢 (特に CRISPR に着目) であれば、宿主であるマウスの寿命などを延長可能なかを明らかとする。つまり、細菌叢を数値によって表現することで、細菌叢の「老化」、「年齢」を定義する。

10. 人工細菌混合体により老化した細菌叢の若返りが可能か、つまり例えば細菌感染に対する抵抗性の回復が可能か (再構築) に検討を加える。

本研究目的を達成するために、次の 3 つのグループ (細菌叢、バイオインフォマティクス、動物実験) が連携して行った。これらに対する知識だけではなく、遂行するための技術と設備が要求される。そこで、細菌叢解析の知識および設備 (Roche GS Junior, Illumina GAIIx) を有する研究代表者および同大学の中川一路 教授と、(メタ)ゲノム解析を含む微生物学分野における情報解析の実績と充実したコンピューター環境 (大型メモリ計算サーバー、クラスタマシンなど) を備えている東京工業大学の黒川顕 教授、病原細菌の感染機構を解析するために常時実験動物を飼育し、細菌感染実験に業績、技術を有する東京大学の三室仁美 准教授とで実施する。シーケンスおよび初期情報解析を

東京医科歯科大で、数理モデルの構築や大規模情報解析を東京工業大学で、マウスなどを用いた動物実験を東京大学医学研究所にて行うこととした。申請者は、これらの研究者と複数の共同研究を既に実施していることから、本計画についても円滑な遂行が可能だと考えられた。

#### 4. 研究成果

地球上のあらゆる環境に微生物は適応し、地底深くから、成層圏にまで様々な微生物が生息している。それぞれの環境に応じた微生物群集が形成されており、群集はストレスにたいして頑強性を有しており、環境の変化に迅速に適応し、栄養の変化などであれば、その栄養を消費した後は、元の環境に戻すだけではなく、増加した一部の種も減少し、もとの群集構造へと回復する。この現象が環境ごとにどのように起こるのかは不明であったが、本研究の一部として実施したタイムコースメタゲノム解析により、あまり細菌種の物理的な移動がないと考えられる土壌であっても、優占種を殺すことで群集構造を維持する機構が、バクテリオファージによってもたらされることが判明した。また、細菌群集構造に加えて、群集が保有する機能遺伝子組成は、さらに頑強であること、その一方で、獲得免疫機構である CRISPR は全くもとの組成とは異なるものに変換することが判明した。すなわち、集団の持つ機能ポテンシャルや、種組成は頑強であるものの、集団組成維持に関与する CRISPR は急速に変化し、頑強性はものと状況とは変化することが明らかとなった。

現在、次世代シーケンサーの登場により、急速に遺伝子データベースの蓄積が進んでいる。そして、earth microbiome project というあらゆる自然環境のメタゲノム解析プロジェクトや、培養を介さない、シングルセルゲノム解析により、あらゆる環境のあらゆる細菌種のゲノムデータを取得することができる。これを利用し、ゲノムとメタゲノムに含まれるバクテリオファージ、プラスミド、CRISPR の種類や組成の多様性、分布について解析を実施した。これまで、菌交代症で有名な Clostridium と腸内細菌メタゲノム解析の virome 解析からのみ、CRISPR を保有するプロファージが知られていたが、本研究からは、普遍的に自己の免疫システムである CRISPR を保有するバクテリオファージの存在が明らかとなった。すなわち、メタゲノムデータからは、海洋のファージなどにも CRISPR を保有するものがあること、またゲノムデータからは系統的に極めて広範な細菌種に CRISPR が存在していることが明らかとなった。そして、プロファージではなく、実際にファージ粒子形成が可能なファージゲノム内にも、CRISPR が存在することが判明した。つまり、広範な環境、細菌種で CRISPR を有するファージが存在していた。この CRISPR

に含まれる記憶領域を調べてみたところ、自己のゲノムに一致するものはなく、近縁種に感染可能な別株のファージを標的としていることが明らかとなった。すなわち、これらのファージは複製などの過程で偶然に CRISPR を取り込んだのかもしれないが、CRISPR はシスではなく、トランスでも機能することから、実際に機能し、他のバクテリオファージによる宿主の溶菌を防御しているものと考えられた。すなわち、宿主にとっては、一つのバクテリオファージを受け入れることで他の複数のバクテリオファージからの感染を防ぐという意味で諸刃の剣ともいえる、新たな細菌群集構造維持機構を明らかにできたものと考えられる。

研究の開始時点では、CRISPR とファージは相反するシステムであり、共存できないものと考えていたが、研究の過程で初めて、CRISPR とファージが普遍的に共存することを明らかとすることができた。これは微生物群集の頑強性を定義する上で、欠かせない新しい要因を明らかにしたものであり、これを考慮した数理モデルの構築が望まれる。また、このようなバクテリオファージの存在は、現在、成功しているとは言いがたいファージ療法への応用が考えられる。すなわち、ファージ療法では、バクテリオファージがプロファージ化して、宿主を殺せないことがある、また、例えば毒素遺伝子だけをもつ細菌種を標的とすることができないが、本研究で発見した CRISPR をもつファージを利用することで、これらの障害を回避できるものと考えられる。すなわち、CRISPR の記憶領域に毒素遺伝子特異的な配列をいれこむことにより、特異的な遺伝子配列を標的とする、また、CRISPR を恒常的に発現させることにより、宿主の生理状態に関わらず、標的細菌を不活化することが可能となるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

下記 URL を参照

<http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp/accomplishment.html>

## 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：30423122

### (2) 研究分担者

中川 一路 (NAKAGAWA Ichiro) 京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70294113

黒川 顕 (KUROKAWA Ken) 東京工業大学・地球生命研究所・准教授

研究者番号：20343246

三室 仁美 (MIMURO Hitomi) 東京大学・医科学研究所・准教授