

トピックス

3. バクテリオファージのビッグデータ解析

矢原 耕史

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター

新学術領域「ネオウイルス学」の公募研究として、私は、細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ(以下、ファージ)のビッグデータ解析に注力する機会を頂いた。本稿では、その代表的な成果である、地球上の様々な環境由来のヴァイロームデータをゲノム組み換えの観点から解析した研究¹⁾と、ロングリードシーケンサー PromethIONを用いたメタゲノム研究²⁾について紹介する。

ファージは、地球上で最も多様かつ豊富な生命体であり、ヒトの体内や、地球上の様々な環境に、その宿主細菌とあわせて存在する。ファージを細菌感染症の治療に応用するファージ療法の研究が進められる一方、ファージが正常なマイクロバイオームや土壌等の環境の質の維持に貢献している可能性も、近年注目されている^{3,4)}。ファージは、様々な環境でどのように進化して生存し、何をしていて、ヒトの健康から地球環境に至るまでにどのような影響を与えているのか? 次世代シーケンサーを活用してそれを massive に探る研究が、「ネオウイルス学」の始動と歩調をあわせるかのように、進められるようになった。

その先鞭を切ったのは、Uncovering Earth's virome と銘打った、2016年8月のNatureの論文⁵⁾である。この論文では、世界各地の様々な環境から3042メタゲノムサンプルを解析し、12万本以上のウイルスの塩基配列を同定し、その数は当時の既知DNAウイルスの50倍以上であった。「ネオウイルス学」公募研究の立案の過程で私は、この先行研究で生み出されて公開されたデータを、私が長らく研究対象としてきたゲノムの組み換えの観点から解析し、組み換えの痕跡がどのような環境由来のファージでどれだけ広く検出されるのか(特に、自然選択を受けて、組

み換えが頻発して見えるファージの系統や遺伝子は存在するのか)、を探ろうと考えた。ゲノムの組み換えは、進化の原動力であり、ファージの場合には、宿主菌に重複感染したファージの間で、塩基配列の相同性に依存して生じる。ファージがしばしば組み換えを起こし、その結果として一般にファージゲノムがモザイク化していることは、2011年の時点でレビューに記されている⁶⁾。しかし、ゲノムを組み換えることがいつでもファージにプラスになる訳ではなく、組み換えが実際にファージに有利に適応的になるかどうかは、宿主細菌とその生息環境に依存する。私は、大学院修士課程で最初に取り組んだプロジェクトの中で、それを理論的に明らかにした⁷⁾。いわば私にとっての研究生活の原点が、約10年を経て、Earth's virome プロジェクトと結びつき、「ネオウイルス学」の公募研究に至った。

Earth's virome データは、アミノ酸配列の類似度に基づいて、ウイルスグループという、ウイルスの種に対応するグループに分類されており、私はその中から、宿主細菌種が推定済で、ゲノムの組み換えの解析に必要な量の塩基配列の存在するものを抽出した。そして、各ウイルスグループでパンゲノム解析を行い、全遺伝子を対象に組み換えの痕跡を検出した。その結果、まず、約8割のウイルスグループで組み換えの痕跡が検出され、ファージのゲノムの組み換えが一般的な現象であることを確認した。その上で、塩基配列の中に変異が多いほど組み換えの痕跡は検出されやすいことを考慮し、ウイルスグループあたりの塩基多様度と組み換えの痕跡の頻度(塩基あたり)の関係を図1のようにプロットした上で、組み換えの痕跡が外れ値的に多く見られるウイルスグループ(図1の赤丸)を同定した。その内訳を調べると、8割以上が口腔由来であり、組み換えが頻発して見えるファージは口腔に有意に多く検出されることが明らかになった。この結果は、その後、Earth's virome プロジェクトの後継で7986メタゲノムサンプルを解読しIMG/VR 2.0 データベース⁸⁾に登録された拡張データの解析によっても、再現された(図1に示しているのは、その拡張データに含まれる642ウイルスグループの解析結果である)。さらに、遺伝子レベルで解析し、組み換えの頻発して見える遺伝子を同定し、その機能を推定したとこ

連絡先

〒189-0002

東京都東村山市青葉町4-2-1

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター

TEL: 042-202-6080

FAX: 042-392-2775

E-mail: k-yahara@niid.go.jp

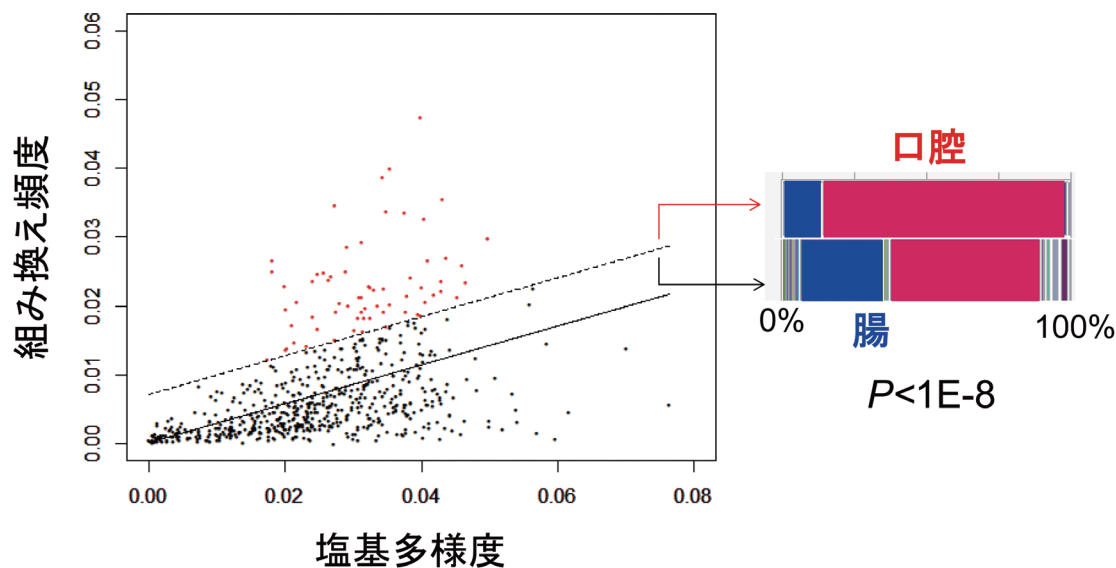


図1. 組み換え頻度の上昇して見えるファージ種（赤丸）には口腔由来が多い

ろ、ファージの形態形成（capsid, tail, tapemeasure, portal など）に関する遺伝子が約 75% を占め、統計的に有意に高い割合であった。口腔には宿主菌とファージが高密度に存在し、口腔内では宿主菌の免疫系である CRISPR スペーサーが数十万個転写されていること⁹⁾ から、口腔ファージに多く見られる組み換えの痕跡は、それがゲノムの組み換えによって宿主菌の免疫系から認識される配列を変化させ、免疫系を回避し続けていることを示唆していると考えられた。これらの成果をまとめる過程では、ウイルスの系統解析のリーダーの 1 人である Jan Meier-Kolthoff (Leibniz Institute), Earth's virome プロジェクトのリーダーである David Paez-Espino (Joint Genome Institute) と初めて議論し、共著者として論文を出版することができた。

一方で私は、「ネオウイルス学」の公募研究のもう 1 つ軸として、微生物感染が背景にあるとされながら機序・原因が不明の口腔疾患に注目し、その患者と健常者の唾液をメタゲノム解読して比較する、という計画を立案した（前述の Earth's virome データの解析が期せずして口腔ファージに帰着したため、公募研究の計画段階での 2 つのアイデアは、口腔をキーとしてつながることになった）。この研究から見つかった口腔疾患関連微生物は、ウイルスではなく細菌であった¹⁰⁾ が、この研究を進める過程で私は、ロングリードシーケンサーのうち PromethION であれば、唾液 1mL から抽出できる DNA の解読にも利用できることに気づいた。また当時、ヒトの腸内マイクロビオームに含まれるファージが注目されるようになってきた¹¹⁾ 一方で、口腔のファージに関しては僅かなメタゲノム研究があるのみであった。そこで私は、唾液由来 DNA を

PromethION でメタゲノム解読することで、Illumina シーケンサーには不可能な、個々の口腔ファージの全長を明らかにする、という研究を新たに立案した。この研究計画は幸い、「先進ゲノム支援」に採択され、「ネオウイルス学」第 2 期の公募にも採択され、唾液からロングリードに適した酵素法で抽出した DNA を 1 サンプルあたり 30Gb 以上の厚みで、PromethION と HiSeq の両方で解読したデータを解析する機会に恵まれた。

この巨大なデータをまずどうアセンブルするかについて、しばらく手探りの状態が続いたが、国際学会で Ryan Wick (Monash University), Nick Loman (Birmingham University) と議論し、ロングリードのアセンブルとエラー補正の方針を固めることができた。そして、アセンブルしエラー補正したデータの中からファージを網羅的に検出し、ロングリードによってプロファージの genomic context の解析が可能になる好例（図 2）や、口腔ファージのコードする遺伝子の特徴や、口腔にもジャンボファージ・プロファージが存在すること、さらに口腔ファージが宿主菌の CRISPR 免疫系を回避し続けていることを示す新たな証拠などを明らかにすることができた。また、サンプルの保存から DNA 抽出とメタゲノム解読の過程で、ヒト由来 DNA のコンタミをどのように低減させられるのかという、ヒト由来試料のメタゲノム研究全般に通底する問題にも 1 つの解を与えることができた。これらの成果は、「ネオウイルス学」の班会議と国際ワークショップを通じて得た新たな共同研究者（特に、班会議のオブザーバーだった当時学振 PD の岡崎友輔さん（現、京大バイオインフォマティクスセンター助教）と様々な議論から結実したものであ

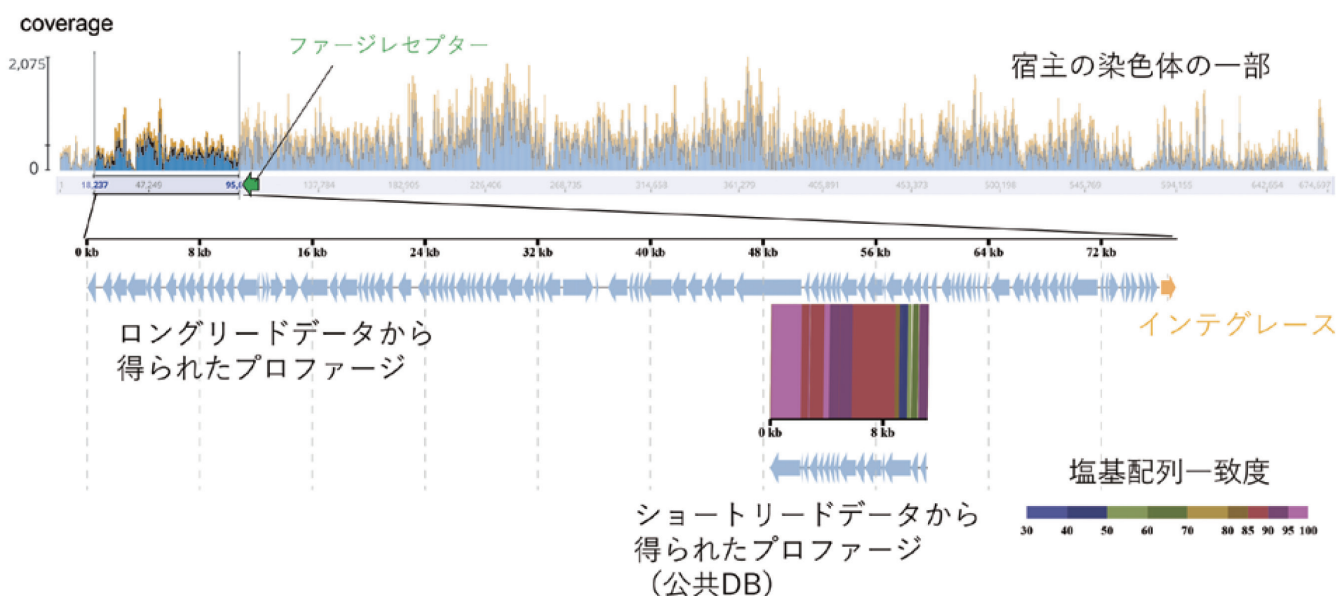


図2. ロングリードによるプロファージの genomic context の解析例 (Yahara et al (2021), Nature Comm. を改変)

り,「ネオウイルス学」で4年に渡って頂いた素晴らしい機会に, この場をお借りして改めて深く御礼申し上げる。

本稿に関連し, 開示すべき利益相反状態にある企業等はない。

参考文献

- 1) Meier-Kolthoff, J. P., Uchiyama, J., Yahara, H., Paez-Espino, D. & Yahara, K. Investigation of recombination-intense viral groups and their genes in the Earth's virome. *Sci Rep* **8**, 11496 (2018).
- 2) Yahara, K., Suzuki, M., Hirabayashi, A., Suda, W., Hattori, M., Suzuki, Y. & Okazaki, Y. Long-read metagenomics using PromethION uncovers oral bacteriophages and their interaction with host bacteria. *Nat Commun* **12**, 27 (2021).
- 3) Baker, J. L., Bor, B., Agnello, M., Shi, W. & He, X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol* **25**, 362-374 (2017).
- 4) Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., Chan, H. T., Seviour, R. J., Petrovski, S. & Franks, A. E. Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens* **8** (2019).
- 5) Paez-Espino, D., Elloe-Fadrosh, E. A., Pavlopoulos, G. A., Thomas, A. D., Huntemann, M., Mikhailova, N., Rubin, E., Ivanova, N. N. & Kyrpides, N. C. Uncovering Earth's virome. *Nature* **536**, 425-430 (2016).
- 6) Hatfull, G. F. & Hendrix, R. W. Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol* **1**, 298-303 (2011).
- 7) Yahara, K., Horie, R., Kobayashi, I. & Sasaki, A. Evolution of DNA double-strand break repair by gene conversion: coevolution between a phage and a restriction-modification system. *Genetics* **176**, 513-526 (2007).
- 8) Paez-Espino, D., Roux, S., Chen, I. A., Palaniappan, K., Ratner, A., Chu, K., Huntemann, M., Reddy, T. B. K., Pons, J. C., Llabres, M., Elloe-Fadrosh, E. A., Ivanova, N. N. & Kyrpides, N. C. IMG/VR v.2.0: an integrated data management and analysis system for cultivated and environmental viral genomes. *Nucleic Acids Res* **47**, D678-D686 (2019).
- 9) Lum, A. G., Ly, M., Santiago-Rodriguez, T. M., Naidu, M., Boehm, T. K. & Pride, D. T. Global transcription of CRISPR loci in the human oral cavity. *BMC Genomics* **16**, 401 (2015).
- 10) Yahara, H., Hiraki, A., Maruoka, Y., Hirabayashi, A., Suzuki, M. & Yahara, K. Shotgun metagenome sequencing identification of a set of genes encoded by Actinomyces associated with medication-related osteonecrosis of the jaw. *PLoS One* **15**, e0241676 (2020).
- 11) Manrique, P., Bolduc, B., Walk, S. T., van der Oost, J., de Vos, W. M. & Young, M. J. Healthy human gut phageome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 10400-10405 (2016).

