



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

病原性微生物ゲノムの分子進化についての研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-01-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉崎, 純夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/79678

氏名（本籍）	吉崎 純夫（岐阜県）
学位の種類	博士（医科学）
学位授与番号	甲第 52 号
学位授与日付	令和 2 年 9 月 25 日
専攻	医療情報学専攻
学位論文題目	病原性微生物ゲノムの分子進化についての研究 (A study on the molecular evolution of pathogenic microbial genomes)
学位論文審査委員	(主査) 教授 田中 香お里 (副査) 准教授 大橋 憲太郎 (副査) 教授 武藤 吉徳

論文内容の要旨

背景： 微生物の中には病原性を示すものが多く知られているが、この病原性はゲノムの変化を伴う進化の過程で獲得されてきたものである。したがって、病原性微生物が進化する経路で積極的に変化してきたゲノムやそれに含まれる遺伝子を同定することができれば、病原性のしくみの解明に大きく貢献できる。従来から、こうしたゲノムの進化的特性を調べるためには、現存生物のゲノムを用いた比較ゲノム解析が用いられてきた。とりわけ、遺伝子の自然選択や組み換えは最も重要な進化の原動力と考えられるため、これらを検出する様々な手法が開発され、病原微生物の解析にも適用されてきた。本研究で着目した*Bacteroides fragilis*はグラム陰性嫌気性菌であり、ヒトの通常の腸内細菌叢の主要構成細菌である。しかし、本菌は腹腔内感染症の主要な病原菌でもあり、その病原性は他の近縁種に比べ著しく強い。一方、アピコンプレクサ門の原虫である*Toxoplasma gondii*は、ヒトに人畜共通感染症を誘発する。これらの病原微生物については、病原因子の探索などの活発な研究が進められてきたが、全ゲノムを用いた自然選択や組み換えの網羅的解析はほとんど行われていない。そこで、本研究では原核微生物として*Bacteroides fragilis*を、そして真核微生物として*Toxoplasma gondii*を選定し、これらが保有する遺伝子の分子進化的特性を明らかにするために、遺伝子レベルでの正の自然選択について詳細に解析した。

結果： 原核微生物である*B. fragilis*では、8つの*Bacteroides*ゲノムすべてに存在する1275個のオルソログ遺伝子（コアゲノム）を特定した。*B. fragilis*へ至る進化経路においては、52個の遺伝子で正の自然選択を検出した。これらの遺伝子は、「Lipid transport and metabolism」、「Intracellular trafficking, secretion and vesicular transport」、「Defense mechanisms」などの多様な機能に関わっていたが、表面/膜に局在するタンパク質をコードする遺伝子が顕著であった。それらの中でTonB dependent receptorなどの細胞表面タンパク質をコードする遺伝子に注目し、正の選択を受けたアミノ酸部位を三次元立体構造上にマッピングした。その結果、正の選択を受けたアミノ酸は、主にタンパク質の細胞外ループに存在することが明らかになった。

真核微生物の*Toxoplasma gondii*は、免疫不全のヒトに感染を引き起こす重要な原虫病原体であることは判明しているが、比較ゲノム解析による遺伝子の分子進化についての詳細な研究はほとんど

ない。本研究では、3種類の*T. gondii*ゲノムと2つの密接に関連する種である*Neospora caninum*および*Hammondia hammondi*ゲノムすべてに存在する5788個のオルソログ遺伝子（コアゲノム）を特定した。Site modelによって5788個のコアゲノム遺伝子の4.5%で正の自然選択が検出された。これら正の自然選択を受けた遺伝子の多くは、*T. gondii*のシグナル伝達に関わっており、宿主-原虫相互作用システムの重要な要因である可能性が示唆された。さらに、9つの*T. gondii*原虫のゲノムを用いて、branch-site modelによって*T. gondii*系統内での正の自然選択を詳細に解析した。*T. gondii*の各系統へ至る進化経路では、2~20の遺伝子が有意な正の選択を受けたことが示された。正の選択を検出した遺伝子によってコードされるタンパク質の多くは、secretory pathogenesis determinants (SPD)をはじめとする*T. gondii*の病原性に強く関わる分泌タンパク質や表面タンパク質であった。次に、正の選択を受けた遺伝子のなかのtoxofilinに注目して、正の選択を受けたアミノ酸部位を三次元立体構造上にマッピングした。その結果、正の選択を受けたアミノ酸は宿主のアクチンと相互作用するヘリックスドメインに位置しており、アクチン結合に重要な役割があることが示唆された。

総括： 本研究で用いた原核生物 (*B. fragilis*) と真核生物 (*T. gondii*) について、それぞれの正の自然選択を受けた遺伝子は様々であったが、両者において病原性に関わる遺伝子の多くが正の選択を受けていた。正の選択を顕著に受けている遺伝子の中には、宿主への侵入、感染に際して機能するタンパク質をコードしているものも多い。こうした研究成果は、微生物の病原性解明へのアプローチの一つとして、比較ゲノム解析による正の自然選択の検出が有効であることを示している。今後、こうした分子進化解析の結果に基づいて実験検証を含めた研究をさらに進めることにより、微生物の病原性についてより詳細な分子機構の解明が期待できる。

論文審査結果の要旨

微生物の病原性は、ゲノムの変化による進化の過程で生じてきた特性である。このため、病原性微生物が進化する経路で急速に変化してきた遺伝子を同定できれば、病原性のしくみ解明に大きく貢献できる。本論文は、こうした観点に基づき、原核微生物として *Bacteroides fragilis* を、そして真核微生物として *Toxoplasma gondii* を選び、これらが保有する遺伝子の分子進化的特性を網羅的に解析し、遺伝子レベルにおける自然選択の特徴と病原性との関わりについて成果をまとめたものである。

従来から、ゲノムの進化的特性を調べるためには、現存生物のゲノムを用いた比較ゲノム解析が用いられてきた。とりわけ、遺伝子の自然選択や組み換えは最も重要な進化の原動力と考えられるため、これらを検出する様々な手法が開発され、病原微生物の解析にも適用されてきた。本研究で申請者が注目した *B. fragilis* はグラム陰性嫌気性菌であり、ヒトの通常の腸内細菌叢の主要構成細菌である。しかし、本菌は多くの腹腔内感染症の原因菌でもあり、その病原性は他の近縁種に比べ著しく強い。一方、アピコンプレクサ門の原虫である *T. gondii* は、ヒトに人畜共通感染症を誘発する。これらの病原微生物については、病原因子の探索などの活発な研究が進められてきたが、全ゲノムを用いた自然選択や組み換えの網羅的解析はほとんど行われていない。

本研究で申請者は、原核微生物である8つの *Bacteroides* ゲノム全てに存在する1275個のオルソログ遺伝子（コアゲノム）を特定した。そして、*B. fragilis* へ至る進化経路においては、52個の遺伝子で正の自然選択を検出した。これらの遺伝子は、Defense mechanisms を代表例とする多様な機能に関わって

いたが、細胞表面に局在するタンパク質をコードする遺伝子が顕著であった。それらの中で TonB dependent receptor などの外膜タンパク質に着目し、正の選択を受けたアミノ酸部位を三次元立体構造上にマッピングした。その結果、正の選択を受けたアミノ酸は、主にタンパク質の細胞外ループに位置しており、外界との相互作用に関与することが明らかになった。

一方、3種類の *T. gondii* ゲノムと2つの密接に関連する種である *Neospora caninum* および *Hammondia hammondi* ゲノムにおいては、5788個のオルソログ遺伝子（コアゲノム）が特定された。Site model によって、5788個のコアゲノム遺伝子の4.5%で正の自然選択が検出された。これら正の自然選択を受けた遺伝子の多くは、*T. gondii* のシグナル伝達に関わっており、宿主-原虫相互作用システムの重要な要因である可能性が示唆された。申請者は、さらに9つの *T. gondii* 原虫のゲノムを用いて、*T. gondii* 系統内における正の自然選択を詳細に解析した。*T. gondii* の各系統へ至る進化経路では、2~20の遺伝子が統計的に有意な正の選択を受けたことが示された。正の選択を検出した遺伝子によってコードされるタンパク質の中には、Secretory pathogenesis determinants (SPD) をはじめとする *T. gondii* の病原性に強く関わる分泌タンパク質や表面タンパク質が多く含まれていることが明らかとなった。次に、正の選択を受けた遺伝子の中の Toxofilin に着目して、正の選択を受けたアミノ酸部位が三次元立体構造上にマッピングされた。その結果、正の選択を受けたアミノ酸は宿主のアクチンと相互作用するヘリックスドメインに位置しており、アクチン結合に重要な役割があることが示唆された。

Bacteroides や *Toxoplasma* による感染症では、宿主とこれら微生物との相互作用が感染初期から重症化に至るまで大きな役割を果たす。申請者の解析結果は、同定された正の選択を受けた遺伝子の多くが、こうした病原菌-宿主間の相互作用に重要であることを強く示している。したがって、申請者の研究によって得られた分子進化的知見は、*Bacteroides* や *Toxoplasma* 感染症のメカニズムの解明及び治療薬の開発に関わる創薬標的の発見に大いに貢献すると期待できる。このような観点から、申請者吉崎純夫の論文は学術的価値が極めて高く、審査の結果、学位論文に値するものと判定した。

最終試験結果の要旨

吉崎氏の学位論文の主要部分は審査付き学術雑誌に公表済みの二編の論文に基づくものであり、本論文が学位論文として完成された内容であることを確認した。

また、公聴会において、学位論文の内容に関する事項、すなわち、遺伝子の分子進化と自然選択の概念、正の選択の検出技法、病原性細菌遺伝子の生物学的機能、研究成果の医療や創薬との関連、さらには今後の研究の展開や将来性などについて諮問を行った。申請者からは十分な内容の回答が得られたので、博士（医科学）の学位に適するものと判断し、最終試験に合格したと判定した。

論文リスト

1. Sumio Yoshizaki, Hiromichi Akahori, Toshiaki Umemura, Tomoyoshi Terada, Yasuhiro Takashima and Yoshinori Muto. Genome-wide analyses reveal genes subject to positive selection in *Toxoplasma gondii*. *Gene*. **699**:73-79, 2019. 【Impact Factor: 2.984】
2. Sumio Yoshizaki, Toshiaki Umemura, Kaori Tanaka, Kunitomo Watanabe, Masahiro Hayashi and Yoshinori Muto. Genome-wide evidence of positive selection in *Bacteroides fragilis*. *Computational Biology and Chemistry*. **52**:43-50, 2014. 【Impact Factor: 1.85】