

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2022

課題番号：18KK0436

研究課題名（和文）ゲノム連鎖とエピゲノムがもたらす抗酸菌の系統進化機構の解明

研究課題名（英文）Roles of gene interaction and epigenome in evolution of *Mycobacterium avium*

研究代表者

丸山 史人（MARUYAMA, FUMITO）

広島大学・IDEC国際連携機構:PHIS・教授

研究者番号：30423122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,900,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：全体の渡航を通じて、ミネソタ大学バーン准教授の研究室の複数のメンバーとの交流と、この研究室で保有する機能ゲノム解析に関する知識と技術、網羅的な条件 必須遺伝子探索に資するTn-seq, 必須遺伝子の発現抑制が可能なCRISPRi, *Mycobacterium*属で極めて単純かつ高効率の遺伝子改変技術であるORBITを習得した。これらの技術は、実施者である丸山が主宰する研究室にも導入され、丸山が代表の基盤研究Aへと引き継がれている。そこで、*Mycobacterium avium*へのこれらの手法の応用を目指して共同が継続されることとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

米国において習得したTn-seq, CRISPRi, ORBITという異なる機能ゲノム解析は、*M. avium*を含む*Mycobacterium*属の一部の遺伝子を効率よく改変することができる。そのため、この技術を日本でも確立することで遺伝子機能と疾患の理解が深まり、本感染症の新たな治療法の開発が期待できる。また、米国との連携が深まったため、このコネクションを活かした国際共同研究の加速が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Through the entire stay, I had interactions with multiple members of Associate Professor Baughn's lab at the University of Minnesota, and acquired knowledge and techniques related to functional genome analysis held in this lab, such as Tn-seq for comprehensive conditionally essential gene discovery, CRISPRi which can suppress essential gene expression, and ORBIT which is a very simple and highly efficient gene modification technique in *Mycobacterium*. These techniques have been introduced to the lab that I, Maruyama, preside over and have been handed over to JSPS KAKENHI basic research A, for which I am the representative. Therefore, it has been decided that our collaboration will continue with the aim of applying these techniques to *Mycobacterium avium*.

研究分野：Microbial Genomics and Ecology

キーワード：非結核性抗酸菌 *Mycobacterium avium*

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

A群レンサ球菌 (**Group A Streptococcus**, 以下 **GAS** と示す) は、幅広い症状を呈することが知られている。症状を全く引き起こさないこともあれば、咽頭炎、扁桃炎といった軽症 (世界で年間6億人)、致死率が30%を超える劇症型感染症 (世界で年間50万人) を引き起こすこともあり、臨床的にも重要な病原細菌である。これまで、**GAS** による劇症型感染症の発症メカニズムを解明するために、細菌の全ゲノム解読および比較ゲノム解析、病原因子の機能解析、また、宿主側の免疫機構解析が進められてきた。こうした研究から、本菌はゲノムサイズが小さい割に多くの病原遺伝子を保有していること、また、病原関連遺伝子の二成分制御システムにおける一塩基多型 (**SNPs**) が劇症化の一因ではないかと報告されている (**PLoS Pathog.**, 2009 等)。しかし、本遺伝子の **SNPs** だけでは劇症株の一部しか説明できない。また先行研究においては、特定の系統群に属する劇症型株のみを用いた比較解析により得られた知見に留まっている。

内容及び進捗状況として、申請者らはこれまでに、下記の3点を明らかにしてきた。従来考慮されてこなかった非劇症型株を合計259株用いて比較ゲノム解析を実施し、A群レンサ球菌の「株特異的病原性発揮機構」を情報学的に明らかとしてきた。具体的には、i) 劇症型株に特異的に保存されている新規 **SNPs** を多数同定し、ii) 劇症型特異的に優占するファージと外来性病原因子や、iii) ファージ由来メチラーゼによるメチル化パターンが病原因子により異なることを見出した。また、本種の多様化においては、原核生物の獲得免疫システム (**CRISPR**) と病原因子の運搬役であるバクテリオファージの関わりが主要な役割を果たし、**CRISPR** の欠失が一つの種内を大きく2つのグループに分ける要因になっていることを明らかにした。各グループの特徴として、**CRISPR** を保有するグループはゲノムを構成する遺伝子数がほぼ一定で保守的であるのに対し、**CRISPR** を欠損したグループはゲノム上に多様なファージの出入りがあり、種としては多数の遺伝子種を保有するが、全株共有の遺伝子種は **CRISPR** 保有型に比べ少なくなっていた。すなわち、「ファージを介したゲノム縮小という新規ゲノム進化機構」の存在を明らかにすることができた。

本課題の元となる上記、基課題をどのように発展させる予定であったかを以下に述べる。難治性の慢性呼吸器感染症である肺 **NTM** 症 (**Notuberculous mycobacteria, NTM**) は、先進諸国を中心に患者数が急増しており、国内の罹患率が世界一高いことから公衆衛生上の対策が急務である。特に本菌の対策において、迅速な治療が求められない安定型に対して、予後の経過が思わしくない進行型の原因解明が求められている。しかし、**NTM** は生育が遅く遺伝子改変が困難であることから研究が進んでいない。研究課題は、肺 **NTM** 症の原因細菌の一つである **M. avium** を対象に、基課題のゲノム情報学で導かれた3点:i) 本菌で観察される安定型には見られない進行型特異的な **SNPs**、ii) 進行型特異的な外来性病原因子、iii) 外来遺伝因子に由来するメチル化に伴う病原遺伝子発現に関わる候補遺伝子を情報学的に探索するとともに、結核菌 (**M. tuberculosis**) ですでに確立されているトランスポゾンシーケンシング (**Tn-Seq**) や新規に特異的な遺伝子サイレンシングが可能な **CRISPRi** を含む分子生物学の手法を、**M. avium** においても確立し、情報学的に見出された候補遺伝子機能を実験的に証明することを予定していた。

以下に、海外共同研究者の役割、研究内容を述べる。ミネソタ大学の **Baughn** 博士は、常に最前線で結核菌研究分野を牽引してきた **William R. Jacobs Jr.** 博士に師事を受け、抗結核薬の作用機序・薬剤耐性機構の分野に強みを持つ。そのため、研究代表者の情報解析で見出された「株特異的病原性発揮機構」に関わる遺伝子の機能解明、バリデーション、創薬ターゲットの決定を実験的に行う。港博士は、**Baughn** 博士の指導の下で機能ゲノム学の手法を駆使した方法で結核菌の全遺伝子の機能を網羅的にかつ簡便に解析できる系を確立しており (現在共著論文をリバイス中)、**Tn-Seq** 法による解析を担当する。**Gohl** 博士は **Minnesota** 大学ゲノム解析センターの研究開発部門のリーダーであり、プロトコルを独自に最適化し、高度な解析が可能な系を確立している (**Nature Methods** (2011)、**Nature Biotechnol.** (2016))。そのため実験的に高いレベルでデータをを得るための協力をしてもらおう。本3名は、幅広くかつ各々が独自の人脈をもつため、この三人を併せた豊富な人脈により、研究課題を効果的に進めるために必要な研究協力者との連携を築くためのハブとなる。

そのため、この海外共同研究者との準備状況を以下に記す。本課題の共同研究の遂行に当たり、2018年3月、京都大学に **Baughn** 博士を招聘し、共同研究に関する打ち合わせを行った。さらに、**Annual Meeting in Awaji Systems and Synthetic Bacterial biology** (2018年3月、淡路島)、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域セミナー (2018年3月、奈良先端科学技術大学院大学) においても、ともに講演を行い、互いの研究内容を同行した港博士とともに確認、協議を重ねた。さらに、2018年8月には、研究代表者が **Minnesota** 大学を訪問して、**Gohl** 博士を含む3名の研究室や施設を見学し、学生や関係者とともにセミナーを二日間にわたり実施した。このように十分な協議を行っていること、さらに、研究代表者が分担研究者をつとめる **AMED** の抗酸菌ゲノムデータベース構築構想においても共同実施に合意しており、円滑な研究実施の開始が可能な状況にある。この海外共同研究者のこれまでの研究活動や研究業績をまとめると、**Baughn** 博士は、下記を含む一連の卓越した研究業績に加え、**Yale** 大学や **Johns Hopkins** 大学などの一流大学からの招待講演も受けている。さらに、結核研究者が

集う 2017 年開催のゴードン会議において講演者として招待されており、当該研究分野に携わる研究者の中心に位置している。また、主要な論文として、以下が挙げられる。1) Minato Y, 他 4 名, *Baughn AD. Nat Commun.* (2018) 8:9(1):1003., 2) Bartek IL, Woolhiser LK, Baughn AD, 他 4 名 (2014) *mBio* 5:e01106-14. 3) Baughn AD, 他 3 名 (2009) *PLoS Pathog* 5:e1000662.

2. 研究の目的

先に記載したように、NTM 症は近年アメリカ・日本を含む先進諸国を中心に患者数が急増している。しかし増殖に時間がかかること、遺伝子改変の困難さから研究が進んでいない。その中で、海外共同研究者である Baughn 博士は、抗酸菌の一種である *M. tuberculosis* を用いて Illumina 社のシーケンサーの特性である大量並行シーケンシングの技術を応用したトランスポゾンシーケンシング (Tn-Seq) を含む分子生物学の手法を確立し、その困難さを一部克服している。この技術を有することから、さらなる特定遺伝子を標的とした機能ゲノム解析開発基盤が整っている。さらに本国際共同研究では、Minnesota 大学の本 Baughn 博士に加えて、Tn-Seq の確立に尽力してきた港博士、本手法の情報解析手法を独自に確立してきた Minnesota 大学ゲノムセンターの Gohl 博士と共同し、*M. avium* を用いて、特定の遺伝子機能同定が可能な CRISPRi を検討、確立する。これにより、基課題で情報学的に得られた候補遺伝子を対象にして、「株特異的病原性発揮機構」の実験的な実証と機能解明を目指す。

本研究においては、病原細菌を日常的に利用する環境が整備されている必要がある。Baughn 博士の研究室は、研究室内に BSL3 を備えており、あらゆる抗酸菌を扱うことが可能である。さらに、Minnesota 大は米国最大の研究機関型州立総合大学の一つであり、研究課題を遂行するために十分な施設、設備を有する。大学内に世界有数の研究組織である Genomics center、Minnesota Supercomputing Institute、Biotechnology Institute が所属し、いくつもの独自解析パイプラインを開発している。特に Genomics center は大学研究機関所属であるにも関わらず、Illumina 社、PacBio 社の両社から認定シーケンサー使用機関としての認定をうけている。Gohl 博士はこの中核となる研究者であり、後述するように、その成果の多くは、原著論文として多くの一流雑誌に掲載されている。このように、研究課題の円滑な実施において、Minnesota 大学の共同研究体制は、必要不可欠であると考えられる。

科研費（基課題）において、ヒトの重要な病原細菌である A 群レンサ球菌 1,000 株を用い、大規模な比較ゲノム解析、ゲノム連鎖解析、トランスクリプトームとメチローム解析を行っている。現時点まで、i) 劇症型特異的な一塩基多型 (SNPs)、ii) 劇症型特異的に優占するファージと外来性病原因子、iii) ファージ由来メチラーゼによるメチル化パターンが病原因子により異なることを見出すなど、A 群レンサ球菌の「株特異的病原性発揮機構」を情報学的に明らかとしてきた。国際共同研究（研究課題）では、現在日本、アメリカの一部の先進国で特に感染が広がっている *Mycobacterium* 属細菌（特に *Mycobacterium avium*）を用いて基課題の研究成果の普遍性を検証することに加え、基課題では用いていない機能ゲノム学の手法を用い、上記の情報学的に導かれた事象の実験的証明を目指すというのが、本課題の目的である。

3. 研究の方法

本課題では、渡航による共同研究により研究交流を深めることを目的としており、以下のような方策を検討、実施した。

① 今後の国際的な研究上の連携

研究代表者は、研究課題を通して、Baughn 博士と協力して、AMED の新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業での会議、日米医学協力計画抗酸菌症専門部会、日本細菌学会や日本ゲノム微生物学会等で発信していく。すなわち、研究課題で培った人的ネットワークを活用して、関連研究分野の研究者らを招聘し、上記の学会等において、当該研究分野の国際シンポジウムを開催する。この取り組みにより、当該、また関連研究分野の国内研究者と海外研究者らとの新たな国際的研究連携の形成を促す。また、研究課題を通して、港博士、Gohl 博士とも研究協力関係を確立することを通じて、持続性のある研究連携を築く。特に、本共同研究は同世代の研究者で構成されており、持続性のある研究連携の構築は今後の当該研究分野の発展に大きく貢献する。

② 独立した研究者として国際的に役割を担う

研究代表者は、上記の AMED 事業の分担者、ゲノム微生物学会の評議委員などを通じて、国内での研究基盤を築いてきている。さらに研究代表者は、本研究課題とは異なる病原細菌と薬剤耐性細菌の研究にて (SATREPS: 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム)、二国間交流事業、基盤研究 B (海外学術調査) などの代表研究者として、学際的な研究を培ってきた経験がある。そのため、本研究課題を通して当該研究分野での経験を積み、国際的に牽引する PI となる。国内の有望な若手研究者、及び研究成果や資源を国際的な場で紹介し、次世代の研究者が国際研究ネットワークに入りやすい環境整備に取り組む。また、研究課題での経験を大学教育の場で活かし、国際的な相互人材交流に努める。

③ 当該研究分野や関連研究分野に対して貢献

当該研究分野：上記 3 名との連携により得られる抗酸菌のゲノム解析、エピゲノム解析、機能

ゲノム解析の成果は、重要な感染症を引き起こす本菌の生態の解明に直結する成果であり、当該研究分野、特に衛生管理や臨床診断への貢献度は極めて高い。また、この成果はモデル生物以外では知見が限られている機能ゲノム、エピゲノム情報が得られるため、遺伝子発現調節研究、エピゲノム駆動型進化研究という新領域を開拓する成果になる。

関連研究分野：Baughn 博士との連携により、研究代表者のこれまでのゲノム解析、エピゲノム解析といった情報解析から見出される仮説に、抗酸菌の機能分析、実験証明が加わることは、本菌の治療法開発、ワクチン開発、診断法の開発につながる。本研究で用いる情報、実験の両者の技術が必要な Tn-Seq 法や CRISPRi システムは、その他の遺伝子改変が難しい生物にも応用が期待できる。これらの成果は、その他の細菌種においても普遍性の高い生命システム原理解明の一助となる。

4. 研究成果

全体の渡航を通じて、ミネソタ大学バーン准教授の研究室の複数のメンバーとの交流と、この研究室で保有する機能ゲノム解析に関する知識と技術、網羅的な条件 必須遺伝子探索に資する Tn-seq, 必須遺伝子の発現抑制が可能な CRISPRi, Mycobacterium 属で極めて単純かつ高効率の遺伝子改変技術である ORBIT を習得した。これらの技術は、実施者である丸山が主宰する研究室にも導入され、丸山が代表の基盤研究 A へと引き継がれている。そこで、Mycobacterium avium へのこれらの 手法の応用を目指して共同が継続されることとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ: <https://mge.hiroshima-u.ac.jp>
 広島大学研究者総覧: <https://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.9e8774cd06d23a8b520e17560c007669.html>
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2347-616X>
 GoogleScholar: <https://scholar.google.co.jp/citations?user=HeDrKa4AAAAJ&hl=ja>
 Researchmap: <https://researchmap.jp/read0091166/>
 研究室ホームページ: <https://mge.hiroshima-u.ac.jp>
 FaceBook: <https://www.facebook.com/MicrobGenoEcol/>
 ResearchGate: https://www.researchgate.net/profile/Fumito_Maruyama/publications

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	バーン アントニー (Baughn Anthony)	ミネソタ大学・Microbiology&Illunology・Associate Professor	

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			
米国	ミネソタ大学			