

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08172

研究課題名(和文) バイオフィーム形成因子の全ゲノム探索を足掛かりとした肺MAC症の難治化機序の解明

研究課題名(英文) Genome-wide identification of essential genes for biofilm formation in Mycobacterium-avium intracellulare complex in order to discover novel drug targets

研究代表者

立石 善隆 (Tateishi, Yoshitaka)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30433296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺MAC症の起因菌である非結核性抗酸菌に対して、トランスポゾン(動く遺伝子)変異システムと次世代シーケンシング技術を駆使して、全ゲノムレベルでの生存必須遺伝子およびバイオフィーム形成必須遺伝子を同定した。これらの必須遺伝子が司る代謝経路を阻害することで、菌の増殖が阻止されることを細菌学的実験により証明した。非結核性抗酸菌の生存必須遺伝子ならびにバイオフィーム形成必須遺伝子のリストは、新規治療薬開発の重要な基盤情報となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、主要な非結核性抗酸菌であるマイコバクテリウム・イントラセルラーエに対して、トランスポゾン(動く遺伝子)による変異株ライブラリーの作成と次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンシングを組み合わせたトランスポゾンシーケンシングを行い、全ゲノム規模で生存必須遺伝子の同定を行いました。今回同定した生存必須遺伝子群は、非結核性抗酸菌の薬剤標的となるため、肺MAC症に対する新しい治療薬の開発において重要な情報源となります。

研究成果の概要(英文)：The global incidence of the human nontuberculous mycobacteria disease is rapidly increasing. However, knowledge of gene essentiality under optimal growth conditions and conditions relevant to the natural ecology of NTM, such as hypoxia, is lacking. In this study, we utilized transposon sequencing to comprehensively identify genes essential for growth in Mycobacterium intracellulare. Of 5126 genes of M. intracellulare ATCC13950, 506 genes were identified as essential genes. The shared genes included target genes of existing antituberculous drugs. From 175 genes showing decreased fitness as conditionally essential under hypoxia, preferential carbohydrate metabolism including gluconeogenesis, glyoxylate cycle and succinate production was suggested under hypoxia. Virulence-associated genes including proteasome system and mycothiol redox system were also identified as conditionally essential under hypoxia. These findings provide critical functional genomic information for drug discovery.

研究分野：細菌学

キーワード：トランスポゾン 次世代シーケンシング 非結核性抗酸菌症

1. 研究開始当初の背景

肺 MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex) 症は、2014 年の全国調査により、罹患率が人口 10 万対 15 に達し、この 10 年間で 3 倍以上に急増した。わが国の肺 MAC 症の患者は非 AIDS 患者であり、宿主側の免疫不全を土台とすることなく、慢性持続感染状態が維持される。かつ、マクロライドと抗結核薬を組み合わせた標準化学療法でも経年的な増悪をたどる。このように、宿主免疫併存せず、薬剤不能性という事実から、肺 MAC 症の克服には、MAC 菌の病原因子の解明が不可欠である。

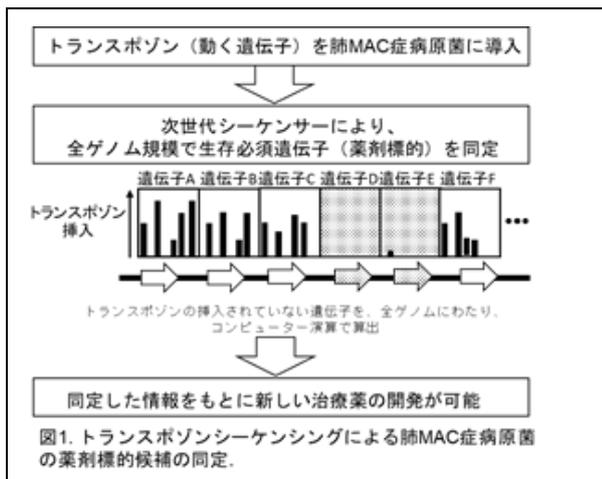
近年、緑膿菌感染などの慢性持続細菌感染症において、バイオフィームが重要な感染源となることが注目されている。申請者は MAC 菌のバイオフィーム形成が、低酸素かつ富栄養条件で起こることを証明した (Totani T, Tateishi Y. Sci. Rep. 2017)。このことは、MAC 菌が低酸素条件下で特異的に働くバイオフィーム形成因子をもつこと、そして生体での薬剤不能性の要因としてバイオフィーム形成の関与を示唆する。ところが、MAC 菌ではゲノム多様性や遺伝子組換え技術の難しさにより病原因子の解明が進んでいない。そして、MAC 菌における、バイオフィーム形成に関連した難治化病態を説明できる因子を同定するには、ゲノム全体を網羅した検討が必要である。申請者は MAC 菌に対して、トランスポゾン (動く遺伝子) を持つ抗酸菌ファージによる遺伝子変異導入システムにより、変異株集団の構成を次世代シーケンサーで分析するトランスポゾン-シーケンシング (以下、Tn-Seq) を駆使して MAC 菌の生存必須遺伝子、およびバイオフィーム形成因子を解明することを計画した。そして、Tn-Seq を駆使したバイオフィーム形成因子の解明を足掛かりとして肺 MAC 症の難治化病態の本質に迫ることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1. MAC 菌の生存必須遺伝子の同定、2. バイオフィーム形成において特異的に働く MAC 菌の必須遺伝子および代謝経路の同定を行うことである。

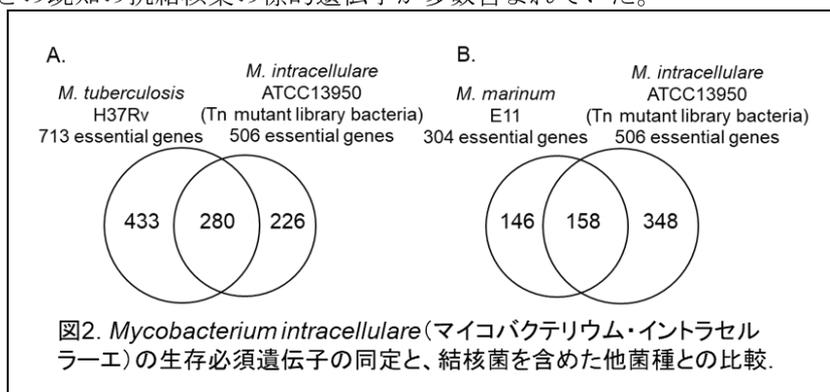
3. 研究の方法

M. intracellulare 標準株において、トランスポゾンを導入し、変異株プールを作成した。この変異株プールから対数増殖菌およびバイオフィーム菌を作成しゲノム DNA を抽出した。次世代シーケンサー (イルミナ HiSeq2500) と Bowtie2 によるマッピングにより、トランスポゾン挿入位置とリード数を算出した (図 1)。隠れマルコフモデルによるトランスポゾン挿入リード数変化の数理解析により、生存必須遺伝子を同定した。また、対数増殖菌と比較してバイオフィーム形成菌において、リード数が有意に減少した遺伝子を、「バイオフィーム形成に特異的な必須遺伝子」として同定した。さらに、検出した遺伝子に対して、KEGG データベースを用いたパスウェイ解析を行い、バイオフィーム形成に必須となる代謝経路を同定した。

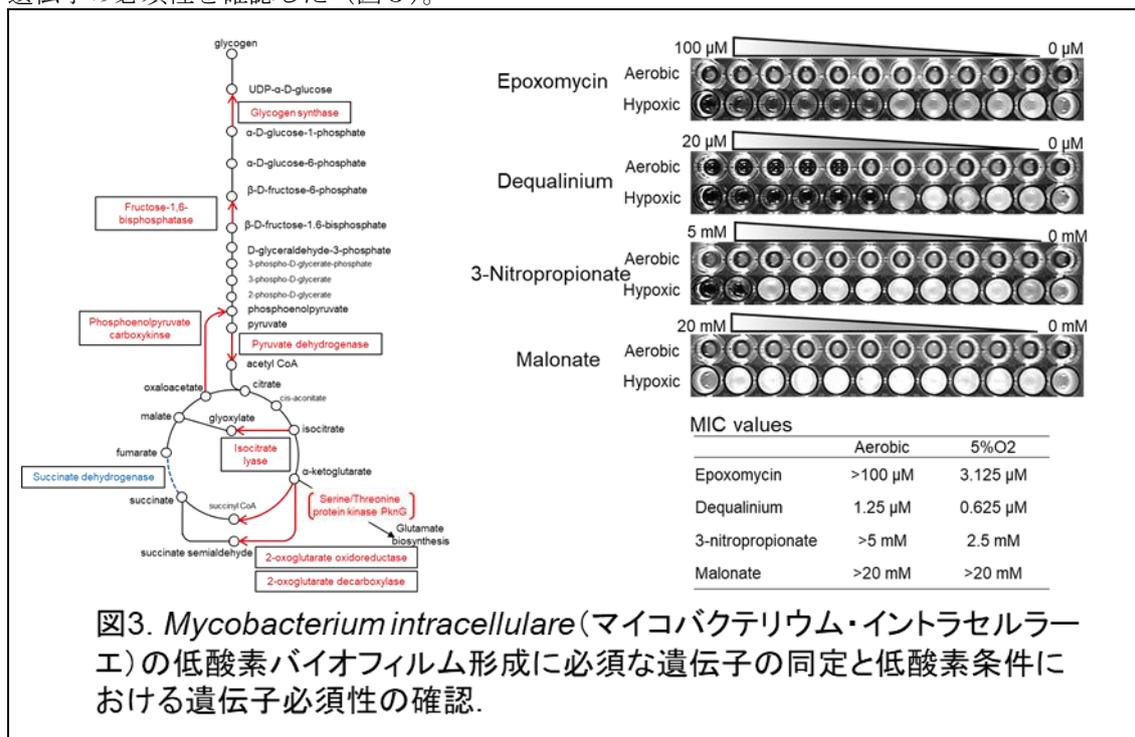


4. 研究成果

M. intracellulare には、506 の生存必須遺伝子が存在することが分かった。結核菌および *M. marinum* との共通生存必須遺伝子が、それぞれ 280 および 158 遺伝子存在することが分かった (図 2)。そして、生存必須遺伝子には、*gyrB*, *gyrA*, *embB*, *embA*, *inhA*, *dfrA*, *alr*, *rpoB*, *mmPL3* などの既知の抗結核薬の標的遺伝子が多数含まれていた。



バイオフィーム形成において 175 遺伝子が必須であることが分かった。バイオフィーム形成必須遺伝子群からパスウェイ解析により、バイオフィーム形成に必須な代謝経路を探索したところ、糖新生系、各種アミノ酸代謝、各種脂質代謝、マイコサイオール系、typeVII 分泌システムなどが挙がってきた。これらの結果に対して、化合物や阻害薬を使った細菌学的実験を行い、遺伝子の必須性を確認した (図3)。



以上の結果を誌上発表した (Tateishi Y. Sci. Rep. 2020)。今回同定した生存必須遺伝子群は、非結核性抗酸菌の薬剤標的となるため、肺 MAC 症に対する新しい治療薬の開発において重要な情報源となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tateishi Y, Minato Y, Baughn AD, Ohnishi H, Nishiyama A, Ozeki Y, Matsumoto S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome-wide identification of essential genes in Mycobacterium intracellulare by transposon sequencing - Implication for metabolic remodeling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62287-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Dewi DNSS, Mertaniasih NM, Soedarsono, Ozeki Y, Artama WT, Fahiruddin, Niki M, Tateishi Y, Ato M, Matsumoto S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Characteristic profile of antibody responses to PPD, ESAT-6, and CFP-10 of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis suspected cases in Surabaya, Indonesia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Braz J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 246-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bjid.2019.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maekura R, Kitada S, Osada-Oka M, Tateishi Y, Ozeki Y, Fujicawa T, Miki M, Jyunko O, Mori M, Matsumoto S.	4. 巻 0
2. 論文標題 Serum antibody profiles in individuals with latent Mycobacterium tuberculosis infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohara Y, Ozeki Y, Tateishi Y, Mashima T, Arisaka F, Tsunaka Y, Fujiwara Y, Nishiyama A, Yoshida Y, Kitadokoro K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawa I, Maekura R, Yamamoto S, Katahira M, Matsumoto S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Significance of a histone-like protein with its native structure for the diagnosis of asymptomatic tuberculosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0204160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0204160.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oh S, Libardo MDJ, Azeza S, Pauly GT, Roma JSO, Sajid A, Tateishi Y, Duncombe C, Goodwin M, Ioeiger TR, Wyatt PG, Ray PC, Gray DW, Boshoff HIM, Barry CE 3rd.	4. 巻 7
2. 論文標題 Structure-Activity Relationships of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-ones as Antitubercular Agents.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 479-492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsinfectdis.0c00851.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hakamata M, Takihara H, Iwamoto T, Tamaru A, Hashimoto A, Tanaka T, Kaboso SA, Gebretsadik G, Ilinov A, Yokoyama A, Ozeki Y, Nishiyama A, Tateishi Y, Moro H, Kikuchi T, Okuda S, Matsumoto S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Higher genome mutation rates of Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis during human infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75028-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi M, Nishiyama A, Kitamoto R, Tateishi Y, Osada-Oka M, Nishiuchi Y, Kaboso SA, Chen X, Fujiwara M, Inoue Y, Kawano Y, Kawasaki M, Abe T, Sato T, Kaneko K, Itoh K, Matsumoto S, Matsumoto M.	4. 巻 64
2. 論文標題 Adduct Formation of Delamanid with NAD in Mycobacteria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 e01755-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.01755-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 立石善隆、松本壮吉
2. 発表標題 Genome-wide identification of essential genes in nontuberculous mycobacteria
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立石善隆、松本壮吉
2. 発表標題 トランスポゾンシーケンシングによる非結核性抗酸菌のペリクル形成因子の解明
3. 学会等名 第33回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立石善隆
2. 発表標題 機能ゲノム解析による非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成因子の解明
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立石善隆
2. 発表標題 Transposon sequencingを利用した非結核性抗酸菌のバイオフィルム形成における必須遺伝子の探索
3. 学会等名 日本細菌学会中部支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立石善隆、尾関百合子、西山晃史、松本壮吉
2. 発表標題 Comparative genomic analysis of <i>M. intracellulare</i> clinical strains.
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立石善隆、港雄介、西山晃史、尾関百合子、松本壮吉.
2. 発表標題 Transposon sequencingによる非結核性抗酸菌の生存必須遺伝子とバイオフィーム形成必須遺伝子の検出.
3. 学会等名 第34バイオフィーム学会、第57日本細菌学会中部支部会.
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学医学部細菌学 https://www.med-niigatauniv-bacteriol.org/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------