

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19564

研究課題名（和文）メタファージゲノム解析法の開発によるヒト腸内に広がるリアルファージワールドの解明

研究課題名（英文）Development of a pipeline for metagenomic analysis of phages in human intestine

研究代表者

林 哲也（Hayashi, Tetsuya）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10173014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：バクテリオファージは生物学的にも生態学的にも重要な役割を演じている。ウシ糞便サンプルを使用してロング・ショートリードのシーケンサを併用した網羅的解析手法の確立し、ヒト腸内に存在するファージの実態解明を試みたが、フリーのファージに関しては十分なロングリードを得ることができず、ファージ誘発サンプルの解析では、少数のファージが圧倒的多数を占め、幅広いファージのゲノム情報を得ることができなかった。この原因としてはサンプル量の不足等が考えられ、より大規模な解析の必要性が示唆された。しかし、ウシ由来検体のデータ解析から極めてユニークで新規性の高いファージを見出したため、その解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では腸内に存在するファージの実態解明には至らなかったが、今回の挑戦を通じて、腸内に存在するフリーのファージの解析には十分なサンプル量を用いた解析が必要であること、溶原化ファージを含めた解析には、相当量のデータを取得する必要があること、現時点ではロングリードによる糞便のメタゲノム解析を中心とした解析が現実的であることが示唆された。これらの解析法等に関する基本情報は、今後の解析のための有用な情報基盤となる。同時に、ウシ由来検体のデータから極めて新規性の高いファージが発見できたことは、ヒトや動物の腸内に存在するファージ群は新規性が高く学問的にも重要な遺伝リソースであることを強く示唆する。

研究成果の概要（英文）：acteriophages are playing various biologically and ecologically important roles. In this study, using bovine fecal samples as test materials, we first established a pipeline for comprehensive analyses of bacteriophage communities by utilizing long and short read sequencing technologies. Using this pipeline, we analyzed human fecal samples, but were unable to obtain enough long reads from free bacteriophages. In the analyses of phage-induced samples, relatively small numbers of bacteriophage dominated in the data obtained. These results suggest that, to understand the real diversity of bacteriophages existing in human intestine, much larger scale analyses using relatively larger amounts of samples are required. However, we identified a large and very unique phage genome in the data obtained from the analyses of bovine fecal samples. Detailed analyses of this novel phage are in progress.

研究分野：細菌学

キーワード：バクテリオファージ ファージコミュニティ ロングリードシーケンシング メタゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

細菌を宿主とするウイルスであるバクテリオファージ（または単にファージとも呼ぶ）は広く自然界に分布し、細菌間での遺伝子伝達による細菌の進化・多様化や、様々な環境中における細菌集団の組成変動にも大きく寄与するなど、生物学的にも生態学的にも重要な役割を演じている。最近では、多剤耐性菌に対するファージ療法や常在菌叢の人為的制御など、医療へのファージの利用も注目されている。しかし、高い安全性が要求される医療への応用には、組換え等によってファージが変化するリスクが十分に低いことなどの条件を満たす必要がある。その安全性検証のための情報基盤として、腸内細菌叢などに存在するファージの実態（リアルファージワールド）の解明は不可欠であるが、その詳細はほとんどわかっていない。これは、ファージの多様性が極めて高く、細菌の 16S rRNA のような組成解析用マーカーが存在しないことなどによる。メタゲノム解析は 1 つの解決策であるが、腸内細菌叢などの場合には、ファージ間での組換えによって生じたモザイク状ゲノムをもつ類似のファージが数多く存在することから、単純なメタゲノム解析では、ファージゲノムの断片しか取得できない。また、プロファージとして宿主染色体に組み込まれて存在するファージも多数存在するためにフリーのファージの解析のみでは不十分である。これらの問題点を克服するには新たな研究手法の開発が必要であるが、10X ゲノミクス社のリンクドリードシーケンシングとオクスフォードナノポア社の 1 分子シーケンシングによるロングシーケンシングという 2 つの新しいシーケンシング技術を利用することにより、個々のファージの全長ゲノム配列に相当する高精度な配列情報を効率的に取得できる可能性が生まれてきた。後者に関しては、最近のバージョンアップにより、40 kb を超えるロングリードが可能になり、シーケンス精度もまだ 90% 程度に留まるものの、実的なレベルまで向上した。さらに、メタゲノム配列情報との統合によってプロファージとして存在するファージ集団の解析も可能と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景に基づき、大きな注目を集めているヒトの腸内細菌叢に存在するファージ集団を解析対象として、(1) 10X ゲノミクスとナノポアを用いたファージゲノムの網羅的な解析手法を確立する。菌叢からのマイトマイシンによるプロファージ誘発と細菌叢のメタゲノム解析を組み合わせることにより、プロファージとして溶原化しているファージのゲノム配列決定だけでなく、その宿主菌まで同定する解析手法を開発するとともに、(2) 確立した手法を用いて、ヒト腸内細菌叢に存在するファージの網羅的なゲノム解析を行い、腸内に存在するファージの多様性と各ファージの存在比率、ファージ間での組換えなどによる多様化の実態、ファージが伝達する多様な機能、腸内でのファージを介した細菌間での遺伝子水平伝達の実態などを明らかにすることによって、ヒト腸内に広がるリアルファージワールドの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

当初計画では、29 年度には、大規模解析の基盤となる解析手法の確立を目的として、まず 1 検体の健康人由来糞便サンプルを対象としてディープな配列解析を行い、必要データ量など、各解析条件の至適化を行うこととした。具体的には、(1) 糞便中に存在するファージ粒子とマイトマイシンを含む増菌培地中で糞便を短時間培養した際に誘発されるファージ粒子を精製し、高分子量の intact なファージゲノム DNA を抽出する、(2) 10X ゲノミクスを用いてファージゲノム毎に異なるタグがついたライブラリを作成し、イルミナ HiSeq を用いて配列を取得する、(3) ナノポアを用いて 1 分子シーケンシングを行い、取得したロングリードのアッセンブルとアッセンブル配列に対するイルミナリードのマッピングにより、各ファージゲノムの全長をカバーする高精度配列を取得する、(4) 糞便サンプルのメタゲノム解析を行い、各ファージの染色体挿入部位を決定し、挿入部位の周辺の配列から宿主菌種を同定する、(5) 解析に使用するリード量を様々に変えたシミュレーションを行い、必要データ量を決定する。さらに H30 年度には、10 検体程度の糞便サンプルを対象として、(1) 1 年目に至適化した解析条件を用いて、各検体からファージゲノム情報とメタゲノム情報を取得し、(2) 全検体から得られたファージゲノム配列の比較解析とメタゲノム配列との統合解析により、全検体に存在するファージのカタログ化と類似ファージのグループ化、各ファージの各検体における存在比とその検体間での差異の解析、ファージ間での組換え頻度と組換え様式の解析、ファージ遺伝子のカタログ化(腸内ファージのパンゲノムの解析)、宿主菌の同定結果に基づく菌種間でのファージを介した遺伝子伝達頻度やパターンの解析等を行うことにより、腸内に広がるリアルファージワールドの実態解明を目指す。

このうち、一年目の解析において使用予定であったヒトサンプルに関しては、コホート研究からサンプルを収集することになっていたが、その計画立案と倫理審査に時間を要し、ヒトサンプルの使用ができなかったため、代替案としてウシ糞便サンプルを使用し、種々の条件検討と、解析パイプラインの整備を行うこととした。また、(2) の解析で使用予定であった 10X ゲノミクスに関しては、その学内導入が中止となったため、外部業者にライブラリ作製を依頼

する必要が生じた。

#### 4. 研究成果

H29年度の第一目標は、大規模解析の基盤となる解析手法の確立であり、まず1検体の健康人由来糞便サンプルを対象としてディープな配列解析を行う計画であったが、上記のようにヒトサンプルの使用ができなかったため、別プロジェクトで入手したウシ糞便サンプルを使用して、サンプル調整法やナノポアを用いたシーケンシング法の評価など、以下の条件の至適化と解析パイプラインの整備を行った。(1)各種濃度のマイトマイシンCを含む増菌培地中で糞便を培養した際に誘発されるファージ粒子の精製と高分子量ファージゲノムDNA抽出法、および菌体からのゲノムDNA抽出法について検討し、基本的なプロトコルを作成した。菌体からの高分子量ゲノムDNA抽出に関しては、機械的な細胞破砕法によってもある程度のサイズのゲノムDNAが抽出できることを確認できた。(2)ナノポアを用いた1分子シーケンシングに関しては、大腸菌を含む数種類のゲノム(ミトコンドリアと葉緑体を含む)を用いて、新しいバージョンのナノポアシステムでのサンプル調整法に関する検討、シーケンスリードの評価、アッセンブル法とイルミナリードによるポーリッシングの効果の評価を行い、解析パイプラインを確立した。これらの検討とデータ解析から、基本的には、50x以上のデータが取得できれば、特殊な配列を除くと、99%以上の精度の高精度配列を取得することができることを確認できた。(3)10X ゲノミクスを用いたリンクドリードシーケンシングに関しては、業者委託によってイルミナシーケンサでの解析に使用できるライブラリが得られることが確認できたが、その使用により劇的な効果が確認できなかったこと、また金額的にも複数のサンプルを解析することは難しいことが判明したために、その解析を中止することとした。

H30度は、前年度に整備した解析パイプラインを用いて、コホート研究で収集した糞便サンプルを用いたファージメタゲノム解析を進めた。フリーのファージの解析(マイトマイシンC処理なしのサンプル)に関しては、アッセンブリに十分なロングリードを得ることができなかった。この原因としては、各検体から含まれるファージDNA(DNA分解酵素耐性のDNAとして評価)は非常に少なく、しかも多様性に富んでいると思われること、またライブラリー作成の際に想定以上に断片化が起きること、明らかに宿主菌由来(非ファージのDNA)と考えられる配列が相当な割合を占めることなどが考えられた。これらの問題点を解決するため、ファージ粒子回収法に関して種々の検討を行ったが、満足できる結果が得られず、最終的に糞便サンプルの量を増やすことが必要と判断した。しかし、今回の研究計画では、数グラム程度の使用が限度であったため、ボランティア健康者からの検体収集計画を新たに立案し、学内承認の準備を進めることとした。一方、マイトマイシンCで誘発した糞便サンプルのメタゲノム解析では、少数のファージが圧倒的多数を占め、幅広いファージのゲノム情報を得ることができなかった。幅広く溶原化ファージのゲノム情報を得るためには、データ量を10倍以上増やす必要があり、その多様性、ファージを介した遺伝子伝達頻度やパターン、ファージ間での組換え等の解析には至らなかった。

以上の結果から、現時点では、フリーのファージの解析には十分なサンプル量を用いた解析が必要であること、溶原化ファージを含めた解析には、相当量のデータを取得する必要があり、ロングリードによる糞便のメタゲノム解析を中心とした解析が現実的であると判断される。しかし、H29年度の解析で得られたウシ由来検体のデータ解析の中から、250 kbを超えるゲノムサイズを有し、さらに20種類以上のtRNA遺伝子をコードする一方で、既知のファージ遺伝子に相同性を示す遺伝子がほとんど存在しない極めてユニークで新規性の高いファージと思われるゲノムを見出している。このことは、腸内細菌叢に存在するファージ群は新規性の高い遺伝リソースである可能性を強く示唆しており、今回の研究で得られた解析法等に関する基本情報は、今後の解析に有用である。なお、上記のウシ由来検体から見出したファージに関しては、現在、宿主菌の検索や類似ファージの検索などを含めた詳細な解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 林哲也(招待講演)「次世代シーケンサーを用いた病原細菌におけるゲノム解析の進展」, 日本農芸化学会2019年度大会, 2019.3.26, 東京都世田谷区(東京農業大学世田谷キャンパス)
2. 林哲也(招待講演)「次世代シーケンサーを用いた病原細菌におけるゲノム解析の進展」, 第13回日本ゲノム微生物学会年会, 2019.3.8, 八王子市(首都大学東京南大沢キャンパス)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：小椋 義俊

ローマ字氏名：Ogura Yoshitoshi

研究協力者氏名：後藤 恭宏

ローマ字氏名：GOTO Yasuhiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。