

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：84505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08793

研究課題名(和文)鳥型結核菌の系統地理学的構造から推察される肺MAC症感染様式の地域差

研究課題名(英文)Phylogeographical divergence of *Mycobacterium avium* results in host tropism and niche specific adaptation

研究代表者

岩本 朋忠 (Iwamoto, Tomotada)

神戸市環境保健研究所・感染症部・部長

研究者番号：70416402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：増加し続けている肺非結核性抗酸菌症の原因菌の一つ *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) のゲノムを集団規模で比較解析し、MAHには少なくとも5つの遺伝系統群が存在し、その分布には地域性が認められること、結核菌とは対照的に異種から遺伝子を積極的に獲得していること、さらに、MAHは進化の過程で異系統間での染色体の組み換えを頻繁に行っていることを明らかにした。また、東アジアに分布する2系統(東アジア系統1、東アジア系統2)に特異的な遺伝子領域として、トレハロースの合成に関わる複数の遺伝子を特定した。

研究成果の概要(英文)： *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* is an emerging human pathogen in developed countries. Despite increasing worldwide incidence, little is known about the genetic mechanisms behind the population evolution of MAH. To elucidate the local adaptation mechanisms of MAH, we assessed genetic population structure, the mutual homologous recombination, and gene content for 36 global MAH isolates, including 12 Japanese isolates sequenced in the present study. We identified five major MAH lineages and found that extensive mutual homologous recombination occurs among them as "sexual bacteria". Two lineages (MahEastAsia1 and MahEastAsia2) were predominant in the Japanese isolates. We identified alleles unique to these two East Asian lineages in the loci responsible for trehalose biosynthesis (*treS* and *mak*) and in one mammalian cell entry operon, which presumably originated from as yet undiscovered mycobacterial lineages. Recombination would be a major driving force to local adaptation.

研究分野：Molecular epidemiology, population genetics

キーワード：非結核性抗酸菌 *M. avium* complex (MAC) population genomics 比較ゲノム ゲノム進化

1. 研究開始当初の背景

MAC 症は、*Mycobacterium avium* complex (MAC : 臨床的には *M. avium* と *M. intracellulare* の 2 菌種の総称) の感染により引き起こされる難治性の慢性肺疾患である。1990 年頃より患者数が増加しており、今や、罹患率・有病率ともに結核を上回る、我が国最大級の細菌性呼吸器感染症である。主な起因菌は *M. avium* であり、MAC 症の約 7 割は、本菌への感染による。結核菌と同様、遅発育性の抗酸菌であるが、ヒトからヒトへの感染はなく、主な感染経路は環境中の本菌への暴露によると推測されているが、それを支持する決定的な証拠はない。

申請者は、MAC 症の発生要因の解明を最終目的として、分離由来の異なる *M. avium*、なかでもヒトを中心的な宿主とする *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) の進化的変遷の解明に取り組んでいる。これまでに、家畜 (ブタ)・住環境 (浴室環境)・ヒト臨床分離株を用いた反復配列数多型解析をおこない、我が国では、MAC 症患者から分離した株と浴室から分離した株の相同性は高く、欧州諸国から報告されてきた、人獣共通感染症としての感染様式とは異なる可能性を報告した (引用文献 1, 2)。

このような感染様式の違いや系統地理学的分布の根源を探るためには、MAH の全ゲノムレベルでの解析が不可欠となる。しかしながら、本研究開始時点でのゲノムデータは不足しており、日本に分布する MAH の進化的位置付けや遺伝的特徴は不明であった。

2. 研究の目的

肺 MAC 症の原因菌である MAH の系統地理学的分布を解明し、MAC 症感染様式の世界規模での違いの原因を究明する。さらに、MAH のゲノムを集団規模で比較解析し、日本に分布する MAH 系統のゲノムの特徴と進化の仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 日本で分離された MAH のゲノムの決定。

わが国で単離されたヒト臨床分離株 9 株、浴室環境分離株 1 株、ブタリンパ節分離株 2 株の合計 12 株の全ゲノム配列を PacBio RSII と Illumina HiSeq/MiSeq を用いて解析した。

(2) 集団ゲノミクス解析

わが国で単離された MAH12 株のゲノム情報とデータベース内の他国単離株 24 株の情報を合わせて、合計 36 株のゲノム情報を用いて、次の通り、一連の集団ゲノミクス解析を行った。まず、pan-genome 解析を行い、MAH の遺伝子レパートリーを結核菌と比較した。次に、36 株のコアゲノム上の多型サイトを抽出しコアゲノム系統樹を作成した。また、fastGEAR (引用文献 3) を用いて、過去の組み換えによって親株から一度に継承された染色体断片の網羅的検出を行い、そのデータをも

とに株ごとが進化的にどの程度はなれているか数値化し、階層的クラスタリングによって得られた各クラスターを MAH の系統と定義した。

(3) 東アジア系統に特異的な遺伝子の探索

MAH36 株、それぞれの株が保有する遺伝子と比較し、各遺伝系統群で有意に頻出する遺伝子を探索した。

4. 研究成果

本研究により、MAH のゲノム情報が増加したことで、世界中に分布する MAH が複数の遺伝系統群に分類されることが明らかになった。また、MAH のゲノム進化のパターンが結核菌とどのように異なっているのかについて検証できた。さらに、日本に分布する MAH 系統のゲノムの特徴を見出すことに成功した。各研究成果について、下記にまとめた。

(1) MAH は結核菌に比べて遺伝的に多様な種である。

種が持つ遺伝子レパートリーの数と、MAH は結核菌に比べて多様なレパートリーを有することが分

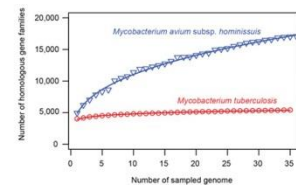


図1. 種が持つ遺伝子ファミリーの数の推定

かった。また、MAH は種外から積極的に新しい遺伝子を取り込んでいる種であることが推定された。

(2) MAH は地域性を示す 5 つの遺伝系統群に分類される。

コアゲノム SNPs の類似性をもとに系統ネットワークを作成すると、5 つのクラスターに分類された。各クラスターは地域性を示しており、たとえば、日本のヒト

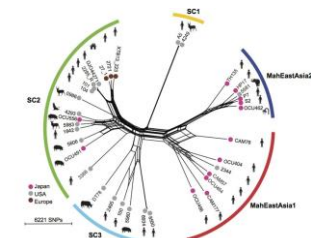


図2. 分離由来の異なる種々のMAHのコアゲノム系統樹

臨床分離株は東アジア系統 1 あるいは東アジア系統 2 に分類された。一方、日本のブタ由来株や欧米での分離株は SC1, SC2, SC3 の系統に分類された。また、各遺伝系統にはヒト以外からの分離株が含まれており、MAH のヒト-環境循環説が支持された。さらに、複雑なネットワーク構造が見られることから、ゲノムの組み換えを頻繁に行う種であることが推定された。そこで、fastGEAR を用いて、連鎖が起きている染色体領域 (組み換えによって親から一度に継承された連続した領域) の網羅的検出を行ったところ、MAH が比較的大きい染色体断片 (平均 4.2kb) を組み替えによって交換する細菌種であることが明らかになった。

(3) 病原性を示唆する東アジア系統に特異的な遺伝子が検出された。

日本には東アジア系統以外の系統も分布しているにもかかわらず、患者からは東アジア株が優占することから、東アジア型の2系統が日本人への感染、あるいは、日本の環境への適応に必要な遺伝子を保有しているものと推察した。そこで、東アジア2系統だけに高頻度に出現する遺伝子を統計学的にスクリーニングした。その結果、トレハロース合成に関わる複数の遺伝子の配列が、東アジア系統と他の系統では大きく異なっていることが判明した。宿主細胞内での生存や病原性・毒性の発現に関与するアシル化 trehalose 脂質化合物の構造に影響すると推察され、東アジア系統の毒性への関与が示唆される知見である。

以上の研究成果から、我々は、MAHは異種から新しい遺伝子を獲得し、それを組み換えにより種内に拡散することで地域適応を進めている「性を持つ細菌」と認識するべきであると結論付けた。

<引用文献>

- ① Tomotada Iwamoto, et al. 2012. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect. Genet. Evol.* 12:846-852
- ② Tomotada Iwamoto, et al. 2014. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Infect. Genet. Evol.* 21:479-483
- ③ Mostowy R, et al. 2017. Efficient Inference of recent and ancestral recombination within bacterial populations. *Mol Biol Evol.* 34(5):1167-1182.

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2件)

- ① Yukiko Nishiuchi, Tomotada Iwamoto, Fumito Maruyama, Infection sources of a common non-tuberculous mycobacterial pathogen, *Mycobacterium avium* complex, *Front. Med.* 4:27, 2017
- ② Hirokazu Yano, Tomotada Iwamoto, Yukiko Nishiuchi, Chie Nakajima, Daria A.

Starkova, Igor Mokrousov, Olga Narvskaya, Shiomi Yoshida, Kentaro Arikawa, Noriko Nakanishi, Ken Osaki, Ichiro Nakagawa, Manabu Ato, Yasuhiko Suzuki, Fumito Maruyama. Population Structure and Local Adaptation of MAC Lung Disease Agent *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, *Genome Biol. Evol.*, 9:2403-2417, 2017

[学会発表] (計7件)

- ① Tomotada Iwamoto, Hirokazu Yano, Fumito Maruyama. Phylogenetic diversification of *Mycobacterium avium* result in host tropism and niche specific, SMBE Satellite Workshop on Genome Evolution in Pathogen Transmission and Disease adaptation, Feb. 22 - 25, 2016, Shiga Kogen, Japan.
- ② 岩本朋忠、矢野大和、丸山史人. *Mycobacterium avium*のゲノム多様性, 第10回 日本ゲノム微生物学会年会, 2016年3月4-6日, 東京
- ③ 岩本朋忠、矢野大和、西内由紀子、有川健太郎、中島千絵、鈴木定彦、丸山史人. *Mycobacterium avium*の系統分岐に伴う大規模なゲノム構造の変化, 第89回 日本細菌学会総会, 2016年3月23-25日, 大阪
- ④ Tomotada Iwamoto, Dynamic denomic changes of *Mycobacterium avium* provide an evidence of geographical divergence, The 89th annual meeting of Japanese Society for Bacteriology (国際シンポジウム), March 23-25, 2016, Osaka, Japan.
- ⑤ 岩本朋忠, NTMはどこにいるのか? 日常生活の中でのかかわりと菌の進化, 第32回日本環境感染症学会総会, 2017年2月24日-25日, 神戸市
- ⑥ 矢野大和, 丸山史人, 西内由紀子, 中川一路, 中島千絵, 鈴木定彦, 岩本朋忠. 種内相互組み換えによって促進される鳥型結核菌の地域適応, 第11回日本ゲノム

微生物学会，2017年3月2-4日，藤沢市

- ⑦ Tomotada Iwamoto, Population structure and local adaptation of human lung disease agent *Mycobacterium avium*, The 14th Japan-Korea International Symposium on Microbiology 2018, March 27-29, 2018, Fukuoka, Japan.

〔図書〕（計 件）

〔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

岩本 朋忠 (IWAMOTO, Tomotada)
神戸市環境保健研究所・感染症部長
研究者番号：70416402

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30423122

(4) 研究協力者

()