

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16144

研究課題名(和文)階層ベイズモデルによるメタゲノムデータからの腸内ファージの感染細菌予測法の開発

研究課題名(英文)Development of prediction methods for intestinal phage-bacteria associations from metagenomic data by hierarchical Bayesian model

研究代表者

木村 恭将(Kimura, Yasumasa)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：30632913

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):腸内には常在ウイルスが存在し、その大部分は未知のファージ(細菌に感染するウイルス)である。メタゲノムシーケンスされたゲノム断片からウイルスゲノムを再構築することで、多くの未知ファージゲノムを見出した。その未知のファージがどの細菌に感染するかについて、感染によって宿主細菌ゲノム内に残るファージの配列を基にして、感染関係を予測する方法を開発した。感染関係予測法の検証を行った後、ヒト健康人における腸内細菌・ファージの感染関係について解析し、共生関係に関する知見を得た。

研究成果の概要(英文):The intestine contains commensal viruses, the majority of which are unidentified bacteriophages (phages). This study revealed many genomes of unknown phages by reconstructing them from metagenomic sequence reads. To understand infectious hosts of the unknown phages, I developed prediction methods of phage-bacteria infectious association based on the phage genomic sequence remaining in the host bacterial genome. After validating the prediction methods, I analyzed the infectious associations of intestinal bacteria / phage in healthy humans and obtained knowledge on symbiotic relationship between phage and bacteria.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：細菌・ファージ感染関係 メタゲノム ウイルス分類 プロファージ CRISPR 腸内ウイルス

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢研究は肥満、腸炎、脳・神経疾患にまで影響することが知られるようになり、産生される代謝物や免疫細胞との相互作用等のメカニズムも徐々に明らかになってきた。一方で、腸管内にはバクテリオファージ（ファージ）をはじめとする多数のウイルスも存在している。しかし、腸管内のウイルス叢解析は、ほとんど行われておらず、2014年にヒト腸管内で最も量の多いファージ（crAssphage）が新規に同定されるような状況であった。ファージは細菌に感染し細菌を溶解するだけでなく、細菌への薬剤耐性遺伝子の伝搬、毒素や機能遺伝子の導入といった機能を果たしていることが知られていた。ファージの機能解析を行う一つの方法は、宿主となる細菌を培養することでその細菌に感染するファージを増幅・単離して調べることである。しかし、腸管内のファージの大部分は、どの細菌に感染するのか未知のため、実験的には数千種におよぶ細菌の一つ一つを培養法によって調べるしかなく、これは困難を極める。このため、データに基づきファージが感染する細菌を予測できれば、ファージの機能解析に対して重要な足がかりとなる。また、ファージの感染による細菌の溶解は、細菌叢を直接的に変化させるため、ファージを用いた治療にも繋がる重要な知見となる。

2. 研究の目的

腸内ファージは、細菌への感染・溶解を通して、腸内細菌叢に強い影響を及ぼしていると考えられる。しかしながら、腸内ウイルス叢には未知のウイルスが多く存在し、ゲノム情報と機能情報の整備が急務である。機能未知のファージが感染する細菌を予測できれば、細菌叢への影響を理解でき、細菌培養による未知ファージの単離を容易にすることができる。本研究では、腸内ウイルス叢と細菌叢のメタゲノムシーケンスデータを用い、ゲノム配列データを整備しつつ、各ファージの感染標的細菌を推定する情報解析技術を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

腸内の微生物集団を反映する糞便サンプルを使用し、サンプル中のゲノムDNAを網羅的に解析するメタゲノム解析の手法を用いて、腸内ウイルス叢と細菌叢の解析を行った。研究代表者の研究室にて開発された、ウイルス、バクテリアそれぞれの微生物群を濃縮してDNA抽出する方法を用い、次世代シーケンサーにより、ウイルス叢と細菌叢のメタゲノムデータが産出される。産出された細菌叢とウイルス叢のメタゲノムデータを用いて、バクテリオファージ（ファージ）が感染する細菌を推定する情報解析技術を開発した。既存のゲノム情報も利用するが、腸内にはゲノム配列が知られていない未知のウイルスが多数存在するため、ウイルスメタゲノムの解

析パイプラインを構築し、ウイルスゲノムの情報を整備した上で、感染関係の推定方法を構築した。推定方法は、ファージが細菌に感染した際に細菌ゲノムに挿入される「プロファージ配列」、「CRISPR配列」の情報を基に推定する方法と、細菌数およびウイルス数の「数量変動」の情報から推定する方法をそれぞれ構築した。

4. 研究成果

(1) 腸内に存在する未知のウイルスを解析する基盤の構築:

メタゲノムシーケンスリードからゲノムアセンブリを行い、個々のウイルスゲノムを再構築し、再構築されたゲノム断片“コンティグ”を基本単位としてウイルス分類解析を行う解析パイプラインを構築した。

コンティグの構築後、各コンティグ上に複数存在する遺伝子領域の予測を行い、予測された各遺伝子配列を相同性検索により、近縁のウイルス情報と結びつける。各コンティグ上で結びつけられた近縁のウイルス情報を基に各コンティグのウイルス分類を行う。

また、ウイルス分類の過程で、ウイルスに特有の遺伝子や、ウイルスに多く存在する遺伝子の割合が統計的に高いコンティグ配列をウイルスゲノムと判断し、それ以外の細菌や細胞由来と考えられるコンティグを除く処理を行うようにした。

実データを解析して得られたコンティグ中にはコンティグが環状につながる（始めと終わりの配列が完全一致する）ものがあり、それらのウイルスゲノムは完全長で解析できていることが示唆された。いくつかの環状コンティグについては、PCRによる検証確認も行い、実験的にも存在を確かめることに成功した。

(2) プロファージによる感染関係の予測:

ファージの中でも自身のゲノムを細菌ゲノム中にプロファージ配列として埋め込み潜伏する溶原化ファージ（図1）について、プロファージ配列を細菌ゲノムから検出し、感染関係を予測する方法を開発した。ウイルス解析パイプラインによりウイルスと判断されたコンティグの配列が、バクテリアコンティグ内に内包されている配列を検出する。

マウスサンプルより得られた腸内ウイルス叢、細菌叢のメタゲノムデータを解析し、構築した予測法により感染関係を見てみると、従来のプロファージ配列予測法（PHASTER (Arndt et al., 2016)、Phage Finder (Fouts, 2006))では検出できないプロファージ配列を検出することができていた。従来の方法では既知のプロファージの配列から学習して予測しているため、腸内に多く存在する未知のファージには対応できていなかったと考えられる。未知ウイルスを解析するパイプラインと合わせて解析することでこのような成果が得られた。

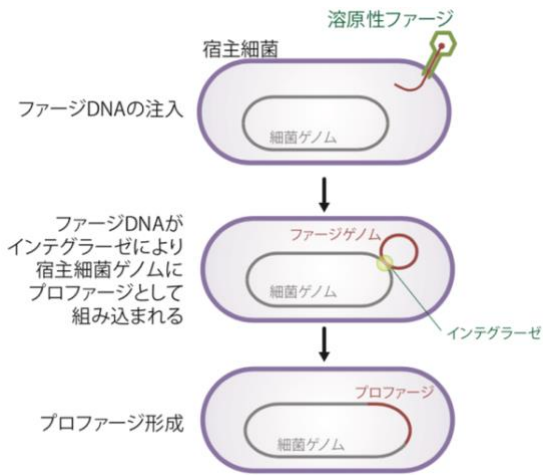


図1. 溶原性ファージのプロファージ形成

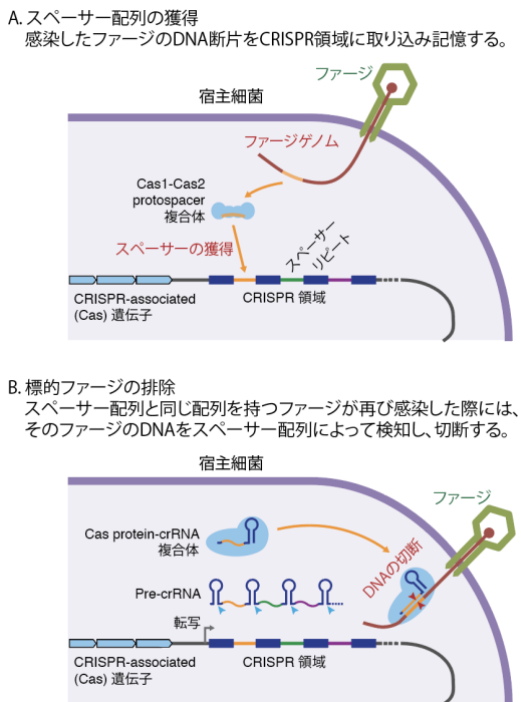


図2. CRISPR/Cas システムの作用機構

(3) CRISPR スペーサーによる感染関係の予測:

細菌の獲得免疫機構である CRISPR/Cas システム (図2) により細菌ゲノム中に挿入されたファージゲノムの断片を検出し、感染関係を予測する方法を開発した。CRISPR 領域の予測ツール CRISPRDetect により CRISPR スペーサーと CRISPR リピーターの配列を予測し、予測された CRISPR スペーサーの配列をウイルスコンティグの配列から検索して、感染関係を検出する。

マウスより得られた腸内ウイルス叢、細菌叢のメタゲノムデータを解析し、CRISPR スペ

ーサーによる感染関係を見てみると、プロファージとして宿主細菌に潜伏する溶原性ファージの他、宿主細菌に感染後直ちに増殖と溶菌を行う溶菌性ファージの感染関係も得られることが分かった。

また CRISPR スペーサーが標的としている配列の詳細について見てみると、標的配列は多くの場合、ファージの構造タンパクもしくは複製に必要な酵素タンパクなど、ファージの生活環に必須の遺伝子が多いことが分かった。

(3) 菌数・ウイルス数による感染関係の予測:

宿主となる細菌の有無により寄生するファージの量の変動する。このような数量の変動関係から感染関係を検出する方法を開発した。多くのサンプルより得られたメタゲノムデータを同時に解析することで、各細菌とウイルスの存在量のプロファイルを作成する。この存在量のプロファイルを解析すると、非常に限られた少数のサンプルに特異的に出現する細菌とウイルスのペアが既知の感染関係を反映していることを見出した。このようなペアを抽出する方法を定式化し、感染関係を検出する方法を構築した。

(4) 開発した情報解析技術による実データの解析:

①異なる5種の抗生剤を投与したマウスにおいて、抗生剤により錯乱される腸内細菌叢とウイルス叢のダイナミクスについて感染関係の観点から解析し、薬剤耐性となる細菌と感染するファージに関する知見を得た。
②ヒト健康人における腸内細菌叢とウイルス叢の解析を行い、腸内ウイルス叢が大きく3つのパターンに分かれる傾向があること、それぞれのパターンにおける感染関係の傾向の違い、そしてそれがどのように腸内細菌叢とウイルス叢の構成に反映されているかについて知見を得た。
これらの解析結果を論文としてまとめ、発表を行う予定である。

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 2件)

① Ouchi Y, Patil A, Tamura Y, Nishimasu H, Negishi A, Paul S K, Takemura N, Satoh T, Kimura Y, Kurachi M, Nureki O, Nakai K, Kiyono H, Uematsu S. Generation of tumor antigen-specific murine CD8+ T cells with enhanced anti-tumor activity via highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing. Int Immunol. 2018;30(4):141-154.

② Eri T, Kawahata K, Kanzaki T, Imamura M, Michishita K, Akahira L, Bannai E, Yoshikawa N, Kimura Y, Satoh T, Uematsu S, Tanaka H, Yamamoto K. Intestinal

microbiota link lymphopenia to murine autoimmunity via PD-1+CXCR5-/dim B-helper T cell induction. Sci Rep. 2017 Apr 26;7:46037.

〔学会発表〕（計 0件）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0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 0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

木村 恭将 (KIMURA, Yasumasa)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：30632913

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()