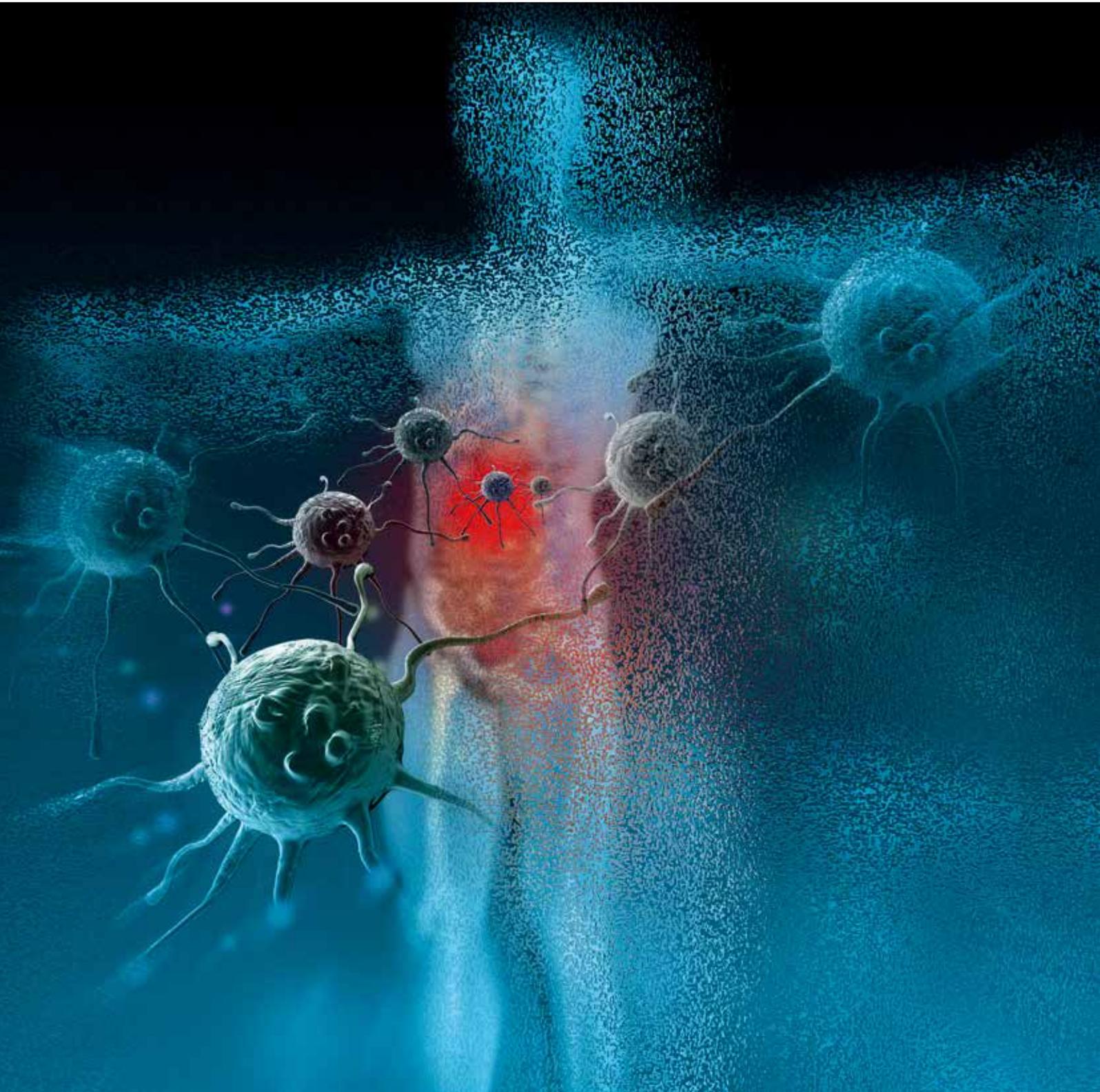


ヒトの健康における 細菌およびメタゲノム

イルミナテクノロジーを使用した最新論文の概要



目次

- 4 はじめに
- 5 ヒト細菌叢
 - 腸の微生物叢
 - 腸内細菌叢と疾患
 - 炎症性腸疾患 (IBD)
 - 代謝性疾患：糖尿病と肥満症
 - 肥満症
 - 口腔細菌叢
 - その他のヒトバイオーム
- 25 バイロームとヒトの健康
 - ウイルス集団
 - ウイルス性動物由来感染症の保有宿主
 - DNA ウイルス
 - RNA ウイルス
 - ヒトのウイルス病原体
 - ファージ
 - ウイルスワクチン開発
- 44 微生物病原論
 - ヒトの健康に重要な微生物
 - 抗菌耐性
 - 細菌ワクチン
- 54 微生物集団
 - アンプリコンシーケンス：16S リボソーム RNA
 - メタゲノムシーケンス：全ゲノムショットガンメタゲノミクス
 - 真核生物
 - シングルセルシーケンス (SCS)
 - プラスミドーム
 - トランスクリプトームシーケンシング
- 63 用語解説
- 64 参考文献一覧

本書では、免疫学研究においてイルミナテクノロジーを利用できることを実証する最近の発表に焦点を当てています。プラットフォームおよびアッセイについての詳細は、jp.illumina.com をご覧ください。

はじめに

ヒトの健康における細菌の研究はこれまで、患者の病原体を同定し、通常、抗菌薬で治療することに焦点を当てて行われてきました。抗菌薬に対する耐性と世界の人口密度（移動の自由）の上昇によって、そのアプローチには変化が迫りつつあります^{1,2,3}。さらにパワフルになった高スループットのシーケンスは次世代シーケンス（NGS）とも呼ばれ、ヒトの健康における細菌を調べるための総合的なアプローチを可能にします。

ヒトの体内や体表面には、自身の細胞を圧倒的に上回る数の細菌が生息しています⁴。これらの微生物細胞がヒトの細菌叢を構成しています。ヒトの細菌叢のメンバー、つまり共通する遺伝子および機能を明らかにすることにより、ヒトの健康と疾患に関わる微生物コミュニティの役割が定義されます。高スループットのシーケンステクノロジーに基づいた強力な解析ツールを利用することによって初めて、この目標を実現することができます⁵。

急成長を遂げる科学分野のひとつであるメタゲノミクスは、世界規模で生活の質を改善する中心的ツールになりつつあります。最初は、培養のできない微生物の集合ゲノムとして捉えられていた⁶メタゲノミクスは、現在では、高スループットのDNAシーケンスを行って、ラボで細菌を培養することなく微生物コミュニティの分類（「どのような細菌がそこにいるのか」）と機能（「細菌が何をしているのか」）のプロファイルを提供しています⁷。ラボで培養可能な細菌は2%未満と推定されています⁸。原核生物、真核生物、またはウイルスであれ、これまで解明されなかった98%の細菌を同定することが急速に可能になり、微生物学の分野を根本的に変え、活気をもたらしています。

本書では、イルミナのシーケンステクノロジーを利用したメタゲノミクス研究に関する最新の文献をクローズアップしています。

総説

“微生物ゲノムにシーケンステクノロジーを利用すれば、患者の治療法を改善し、公衆衛生を高めることができるだろう。実現可能性とコストはクリアしている。” – Peacock 2014⁹

1. Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., et al. (2015) The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect* 6: 22-29
2. Shallicross L. J., Howard S. J., Fowler T. and Davies S. C. (2015) Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370: 20140082
3. Sharland M., Saroey P. and Berezin E. N. (2015) The global threat of antimicrobial resistance - The need for standardized surveillance tools to define burden and develop interventions. *J Pediatr (Rio J)* 91: 410-412
4. National Institutes of H. (2012) NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body. 2015: www.nih.gov/news/health/jun2012/nhgri-13.htm; accessed September 29, 2015
5. Cho I. and Blaser M. J. (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 13: 260-270
6. Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J. and Goodman R. M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5: R245-249
7. Franzosa E. A., Hsu T., Sirota-Madi A., Shafquat A., Abu-Ali G., et al. (2015) Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 13: 360-372
8. Wade W. (2002) Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. *Journal of the Royal Society of Medicine* 95: 81-83
9. Peacock S. (2014) Health care: Bring microbial sequencing to hospitals. *Nature* 509: 557-559

ヒト細菌叢

ヒトの細菌叢には、真核生物、古細菌、細菌、ウイルスなど人体に関連する微生物群集が含まれます¹⁰。2008年に米国立衛生研究所（NIH）が共同基金でヒトマイクロバイオームプロジェクトを立ち上げ、その資金でヒト細菌叢の総合的な特性付けを可能にし、健康と疾病における細菌叢の役割を分析しました¹¹。この取り組みにより、人体の口腔、消化管、皮膚、膣などさまざまな部位の細菌叢について、微生物コミュニティの特徴を得ることができました。並行して、疾患の状態に関連した複数のバイオームについて特性評価も行われ、疾患発症における細菌叢の乱れが与える影響に焦点が当てられました¹²。動物に関連した細菌叢についても、動物の健康を改善し、ヒトと環境との相互作用を理解するための特徴付けが進められています¹³。

10. Human Microbiome Project C. (2012) A framework for human microbiome research. *Nature* 486: 215-221
11. Foxman B. and Rosenthal M. (2013) Implications of the human microbiome project for epidemiology. *Am J Epidemiol* 177: 197-201
12. Morgan X. C., Segata N. and Huttenhower C. (2013) Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet* 29: 51-58
13. Penders J., Stobberingh E. E., Savelkoul P. H. and Wolfs P. F. (2013) The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front Microbiol* 4: 87

総説

DeWeerd S. (2015) Microbiome: Microbial mystery. *Nature* 521: S10-11

Franzosa E. A., Hsu T., Sirota-Madi A., Shafquat A., Abu-Ali G., et al. (2015) Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 13: 360-372

Koch L. (2015) Metagenomics: Shaping the gut microbiome. *Nat Rev Genet* 16: 2

Preidis G. A. and Hotez P. J. (2015) The newest "omics" --metagenomics and metabolomics-- enter the battle against the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003382

Zhou J., He Z., Yang Y., Deng Y., Tringe S. G., et al. (2015) High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *MBio* 6:

Fricke W. F. and Rasko D. A. (2014) Bacterial genome sequencing in the clinic: bioinformatic challenges and solutions. *Nat Rev Genet* 15: 49-55

Lasken R. S. and McLean J. S. (2014) Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nat Rev Genet* 15: 577-584

Peacock S. (2014) Health care: Bring microbial sequencing to hospitals. *Nature* 509: 557-559

参考文献

Franzosa E. A., Morgan X. C., Segata N., Waldron L., Reyes J., et al. (2014) Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2329-2338

ほぼすべての細菌叢研究では、専門の職員によって特定の施設でサンプルを採取する必要があるため費用がかさみ、研究対象が狭められる場合があります。著者らは、便と唾液のサンプルを自己採取し、採取から24時間以内に冷凍配送するプロトコルを開発しました。著者らは、メタゲノムとメタトランスクリプトーム解析を使用して、他の2つのサンプル処理法と比較した、本プロトコルの精度および実現可能性を評価しました。遺伝子、菌種、および転写レベルで3つの方法すべてに被験者内の強い相関性がみられ、開発したプロトコルがメタゲノムプロファイルへの影響が少ないことを示しました。便サンプルに共生していた口腔細菌の存在量と転写レベルが低下したため、消化管に移行する口腔細菌は一定ではなく、消化管生態学における役割はないことが示唆されました。総じて、この研究では細菌叢研究における両アプローチの相補性に焦点を当てながら、頑健な自己採取法を提示し、メタトランスクリプトームとメタゲノムとの関係を区別しています。

イルミナ技術: HiSeq

Lax S., Smith D. P., Hampton-Marcell J., Owens S. M., Handley K. M., et al. (2014) Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 345: 1048-1052

ヒトは特定の微生物コミュニティと共存しています。このような住宅は、室内に生息する微生物のプロファイルと住人への影響をモニターするのに利用できます。Home Microbiome Project では、16S rRNA V4 アンプリコンシーケンスを行って皮膚と住宅の微生物コミュニティをモニターしました。新居への引っ越し前後をモニターした 3 家族を含め、全 10 戸を 6 週間モニターしました。居住者がこれら細菌叢の主因だったため、微生物コミュニティは各住宅 / 家族のペアに特異的であり、引っ越し直後に同じ微生物コミュニティが居住家族に確認されています。遺伝的関連性のある個人では細菌叢にわずかな違いがみられましたが、共通のエリアを共有する遺伝的関連性のない個人では大きな違いを示しました。ショットガンメタゲノムシーケンスを行った結果、特定の居住者にみられた病原菌および病原性遺伝子が、キッチンカウンターの表面にはほとんど存在しないことが明らかになりました。この研究では、ヒトと環境との相互作用、およびこの関係が健康状態に及ぼす影響をクローズアップしています。

イルミナ技術 : Nextera XT DNA Library Prep Kit, HiSeq 2000, MiSeq

腸の微生物叢

腸では、宿主が提供する食物から、微生物叢は栄養分を作り出し、宿主に届けます。この共生関係によって、日和見病原体も瀬戸際で食い止められます。微生物叢の組成は、遺伝性¹⁴、分娩様式¹⁵、食事^{16, 17}、地理的条件^{18, 19}、年齢²⁰、および運動さえも関係する多数の要因に影響されるため個人間でばらつきがあります²¹。この複雑な微生物バイオームは、免疫系^{22, 23, 24}、糖尿病²⁵、アテローム硬化症²⁶、および生体異物との相互作用などヒトの健康に関する数多くの生物学的側面に影響を与えています²⁷。



腸では、宿主が提供する食物から、微生物叢は栄養分を作り出し、宿主に届けます。

食事および現代の加工食品は、予測できない方法で細菌叢と代謝の経路を変化させることがあります。例えば、特定の人工甘味料はマウスの腸管を乱れさせ、耐糖能を減少させます²⁸。ヒトの結腸直腸がん発症前または発症時にも、微生物叢組成に重要な変化が生じている可能性があります。これらの変化が診断と疾患管理の潜在的なバイオマーカーとなれば、腸の微生物叢の特性を強調することができます²⁹。細菌種、遺伝子 / 経路を同定し、臨床的変数に関連する推測をサポートする、さまざまなバイオインフォマティクスツールが開発されています³⁰。

14. Goodrich J. K., Waters J. L., Poole A. C., Sutter J. L., Koren O., et al. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159: 789-799
15. Dominguez-Bello M. G., Costello E. K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., et al. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11971-11975
16. Veiga P., Pons N., Agrawal A., Oozeer R., Guyonnet D., et al. (2014) Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. *Sci Rep* 4: 6328
17. Wu G. D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y. Y., et al. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334: 105-108
18. Nakayama J., Watanabe K., Jiang J., Matsuda K., Chao S. H., et al. (2015) Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep* 5: 8397
19. Schnorr S. L., Candela M., Rampelli S., Centanni M., Consolandi C., et al. (2014) Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 5: 3654
20. Yatsunenkov T., Rey F. E., Manary M. J., Trehan I., Dominguez-Bello M. G., et al. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222-227
21. Lambert J. E., Myslicki J. P., Bomhof M. R., Belke D. D., Shearer J., et al. (2015) Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 40: 749-752
22. Erny D., Hrabě de Angelis A. L., Jaitin D., Wieghofer P., Staszewski O., et al. (2015) Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18: 965-977
23. Kamada N., Seo S. U., Chen G. Y. and Nunez G. (2013) Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 13: 321-335
24. Kamada N. and Nunez G. (2013) Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells. *J Immunol* 190: 1389-1395
25. Markle J. G., Mortin-Toth S., Wong A. S., Geng L., Hayday A., et al. (2013) gamma-delta T cells are essential effectors of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model. *J Immunol* 190: 5392-5401
26. Org E., Mehrabian M. and Lusis A. J. (2015) Unraveling the environmental and genetic interactions in atherosclerosis: Central role of the gut microbiota. *Atherosclerosis* 241: 387-399
27. Kim D. H. (2015) Gut Microbiota-Mediated Drug-Antibiotic Interactions. *Drug Metab Dispos* 43: 1581-1589
28. Suez J., Korem T., Zeevi D., Zilberman-Schapira G., Thaiss C. A., et al. (2014) Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 514: 181-186
29. Feng Q., Liang S., Jia H., Stadlmayr A., Tang L., et al. (2015) Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun* 6: 6528
30. Nayfach S., Fischbach M. A. and Pollard K. S. (2015) MetaQuery: a web server for rapid annotation and quantitative analysis of specific genes in the human gut microbiome. *Bioinformatics*

総説

Dietert R. R. and Silbergeld E. K. (2015) Biomarkers for the 21st century: listening to the microbiome. *Toxicol Sci* 144: 208-216

Gritz E. C. and Bhandari V. (2015) The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Front Pediatr* 3: 17

Koch L. (2015) Metagenomics: Shaping the gut microbiome. *Nat Rev Genet* 16: 2

Candela M., Turrone S., Biagi E., Carbonero F., Rampelli S., et al. (2014) Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol* 20: 908-922

Genit M. C., Matzaraki V., Tigchelaar E. F. and Zhernakova A. (2014) Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1842: 1981-1992

Salazar N., Arboleya S., Valdes L., Stanton C., Ross P., et al. (2014) The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front Genet* 5: 406

Walker A. W., Duncan S. H., Louis P. and Flint H. J. (2014) Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends Microbiol* 22: 267-274

参考文献

[Feng Q., Liang S., Jia H., Stadlmayr A., Tang L., et al. \(2015\) Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun* 6: 6528](#)

良性ポリープは緩徐に結腸直腸がんに移行しますが、疾患の進行過程で腸に起こる細菌叢の変化については十分に理解されていません。腺腫およびがんの患者群と健常者の対照群から便サンプルを採取して行った全メタゲノム関連研究では、各グループに多く含まれる細菌、遺伝子および機能を評価しました。腸の細菌叢において、健康状態から進行性のがんへ移行する中で、特異的な桿菌が増加するなど腫瘍に関連する大きな変化が観察されました。著者らは、疾患の潜在的なバイオマーカーとして、がんのサンプルに多く含まれる特異的な遺伝子マーカーを同定しました。野菜と比べて赤身肉の消費量が多いと、疾患を発症する危険性が高まります。これは、大腸でアミノ酸を分解することで腸の環境を良好にするのとは反対の細菌が増殖するためです。同様に、対照群のサンプルに豊富に含まれる乳酸は、大腸でアミノ酸の分解を阻害し、潜在的な病原菌を抑制することがあり、腸内環境を育てるのに貢献しています。

イルミナ技術: HiSeq 100 bp ペアエンド (PE) リード



小腸ポリープ。

[Martinez I., Stegen J. C., Maldonado-Gomez M. X., Eren A. M., Siba P. M., et al. \(2015\) The gut microbiota of rural papua new guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Rep* 11: 527-538](#)

腸の細菌叢は生活スタイル、食事などの因子に左右され、これらの因子が変化することで健康障害をもたらされることがあります。16S V5 rRNAのアンプリコンシーケンスを使用して、パプアニューギニア地方 (PNG、発展途上国) および米国 (西洋化) の住人から便サンプルを採取しコミュニティの違いを評価しました。PNG および米国の住人は、核となる大半のファイロタイプは共有していましたが、各集団に特異的な細菌叢のサインにかなりの違いがありました。PNG の細菌叢の特徴は、細菌を均質化する分散過程にあり、個体間変動がより小さくなり、細菌の多様性および存在量は大きくなります。また、この集団に特有の細菌種が存在しました。著者らは、細菌叢の差は集団の異質性と、発展途上国の細菌叢に発見された、細菌の分散過程を制限する西洋化社会に用いられた衛生基準によることであると示唆しています。さまざまな要因の組み合わせが観察された差に寄与していると考えられます。

イルミナ技術: MiSeq



パプアニューギニア人は、先進国社会で発見された微生物とは区別される特徴的かつ多様な腸内微生物を有しています。

Obregon-Tito A. J., Tito R. Y., Metcalf J., Sankaranarayanan K., Clemente J. C., et al. (2015) Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. Nat Commun 6: 6505

16S V4 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスとメタゲノムシーケンスを行って、ペルーの伝統的な2集団（狩猟採集民と農村地域）および典型的な米国地域を比較しました。伝統的なコミュニティは両方とも、米国コホートより微生物の多様性がより高くなっていました。離れた地域の類似した集団から得た利用可能なデータからも、これらの所見は裏付けられ、伝統的地域の細菌叢と先進国の細菌叢との明確な区別が示されています。農村コミュニティには、糖質のメタボライザー *T. succinifaciens* に類似した非病原性のトレポネーマが豊富にありました。古代の細菌叢と他の伝統的集団に同様の報告がみられ、これらの細菌は西洋化により失われることがありますが、潜在的な代謝機能により伝統的集団に残っていると示唆されます。

イルミナ技術：Nextera DNA Library Prep Kit、HiSeq v4

Arthur J. C., Gharaibeh R. Z., Muhlbauer M., Perez-Chanona E., Uronis J. M., et al. (2014) Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. Nat Commun 5: 4724

結腸直腸がんにおける微生物叢、炎症、および病理の複雑な関係は未だによくわかっていません。16S V6 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスとRNA-Seqを行って、無菌インターロイキン10^{-/-}マウスから作成した大腸炎モデルマウスにおける腸内の微生物組成を定義しました。著者らは、炎症-感受性の遺伝的背景において、*E. coli* により誘発された結腸直腸がんの発症には必ず炎症が生じていたことを示しました。このモデルでは、どのような腸環境が微生物の遺伝子発現を変化させることができるのか、どのような炎症が *E. coli* により誘発されたがんの決定因子であるのかについて説明しています。

イルミナ技術：TruSeq RNA Library Prep Kit v2、HiSeq 2000

Goodrich J. K., Waters J. L., Poole A. C., Sutter J. L., Koren O., et al. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. Cell 159: 789-799

宿主の遺伝性、腸の細菌叢、および代謝パターンの相互作用は疾患と肥満に影響を与えることがあります。この相互関係を定義することは、疾患の予防、診断、および治療に新たな道を開く可能性があります。成人の双子ペア416名から自己採取した便サンプルで16S V4 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行いました。特異的な微生物叢メンバーの存在量は、宿主の遺伝性に左右されました：分類群の存在量は、一卵性ペアのほうが、二卵性ペアより関連性がありました。著者らは、他の遺伝的な細菌およびメタン生成アーキアと共存するネットワークを形成している極めて遺伝的な細菌の分類群 (*Christensenellaceae*) を発見しました。これらのネットワークは、体重が低い個人に豊富に存在していました。肥満の細菌叢に *Christensenellaceae minuta* を導入した後、無菌マウスに移植すると、レシピアントの体重増加が抑えられ、コミュニティの多様性に安定した変化を獲得しました。

イルミナ技術：MiSeq 250 bp PEリード

Hsiao A., Ahmed A. M., Subramanian S., Griffin N. W., Drewry L. L., et al. (2014) Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature* 515: 423-426

伝染性病原菌を原因とする下痢またはその後の腸内微生物叢の変化については十分な特徴付けがされていいため、回復または易感染の原因も十分理解されないままです。*V. cholerae*による下痢の、およびその下痢から回復しつつあるバングラデシュの成人から便サンプルを採取し、16S V4 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスとメタゲノム解析を実施した結果を調べました。回復中にある微生物叢組成は、バングラデシュの健康な小児に発見された定着パターンと一致しています。ノトバイオームマウスに回復中の微生物叢の便を移植すると、幼児の微生物叢の確立と *V. cholerae* による下痢からの回復に関連する *Ruminococcus oleum* が、クオラムセンシング自己誘導因子 2 のメカニズムおよび新規の調節経路により *V. cholerae* のコロニー形成を制限できたことが明らかになりました。著者らは、採取した微生物叢のデータの価値に焦点を当て、腸管病原菌によるコロニー形成を制限するメカニズムを特定しています。

イルミナ技術: MiSeq 250 bp PE リード、Genome Analyzer_{IIx}、HiSeq 2000



コレラは古代からガンジス川デルタ地帯に蔓延しています³¹。

Integrative H. M. P. R. N. C. (2014) The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell Host Microbe* 16: 276-289

ヒトマイクロバイオームプロジェクト (HMP) は、プロトコール、バイオインフォマティクスパイプライン、およびデータを多数作成しました。Integrative HMP (iHMP) リサーチネットワークコンソーシアムは第 2 期 HMP を実施し、細菌叢および宿主の変化を 3 年間にわたりモニタリングすることで、細菌叢 - 宿主の相互作用を理解することを目標としています。i) 妊娠、ii) 腸疾患の発症 (炎症性腸疾患 (IBD) モデル)、iii) 呼吸器ウイルス感染症および 2 型糖尿病の発症、に焦点を当てた 3 つの長期的研究を行って、系統的組成 (アンプリコンシーケンスおよびショットガンシーケンス) およびオミックスアプローチ (トランスクリプトーム、プロテオーム) から得られる機能的データが作成されます。

イルミナ技術: イルミナのプラットフォームは本研究に使用されます。

Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., et al. (2014) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32: 834-841

複数の腸内細菌叢の研究により大規模な遺伝子データセットが作成されています。標準遺伝子の世界的な代表カタログを作成するためにデータを統一することは、腸内微生物叢の包括的研究を可能にすると考えられます。ヒトの腸内細菌叢の遺伝子 9,879,896 から成る重複のないカタログが、新たにシーケンスしたサンプル 249、MetaHit からのサンプル 1018、HMP および糖尿病試験、さらに腸の細菌および古細菌のゲノムシーケンス 511 を組み合わせで作成されました。遺伝子の統合的カタログ (IGC) は、マッピングの成功事例および最近の研究データによるメタトランスクリプトームとメタゲノムとの相関性により検証を行いました。IGC は、中国およびデンマークのコホートで地方に特異的な腸内細菌叢のサインを実証するのに使用され、その有用性に焦点を当てて集団にわたるさまざまな特性を明らかにしています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx} および過去に行った研究からイルミナが作成したデータ

Moeller A. H., Li Y., Mpoudi Ngole E., Ahuka-Mundeki S., Lonsdorf E. V., et al. (2014) Rapid changes in the gut microbiome during human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16431-16435

ヒトの腸内微生物叢の進化の歴史は、ヒト以外の霊長類の細菌叢研究で説明することができます。16S V4 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行って、アフリカのさまざまな類人猿 (チンパンジー、ボノボ、およびゴリラ) の腸内細菌叢の特徴付けを行いました。この情報を利用して、細菌叢の変化の再構築を通し祖先集団から現在のヒト細菌叢の進化の分岐モデルを作成しました。アフリカ類人猿の腸内細菌叢は、多様化の際にゆっくりとした組成変化をたどりましたが、ヒトと比較すると非常に多様です。著者らは、ヒトは分岐速度が加速度的になるのに従い、動物性の食事への適応として微生物叢の多様性を失ったことが特徴的であると提案しています。

イルミナ技術: MiSeq

31. Sack D. A., Sack R. B., Nair G. B. and Siddique A. K. (2004) Cholera. *Lancet* 363: 223-233



葉を食べるマウンテンゴリラ (*Gorilla gorilla berengeii*) Park du Volcanes、ルワンダアフリカ猿人類はヒトの進化における腸内細菌叢のモデルとして利用されています。

Rosser E. C., Oleinika K., Tonon S., Doyle R., Bosma A., et al. (2014) Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. Nat Med 20: 1334-1339

制御性 B (B_{reg}) 細胞はインターロイキン (IL) -10 を放出して過剰な免疫応答を抑制します。これらの細胞は炎症を見分けますが、このプロセスに関与するシグナルの範囲は不明です。著者らは、腸内細菌叢を除去するために、マウスに抗菌薬を投与しました。マウスの抗原誘発関節炎は軽度まで回復し、免疫細胞および炎症誘発性サイトカインの数は減少しました。Breg 細胞の機能と分化が低下すると共に、同様の乱れが脾細胞および腸間膜リンパ節に見られました。関節炎誘発モデルにおいて、炎症誘発性サイトカインの IL-1 β および IL-6 は、従来の飼育マウスで産生されましたが、無菌の飼育動物では産生されませんでした。このようなサイトカインは Breg 細胞の分化および IL-10 の産生を促進し、それらのシグナルは腸内細菌叢と関節炎に反応して産生されます。著者らは、IL-1 β 、IL-6、および th17 の分化は Breg 細胞の分化に要するシグナルでもあると示唆しています。加えて、共生細菌叢の中の小さな変化がこのような動態の陰で炎症誘発性反応および制御反応の両方に寄与しています。

イルミナ技術: MiSeq 250 bp ペアエンド (PE) リード

Schwab C., Berry D., Rauch I., Rennisch I., Ramesmayer J., et al. (2014) Longitudinal study of murine microbiota activity and interactions with the host during acute inflammation and recovery. ISME J 8: 1101-1114

大腸炎発症後の腸内細菌叢の機能的変化および回復パターンについては詳細に調査されていません。メタトランスクリプトーム、16S rRNA アンプリコンシーケンス、および宿主マーカーを使用して、急性炎症時の腸内細菌叢の変化と、デキストラン硫酸ナトリウムで誘発したマウス大腸炎モデルの回復をモニターしました。腸内バランスの善しい乱れが急性大腸炎で観察され、その後、元の微生物叢組成が徐々に戻ってきました。しかし、微生物叢の遺伝子発現が、乱れに素早く反応し、すぐに回復するようでした。宿主の炎症マーカーは急性大腸炎、共生するクロストリジウム鞭毛遺伝子の転写減少、およびムチン分解に関連する転写増加に相関していました。著者らは、腸内細菌叢は回復力に優れており、一時的な微生物叢のバランス異常をもたらす共生細菌の鞭毛に対して、炎症が免疫応答を誘発すると提案しています。

イルミナ技術: HiSeq

Suez J., Korem T., Zeevi D., Zilberman-Schapira G., Thaiss C. A., et al. (2014) Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. Nature 514: 181-186

ノンカロリー甘味料 (NAS) は低カロリーのため広く使用されており、そのほとんどは宿主で胃腸管を未消化で通過し、腸内の微生物叢に直接届きます。16S V2 rRNA アンプリコンシーケンスおよびショットガンメタゲノム解析を行って、小規模なヒトコホートの便サンプルを解析し、マウスには別の NAS を与えました。マウスは長期間 NAS に曝露した後、耐糖能障害を発症しました。ヒトは腸内微生物叢組成の変化にわずかに血糖反応を示しました。耐糖能は便移植で元に戻し、抗菌剤治療で無菌にしました。微生物叢組成の変化と存在量が、NAS が誘発する耐糖能において腸内バランス異常に寄与していることをさらに確認しました。グリカン分解経路が NAS を与えたマウスに過剰に存在しており、これがエネルギー回収を高め、グルコースと脂質を新規合成する先駆物質の産生増加の原因となったようでした。著者らは、ヒトに及ぼす NAS の影響を再考する必要があると強調しています。

イルミナ技術: MiSeq, HiSeq

Wang J., Linnenbrink M., Kunzel S., Fernandes R., Nadeau M. J., et al. (2014) Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2703-2710

特異的な腸内微生物叢のサインを分類群によって特徴付けるエンテロタイプは未だに議論されています。16S V1 および V2 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス、ショットガンメタゲノムシーケンス、および食事の再構築を行って、飼育マウスでエンテロタイプを評価しました。著者らは、ヒトと他の哺乳動物で特定されたものと類似する2つのクラスターを同定しました。このクラスターは、植物由来および食肉由来に関連する炭水化物とタンパク質の代謝経路に関わる遺伝子転写の違いを示しました。しかし、エンテロタイプの分類は食事の変化ですぐに変わりました。さらに、野生マウスにおいて、異なる環境設定に関連する変化および採餌歴の再構築から、エンテロタイプ様クラスターが食事に大きく影響されることが明らかになりました。

イルミナ技術: HiSeq 2000 100 bp PE リード

腸内細菌叢と疾患

最近では、個人の細菌叢の変化（または腸内バランス異常）と临床上重要な異なる疾患とを結び付ける研究がいくつか行われています。急性の移植片対宿主病における新たな役割の可能性を含め、腸内細菌叢は、慢性炎症から感染症まで、健康および疾患に関する広範囲な役割を担っています³²。

腸内微生物叢の回復は、腸のバランス異常に対処する有望な代替療法であり³³、腸疾患後の正常な微生物遷移と類似します³⁴。院内関連の感染症を繰り返し起こす原因である *Clostridium difficile* 大腸炎は、抗菌薬関連の腸内バランス異常について十分に特徴付けられたモデルです。腸内バランス異常の特徴は分類群の多様性が減少することであり、*C. difficile* が抑制されず増殖する原因となります。微生物層が良好に回復すると、再び *C. difficile* の増殖を抑えることができます³⁵。

特異的な細菌叢のサイン、オーダーメイドの治療法、新たな抗菌薬の開発、標的食事療法、個人のバイオームのプロファイリングに関連する診断テストの開発は、将来的に、個別化医療のツールになる可能性があります。オミックスアプローチ法を併用した解析によって同定された新世代の無毒の低分子が、疾患に関連する経路や代謝を妨げる可能性があります^{36, 37, 38, 39}。

総説

Gritz E. C. and Bhandari V. (2015) The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Front Pediatr* 3: 17

Shono Y., Docampo M. D., Peled J. U., Perobelli S. M. and Jenq R. R. (2015) Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 101: 428-437

32. Chen Y., Zhao Y., Cheng Q., Wu D. and Liu H. (2015) The Role of Intestinal Microbiota in Acute Graft-versus-Host Disease. *J Immunol Res* 2015: 145859
33. Zanella Terrier M. C., Simonet M. L., Richard P. and Frossard J. L. (2014) Recurrent *Clostridium difficile* infections: the importance of the intestinal microbiota. *World J Gastroenterol* 20: 7416-7423
34. David L. A., Weil A., Ryan E. T., Calderwood S. B., Harris J. B., et al. (2015) Gut microbial succession follows acute secretory diarrhea in humans. *MBio* 6: e00381-00315
35. Singh R., Nieuwdorp M., ten Berge I. J., Bemelman F. J. and Geerlings S. E. (2014) The potential beneficial role of faecal microbiota transplantation in diseases other than *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 20: 1119-1125
36. Wikoff W. R., Anfora A. T., Liu J., Schultz P. G., Lesley S. A., et al. (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3698-3703
37. Rath C. M. and Dorrestein P. C. (2012) The bacterial chemical repertoire mediates metabolic exchange within gut microbiomes. *Curr Opin Microbiol* 15: 147-154
38. Jacobsen U. P., Nielsen H. B., Hildebrand F., Raes J., Sicheritz-Ponten T., et al. (2013) The chemical interactome space between the human host and the genetically defined gut metabolites. *ISME J* 7: 730-742
39. Jia W., Li H., Zhao L. and Nicholson J. K. (2008) Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 7: 123-129

参考文献

Buffie C. G., Bucci V., Stein R. R., McKenney P. T., Ling L., et al. (2015) Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517: 205-208

Clostridium difficile は、抗菌薬によって入院患者が下痢を起こす主な原因です。しかし、*C. difficile* のコロニー形成に対する感受性または耐性に関与する細菌は知られていません。ターゲットにした無菌状態の腸内微生物層と組み合わせる 16S V4-V5 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行って、マウスで *C. difficile* のコロニー形成におけるさまざまな細菌集団の役割を評価しました。ヒトとマウスに共通する二次胆汁酸合成に関わる菌種 *C. scindens* が *C. difficile* 感染に対する耐性と関連していました。マウスにヒト由来 *C. scindens* を追加すると耐性が強化され、二次胆汁酸の合成との相関性がみられたことで、*C. difficile* 抑制の機能的役割が明らかになりました。この方法により、豊富な腸内微生物叢の中から、*C. difficile* を抑制することができた細菌を 1 つ同定しました。複雑な微生物叢の相互作用に固有の生物学的側面を踏まえて、便移植、微生物操作、および最初の抗菌薬アプローチで使用する可能性を考慮します。

イルミナ技術: TruSeq DNA Library Prep Kit, MiSeq

He B., Nohara K., Ajami N. J., Michalek R. D., Tian X., et al. (2015) Transmissible microbial and metabolomic remodeling by soluble dietary fiber improves metabolic homeostasis. *Sci Rep* 5: 10604

まだ完全には特性が得られていない健康効果を促進させることで、食事管理により代謝性疾患を改善することができます。マルトデキストリン (RM) のように消化されにくい植物由来繊維は、糖および脂質のホメオスタシスを改善し、体重増加を抑制するのに役立ちます。著者らは、16S V4 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行って、肥満マウスに RM を与え、耐糖能におけるその効果を実験し、腸内微生物叢の変化をモニターしました。RM は空腹時血糖値を低下させることで血糖コントロールを改善しました。RM は、有益な細菌 (乳酸桿菌およびビフィズス菌) の存在量を増やし、脂肪に関連する細菌 (*Alistipes*) を減少させることで有益な腸内微生物叢のリモデリングを誘導しました。コレステロールおよび糖の代謝改善といった代謝性の変化を伴う、RM によりリモデリングされた腸内細菌叢の正の効果が、便移植によって実証されました。この研究は RM の根底にある有益な効果の機序に注目しています。

イルミナ技術: MiSeq 250 bp PE リード, CASAVA v1.8.3

Weingarden A., Gonzalez A., Vazquez-Baeza Y., Weiss S., Humphry G., et al. (2015) Dynamic changes in short- and long-term bacterial composition following fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Microbiome* 3: 10

便移植によって、抗菌薬に抵抗性を示す再発性 *C. difficile* 感染症患者の腸内微生物叢を回復させることができます。便移植の安定的および持続的な効果については、その利用頻度が増しているにもかかわらず、取り組まれてきませんでした。16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行って、便移植によって *C. difficile* を治療した患者の腸内微生物叢の変化を、治療後、最長 151 日間モニターしたところ、重度の腸内バランス異常から、HMP で確立した健常者のコホートに類似する細菌叢へと、微生物組成が変化しました。便移植では、レシピエントの腸内微生物叢はドナーのものに類似していましたが、治療を受けた各個人で経時的に相違が生まれました。著者らは、それぞれ交互にかつ経時的に続いた変わりやすい微生物の極めてダイナミックな変化の様子を示しました。頻繁にサンプリングを行い、高スループットの手法で腸内細菌叢を綿密にモニタリングして初めて、このようなサーベイルランスが得られます。

イルミナ技術: MiSeq v3 150 bp PE リード

Yin J., M P., Wang S., Liao S. X., Peng X., et al. (2015) Different Dynamic Patterns of beta-Lactams, Quinolones, Glycopeptides and Macrolides on Mouse Gut Microbial Diversity. *PLoS One* 10: e0126712

経口抗菌薬は、院内および院外で一般的に使用されています。これらの化合物は、腸内微生物叢に取り込まれ、明確な効果がありますが、まだ、固有の乱れについての詳細は、さらに調査が必要です。16S V6 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行って、一般的に使用される 6 種類の抗菌薬を BALB/c マウスに投与し、引き起こされる腸内の微生物変化をモニターしました。セフトリアキソンナトリウム、セフォバロザン / スルバクタム、メロペネムおよびバンコマイシンは急速かつ劇的な変化をもたらしました。アジスロマイシンは検出可能な変化を生じ、オフロキサシンの効果はごくわずかでした。β ラクタム系は *Alistipes* を抑制して、クロストリジウムの増殖に著効しました。クロストリジウムは、β ラクタム使用後の *C. difficile* 感染症の発症に影響することがあります。一方、バンコマイシンは *E. coli* の増殖に著効し、クロストリジウムを抑制しました。最後に、アジスロマイシンおよびメロペネムは *Enterococcus* の増殖を誘発しました。この研究での焦点である注目される腸内微生物叢に一般的に使用される抗菌薬は、微生物コミュニティに迅速に起こり、持続的な効果をもたらすことができます。

イルミナ技術: TruSeq DNA Library Prep Kit, HiSeq 2000 100 bp PE リード

Lukens J. R., Gurung P., Vogel P., Johnson G. R., Carter R. A., et al. (2014) Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease. Nature 516: 246-249

炎症性疾患はここ数年間で増加してきており、食習慣の変化が、疾患発生の原因になることがあるという裏付けがあります。この研究で著者らは、マウス骨髄炎モデル (*Pstpip2^{cmo}*) および 16S V4 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行って、炎症性疾患に対する食事の影響を評価しました。骨髄炎マウスは、プレボテラの存在量が豊富でした。骨髄炎を食事で予防したところ、好中球の pro-IL-1 β の発現が減少しました。この研究では、マウス骨髄炎モデルにおいて食事を変えることで炎症を制限することができ、それゆえ炎症性疾患と腸内微生物叢の相互作用に寄与することができることを示しています。

イルミナ技術：MiSeq

Morgan A. P., Crowley J. J., Nonneman R. J., Quackenbush C. R., Miller C. N., et al. (2014) The antipsychotic olanzapine interacts with the gut microbiome to cause weight gain in mouse. PLoS One 9: e115225

オランザピンは統合失調症、双極性障害、およびその他の精神病の治療に処方されます。しかし、この薬を処方されている患者の体重は、まだ解明されていない機序によって劇的に増加します。16S v4 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行って、オランザピンを投与したマウスの微生物変化を調査しました (クロスオーバー実験デザイン)。高脂肪食 (HFD) のもと、8 種類の異なる純系マウスで、これらの薬剤は体重増加をもたらしました。この作用が腸内微生物叢に関連し、オランザピンのクロスオーバー試験で実証されたとき、HFD はマウスの腸内微生物叢に、「肥満の原因となる」細菌を増殖させました。さらに、*in vitro* でオランザピンは 2 つの豊富な共生腸内細菌の成長を妨げ、または遅らせる可能性があります。この研究では、腸内微生物叢組成を改変させることでオランザピンの肥満の原因となる効果を強く示唆する 3 つの証拠を示します。薬剤による体重増加におけるバイオマーカーおよび治療の標的となる可能性として腸内微生物叢の重要性を示すものです。

イルミナ技術：Nextera DNA Library Prep Kit, MiSeq 250 bp PE リード、CASAVA v1.8.2

Stefka A. T., Feehley T., Tripathi P., Qiu J., McCoy K., et al. (2014) Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 13145-13150

食物アレルギーは共生微生物叢の変化で増悪することがありますが、特定の機序または防御性 / 感受性に関する細菌分類群について詳細に調査されていません。16S V4 rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスおよびノトバイオームマウスの選択的コロニー形成により、アレルギーを防御するクロストリジウムが豊富にある細菌コミュニティを同定しました。この防御性クロストリジウムは Treg 細胞の活性化、大腸での IgA 産生、血流に入るアレルギーの制御に関連する自然リンパ球機能の新しい制御機序を誘導しました。さらに、腸上皮の透過性はクロストリジウムによって上方制御され、抗菌剤で新生仔の腸内微生物叢を減少させると食物アレルギーの感作が増加しました。これらの所見は総じて、i) 食物アレルギーにおける腸内微生物叢の役割を示唆し、ii) 「防御性」コミュニティを同定し、iii) 食物アレルギーを防止または治療するための微生物叢を操作する可能性を高めます。

イルミナ技術：イルミナ MouseRef-8 アレイ、MiSeq



ノトバイオームマウスを使用して、食物アレルギー感作における細菌の役割を明らかにしました。

炎症性腸疾患 (IBD)

微生物遺伝子と腸の健康および疾病との関係の特徴付けることを狙いとした MetaHit プロジェクトでは、IBD および肥満症に焦点を当てています⁴⁰。一般に、多様性が低いと、しばしば慢性炎症性疾患や他の健康障害にみられる腸のバランス異常が起こりますが、食事の管理によってある程度コントロールすることができ⁴¹、がんに関連する腸の症状を緩和させる可能性もあります⁴²。

メタゲノム解析は、微生物遺伝子のコピー数、菌種レベル、IBD および肥満症の変化を結びつけて行われます⁴³。生検サンプルからもウイルスの塩基配列を回収して、ウイルスと微生物の構成要素との相互作用を示唆しています⁴⁴。免疫系およびそれに関連した腸内細菌叢の発症と時期との相互関係を考慮すると、この腸の乱れは IBD の免疫病原性の一因となっています⁴⁵。IBD の複雑性および健康な細菌叢の重要性から、IBD などの疾患をコントロールする妥当な手段として、腸内細菌叢の管理に取り組む必要性を実証しています。

総説

Cammarota G., Ianiro G., Cianci R., Bibbo S., Gasbarrini A., et al. (2015) The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: potential for therapy. *Pharmacol Ther* 149: 191-212

Ohman L., Tornblom H. and Simren M. (2015) Crosstalk at the mucosal border: importance of the gut microenvironment in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12: 36-49

Bringiotti R., Ierardi E., Lovero R., Losurdo G., Di Leo A., et al. (2014) Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? *World J Gastrointest Pathophysiol* 5: 550-559

Ferreira C. M., Vieira A. T., Vinolo M. A., Oliveira F. A., Curi R., et al. (2014) The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res* 2014: 689492

Gkouskou K. K., Deligianni C., Tsatsanis C. and Eliopoulos A. G. (2014) The gut microbiota in mouse models of inflammatory bowel disease. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 28

参考文献

Jones-Hall Y. L., Kozik A. and Nakatsu C. (2015) Ablation of tumor necrosis factor is associated with decreased inflammation and alterations of the microbiota in a mouse model of inflammatory bowel disease. *PLoS One* 10: e0119441

IBD を特徴とする慢性炎症は腫瘍壊死因子 (TNF) の遷延分泌に密接に関係しています。大腸炎における TNF および腸内微生物叢の作用は、十分に特徴付けられていませんが、抗 TNF 治療が必ずしも奏功するわけではない理由を説明できることがあります。野生型 (WT) および *tnf*^{-/-} マウスの急性大腸炎モデルで、16S V3-V4 rRNA アンプリコンシーケンスにより微生物組成を評価し、大腸炎と腸内微生物叢における TNF の影響を明らかにしました。炎症は、マウスの遺伝子型に従って微生物組成に有意な違いを生じ、TNF がいない大腸炎は軽度で、微生物の α 多様性は WT マウスより減少していました。著者らは、TNF 媒介炎症では腸内微生物叢を変化するため、TNF を抑制し微生物コミュニティを変化させる併用療法が有益となり得ると結論しています。

イルミナ技術: MiSeq 250 bp PE リード

40. Lee J. S., Rhee J. S., Kim R. O., Hwang D. S., Han J., et al. (2010) The copepod *Tigriopus japonicus* genomic DNA information (574Mb) and molecular anatomy. *Mar Environ Res* 69 Suppl: S21-23
41. Cotillard A., Kennedy S. P., Kong L. C., Prifti E., Pons N., et al. (2013) Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500: 585-588
42. Bindels L. B., Neyrinck A. M., Salazar N., Taminiou B., Druart C., et al. (2015) Non Digestible Oligosaccharides Modulate the Gut Microbiota to Control the Development of Leukemia and Associated Cachexia in Mice. *PLoS One* 10: e0131009
43. Greenblum S., Carr R. and Borenstein E. (2015) Extensive strain-level copy-number variation across human gut microbiome species. *Cell* 160: 583-594
44. Wang W., Jovel J., Halloran B., Wine E., Patterson J., et al. (2015) Metagenomic analysis of microbiome in colon tissue from subjects with inflammatory bowel diseases reveals interplay of viruses and bacteria. *Inflamm Bowel Dis* 21: 1419-1427
45. Cammarota G., Ianiro G., Cianci R., Bibbo S., Gasbarrini A., et al. (2015) The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: potential for therapy. *Pharmacol Ther* 149: 191-212

Morgan X. C., Kabachiev B., Waldron L., Tyler A. D., Tickle T. L., et al. (2015) Associations between host gene expression, the mucosal microbiome, and clinical outcome in the pelvic pouch of patients with inflammatory bowel disease. *Genome Biol* 16: 67

潰瘍性大腸炎 (UC) に対する回腸嚢肛門吻合術 (IPAA) は、しばしば解剖学的変化および大腸様環境に似た微生物叢変化に関連する回腸嚢炎を併発します。どのように、そしてなぜこのような変化が起こるのか、このような変化と UC および IBD との関係について、十分に理解されていません。著者らは、対応する宿主の細菌叢 (16S V4 アンプリコンシーケンスを実施) および IPAA 患者の大規模コホートからトランスクリプトームを得て、細菌叢 - 宿主の遺伝子発現軸を研究しました。細菌叢は個体差があり、抗生剤治療など臨床上の違いに影響され、宿主の腸上皮の転写は組織の場所に影響されました。細菌叢と宿主の転写パターンとの関連性は、宿主組織の炎症レベルに関係しました: 微生物 - 宿主の最も強い関連パターンは補体系に豊富で、逆にサイトカイン IL-12 経路は *Bifidobacteria* などの存在量に相関していました。しかし、微生物組成および / または転写活性に基づく回腸嚢炎の転帰モデルを作成することはできず、上皮転写における部分変化の役割が IPAA 中、宿主 - 細菌叢のインターフェースに重要でないことを示唆しています。

イルミナ技術: MiSeq v2 175 bp PE リード

Schaubek M., Clavel T., Calasan J., Lagkouvardos I., Haange S. B., et al. (2015) Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence.

腸内のバランス異常は腸の炎症性疾患 (クローン病 (CD)) に関連していますが、この疾患が頻発する機能については未だに説明されていません。一時的に、腸内微生物叢のメタプロテオミクス (LC-MS) およびメタゲノム (16S rRNA 遺伝子) のプロファイルは CD 病態に似たモデル TNF^{deltaARE} マウスから得ました。疾患の重症度および場所は微生物に依存していました: 無菌 TNF^{deltaARE} マウスには炎症がなく、回腸炎 (大腸炎はない) は抗生剤治療後軽減しました。いくつかの組成および機能の改変が炎症マウスの微生物叢コミュニティで観察され、その特徴として、パネート細胞機能の喪失を伴う CD 様回腸炎の原因となった微生物叢の移植で再現性がみられました。この研究により、慢性回腸炎の発症における腸のバランス異常の因果的役割が裏付けられています。

イルミナ技術: MiSeq

Knights D., Silverberg M. S., Weersma R. K., Gevers D., Dijkstra G., et al. (2014) Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med* 6: 107

特定の微生物分類群における宿主の特異的な疾患アレルを区別しなくても、炎症性疾患では宿主の遺伝性および腸内細菌叢とが相互に関係することが観察されています。ここで、ImmunoChip のジェノタイプングおよび 16S rRNA シーケンスを行って 3 つの IBD コホートの生検を評価し、宿主のアレル - 微生物分類群のペアにおける関係を同定しました。著者らは、それぞれ異なるコホートで、リスクアレル NOD2 が一貫して、微生物分類群 *Enterobacteriaceae* に関連していたことを示しました。彼らは、2 つまたは 3 つのコホートで、微生物分類群に一貫して関連していた IBD の一塩基多型 (SNP) 48 個も加えて同定しました。これらの SNP は免疫応答 (例えば JAK-STAT) に関わる遺伝子に関連しています。したがって、ゲノム - 細菌叢の対合を解析することは、IBD における宿主の改変した機能的経路および細菌叢構造との複雑な関係性を実証することになり得ます。

イルミナ技術: MiSeq, Infinium ImmunoChip

Rooks M. G., Veiga P., Wardwell-Scott L. H., Tickle T., Segata N., et al. (2014) Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *ISME J* 8: 1403-1417

IBD 患者の疾患症状を緩和し、寛解を促進するために、異なる個人療法が頻繁に行われます。治療が腸内微生物叢にどのように影響するかについてあまり知られていないため、治療法のバラツキによって寛解に関与する有効な機序は解明されていません。全ショットガンメタゲノムおよび 16S rRNA アンプリコンシーケンスを行って、マウス大腸炎モデルで、疾患発症期および治療による寛解期の腸内細菌叢を調査しました。両ステージ間の細菌叢の違いが、糖質エネルギー代謝、細菌の病原性 (運動およびシグナル伝達経路) および異物代謝能力の増加に関連することが報告されました。ゲンタマイシンおよびメトロニダゾールと違い、バンコマイシンは、症状の回復に有効ではないにもかかわらず、この 3 種類はしばしば *C. difficile* 感染症の治療に使用されています。また、免疫調節療法は異なる微生物分類群を増やして微生物コミュニティを改変しました。この研究では、マウス大腸炎モデルで、特異的な細菌分類群、疾患に関与する経路、およびそれぞれの治療法に特異的な変化を同定しています。

イルミナ技術: HiSeq 2000

代謝性疾患：糖尿病と肥満症

1型 (T1D) および 2型 (T2D) 糖尿病は、腸内微生物叢の変化に関連する多因子性代謝疾患であり、遺伝的素因のある個人では、同じ因子が疾患の発症を左右します⁴⁶。T1Dに関する研究についてまだ結論付けはされていませんが、分類群多様性の減少および上皮細胞受容体と免疫細胞との相互作用の変化については数多く裏付けられています。これらの因子が組み合わさると、膵臓β細胞の自己免疫破壊が進みます⁴⁷。

T2Dでは、中程度の腸のバランス異常によって上皮の透過性および炎症伝達物質の放出が減少し、加えて、胆汁酸代謝遺伝子の存在量も減少しました⁴⁸。T2Dに関連するイベントには、微生物叢の変化による分枝鎖アミノ酸および芳香族アミノ酸の過剰な産生と摂取があります⁴⁹。代謝経路の変化は、腸内バランス異常のサインに違いが生じるため⁵¹、糖尿病マーカーとして有用となることがあります⁵⁰。

総説

Gulden E., Wong F. S. and Wen L. (2015) The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol* 159: 143-153

Hansen T. H., Gobel R. J., Hansen T. and Pedersen O. (2015) The gut microbiome in cardio-metabolic health. *Genome Med* 7: 33

He C., Shan Y. and Song W. (2015) Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. *Nutr Res* 35: 361-367

Hu C., Wong F. S. and Wen L. (2015) Type 1 diabetes and gut microbiota: Friend or foe? *Pharmacol Res* 98: 9-15

Parekh P. J., Balart L. A. and Johnson D. A. (2015) The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease. *Clin Transl Gastroenterol* 6: e91

Gomes A. C., Bueno A. A., de Souza R. G. and Mota J. F. (2014) Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutr J* 13: 60

Nielsen D. S., Krych L., Buschard K., Hansen C. H. and Hansen A. K. (2014) Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. *FEBS Lett* 588: 4234-4243

参考文献

Daft J. G., Ptacek T., Kumar R., Morrow C. and Lorenz R. G. (2015) Cross-fostering immediately after birth induces a permanent microbiota shift that is shaped by the nursing mother. *Microbiome* 3: 17

宿主の遺伝子構成要素で代謝性疾患における微生物叢の影響を認識することは、複雑な疾患の中のわずかな側面にすぎません。微生物を安定した「健康な」表現型に操作することは好ましいことであり、腸内微生物叢を確立する必要があります。仔マウス (NOR 菌および NOD 菌) における腸内微生物叢の交差哺育効果をアンプリコンシーケンスにより調査しました。腸内微生物叢の確立は速く、母親マウスの微生物叢によって決定され、32週で安定しました。この方法を炎症性疾患および T1D の既存モデルにまで広げて、異なる菌を保有するマウスでも共生微生物叢を正常にすることができます。

イルミナ技術：MiSeq 250 bp PE リード

46. Gulden E., Wong F. S. and Wen L. (2015) The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol* 159: 143-153
47. Hu C., Wong F. S. and Wen L. (2015) Type 1 diabetes and gut microbiota: Friend or foe? *Pharmacol Res* 98: 9-15
48. Labbe A., Ganopoulosky J. G., Martoni C. J., Prakash S. and Jones M. L. (2014) Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. *PLoS One* 9: e115175
49. Neis E. P., Dejong C. H. and Rensen S. S. (2015) The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients* 7: 2930-2946
50. Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., et al. (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490: 55-60
51. Karlsson F. H., Tremaroli V., Nookaew I., Bergstrom G., Behre C. J., et al. (2013) Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498: 99-103



仔マウスの腸内微生物叢の交差哺育効果をアンプリコンシーケンスで調査しました。

Bell E. T., Suchodolski J. S., Isaiah A., Fleeman L. M., Cook A. K., et al. (2014) Faecal microbiota of cats with insulin-treated diabetes mellitus. PLoS One 9: e108729

ヒトと同様に T2D に罹患したネコはインスリン治療を受けます。この研究では、16S V4 rRNA シーケンスおよび qPCR により、インスリン治療を受けている少数の糖尿病ネコ (n = 10) および非糖尿病ネコ (n = 20) の便微生物叢を評価しました。著者は、インスリン治療を受けている糖尿病ネコと非糖尿病ネコとの間に腸内の微生物叢組成または存在量の違いを観察しませんでした。実際、年齢、性別、品種、または食餌内容にしたがっても差は観察されませんでした。10 歳以上のネコの qPCR で *Faecalibacterium* spp の減少を認めただけでした。大規模コホートで違いを調べる追加的研究が必要です。これらの研究では、糖尿病ネコおよび非糖尿病ネコの全体的な微生物組成に反映されない機能的生産、転写、および代謝因子が比較されます。

イルミナ技術: MiSeq

-
52. Turnbaugh P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., Magrini V., Mardis E. R., et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444: 1027-1031
 53. Tremaroli V. and Backhed F. (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature 489: 242-249
-

肥満症

代謝性疾患に影響を及ぼす宿主と環境の因子では、食事、微生物、および代謝の関係に焦点が当てられます。例えば、肥満のマウスとヒトは腸内の微生物コミュニティに再現性のある変化を示します。微生物叢の乱れは、過剰な短鎖脂肪酸（後に脂肪組織に蓄積）およびエネルギーの蓄積をもたらす豊富な代謝経路によってエネルギーハーベストを高めます⁵²。さらに、改変した微生物から代謝される産物は、脳や肝臓のような腸から離れた部位で宿主の代謝シグナルとして働き、脂肪レベルとそれに関連する合併症に影響を与えます⁵³。



糖尿病および肥満のマウスモデルの腸内細菌叢研究では、食事、炎症、および代謝の複雑な関係が明らかにされています。

参考文献

Chassaing B., Koren O., Goodrich J. K., Poole A. C., Srinivasan S., et al. (2015) Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519: 92-96

腸内微生物と腸管上皮との距離は、粘膜層によって安全に保たれています。in vitro では、この粘膜層が乳化剤によって破壊されるため、加工食品に含まれる乳化剤が代謝性疾患を発症する要因となることがあります。マウスの腸組織および細菌叢を、一般的な低濃度の乳化剤 2 種類カルボキシメチルセルロース (CMC) またはポリソルベート -80 (P80) に曝露させ、16S V4 rRNA シーケンスによりモニターしました。いずれの乳化剤も、WT マウスで軽度の炎症および肥満症を、感受性マウスモデルで大腸炎を誘発しました。肥満症は、増殖した微生物の上皮層への侵入、菌種組成の改変、および炎症誘発能の上昇に関連していました。メタボリック症候群の発症に関して、無菌マウスの便移植により腸内微生物叢がこのように変化したことが明確になりました。腸内環境における一般的な乳化剤の新たな作用や、メタボリック症候群および炎症性疾患に関連する可能性を、疾患の発生率が上昇していることを踏まえ再検討する必要があります。

イルミナ技術: MiSeq 250 bp PE リード

Frank D. N., Bales E. S., Monks J., Jackman M. J., MacLean P. S., et al. (2015) Perilipin-2 Modulates Lipid Absorption and Microbiome Responses in the Mouse Intestine. *PLoS One* 10: e0131944

微生物叢および代謝性疾患は関係していますが、この関係の根底にある分子メカニズムについては、ほんの一部しか明らかにされていません。その中でも、HFD を与えたマウスでは、細胞内の脂肪滴局在タンパク質ペリリピン-2 (Plin2) は脂質代謝に関与しており、食事の変化で腸内細菌叢を改変することがあります。野生型マウスおよび Plin2 欠損マウスに、低脂肪食 (LFD) または HFD を与え、細菌叢組成を 16S V2-V3 rRNA シーケンスによりモニターし、生理学的パラメーターを記録しました。Plin-2 マウスでは、WT 対照群と比較した場合、生理学的パラメーターに著しい乱れを示しました。脂肪摂取量および Plin-2 は、細菌叢組成、多様性、および機能的相違と独立して関連していました。Plin-2 は、マウスの便中の脂質レベルおよびエネルギー利用を調節しており、いずれも特定の微生物コミュニティと関連しています。著者らは、腸内において、Plin-2 は食事による肥満に関連する腸内細菌叢の変化をきたす脂質の吸収を制御すると結論付けています。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq Reagent Kit v3

Yasir M., Angelakis E., Bibi F., Azhar E. I., Bachar D., et al. (2015) Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia. *Nutr Diabetes* 5: e153

食習慣が腸の微生物叢組成と機能に影響を及ぼすのと同様に、肥満の原因となる微生物叢は代謝性疾患の発症に影響を及ぼします。全く食習慣の異なる正常および肥満の 사우ジアラビア人とヨーロッパ人の便の微生物叢を 16S V3-V4 rRNA シーケンスを行って比較しました。肥満コホートと正常コホートにみられた差は、フランス人と 사우ジアラビア人の間では確認されませんでした。正常コホートと比較した場合、肥満フランス人の細菌叢は多様性が低く、そのほとんどを *Proteobacteria* および *Bacteroidetes* が占めていました。肥満 사우ジアラビア人では *Firmicutes* が優勢でしたが、多様性については正常コホートとの違いはありませんでした。全体的に、フランス人は 사우ジアラビア人より細菌叢の多様性が高く豊富でした。正常および脂肪の細菌叢との対比に加え、地理的に離れた集団からの腸内細菌叢の違いに関する情報は有益となることがあり、大きなまとまりのある成果に加え、メタボリック症候群に取り組む統合的な見解を示しています。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq 250 bp PE リード

Everard A., Lazarevic V., Gaia N., Johansson M., Stahlman M., et al. (2014) Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *ISME J* 8:2116-2130

炎症性疾患およびメタボリック症候群を予防する、または対抗する有益な微生物と経路を同定することで、疾患の治療法を改善することができます。さらに、このような研究では、プレバイオティクスなどの介入的治療の適用を裏付けることができます。ショットガンメタゲノム解析および抗菌ペプチド分析により、標準的な食事と HFD を摂取したマウスでプレバイオティクス治療を評価しました。HFD およびプレバイオティクスは、標準対照と比較して、腸内細菌叢組成およびいくつかの門レベルで潜在的機能性を著しく改変しました。著者らは、両グループの存在量の差でいくつかの分類群を同定し、さらにこれらの分類群に関連する豊富な経路も同定しました。HFD は空腸で Reg3g および PLA2g2 の産生を減少させる一方で、プレバイオティクスは腸上皮の健康とターンオーバーに関連する Reg3g および intectin の値を上昇させました。一部では、マウスのメタボリック症候群の発症を改善しました。この研究では、有益な特異的機序がプレバイオティクスで調整した腸の細菌叢によって働いたことを示しており、これはメタボリック症候群で食事介入を行う有力な代替法となります。

イルミナ技術: TruSeq SBS Kit v3, HiSeq 2000, CASAVA v1.8.2

Walters W. A., Xu Z. and Knight R. (2014) Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett* 588: 4223-4233

最新の文献の一部では、腸内微生物叢と代謝疾患との密接な関係が指摘されています。著者らは、高スループットの 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスを使用した入手可能な文献を調査し、IBD および肥満症における腸内微生物叢の特徴付けを行いました。IBD は様々な研究で、一定の細菌叢のサインを示しており、これらの細菌叢により IBD 患者を健常者と分けることができました。反対に、肥満の原因となる細菌叢のサインは、様々な研究で一定していなかったにもかかわらず、便移植により再び肥満になり、各研究において統計学的に有意となりました。この研究では、微生物 - 疾患が同じ効果量ではないことがあるとして、異なる臨床状態でのコホート選択の重要性および効果と解析戦略に焦点を当てています。

イルミナ技術：イルミナテクノロジーを使用した 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス

口腔細菌叢

口腔に生息する微生物コミュニティは複数の機能を実行します。個人の微生物組成は比較的安定である一方で、個人間で大きく異なる可能性があります⁵⁴。口腔細菌叢の変化から、栄養障害⁵⁵、心血管疾患などの健康状態がわかります⁵⁶。

口腔の微生物コミュニティはコンパートメントおよびバイオフィルムで構成されています。過剰な増殖はプラーク形成や口腔疾患の原因となり得ます。メタゲノム研究によって、口腔疾患に特異的な代謝経路が同定されてきました⁵⁷。慢性歯周病、齲蝕、および歯肉炎などの口腔疾患では、口腔病原細菌⁵⁸ および喫煙による人工歯根の感染症から、歯肉下の細菌叢が急激に変化します⁵⁹。これらの変化をモニターし、疾患の進行および治療の有効性を評価します⁶⁰。



慢性歯周病、齲蝕、および歯肉炎などの口腔疾患では、歯肉下の細菌叢が急激な変化を起こします。これらの変化をモニターして、疾患の進行と治療の有効性を評価します。

総説

Duran-Pinedo A. E. and Frias-Lopez J. (2015) Beyond microbial community composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes Infect* 17: 505-516

Diaz P. I., Strausbaugh L. D. and Dongari-Bagtzoglou A. (2014) Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 101

McLean J. S. (2014) Advancements toward a systems level understanding of the human oral microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 98

Xu P. and Gunsolley J. (2014) Application of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence* 5: 424-432

Zaura E., Nicu E. A., Krom B. P. and Keijsers B. J. (2014) Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 85

54. Sato Y., Yamagishi J., Yamashita R., Shinozaki N., Ye B., et al. (2015) Inter-Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra-Day Fluctuations in Individuals. *PLoS One* 10: e0131607
55. Zheng W., Zhang Z., Liu C., Qiao Y., Zhou D., et al. (2015) Metagenomic sequencing reveals altered metabolic pathways in the oral microbiota of sailors during a long sea voyage. *Sci Rep* 5: 9131
56. Leishman S. J., Do H. L. and Ford P. J. (2010) Cardiovascular disease and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol* 2: 5781
57. Xu P. and Gunsolley J. (2014) Application of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence* 5: 424-432
58. Zheng H., Xu L., Wang Z., Li L., Zhang J., et al. (2015) Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Sci Rep* 5: 10948
59. Moon J. H., Lee J. H. and Lee J. Y. (2015) Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in Korean chronic periodontitis patients. *Mol Oral Microbiol* 30: 227-241
60. Shi B., Chang M., Martin J., Mitreva M., Lux R., et al. (2015) Dynamic changes in the subgingival microbiome and their potential for diagnosis and prognosis of periodontitis. *MBio* 6: e01926-01914

参考文献

Edlund A., Yang Y., Yooseph S., Hall A. P., Nguyen D. D., et al. (2015) Meta-omics uncover temporal regulation of pathways across oral microbiome genera during *in vitro* sugar metabolism. *ISME J*

細菌の媒介により pH は下がり、その後歯肉縁上のプラークに炭水化物源を加えると戻ります。これらのイベントは齲蝕の発生において重要ですが、代謝またはトランスクリプトームの詳細を十分に特徴付けるものはまだありません。著者らは、歯肉縁上のプラークの微生物コミュニティに付着した *in vitro* モデルを開発し、これらのバイオフィルムメタトランスクリプトームおよびメタボロミクスのプロファイルを解析しました。著者らは微生物の分類群（乳酸桿菌、連鎖球菌）および pH の低下に反応して酸の中和に関わる上方制御経路を発見しました。これらの分類群も、プラークの pH 回復に重要でした。特定の代謝物および対応する転写 / 分類群は pH 勾配に沿って同定されました。これらのサインを利用して、健康な状態および疾病状態での口腔の細菌叢を比較した研究を行うことができました。

イルミナ技術：HiSeq 2000

Sato Y., Yamagishi J., Yamashita R., Shinozaki N., Ye B., et al. (2015) Inter-Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra-Day Fluctuations in Individuals. *PLoS One* 10: e0131607

この研究では、1日3回3日間にわたり健常者から口腔歯肉縁上の細菌叢を採取して、16S V4 rRNA 遺伝子シーケンスにより調査しました。著者らは、健常者から得た口腔細菌叢が終日安定していたことを示しました。対照的に、個体間変動は菌種レベルで共通していました。個体内の安定性では、稀な細菌中に共生菌 40 個を同定することができました。

イルミナ技術：MiSeq Reagent Kit v2 250 bp PE リード

Duran-Pinedo A. E., Chen T., Teles R., Starr J. R., Wang X., et al. (2014) Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME J* 8: 1659-1672

歯周病は多微生物性の炎症性疾患です。健常者と歯周病陽性者の歯肉下サンプルからトランスクリプトームおよびメタゲノムを抽出して、両状態の間にコミュニティ組成とトランスクリプトームプロファイルの違いを同定しました。歯周病で発現率の高かった病原性遺伝子の菌種のほとんどが、既知の病原菌である *P. gingivalis*、*T. forsythia*、および *T. denticola* でした。存在量と発現量との相関関係は他の微生物にはみられず、一部の「健康な」細菌が病原性因子を発現していると推定されました。このコミュニティは、鞭毛運動、ペプチド輸送、鉄獲得、 β ラクタム分解、およびリピド A 生合成に関連する歯周病と一致する上方制御経路を示しました。これらの結果により、疾患が悪化するとコミュニティが統合的に活性化することが裏付けられます。

イルミナ技術：Nextera XT DNA Library Prep Kit、cBOT、MiSeq v2 150 PE リード、HiSeq 2500



歯周病。

その他のヒトバイオーム

高スループットテクノロジーを低コストで利用できるようになり、多様性に富む複雑でダイナミックなヒトバイオームの特性評価が可能になりました。

皮膚は環境と接触する最初の表面です。その微生物相は複雑で、体内の組織分布上特定の領域にある微小環境によって定められます。こうした微小環境によって、性別⁶¹ および衛生用製品⁶² などの外用化合物に影響を受ける特定の化学的特性を決定付けることができます。皮膚マイクロバイオームは、皮膚疾患および皮膚がんの治療や、健康上の脅威および環境上の侵害をモニタリングするツールとなして利用できる可能性があります。化粧品や衛生用製品は、こうした特定の性別および組織分布的特徴（例：体臭の影響）を活かして開発することができます。



化粧品や衛生用製品は、こうした特定の性別および組織分布的特徴（例：体臭の影響）を活かし開発することができます⁶³。

腔マイクロバイオームは、年齢、生殖状況、民族性、pH、および他の因子により影響を受け、生涯にわたって高度にかつダイナミックに変化します⁶⁴。その障害はさまざまに分類され、多様性があり、予定日前の出産⁶⁵、婦人科感染、がん、およびがん患者⁶⁶の化学療法や放射線による副作用のリスクを増大させます。

最近では、気道マイクロバイオームの動的変化は慢性閉塞性肺疾患⁶⁷、喘息⁶⁸、および嚢胞性繊維症^{69, 70, 71, 72, 73, 74}と関連付けられています。

総説

Grice E. A. (2014) The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Semin Cutan Med Surg* 33: 98-103

Oh J., Byrd A. L., Deming C., Conlan S., Program N. C. S., et al. (2014) Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 514: 59-64

Payne M. S. and Bayatibojakhi S. (2014) Exploring preterm birth as a polymicrobial disease: an overview of the uterine microbiome. *Front Immunol* 5: 595

Salava A. and Lauerma A. (2014) Role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Clin Transl Allergy* 4: 33

van de Wijert J. H., Borgdorff H., Verhelst R., Crucitti T., Francis S., et al. (2014) The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One* 9: e105998

61. Troccaz M., Gaia N., Beccucci S., Schrenzel J., Cayeux I., et al. (2015) Mapping axillary microbiota responsible for body odours using a culture-independent approach. *Microbiome* 3: 3
62. Bouslimani A., Porto C., Rath C. M., Wang M., Guo Y., et al. (2015) Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E2120-2129
63. Oh J., Byrd A. L., Deming C., Conlan S., Program N. C. S., et al. (2014) Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 514: 59-64
64. Zhou X., Brown C. J., Abdo Z., Davis C. C., Hansmann M. A., et al. (2007) Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J* 1: 121-133
65. Hyman R. W., Fukushima M., Jiang H., Fung E., Rand L., et al. (2014) Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reprod Sci* 21: 32-40
66. Chase D., Goulder A., Zenhausem F., Monk B. and Herbst-Kralovetz M. (2015) The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: a review of applications in etiology, symptoms and treatment. *Gynecol Oncol* 138: 190-200
67. Huang Y. J., Sethi S., Murphy T., Nariya S., Boushey H. A., et al. (2014) Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 52: 2813-2823
68. Holt P. G. (2015) The mechanism or mechanisms driving atopic asthma initiation: The infant respiratory microbiome moves to center stage. *J Allergy Clin Immunol* 136: 15-22
69. Harris K. A., Underwood A., Kenna D. T., Brooks A., Kavaliunaite E., et al. (2015) Whole-genome sequencing and epidemiological analysis do not provide evidence for cross-transmission of mycobacterium abscessus in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *Clin Infect Dis* 60: 1007-1016
70. Hoffman L. R., Pope C. E., Hayden H. S., Heltshe S., Levy R., et al. (2014) *Escherichia coli* dysbiosis correlates with gastrointestinal dysfunction in children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 58: 396-399
71. Lopez-Collazo E., Jurado T., de Dios Caballero J., Perez-Vazquez M., Vindel A., et al. (2015) *In vivo* attenuation and genetic evolution of a ST247-SCCmecI MRSA clone after 13 years of pathogenic bronchopulmonary colonization in a patient with cystic fibrosis: implications of the innate immune response. *Mucosal Immunol* 8: 362-371
72. Turner K. H., Wessel A. K., Palmer G. C., Murray J. L. and Whiteley M. (2015) Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 4110-4115
73. Waters V. (2014) Editorial commentary: how can understanding the phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* lead to more successful eradication strategies in cystic fibrosis? *Clin Infect Dis* 59: 632-634
74. Whiteson K. L., Meinardi S., Lim Y. W., Schmieder R., Maughan H., et al. (2014) Breath gas metabolites and bacterial metagenomes from cystic fibrosis airways indicate active pH neutral 2,3-butanedione fermentation. *ISME J* 8: 1247-1258

参考文献

Bouslimani A., Porto C., Rath C. M., Wang M., Guo Y., et al. (2015) Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E2120-2129

皮膚は人体で最大の器官です。その化学的構成は、皮膚細胞やそこに住む微生物の影響を受けていると推定されます。著者らは、身体部位ごとの皮膚のプロテオミクスデータ (UPLC-QTOF, MALDI-TOF) およびマイクロバイオーム組成 (16S rRNA シーケンス) を化学データと統合して、高度に統合された人体の 3D 分子地図作成マップを開発しました。この 3D マップでは、身体部位、代謝産物、および化合物に特定の分類群を関連させました。共起情報分析が可能であったため、性別に関連した特性および衛生用品がヒトの皮膚に与える影響が明らかになりました。このマップは、ヒトの皮膚の詳細な全体像であり、研究におよびカスタマイズされた製品開発に役立つ可能性があります。

イルミナ技術: HiSeq 2000 100 bp PE リード

Boutin S., Graeber S. Y., Weitnauer M., Panitz J., Stahl M., et al. (2015) Comparison of microbiomes from different niches of upper and lower airways in children and adolescents with cystic fibrosis. *PLoS One* 10: e0116029

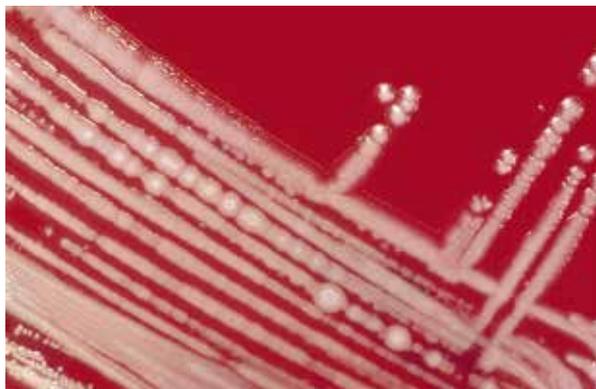
気道マイクロバイオームと嚢胞性繊維症 (CF) の発症 / 進行との関係は、特徴的な病原体による CF の慢性感染症であるにもかかわらず、完全には解明されていません。NGS を用いて、軽度から中等度の肺疾患を伴う若年 CF 患者の鼻腔、咽喉および痰のマイクロバイオームを比較しました。小児と成人の CF 患者の間では、痰マイクロバイオームは類似していたことから、成人様のマイクロバイオームは生涯の早いうちに確立されることが示唆されます。痰マイクロバイオームが個人間で高度にばらついているのは、*Pseudomonas aeruginosa* などの病原体の存在量が増加したためである可能性があります。この研究では、CF 気道微生物相にあるで潜在的病原体の作用を示しています。さらに、痰サンプリングが入手可能でない場合、咽喉スワブで代替可能であることも実証しています。

イルミナ技術: HiSeq

Darch S. E., McNally A., Harrison F., Corander J., Barr H. L., et al. (2015) Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a *Pseudomonas aeruginosa* population during cystic fibrosis infection. *Sci Rep* 5: 7649

Pseudomonas aeruginosa は、CF 患者に慢性肺感染症を引き起こし、時間経過とともに、同じ個人の分離株内に表現型の分岐が認められます。異なる時点での同じ個人から採取した *P. aeruginosa* の分離株の全ゲノムシーケンス (WGS) を行って、この表現型変異の原因となる機序を解明しました。この研究では、5~64 に及ぶ SNP と関連して個体内に多様性が生じることを示し、*in vivo* で慢性 CF 感染している *P. aeruginosa* の遺伝的な表現型の多様性は主に組み換えによって進むことも裏付けています。著者らは、研究で見いだされ示唆された抗菌耐性パターンなどの重要な表現型について考察しています。

イルミナ技術: HiSeq 2000 150 bp PE リード



Pseudomonas aeruginosa コロニー。

Kramer R., Sauer-Heilborn A., Welte T., Jauregui R., Brettar I., et al. (2015) High individuality of respiratory bacterial communities in a large cohort of adult cystic fibrosis patients under continuous antibiotic treatment. *PLoS One* 10: e0117436

CF 患者で定期的に行う微生物感染の臨床診断では、複数菌感染が分子レベルで数多く裏付けられているにもかかわらず、わずかな既知の病原体に限定されています。継続的に抗生物質投与を受けている成人の痰サンプルのアンプリコンシーケンス (16S V3 rRNA 遺伝子) を行って、定期的な培養手法と比較しました。微生物コミュニティは、多様で大きな個体差がありました。NGS だけで CF 関連のバクテリアの詳細がさらに明らかにされましたが、他の手法では既知の病原体について類似した蔓延率を示すに留まりました。CFTR 遺伝子でみられる $\Delta F508$ 以外の突然変異では *P. aeruginosa* の低存在量が示されましたが、宿主因子と CFTR 遺伝子型との間に相関はありませんでした。継続的な抗生物質治療によって、著しい個体差や、臨床的な宿主因子との相関の欠如が生じている可能性があります。

イルミナ技術: Genome Analyzer IIx

Liu J., Yan R., Zhong Q., Ngo S., Bangayan N. J., et al. (2015) The diversity and host interactions of *Propionibacterium acnes* bacteriophages on human skin. ISME J 9: 2078-2093

ファージは溶解、溶原性あるいは耐性を誘導して、微生物集団を制御することができます。この制御はヒトの皮膚にも生じることがありますが、比較的わずかな情報が得られていません。この研究では、ざ瘡 *Propionibacterium* のバクテリオファージの多様性と宿主相互作用に焦点を絞っています。著者らは、ざ瘡患者および健常者から回収した 48 ファージのシーケンスを行い、皮膚メタゲノムを解析して、*P. acnes* ファージを探索しました。個人とは無関係に共通な一部のファージは個体の関連性とは無関係に共通していますが、1 時点に 1 株のファージが皮膚を支配します。これにより、ヒト集団内およびファージの伝播に共通する主要なファージの存在が示唆されます。さらに、CRISPR シーケンスはタイプ II *P. acnes* 菌株中のファージに対する耐性を与えるのには十分ではない場合があります。この研究では、ファージが微生物集団をいかに制御し、最終的にマイクロバイオームを個別化するかを示しています。

イルミナ技術: MiSeq



ざ瘡が発現した皮膚。ファージは溶解、溶原性あるいは耐性を誘導して、微生物集団を制御することができます。著者らは、ざ瘡患者および健常者から回収した 48 ファージのシーケンスを行い、*P. acnes* ファージを捜すために健常な皮膚メタゲノムを解析しました⁷⁵。

MacIntyre D. A., Chandiramani M., Lee Y. S., Kindinger L., Smith A., et al. (2015) The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. Sci Rep 5: 8988

膣マイクロバイオーム試験のほとんどは北米人の集団を対象としており、特定の妊娠転帰との関連性が指摘されてきました。16S V1-V2 rRNA 遺伝子シーケンスを行って、妊娠中の英国人女性の膣マイクロバイオームを合併症のない妊娠中および分娩後に定期的にモニタリングしました。分娩後に、 α 多様性の増加に伴って *Lactobacillus spp.* の優位性が低下するという大きな変化が認められました。ほとんどをアジア系および白人系が占める一部の女性で、*L. jensenii* 優位のマイクロバイオームが認められ、アフリカ系女性においては *L. gasseri* は認められませんでした。この研究は、妊娠中および分娩後の膣マイクロバイオームの生物地理学および民族的因子を明らかにし、マイクロバイオーム、健康、および妊娠転帰の関係の解明に寄与しました。

イルミナ技術: MiSeq 300 bp PE リード

Misic A. M., Davis M. F., Tyldsley A. S., Hodkinson B. P., Tolomeo P., et al. (2015) The shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from *Staphylococcus* carriage sites. Microbiome 3: 2

Staphylococcus 種はヒトおよび動物の皮膚に共通して共生しています。*S. epidermidis* が抗菌耐性遺伝子の保有宿主となり、メチシリン耐性の *S. aureus* (MRSA) が皮膚および軟組織で重篤な感染 (MRSA SSTI) を引き起こす場合があります。著者らは、16S V4 rRNA 遺伝子シーケンスによって MRSA SSTI 患者の世帯およびその愛玩動物の皮膚マイクロバイオームを評価しました。ペットがいない世帯内の住人は互いに類似していたことから、動物がその世帯の微生物プロファイルに関与することが示唆されました。MRSA SSTI に関連した微生物相や、他の *Staphylococcus* の保因にも差異がありませんでした。この研究は、時間の経過に伴い、いかに微生物相がペットとヒトの間で共有され、多様性を増し、安定性に影響を及ぼすかに重点をおいています。

イルミナ技術: MiSeq 150 bp PE リード

-
75. Liu J., Yan R., Zhong Q., Ngo S., Bangayan N. J., et al. (2015) The diversity and host interactions of *Propionibacterium acnes* bacteriophages on human skin. ISME J 9: 2078-2093
-

Silva P. E., Costa P. S., Avila M. P., Suhadolnik M. L., Reis M. P., et al. (2015) Leprous lesion presents enrichment of opportunistic pathogenic bacteria. Springerplus 4: 187

M. leprae は皮膚の慢性疾患である、ハンセン病の原因となります。この疾患による皮膚微生物相組成の変化は、これまで特性評価が行われてきませんでした。今では高スループットのシーケンスを行ってこの課題に取り組むことができます。健康な皮膚（公開済み）およびハンセン病の病変の 16S V3-V4 rRNA 遺伝子およびサンガーシーケンスを行って、皮膚微生物相を調べました。皮膚の微生物相の分類群組成および存在量は、ハンセン病の病変と関連して大きく変化しました。これらの変化によって、は正常細菌叢（*Propionibacterium*、*Staphylococcus* および *Corynebacterium*）を犠牲にして、正常な皮膚とは通常関連性のない、病原性のある細菌（*Burkholderia*、*Pseudomonas* および *Bacillus*）の過成長が助長されました。その結果、病原性のある細菌が、ハンセン病の病変が提供する環境内にある常在細菌に対して競争上の優位を獲得した可能性があることが示唆されます。

イルミナ技術：MiSeq

Gharty J. P., Smith B. C., Chen Z., Buckley N., Lo Y., et al. (2014) *Lactobacillus crispatus* dominant vaginal microbiome is associated with inhibitory activity of female genital tract secretions against *Escherichia coli*. PLoS One 9: e96659

女性生殖管からの分泌物は、病原性のある細菌の増殖を阻害し、定着を防止することができます。こうした共同作業によって、健康なマイクロバイオームのバイオマーカーがつけられます。未妊娠および妊娠中の女性の膣分泌物を採取し、マイクロバイオームシーケンス（16S V6 アンプリコン）を行って、*E. coli* に対する抑制活性の特性評価を行いました。妊娠している場合としていない女性間のマイクロバイオーム組成には全体的な差異はありませんでした。*E. coli* を抑制する分泌物は *L. crispatus* 内で濃縮され、培養上清はこの作用を *in vitro* で再現しましたが、様々な *L. crispatus* 菌株でばらつきがありました。この研究は、*L. crispatus* にマイクロバイオームが豊富にある場合に *E. coli* の定着に対する防御作用を示し、こうした環境を促進することで陰性の妊娠転帰が防止できることを示唆しています。

イルミナ技術：HiSeq 2000 100 bp PEリード

Walther-Antonio M. R., Jeraldo P., Berg Miller M. E., Yeoman C. J., Nelson K. E., et al. (2014) Pregnancy's stronghold on the vaginal microbiome. PLoS One 9: e98514

膣マイクロバイオームが妊娠転帰に及ぼす影響は、実験観察の期間に一部制約があるものの、過去の研究によって示唆されました。この研究では、16S V3-V5 rRNA シーケンスを行って、合併症のない妊娠中の女性の膣マイクロバイオームを、妊娠期間全体にわたり、周期的にモニタリングしました。膣マイクロバイオームは安定しており、多様性は低く、白人種およびアフリカ系アメリカ人の女性では、*Lactobacillus*（特に *L. crispatus*）が優勢でした。*L. liners* が優勢またはシフトしたサンプルはほとんどありませんでした。しかし、民族性に起因する相違点が一部に認められました。白人種のマイクロバイオームは、三半期までに密集し、共通する誘引物質の方へ進行しましたが、アフリカ系アメリカ人のマイクロバイオームは個別に密集しました。この研究は、膣マイクロバイオーム特性について過去の観察を裏付け、妊娠合併症リスクの原因ともなる、民族性がマイクロバイオーム差異に及ぼす影響について考察しています。

イルミナ技術：MiSeq 250 bp PEリード



膣マイクロバイオームには *Lactobacillus* 属が優勢に存在します。障害は妊娠転帰に影響を及ぼし、妊娠合併症リスクの一因となることがあります。

バイロームとヒトの健康

ウイルス集団

ショットガンメタゲノミクスとも呼ばれるダイレクトシーケンス法は、ウイルスを同定し、微生物コミュニティ内でそれらの存在量を測定するために用いられます⁷⁶。これには、新しいウイルスを検出し、標準的な分離および増殖技術における共通の懸念である、細胞培養適応におけるウイルスの突然変異を回避することができるという特別な利点があります⁷⁷。ウイルスはバクテリア 16S rRNA 遺伝子と相似性のある系統発生のマーカーを持っていないため、16S rRNA 遺伝子に基づくターゲットシーケンスではウイルスを検出できません。

臨床サンプルでは、ウイルスの発見および検出のために、種々のプロトコルを用いて、核酸の生産量を増やしています⁷⁸。濃縮および cDNA 合成はエボラウイルス (EBOV)、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV)、中東呼吸器コロナウイルス (MERS-CoV)、狂犬病、およびベクター宿主の環境内に生息するその他の多くの RNA ウイルス^{79, 80}を検出するのに特に重要です^{81, 82}。環境内およびヒトの体内から抽出したメタゲノムデータの解析によって、巨大なアメーバのウイルスの存在がわかり、ヒトの病因が未知の肺炎と関連付けられる場合があります⁸³。

真核生物および原核生物のウイルスがヒトの腸内において微生物相を形作り⁸⁴、ヒトバイロームとして長期間持続し、各個体に固有であると認識されています⁸⁵。

総説

Sridhar S., To K. K., Chan J. F., Lau S. K., Woo P. C., et al. (2015) A systematic approach to novel virus discovery in emerging infectious disease outbreaks. *J Mol Diagn* 17: 230-241

McElroy K., Thomas T. and Luciani F. (2014) Deep sequencing of evolving pathogen populations: applications, errors, and bioinformatic solutions. *Microb Inform Exp* 4: 1

Quinones-Mateu M. E., Avila S., Reyes-Teran G. and Martinez M. A. (2014) Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. *J Clin Virol* 61: 9-19

Virgin H. W. (2014) The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* 157: 142-150

参考文献

Rossee T., Ozhelvaci O., Freimanis G. and Van Borm S. (2015) Evaluation of convenient pretreatment protocols for RNA virus metagenomics in serum and tissue samples. *J Virol Methods* 222: 72-80

前処理方法の正確な評価は、RNA ウイルスメタゲノミクスに統一されたガイドラインを提供するために必要です。この研究では、血清と肺組織のサンプルに低濃度および高濃度で RNA ウイルスを添加し、ウイルス配列の一般的な前処理法および濃縮法を評価しました。著者らにより、ビリオン濃縮戦略 (ろ過および DNase 処理) が有益であることがわかりました。血清サンプルでは、rRNA 除去に DNase 処理を併用することで、ウイルスシーケンスで最良の結果を得ました。組織サンプルでは、rRNA 除去で最も大きな結果を得ました。著者らは、さまざまなサンプルがさまざまな濃縮プロトコルの恩恵を得て、核酸濃度を最適化し、質の高いメタゲノム解析が行えることを明らかにしています。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq v3 300 bp PE リード

76. Allen H. K., Bunge J., Foster J. A., Bayles D. O. and Stanton T. B. (2013) Estimation of viral richness from shotgun metagenomes using a frequency count approach. *Microbiome* 1: 5
77. Sridhar S., To K. K., Chan J. F., Lau S. K., Woo P. C., et al. (2015) A systematic approach to novel virus discovery in emerging infectious disease outbreaks. *J Mol Diagn* 17: 230-241
78. Rossee T., Ozhelvaci O., Freimanis G. and Van Borm S. (2015) Evaluation of convenient pretreatment protocols for RNA virus metagenomics in serum and tissue samples. *J Virol Methods* 222: 72-80
79. Hall R. J., Wang J., Todd A. K., Bissielo A. B., Yen S., et al. (2014) Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *J Virol Methods* 195: 194-204
80. Stremlau M. H., Andersen K. G., Folarin O. A., Grove J. N., Odiya I., et al. (2015) Discovery of novel rhabdoviruses in the blood of healthy individuals from West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003631
81. Qin X. C., Shi M., Tian J. H., Lin X. D., Gao D. Y., et al. (2014) A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6744-6749
82. Walker P. J., Firth C., Widen S. G., Blasdel K. R., Guzman H., et al. (2015) Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae. *PLoS Pathog* 11: e1004664
83. Colson P., La Scola B. and Raoult D. (2013) Giant viruses of amoebae as potential human pathogens. *Intervirology* 56: 376-385
84. Kernbauer E., Ding Y. and Cadwell K. (2014) An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature advance online publication*:
85. Abeles S. R., Robles-Sikisaka R., Ly M., Lum A. G., Salzman J., et al. (2014) Human oral viruses are personal, persistent and gender-consistent. *ISME J* 8: 1753-1767

Xu G. J., Kula T., Xu Q., Li M. Z., Vernon S. D., et al. (2015) *Viral immunology. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. Science* 348: aaa0698

血清検査は単一（あるいは少数の）感染病原体の同一性に関する臨床的推定に基づいて行なわれず、現在および過去の病原体に対する血清学的応答に基づいて決定することができる仮説を必要としない検査は、集団レベルの臨床背景および疫学試験に役立ちます。著者らは、Systematic Viral Epitope Scanning または VirScan と呼ばれる手法を開発しました。これはわずか一滴の血液を用いて、記録上の抗ウイルス抗体を解析する高スループット手法です。この手法は、ヒトウイルス 206 種に相当する、現在既知のヒトウイルスすべてのウイルスペプチドを提示するファージライブラリーの免疫沈降および大量並列シーケンスを基に行われます。VirScan は世界で 569 名の個人で実施され、1 名あたり平均 10 のウイルスに対する抗体を同定し、2 名に 84 のウイルス種を同定しました。一部のペプチドは一貫して抗体のターゲットとなっており、「パブリックエピトープ」に相当することがあります。

イルミナ技術：HiSeq 2000 50 bp PE リード

Bzhalava D., Muhr L. S., Lagheden C., Ekstrom J., Forslund O., et al. (2014) *Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. Sci Rep* 4: 5807

ヒトパピローマウイルス (HPV) は皮膚内および皮膚表面に多く存在します。このメタゲノム解析では、これまで未知であった 47 種を含む皮膚 HPV 273 種が同定されました。著者らはイルミナシーケンサーを用いて、プールの皮膚病変を、事前に PCR 増幅せず、高深度のシーケンスを実施しました。既知の HPV が 23 種、新たな推定上の HPV が 3 種、および非 HPV ウイルス 4 種が同定されました。PCR 増幅した皮膚病変 326 サンプルから、これまで未知であった 226 種を含む、HPV385 種を検出しました。著者らは、高深度のシーケンステクノロジーが高性能および低コストを実現するにつれ、同定される HPV 種の数は増加する可能性が高いと結論付けています。

イルミナ技術：TruSeq Nano DNA Library Prep Kit, Nextera DNA Library Prep Kit, MiSeq v2 250 bp PE リード、MiSeq v3 300 bp PE リード

86. Dacheux L., Cervantes-Gonzalez M., Guigon G., Thiberge J. M., Vandenbogaert M., et al. (2014) A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One* 9: e87194
87. Quinones-Mateu M. E., Avila S., Reyes-Teran G. and Martinez M. A. (2014) Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. *J Clin Virol* 61: 9-19
88. Wang J., Moore N. E., Murray Z. L., McInnes K., White D. J., et al. (2015) Discovery of novel virus sequences in an isolated and threatened bat species, the New Zealand lesser short-tailed bat (*Mystacina tuberculata*). *J Gen Virol* 96: 2442-2452

ウイルス性動物由来感染症の保有宿主

動物由来感染症の保有宿主は、病原体の伝播で重要な役割を果たします。現在では、NGS を用いて、保有宿主動物のスクリーニングを実施し、ウイルス性病原体発生を予測し阻止することが可能です。

コウモリバイロームは、その種の中では高度に可変ですが、コロニーでは自然のウイルス種を維持します⁸⁶。コウモリバイロームには、さらにインフルエンザ A 型、ヘパシウイルス、ヘパドナウイルス、ハンタウイルス、スギウイルス、SARS 様ベータコロナウイルス⁸⁷、乳頭腫ウイルス、ピコルナウイルス、またポリオーマウイルス⁸⁸などの脊椎動物病原体が含まれます。コウモリは病原性の高い出現ウイルスの重要な保有宿主です (表 1)。



コウモリシチュー。

表 1: コウモリに存在する病原性ウイルス。

一般名	学名	ウイルス	参考文献
Chinese horseshoe bats	Genus <i>Rhinolophus</i>	SARS-CoV	89
Egyptian tomb bat	<i>Taphozous perforatus</i>	MERS-CoV	90
Fruit bats	<i>Hypsignathus monstrosus</i> , <i>Epomops franqueti</i> , and <i>Myonycteris torquata</i>	EBOV	91, 92

節足動物は感染症の生態および伝播に重要な役割を果たします⁹³。節足動物には、原腸管部の非病原体の共生体に加えて、哺乳動物に影響を及ぼすさまざまな病原体が潜伏しています⁹⁴。コウモリと異なり、一部の蚊はヒトに積極的に誘引されますが、ヒト固有のにおいの受容体が発現してこの誘引性を進化させた可能性があります。次に、人体においては皮膚微生物相の影響を受けます。これは、行動が特殊化したことによる異常な例です⁹⁵。ベクターによって伝播された感染症を制御するため合理的な手段を設計する際には、こうした相互作用の生物学を理解することが重要になります。このアプローチは、野生集団のウイルスコミュニティの変化を追跡して、集団発生を同定し予測する分子疫学研究にとって、確かに貴重である可能性があります。

総説

Han H. J., Wen H. L., Zhou C. M., Chen F. F., Luo L. M., et al. (2015) Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res* 205: 1-6

Huang J. H., Jing X. and Douglas A. E. (2015) The multi-tasking gut epithelium of insects. *Insect Biochem Mol Biol*

Liang G., Gao X. and Gould E. A. (2015) Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect* 4: e18

Narasimhan S. and Fikrig E. (2015) Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol* 31: 315-323

Bichaud L., de Lamballerie X., Alkan C., Izri A., Gould E. A., et al. (2014) Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microb Pathog* 77: 136-141

O' Shea T. J., Cryan P. M., Cunningham A. A., Fooks A. R., Hayman D. T., et al. (2014) Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg Infect Dis* 20: 741-745

参考文献

Chandler J. A., Thongsripong P., Green A., Kittayapong P., Wilcox B. A., et al. (2014) Metagenomic shotgun sequencing of a Bunyavirus in wild-caught *Aedes aegypti* from Thailand informs the evolutionary and genomic history of the Phleboviruses. *Virology* 464-465: 312-319

ヒトの健康にとって、多くのウイルス性疾患のベクターである、*Aedes aegypti* 蚊は、自らが保菌する数多くのウイルスの影響を明らかに受けていません。野生の *A. aegypti* サンプルに対して、RNA メタゲノムショットガンシーケンスと *de novo* アセンブリを併用することで、*Phlebovirus* 属の新たな種のほぼ完全なゲノムが得られました。特にこのウイルスは節足動物の宿主にのみ限定される、脊椎動物に対する毒性に必要な遺伝子を持っていません。この研究は、ウイルスの宿主向性の進化並びにウイルスの同定に高深度のメタゲノムシーケンスが有用であることに焦点を当てています。

イルミナ技術: TruSeq Stranded RNA Library Prep Kit, Genome Analyzer_{IIx} 50 bp single-end (SE) リード

89. Ge X. Y., Li J. L., Yang X. L., Chmura A. A., Zhu G., et al. (2013) Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503: 535-538
90. Milne-Price S., Miazgowicz K. L. and Munster V. J. (2014) The emergence of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Pathog Dis* 71: 121-136
91. Leroy E. M., Epelboin A., Mondonge V., Pourrut X., Gonzalez J. P., et al. (2009) Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 723-728
92. Leroy E. M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., et al. (2005) Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438: 575-576
93. Bichaud L., de Lamballerie X., Alkan C., Izri A., Gould E. A., et al. (2014) Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microb Pathog* 77: 136-141
94. Ponnusamy L., Gonzalez A., Van Treuren W., Weiss S., Parobek C. M., et al. (2014) Diversity of Rickettsiales in the microbiome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol* 80: 354-359
95. McBride C. S., Baier F., Omondi A. B., Spitzer S. A., Lutomi J., et al. (2014) Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature* 515: 222-227

Dacheux L., Cervantes-Gonzalez M., Guigon G., Thiberge J. M., Vandebogaert M., et al. (2014) A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. PLoS One 9: e87194

コウモリバイロームの研究は、こうしたベクターによってヒトに伝播されるウイルス性疾患の集団発生を阻害する鍵となる可能性があります。この研究では、組織サンプル（脳、肝臓および肺）が、狂犬病監視計画の一環で、発見時死亡していたか採取直後に死亡した食虫コウモリの死骸を対象とした小さなサンプル集団から採取されました。サンプルの高スループットシーケンスを行い、トータルバイロームが得られました。見つかったウイルスの中には、哺乳動物に感染する可能性のある既知のウイルス（シトウイルス、ヘルペスウイルス、およびフラビウイルス）がありました。新たな哺乳動物ウイルスも同定され、ロタウイルス、ボルナウイルス、ブニヤウイルス、新たなコウモリナイロウイルスなどもありました。ヒトと接触のあった、このような小さなサンプル集団内の既知および新たな哺乳動物ウイルスは多様性が高く、存在量が多いことから、ウイルス保有宿主としてのコウモリの重要性が実証されています。

イルミナ技術：TruSeq DNA Library Prep Kit v2、TruSeq PE Cluster Kit v3、TruSeq SBS Kit v3、HiSeq 2000 100 bp PE リード

He B., Zhang Y., Xu L., Yang W., Yang F., et al. (2014) Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China. J Virol 88: 7070-7082

いくつかの重度の急性呼吸器症候群様のコロナウイルス（SARS 様 CoV）は、かつてコウモリに同定されましたが、それらの受容体結合領域はいずれもヒト SARS-CoV に類似していないことから、これらはこのウイルスの先祖ではない可能性があります。この研究で著者らは、中国で 268 匹のコウモリの直腸スワブのメタゲノム解析を行ない、 α および β コロナウイルスの塩基配列を同定しました。SARS 様 CoV (LYRa11) の全ゲノム解析により、ヒト SARS-CoV の 91% のヌクレオチドを同定することができました。特に受容体結合領域の S 遺伝子に最も高い相同性が認められました。回復期の SARS 患者の血清には、このウイルスの S1 領域が認識され、抗原類似性が示されました。著者らは、LYRa11 が多くのコウモリの SARS 様 CoV に進化した親の系統に由来する組換え体であることを示唆しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer

McBride C. S., Baier F., Omondi A. B., Spitzer S. A., Lutomiah J., et al. (2014) Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. Nature 515: 222-227

Aedes aegypti 蚊は、ヒトに感染する病原性ウイルスのいくつかを保菌しています。理由はわからないものの、こうした蚊の一部はヒト以外の動物（「フォレストフォーム」）ではなく、ヒト（「ドメスティックフォーム」）を好みます。これらの 2 つの蚊のフォームが飼育株内で育成されました。主な嗅覚器である、触覚の組織の RNA-Seq により、ヒトに対する嗜好は、ヒトのにおいを大量に放つスルカトン（Sulfur Compound）を認識するに
おい受容体である AaegOr4 の発現の増加と感度に関連していることが示されました。ヒトのにおいの化合物へのこの感度は、蚊がヒト宿主を検出し好むことができるようにする進化的な適応です。しかし、この受容体またはスルカトンのいずれか一方だけでは、この挙動の唯一の因子となる可能性はありません。

イルミナ技術：TruSeq RNA Library Prep Kit v2、イルミナ GEX and HiSeq 2000



一部の蚊に認められるヒトに対する嗜好性は、ヒトが大量ににおいを放つスルカトン（Sulfur Compound）を認識するに
おい受容体である AaegOr4 の発現の増加および感度に関連します。

Woo P. C., Lau S. K., Teng J. L., Tsang A. K., Joseph M., et al. (2014) Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobornaviruses. *Virology* 471-473: 117-125

MERS-CoV の出現およびヒトコブラクダ内のこのウイルスに対する中和抗体の存在は、感染性ウイルス性疾患の蔓延におけるこれらの動物の役割について疑問符を投げかけました。この研究では、ドバイのヒトコブラクダ 203 頭のメタゲノムシーケンスを行って得られた糞バイロームに注目しました。著者らは多くの哺乳動物ウイルス（ピコビルナウイルス、サーコウイルス、ピコルナウイルス、パルボウイルス、アストロウイルス、およびヘルペスウイルス）を同定しましたが、それらの一部はこれまでヒトコブラクダには報告されていない 14 種の完全なサーコウイルスゲノムを同定しました。ヒトコブラクダの糞中にみられるウイルスは多様性が高いため、ヒトコブラクダとヒトの健康に関するそれらの発生率および作用を確立するためには、さらなる研究が必要です。

イルミナ技術：Nextera XT DNA Library Prep Kit, Nextera XT Index Kit, HiSeq 2500 150 bp PE リード

Yang L., Wu Z., Ren X., Yang F., Zhang J., et al. (2014) MERS-related betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats, China. *Emerg Infect Dis* 20: 1260-1262

MERS-CoV のヒトへの伝播を制御するには、自然界のウイルス保有宿主を見つける必要があります。著者らは、中国で *Vespertilio superans* コウモリから肛門スワブによる 32 サンプルを採取しプールして、核酸保護されたウイルス粒子の精製し、NGS によるシーケンスを実施しました。ヒトおよびラクダ MERS-CoV に密接に関連して、MERS-CoV と 60~97% のアミノ酸同一性を有する新たなベータコロナウイルス系統 C のドラフトゲノムを同定し生成しました。PCR 増幅シーケンスにより、5 サンプルがウイルスに陽性であったことが示され、これらのサンプルは互いに 98% 以上のヌクレオチドが同一でした。この新たな系統は、この研究時点で最も類似した MERS-CoV であり、自然界の MERS-CoV の保有宿主としてコウモリを位置づける他の研究を裏付けるものになりました。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}

Zhuang L., Zhang Z., An X., Fan H., Ma M., et al. (2014) An efficient strategy of screening for pathogens in wild-caught ticks and mosquitoes by reusing small RNA deep sequencing data. *PLoS One* 9: e90831

Small RNA にはウイルス - 宿主間の相互作用を制御する役割を果たす場合があります。著者らは、北京でダニと蚊から採取した small RNA のシーケンスによって得られたデータの再解析を開始し、ウイルス、原核生物、および真核生物の病原体のスクリーニングを行いました。新たな生物情報学的パイプラインを自ら開発してデータ内の推定上の病原体配列を探索し、ネステッド PCR を用いて結果の一部を確認しました。この手法により、*H. longicornis* ダニの新たな *Rickettsia spp* を同定し、さらに興味深いいくつかの推定上の原核生物および真核生物の病原体も同定しました。sRNA ディープシーケンスデータを再解析することで新たな薬剤を発見したり、病原体の起源をトラッキングしたりするのに有用であることが期待されます。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}

Wu Z., Yang L., Ren X., He G., Zhang J., et al. (2015) Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J*

コウモリに存在するウイルスのリストの同定はヒトの新興感染症を理解するのに有用な場合があります。この研究では、中国の至る所での主要なコウモリ類 40 種、4,440 匹のコウモリの咽頭および肛門スワブから、高スループットシーケンスによって完全なバイロームが得られました。著者らは、コウモリの生態学および生物多様性に関連して、新たなコウモリウイルスと同様にヒトまたは動物の病原体に密接に関連するウイルスも明らかにする、詳細な遺伝調査について示しています。この調査は、さらに新興病原体を予測し追跡するための、あるウイルスの起源または進化および生態学的情報の基礎を提供します。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}



コウモリのバイロームは、上述のオオコウモリと同様に、ヒトに感染する可能性のある多くのウイルスを潜伏させています。

DNA ウイルス

環境サンプルおよび臨床サンプルの高スループットシーケンスを行うことによって種々の virosphere が明らかになります。そこには、超好熱性の古細菌から哺乳脊椎動物まで DNA ウイルスが広い宿主域に存在しています⁹⁶。NGS は新たなウイルス、新たな遺伝子、および関連する機能とニッチを発見するための重要なツールです。

参考文献

Jensen R. H., Mollerup S., Mourier T., Hansen T. A., Fridholm H., et al. (2015) Target-dependent enrichment of virions determines the reduction of high-throughput sequencing in virus discovery. *PLoS One* 10: e0122636

高スループットシーケンスには通常、ウイルスの配列修復にビリオン濃度および濃縮が必要です。これらのアプローチの感度およびばらつきは十分に評価されておらず可変な場合があります。この研究では、ビリオン濃縮がある場合とない場合の RNA と DNA の両方をターゲットとした、さまざまなライブラリー調製手法を評価しました。DNA および RNA のウイルスの配列修復はビリオン濃縮から恩恵を受けており、特に DNA ウイルスの場合、配列決定を短縮することができました。この所見にもかかわらず、ダイレクトメタゲノミクスシーケンスより検出レベルが低いことは明白ではありませんでした。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Prep Kit, HiSeq 2000 100 bp PE リード

Krupovic M., Zhi N., Li J., Hu G., Koonin E. V., et al. (2015) Multiple layers of chimerism in a single-stranded DNA virus discovered by deep sequencing. *Genome Biol Evol* 7: 993-1001

多量で多様な 1 本鎖 DNA (ssDNA) ウイルスは多くの微生物に感染することが可能で、高頻度のヌクレオチド置換率を忍容することができ、組換えを行います。ssDNA ウイルスの一部はゲノム的にキメラに見えますが、これは RNA ウイルスおよびその他の ssDNA ウイルスから遺伝した複製遺伝子とカプシドが組み合わされるためです。この研究では、スピнкаラムによる CHV14 ssDNA ウイルスの NGS によってキメラ現象の新しい層が明らかにされました。この推定上の新たなウイルスの複製遺伝子は、異なるファミリー (RNA および DNA) のウイルスから遺伝した機能的な領域のキメラです。こうしたキメラ遺伝子は、遺伝子水平伝播およびドメインシャッフリングの産物である場合があります、この珍しいキメラの ssDNA ウイルスを生じさせます。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Markus A., Lebenthal-Loinger I., Yang I. H., Kinchington P. R. and Goldstein R. S. (2015) An *in vitro* model of latency and reactivation of varicella zoster virus in human stem cell-derived neurons. *PLoS Pathog* 11: e1004885

神経節内の水痘帯状疱疹ウイルスの潜在感染は、再活性化して帯状ヘルペスを引き起こす場合があります。しかし、この潜伏期の再活性化機序を検討するための *in vitro* モデルはありません。著者らは、アシクロビルによって安定した潜伏期を持つ胚性幹細胞由来のヒトの神経細胞をベースにした *in vitro* モデルを提示し、成長因子を抑制してあるいはホスホイノシチド-3 キナーゼ活性を抑制して再活性化を生じさせました。RNA-Seq を用いて、潜伏期と再活性化中に遺伝子発現をモニタリングし、特定のゲノム領域の優先転写を示しました。興味深いことには、34°C に温度を下げることで、ウイルスの活性が高まりました。このシステムは、潜伏期活性化のモデル化、および治療の選択肢を評価するツールとして役立つことが判明しました。

イルミナ技術: TruSeq Stranded Total RNA LT Library Prep Kit, HiSeq 2500

Chen J., Xue Y., Poidinger M., Lim T., Chew S. H., et al. (2014) Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. *Virology* 462-463: 14-24

ヒトパピローマウイルス (HPV) 16 は子宮頸がん発症のリスクを高めますが、HPV6b は肛門性器管内の良性病変に関連しています。しかし、こうした表現型の違いがもたらされる理由は完全には解明されていません。この研究では、RNA-Seq を用いて、臨床病変内の両ウイルスの完全なトランスクリプトームを生成しました。関連病変における両ウイルスタイプは、特にプロモーターとして、内因性のトランスクリプトーム的な相違点を示しました。HPV16 の場合には、顕著なトランスクリプトーム的な特徴が、E7、E2、E1、E5 などの調節タンパク質と多くの場合で関連する病勢進行を特徴付けました。こうした特徴は病勢進行および予後のためのバイオマーカーとして使用できる可能性があります。

イルミナ技術: TruSeq RNA Library Prep Kit v2, HiSeq 2000 v3 50 bp PE リード

96. DiMaio F., Yu X., Rensen E., Krupovic M., Prangishvili D., et al. (2015) *Virology*. A virus that infects a hyperthermophile encapsidates A-form DNA. *Science* 348: 914-917

RNA ウイルス

このグループに属するウイルスは、ゲノムサイズの制限並びに宿主、ベクター、およびゲノムの多様性に制限があることを特徴としています。また、RNA ウイルスは特筆すべき能力を持っており、組換え、再集合および保存的なアミノ酸置換によって、環境変化の中で迅速に進化することができます。多くの重要なウイルス感染が RNA ウイルスに依存しており、NGS は、ウイルスの発見および疫学で重要なツールとして利用されています。これは、未確認の微生物または予想外のソースを原因とする未知の疾患の場合には特に重要です。例えば、NGS で行うメタゲノムのアプローチでは、致死的な脳炎を発現したヒト宿主に、斑のリスからボルナウイルス VSBV-1 が直近に伝播したことを示しました⁹⁷。



NGS で行うメタゲノムのアプローチでは、致死的な脳炎を発現したヒト宿主に、斑のリスからボルナウイルス VSBV-1 が直近に伝播したことを示しました。

古代 RNA ウイルスの一部には、ヒトの健康および発育によい影響を与えるものがあります。内在性レトロウイルスは、ヒトゲノムの約 8% を占めます⁹⁸。それらの発現は、特定のがん、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染、および発現がウイルス感染から発育中の胚を保護する初期の胚形成中の場合以外は、ほとんどの場合に抑制されます⁹⁹。

参考文献

Andersen K. G., Shapiro B. J., Matranga C. B., Sealfon R., Lin A. E., et al. (2015) Clinical Sequencing Uncovers Origins and Evolution of Lassa Virus. *Cell* 162: 738-750

著者らは、臨床およびげっ歯類の保有宿主サンプルから、約 200 のラッサ熱ウイルス (LASV) シーケンスのゲノムカタログを作成しました。LASV 感染は、主として保有宿主からヒトへ感染して発生します。著者らは、西アフリカ全体の LASV の蔓延を追跡し、この伝播には LASV ゲノム存在量、致死率、コドン適応、および翻訳効率に変化が伴ったことを示しました。

イルミナ技術: HiSeq 2000 and Nextera XT libraries

Brown J. R., Morfopoulou S., Hubb J., Emmett W. A., Ip W., et al. (2015) Astrovirus VA1/HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 60: 881-888

従来方式では原因を特定できない場合、病因が未知の脳症となり医療現場において大きな懸念事項です。こうしたケースの対策として迅速で信頼性の高いツールが必要です。起源が未知の脳症を呈する、免疫抑制された小児から得られた脳生検で RNA-Seq を行い、VA1/HMO-C アストロウイルスを同定しました。その所見で免疫組織化学法が脳症の原因であることが確認され、他の体液内にもウイルスが認められました。これらの結果から、680 の糞便および 349 の脳脊髄液サンプルに関する調査が行われ、別の免疫抑制された小児から同種のウイルスが同定されました。著者らは、この種のアストロウイルスが神経障害性であり、原因不明の脳症症例において RNA-Seq が価値のある診断ツールであると結論付けています。

イルミナ技術: MiSeq

-
97. Hoffmann B., Tappe D., Hoper D., Herden C., Boldt A., et al. (2015) A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N Engl J Med* 373: 154-162
 98. Belshaw R., Pereira V., Katzourakis A., Talbot G., Paces J., et al. (2004) Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4894-4899
 99. Grow E. J., Flynn R. A., Chavez S. L., Bayless N. L., Wossidlo M., et al. (2015) Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. *Nature* 522: 221-225
-

Grow E. J., Flynn R. A., Chavez S. L., Bayless N. L., Wossidlo M., et al. (2015) Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. Nature 522: 221-225

ヒトの内在性レトロウイルス K 形 (HERV-K) は最近捕捉された内在性レトロウイルスであり、ヒト細胞の完全なオープンリーディングフレームの複製を複数保持しています。ウイルスは、HIV-1 型感染などの特定の条件下以外では、細胞内で抑制されます。この研究では RNA-Seq 法、ヌクレオチド単位解像度のクロスリンク法および免疫沈殿 (iCLIP) 解析を用い、長い末端反復の低メチル化および OCT4 によるトランスアクチベーションが初期胚の HERV-K 転写産物の発現を誘導することを示しました。一部の HERV-K 産物 (例: Rec) の発現は、細胞表面でインターフェロンに誘導された膜貫通型タンパク質 1 (IFITM1) を発現させることで、多能性細胞のウイルス感染を阻害すると考えられ、さらに細胞 RNA 一式を調節します。こうした結果により、HERV-K が初期胚発現における保護的な抗ウイルス性の役割を持ち、胚形成を調節するために宿主細胞因子と相互に作用することが示されます。

イルミナ技術: HiSeq 2000、HiSeq 2500

Stenglein M. D., Jacobson E. R., Chang L. W., Sanders C., Hawkins M. G., et al. (2015) Widespread recombination, reassortment, and transmission of unbalanced compound viral genotypes in natural arenavirus infections. PLoS Pathog 11: e1004900

アレナウイルスはセグメント化 RNA ウイルス (L および S セグメント) であり、ヘビに感染し、時としてげっ歯動物およびヒトにも感染し、出血熱を引き起こします。突然変異、組換え、および再集合のような事象がセグメント化 RNA ウイルスに発生し、哺乳動物アレナウイルスの出現の起源となる場合があります。これらの事象はヘビでは確認されていません。メタゲノムシーケンスを行って、自然感染後に捕捉したヘビ 48 匹のアレナウイルスの多様性を明らかにしました。合計で L 遺伝子型が 23、S 遺伝子型が 11 見つかかり、ヘビはいずれも多重感染していました。S/L 比率は常に不均衡で、L セグメント遺伝子型が S 遺伝子型を上回りました。組換えおよび再集合の事象のゲノムの証拠は一般的なもので、複製し伝播することが可能な異型の構造さえ認められました。著者らは、ヒトが介入して、これらのウイルスにこれまでに感染したヘビを混合したことで、こうしたウイルスの大幅な多様性がもたらされたと推測しています。

イルミナ技術: HiSeq 2500 135 bp PE リード



アレナウイルスはセグメント化 RNA ウイルスであり、ヘビ、さらに時としてげっ歯動物やヒトに感染します。

Stremiau M. H., Andersen K. G., Folarin O. A., Grove J. N., Odia I., et al. (2015) Discovery of novel rhabdoviruses in the blood of healthy individuals from West Africa. PLoS Negl Trop Dis 9: e0003631

著者らは、NGS を用いてナイジェリアの健常者 (n = 328) および原因不明の発熱患者 (n = 195) の血液サンプルから RNA ウイルスを発見しました。発熱患者は、様々なウイルス (例、HIV-1 型、ラッサウイルス) の塩基配列を保有していました。興味深いこととして、健常者 2 名が新たなラブドウイルス 2 種 (Ekpoma ウイルス [EKV]-1 および EKV-2) を保有しており、これらは他の既知のラブドウイルスとも、相互にも大きく異なっていました。最も似通った既知のウイルスは Bas-Congo ウイルスです。健常者の血清検査により、EKV-2 の血清有病率は EKV-1 のものより高いものの、他のラブドウイルスに対する交差反応性を除外することができないことが示されました。

イルミナ技術: HiSeq 2500 100 bp PE リード

Bhat R. K., Rudnick W., Antony J. M., Maingat F., Ellestad K. K., et al. (2014) Human endogenous retrovirus-K(II) envelope induction protects neurons during HIV/AIDS. PLoS One 9: e97984

HERV-K は特定の条件下以外では、ほぼ抑制されています。この研究では、HIV-1 型に感染している脳における HERV-K Env 発現の機能を解明することを目標としました。HERV-K にコードされている RNA 配列が、脳内、特に培養されたヒトの神経細胞内および HIV-1 型に感染した脳内に、最も多く存在していました。神経細胞内での Env の発現は、細胞生育力を増大させ、HIV-1 型 Vpr に媒介される神経毒性を阻害しました。神経幹細胞内での発現は TNF- α 発現および小グリア活性化を抑制し、マウスの神経行動の障害を改善しました。まとめると、これらの研究結果から、病的ストレス下では HERV-K の保護的役割が示唆され、この役割においてヒトゲノム内で保存されている理由であると考えられます。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Dennis F. E., Fujii Y., Haga K., Damanka S., Lartey B., et al. (2014) Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. *PLoS One* 9: e100699

グループ A ロタウイルスは乳幼児の胃腸炎の主要な原因です。ワクチンである Rotarix は 2012 年にガーナで導入されたものの、その当時ウイルスの多様性に関する情報は利用可能ではありませんでした。ワクチン導入前に、G8P の [6] ガーナ菌株 2 種のゲノムシーケンスを行い、系統発生および多様性情報を入手しました。著者らは、両方の菌株に異常な未報告の、次の遺伝子型があったことを示しています。G8 P[6]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H3。さらに、11 中 10 の遺伝子が同定され、VP1 が唯一の例外でした。牛/羊/ヤギのロタウイルスの再集合と伝播が明白であり、ガーナのロタウイルスに多様性を付与する循環内の動物およびヒト菌種のモニタリングが必要であることが強調されました。

イルミナ技術: MiSeq Reagent Kit v2, MiSeq

Mohammadi P., di Iulio J., Munoz M., Martinez R., Bartha I., et al. (2014) Dynamics of HIV latency and reactivation in a primary CD4+ T cell model. *PLoS Pathog* 10: e1004156

潜伏期を逆戻りさせる薬剤 (例: ポリノスタット) がヒストン脱アセチル化酵素を阻害する場合でさえ、HIV 潜伏期戦略によってウイルスはキュレーションを妨げるか、感染細胞から有効に除去されます。感染した可能性のある細胞の RNA-Seq とウイルスをコードするレポーターベクターを併用して CD4+ T 細胞モデルに用い、潜伏期と再活性化の特性を調査しました。著者らは、潜伏期中にきわめて制約のある翻訳でのウイルスの転写産物が持続的に存在することを示しました。薬剤の再活性化によりウイルスの転写は増加しましたが、ウイルスの翻訳は増強されませんでした。これは活性化剤によって標的とされない翻訳後のブロックの一部が HIV 潜伏期に至ることがあることを示唆しています。こうしたブロックを潜伏感染させないために、同定し対処する必要があります。

イルミナ技術: TruSeq RNA Library Prep Kit, TruSeq Cluster Generation Kit, HiSeq 2000

ウイルスの small RNA および宿主相互作用

RNA ウイルスは二本鎖 RNA 中間物 (ウイルス由来の small RNA) を細胞内に産出し、昆虫や植物の RNA 干渉 (RNAi) 機序を活性化します。こうした抗ウイルス性の応答は、抗ウイルス性インターフェロン応答につながると考えられます。細胞由来の small RNA は、次にウイルスの感染によって阻害されます。しかし、一部のウイルスは RNAi パスウェイ上のサブプレッサーをコード化することによりこれらの宿主細胞応答を阻害することができます^{100, 101}。デング熱ウイルス -2 に認められるとおり、ウイルスの small RNA はウイルス複製に対する調節機能を持つ可能性があります¹⁰²。

参考文献

Jiang P., Zhou N., Chen X., Zhao X., Li D., et al. (2015) Integrative analysis of differentially expressed microRNAs of pulmonary alveolar macrophages from piglets during H1N1 swine influenza A virus infection. *Sci Rep* 5: 8167

H1N1 プタインフルエンザ A 型ウイルスはパンデミックの可能性を保有しており、それはヒトの病理発生モデルとしても役立ちます。この研究では、H1N1 に感染した子ブタの肺の肺泡マクロファージ内での microRNA (miRNA) の発現差異を明らかにすることを目標としました。この研究では、宿主 miRNAs が感染の急性期には抑制され、疾患回復中に徐々に正常に戻り、激しい肺損傷が回避されたことが示されました。さらに、miRNA- 標的調節ネットワークを、インフルエンザ感染中の miRNAs の機能および調節機構の特定に役立てることができました。

イルミナ技術: HiSeq 2000, Genome AnalyzerIIx

Zhou Z., Li X., Liu J., Dong L., Chen Q., et al. (2015) Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res* 25: 39-49

スイカズラ (HS, *Lonicera japonica*) は、インフルエンザウイルスの複製に対する活性が報告されている中国の伝統的な薬草です。しかし、その具体的な作用機序は報告されていません。著者らは高スループットシーケンスを用いて、広範囲のインフルエンザ A 型ウイルスを標的とする HS にコードされている miRNA MIR2911 を同定しました。MIR2911 は、HS 浸出液を与えられたマウスの肺および血液で見つかることから、熱安定性があることが示唆されます。MIR2911 の合成物と浸出液を調製したところ、PB2 および NS1 タンパク質発現、およびさらに H1N1 の複製が阻害されました。HS 浸出液による作用が PB2 と NS1 の突然変異誘発、および抗 MIR2911 antagomir により無効化されたことから、HS 浸出液中の MIR2911 の濃度がウイルス阻害作用を誘導するのに十分だったことが示唆されました。MIR2911 はさらに *in vitro* および *in vivo* で H5N1 および H7N9 複製を阻害しました。著者らは、HS 内に初めて認められた、インフルエンザウイルス A を有効に阻害する有効成分を提示しています。

イルミナ技術: HiSeq 2000

100. Parameswaran P., Sklan E., Wilkins C., Burgon T., Samuel M. A., et al. (2010) Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog* 6: e1000764
101. van Mierlo J. T., Overheul G. J., Obadia B., van Cleef K. W., Webster C. L., et al. (2014) Novel Drosophila viruses encode host-specific suppressors of RNAi. *PLoS Pathog* 10: e1004256
102. Hussain M. and Asgari S. (2014) MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 2746-2751



伝統的な中国医学で用いられるスイカズラ茶は、インフルエンザ A 型ウイルスに対する阻害作用を持つ miRNA をコードしています。

Cooper D. A., Jha B. K., Silverman R. H., Hesselberth J. R. and Barton D. J. (2014) Ribonuclease L and metal-ion-independent endoribonuclease cleavage sites in host and viral RNAs. *Nucleic Acids Res* 42: 5202-5216

リボヌクレアーゼ L (RNase L) は金属イオン非依存性のエンドリボヌクレアーゼであり、免疫応答とがんの一因となると考えられています。しかし、この酵素の細胞およびウイルス標的についてはほとんど知られていません。著者らは、2', 3'-環状リン酸塩 cDNA 合成およびイルミナシーケンサーを活用して、RNase L のウイルスおよび細胞 RNA 標的を確認しました。この研究では、RNase L に感受性を示す C 型肝炎ウイルスとポリオウイルスの RNA ゲノム領域を同定しました。その結果、リボソーム RNA 内の RNase L 依存性および非依存性の細胞標的、および 5S rRNA の末端の 2', 3'-環状リン酸塩の証拠が示されました。

イルミナ技術: MiSeq, Genome Analyzer_{IIx}

Li D. J., Verma D., Mosbrugger T. and Swaminathan S. (2014) CTCF and Rad21 act as host cell restriction factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic replication by modulating viral gene transcription. *PLoS Pathog* 10: e1003880

カポジ肉腫に関連するヘルペスウイルス (KSHV) の再活性化および溶菌サイクルの機序には、約 80 の溶菌サイクル遺伝子およびウイルス DNA 複製の転写が必要です。CTCF およびコヒーシンは、ヘルペスウイルスゲノムの特定の部位に結合することによりサイクル調節に関与できる細胞タンパク質ですが、その機序は完全には特徴づけられません。クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) につながれた CTCF とコヒーシンの両方にクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) を併用して RNAi を除去したところ、両タンパク質がウイルスの KSHV 複製の制限因子であることが示されました。ヘルペスウイルス-ゲノムからの解離により、多くのウイルスが産出されました。両因子は最初 KSHV ゲノムの転写を活性化化したものの、後には溶菌の転写を阻害し、ウイルス RNA 蓄積を妨げました。著者らは、ウイルスゲノム内の細胞タンパク質の作用を評価するために、RNAi が細胞タンパク質を効率的にノックダウンする方法であることを示しています。

イルミナ技術: ChIP-Seq DNA Library Prep Kit, TruSeq RNA Library Prep v2 Kit, HiSeq 2000

Shrinet J., Jain S., Jain J., Bhatnagar R. K. and Sunil S. (2014) Next generation sequencing reveals regulation of distinct *Aedes* microRNAs during chikungunya virus development. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2616

昆虫の種々の細胞プロセスにおけるウイルス由来 small RNA (vsRNAs) の役割は、疾患伝播におけるそれらの役割についての研究を促しました。この研究はチクングニヤウイルス (CHIKV) を保菌する *Aedes albopictus* (Singh's) の細胞株に焦点をあてています。未感染の対照群 (n = 88) と比較して、感染細胞群では 79 miRNAs が発現しました。より綿密な解析を行ったところ、両ライブラリーに共通の miRNA 77 種が差次的に発現し、特定の miRNA 8 種が CHIKV 感染によって変更され、上方制御 (n = 4) および下方修正 (n = 4) が認められました。これらの miRNAs の予測標的は、数ある中でも免疫応答、アミノ酸分解およびウイルスの侵入に関連する、異なる 17 パスウェイに集中していました。著者らは、CHIKV 感染中に miRNAs によって発現した細胞変異を明確にする可能性のある、差次的発現した miRNA のパスウェイおよび相互作用を示しています。

イルミナ技術: TruSeq Small RNA Library Prep Kit, Genome Analyzer_{IIx}



Aedes albopictus、ヒトスジシマカ。

Weng K. F., Hung C. T., Hsieh P. T., Li M. L., Chen G. W., et al. (2014) A cytoplasmic RNA virus generates functional viral small RNAs and regulates viral IRES activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 42: 12789-12805

RNAウイルスに対するvsRNAの作用の詳細は哺乳動物細胞では調査されていません。NGSとノーザンブロット法により、エンテロウイルス属-71に感染した細胞内でvsRNA 4種(1~4)が同定されました。vsRNA1は、感染細胞に多量に存在し、ダイサーに関連していました。vsRNA1 過剰発現は、感染細胞内のウイルスの翻訳を抑制し、内部リボソームの挿入部位(IRES)を活性化しました。この機序は、IRESとの相互作用を阻害する、ウイルスの5'-UTRのステムループIIを標的とすることにより媒介される場合があります。したがって、vsRNA1抑制によってウイルス複製が増強され、タンパク質が合成されました。著者らは、vsRNAとIRESとの相互作用によって媒介されたウイルスを調節する新たな機序の可能性について記述しています。

イルミナ技術: HiSeq 2000

103. Lemey P., Rambaut A., Bedford T., Faria N., Bielejec F., et al. (2014) Unifying viral genetics and human transportation data to predict the global transmission dynamics of human influenza H3N2. *PLoS Pathog* 10: e1003932

ヒトのウイルス病原体

ウイルス性感染症の出現および伝播の主要因には、野生の生息地へのヒトの侵入、気候変化、国際貿易、グローバリゼーションおよび海外旅行があります。ヒトの移動性データおよびウイルスシーケンスを組み合わせることで、ヒトインフルエンザH3N2のモデルで実証されるとおり、こうした因子がどのように伝播力学に寄与し、その予測に役立つかを証明することができます¹⁰³。

参考文献

Nordahl Petersen T., Rasmussen S., Hasman H., Caroe C., Baelum J., et al. (2015) Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance. *Sci Rep* 5: 11444

グローバリゼーションと大量輸送システムは、世界中で疾患が急速に蔓延する一因となっています。世界レベルで伝播をモニタリングすることは難しいタスクであり、それには迅速で信頼性の高い高スループット手法が役立ちます。著者らは、世界3地域の9都市からコペンハーゲン(デンマーク)に到着する18の国際便のトイレ排泄物のショットガンシーケンスを行いました。抗菌剤テトラサイクリン、マクロライドおよびβラクタムに対する耐性遺伝子が、すべてのサンプルで最も多く認められました。米国便と比較した場合、南アジアからの便には、これらの遺伝子がより多量に、高い多様性で含まれていました。さらに、ノロウイルスおよび *Salmonella enterica* は南アジアから多く認められましたが、*C. difficile* は米国便で高い頻度でみられました。この研究では、グローバルサーベイランスにショットガンシーケンスが有用であり、病原体の検出やおよび抗菌耐性プロファイルのモニタリングが可能であることを示しています。

イルミナ技術: HiSeq 2000



航空機のトイレから得られた排泄物でメタゲノム調査を行い、グローバルな健康サーベイランスにおける NGS の利用可能性が明らかになりました。

Briese T., Mishra N., Jain K., Zalmout I. S., Jabado O. J., et al. (2014) Middle East respiratory syndrome coronavirus quasispecies that include homologues of human isolates revealed through whole-genome analysis and virus cultured from dromedary camels in Saudi Arabia. MBio 5: e01146-01114

MERS-CoV（および核酸）に対する抗体は、ヒトコブラクダで同定され、ヒトに感染するウイルス MERS-CoV の保有宿主であることが示唆されています。この研究では、ウイルスの全ゲノム配列をダイレクトシーケンスによってサウジアラビアのヒトコブラクダの鼻腔スワブから回収しました。ヒトコブラクダの MERS-CoV 相同配列はヒトの MERS-CoV 配列と同一でした。ヒトコブラクダでは複数のゲノム変異が見つかり、ヒトで見つかった単一クローンのシーケンスとは対照的に、MERS-CoV の複数の菌株によって感染する可能性を示唆しています。これらの所見は、ヒトに感染する MERS-CoV の保有宿主としてのヒトコブラクダの役割を裏付けるものです。クローン性差異を踏まえて、著者らの示唆によれば、ヒトコブラクダ内の MERS-CoV の特定遺伝子型がボトルネック選択を伝達し、異種間の伝播をもたらす可能性があります。

イルミナ技術：HiSeq 2500



ヒトコブラクダはヒトに感染する MERS-CoV ウイルスを保有する宿主である可能性があります。

Brown B. A., Nix W. A., Sheth M., Frace M. and Oberste M. S. (2014) Seven Strains of Enterovirus D68 Detected in the United States during the 2014 Severe Respiratory Disease Outbreak. Genome Announc 2: e01201

細気管支炎と肺炎を引き起こすエンテロウイルス属 D68 (EV-D68) は、1962 年にカリフォルニアで最初に同定されました。長年検出されることがなかったものの、2009 年に再出現し、現在では非常に広範囲の集団発生を引き起こしています。CDC は共同循環している代表的な EV-D68 菌株 7 種のゲノムシーケンスを実施しました。著者らは、これらの 7 種の菌株のゲノム構造について記述し、結論として、これらの VP1 遺伝子を根拠に、この菌株はかつて米国、欧州、およびアジアで分離されたものと密接な関連性があるとしています。

イルミナ技術：HiSeq 2500 v2

Chan B. K., Wilson T., Fischer K. F. and Kriesel J. D. (2014) Deep sequencing to identify the causes of viral encephalitis. PLoS One 9: e93993

病因未知の脳炎の臨床症例は多く、その病因の決定には既知の手技以外の技術が必要とされます。そのため、凍結正常脳 14 サンプル、凍結脳炎脳 7 サンプルのディープ RNA シーケンスと病原体に特有の PCR を行って検討しました。脳炎サンプルの 3 サンプル中 2 サンプルに、麻疹と単純ヘルペスウイルスのタイプ 1 配列がそれぞれ検出されました。これらの結果は臨床および病原体特有の PCR 推定内容と一致しており、メタゲノムシーケンスが凍結脳組織内のウイルス感染を正確に同定できることを示しました。

イルミナ技術：TruSeq Library Prep Kit、HiSeq 2000

Escalera-Zamudio M., Nelson M. I., Cobian Guemes A. G., Lopez-Martinez I., Cruz-Ortiz N., et al. (2014) Molecular epidemiology of influenza A/H3N2 viruses circulating in Mexico from 2003 to 2012. PLoS One 9: e102453

2009 年の H1N1 インフルエンザのパンデミックによって、分子疫学的アプローチを用いてウイルスの保有宿主の特性に取り組む必要性が強調されています。著者らは、2003 年 ~2012 年の間にメキシコで単離されたインフルエンザ A 型 /H3N2 菌株 19 種のシーケンスを行い、系統発生関係を解析し、抗原決定を比較しました。この研究では、多くの系統が同じインフルエンザ流行期間に共同循環することを示しました。これらのうちの一部系統は季節をまたいで存在し続け、再分類の際に保有宿主となる可能性があります。系統発生の特性評価は、抗原同一性と必ずしも関連しておらず、インフルエンザウイルスのサーベイランスでは、抗原データに加えてゲノム決定ツールを用いる必要性が強調されました。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}

Peng X., Alfoldi J., Gori K., Eisefeld A. J., Tyler S. R., et al. (2014) The draft genome sequence of the ferret (*Mustela putorius furo*) facilitates study of human respiratory disease. Nat Biotechnol 32: 1250-1255

国内のケナガイタチは、ヒトインフルエンザウイルス感染および伝播の「標準」モデルと考えられますが、その全ゲノムは解読されておらず、この動物モデルに基づく推論の制約となっています。この研究では、その低い異型接合性によって選択された雌ケナガイタチ 1 匹のドラフトゲノム配列を取得し、ケナガイタチ 24 匹の異なる組織の完全な RNA シーケンスを決定しました。同様に、1918 年および 2009 年に大流行したインフルエンザウイルスに感染したケナガイタチ 42 匹のトランスクリプトームプロファイルには、肺と気管の組織に異なるトランスクリプトームの特徴が示されました。CF 疾患進行を反映したケナガイタチ 16 サンプルのマイクロアレイデータにより、CFTR ノックアウト動物が乳児サンプルで検出されない疾患経路を持っていることが示されました。

イルミナ技術：HiSeq 100 bp PE リード

Sikora D., Rocheleau L., Brown E. G. and Pelchat M. (2014) Deep sequencing reveals the eight facets of the influenza A/HongKong/1/1968 (H3N2) virus cap-snatching process. Sci Rep 4: 6181

NA はこれらのキャップされた断片を「キャップ付加反応」と呼ばれるプロセスでウイルスの mRNA 合成にプライマーとして使用します。著者らは、インフルエンザ A 型 /HongKong/1/1968 (H3N2) に感染したヒトとマウスの細胞のウイルス mRNA の 5' 末端すべてのディープシーケンスを行いました。これらの領域は長さ、モチーフヌクレオチドおよびハイジャックされた宿主 mRNA が可変です。既知の転写開始部位ヘリドをマッピングし、ウイルスが最も大量に細胞 mRNA を標的とすることを示しました。研究結果全体として、ウイルスのポリメラーゼ - ウイルス mRNA 複合体が宿主 mRNA 標的を求めてわずかに競合することを示唆しています。キャップ付加反応についての詳細も記載されています。

イルミナ技術：HiSeq 2000

Wylie K. M., Wylie T. N., Orvedahl A., Buller R. S., Herter B. N., et al. (2015) Genome sequence of enterovirus D68 from St. Louis, Missouri, USA. Emerg Infect Dis 21: 184-186

2014 年 10 月時点で、CDC は 43 州にヒト EV-D68 の 594 症例を確認しました。この特殊なウイルスでは先例がないレベルです。2014 年まで、利用可能なウイルス配列は 5 件しかなく、分子疫学研究には限界がありました。この研究の著者らは、セントルイスで単離された EV-D68 の臨床菌株から 1 つの全ゲノムおよび 8 つの部分配列を提示しています。これらの配列を CDC が生成し中西部から入手した他の 7 つの塩基配列と比較しました。セントルイスの配列はすべてきわめて類似しており、最大 99% のヌクレオチド同一性が共有されました。セントルイスの全ゲノムは中西部ウイルスのものに類似しており、過去数年における欧州およびアジアでの分離株と一緒に分類されました。この塩基配列はこうした急速に蔓延するウイルスのゲノムを比較するためのツールのうちの 1 つですが、表現型の特性にゲノム変化を関連させるためにも詳細な特性評価の実施が有用です。

イルミナ技術：HiSeq 2500 100 bp PE リード

エボラ

EBOV、インフルエンザウイルス、MERS-CoV およびチクングニアウイルスの集団発生は、新興病原体がもたらす複雑な社会的、科学的な課題を例示しています。疫学的研究の裏付けを得るには、ほぼリアルタイムに集団発生をモニタリングする迅速で信頼性の高いウイルス同定用ツールが必要です¹⁰⁴。NGS はこれらの要求を満たす強力なツールになりました¹⁰⁵。長距離航空便のトイレ排泄物のメタゲノム解析に NGS が使用されたことは、グローバルな健康および脅威の監視に NGS の利用が可能であることを示しています¹⁰⁶。

参考文献

Carroll M. W., Matthews D. A., Hiscox J. A., Elmore M. J., Pollakis G., et al. (2015) Temporal and spatial analysis of the 2014-2015 Ebola virus outbreak in West Africa. *Nature* 524: 97-101

この研究は、現在集団発生している EBOV の伝染性研究を支援する数多くの活動を補完し、ギニアの European Mobile Laboratory によって処理された 179 サンプルのディープシーケンスを行い、2014 年 3 月 ~2015 年 1 月にわたりその流行の疫学的、進化的経緯を明らかにしました。この解析によれば、EBOV はギニアからシエラレオネに 2014 年 5 月、おそらく 4 月または 5 月上旬に持ち込まれました。2014 年 8 月、9 月および 10 月時点のシーケンスから、この系統がギニアで独立して進化したことが示されました。シエラレオネでの同様な活動とともに、この研究は抑制措置の有効性を報告し、この集団発生の継続的な経緯について記述しています。

イルミナ技術: ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Prep Kit, HiSeq 2500 v4 125bp PE リード

Park D. J., Dudas G., Wohl S., Goba A., Whitmer S. L., et al. (2015) Ebola Virus Epidemiology, Transmission, and Evolution during Seven Months in Sierra Leone. *Cell* 161: 1516-1526

EBOV の Makona 変異によってアフリカの国々は今も被害を受けています。ウイルス伝播についての知見および力学は介入手段を構築するために重要です。著者らは、シエラレオネで 7 か月間サンプリングした新たな 232 ゲノムのシーケンスを行い、得られたデータを以前の流行時のものと比較しました。シエラレオネでの持続的なヒト同士の感染は、この解析によって確認されましたが、最初に持ち込まれた後、国境を越えて EBOV が移入した証拠はありませんでした。検出されたのは、宿主内での遺伝変異の出現、宿主対宿主の伝播、非同義突然変異の効果的な純化選択抑制、および長期間におよぶムチン様領域での変化でした。著者らは、ウイルスの推定進化速度が、その集団発生の初期に推定したよりも遅く、長期にわたり類似していることと述べていることは重要なことです。この研究は、長期に及ぶ伝染性の力学に関する知見の詳細を示し、流行期間にわたって継続的にサンプリングし、シーケンスを行うことの重要性を強調しています。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, HiSeq 2500 100 bp PE リード

Simon-Loriere E., Faye O., Faye O., Koivogui L., Magassouba N., et al. (2015) Distinct lineages of Ebola virus in Guinea during the 2014 West African epidemic. *Nature* 524: 102-104

著者らは、2014 年 7 月から 11 月までギニアで EBOV 感染患者の 85 サンプルをシーケンスしました。シーケンス解析により、次の 3 つのウイルスの系統の持続的伝播および共同循環が示されました。1 つ目はギニアに特有で最も初期にサンプリングされたウイルスに密接に関連づけられ、2 つ目はおそらくシエラレオネから再導入されたウイルス、3 つ目は後にマリに広がったものでした。系統はそれぞれ、ウイルスの糖タンパク質のムチン様領域を含む突然変異の特定のセットを含んでいました。著者らは表現型変異内の糖タンパク質突然変異が示唆することについて議論しています。

イルミナ技術: ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Prep Kit, HiSeq 2500 v4 125 bp PE リード



エボラウイルス。

104. Kugelman J. R., Wiley M. R., Mate S., Ladner J. T., Beitzel B., et al. (2015) Monitoring of Ebola Virus Makona Evolution through Establishment of Advanced Genomic Capability in Liberia. *Emerg Infect Dis* 21: 1135-1143
105. Lipkin W. I. (2013) The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat Rev Microbiol* 11: 133-141
106. Nordahl Petersen T., Rasmussen S., Hasman H., Caroe C., Baelum J., et al. (2015) Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance. *Sci Rep* 5: 11444

Zaraket H., Baranovich T., Kaplan B. S., Carter R., Song M. S., et al. (2015) Mammalian adaptation of influenza A(H7N9) virus is limited by a narrow genetic bottleneck. *Nat Commun* 6: 6553

鳥インフルエンザ A (H7N9) ウイルスのヒトへの感染は、多くの場合感染した鶏肉との接触に関連しており、ヒト間の伝播は限定されていました。この研究では H7N9 が鶏肉において高度に多様で無症候性であったことが報告されました。ケナガイタチでは、逆の事象が発生しました。多様性はきわめて限定的で、これらの種の間ではあまり伝播可能性はありませんでした。異なるウイルス遺伝子内の一連の突然変異はケナガイタチ感染に関連がありましたが、一層の宿主対宿主の伝播を制限した適応コストを伴いました。この機序は種間跳躍を抑制し、パンデミック対策のリスクアセスメントツールとなります。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq 150 bp PE リード

Gire S. K., Goba A., Andersen K. G., Sealfon R. S., Park D. J., et al. (2014) Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 345: 1369-1372

著者らはアフリカのエボラ流行の初期段階のゲノムシーケンスを回収することができました。NGS を用いて、シエラレオネの患者 78 名から合計 99 の EBOV ゲノムが生成されました。これらのゲノムは蓄積された宿主内および宿主間の遺伝的変異を示しました。その結果、この西アフリカ変異はおそらく 2004 年頃に中央アフリカの系統から分岐し、2004 年 5 月にギニアに入る時点ではヒト同士の伝播が維持されていたことが示されました。著者らは、多くのウイルスの遺伝子が介入手段への影響を評価するためにモニタリングされるべき明確な突然変異を示すことを指摘しています。

イルミナ技術: Hybridase Thermostable RNase H, Nextera XT DNA Library Prep Kit, HiSeq 100 bp PE リード

HIV

HIV-1 型のようなウイルスは、潜伏期を確立して療法を回避する能力を持つため、継続的に問題を引き起こし^{107, 108}、迅速にエイズに進行する侵襲性の変異も出現します¹⁰⁹。NGS を使用した HIV 研究で、ウイルスが腸のマイクロバイオームの腸内毒素症の原因となっていることが示されました。NGS では、Prevotella の大量な存在や、未治療患者¹¹⁰ および抗レトロウイルス療法 (ART) で治療されたコホートの免疫活性化との関連性に重点を置いています¹¹¹。

参考文献

Cotten M., Oude Munnink B., Canuti M., Deijs M., Watson S. J., et al. (2014) Full genome virus detection in fecal samples using sensitive nucleic acid preparation, deep sequencing, and a novel iterative sequence classification algorithm. *PLoS One* 9: e93269

糞便のバイロームのメタゲノムシーケンスは、その同一性に関して既知の前提のないサンプル内の病原体に関する手掛かりを提供することができます。著者らは、イルミナシーケンスおよびバイオインフォマティクなアルゴリズムを用いて、核酸抽出、ライブラリー調製およびウイルス同定を組み合わせることにより、全ゲノム検出プロセスの開発を開始しています。de novo アセンブリを用いてウイルスの全ゲノムを生成しました。その手順は HIV-1 型感染患者から得た糞便サンプルを用いて行われました。このコホートでは一連のウイルスが検出され、日和見 (ひよみ) 感染症では腸疾患のウイルスを含む 6 つのウイルスファミリーから 12 の完全なウイルスゲノムが同定されました。この方法はウイルス検出に有用であり、HIV-1 型進行に伴う変化の解析を改善することができます。

イルミナ技術: MiSeq

Dillon S. M., Lee E. J., Kotter C. V., Austin G. L., Dong Z., et al. (2014) An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol* 7: 983-994

HIV-1 型感染は腸の免疫系障害を引き起こすことが知られており、微生物の転座、リポ多糖類 (LPS) の漏出および免疫系の全身性の活性化がもたらされます。大腸生検の 16S V4 rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスを用いて、腸微生物相変化が評価されました。著者らは HIV-1 型感染患者の腸微生物相変化を示しました。Prevotella 種の存在量の増加や Bacteroides 数の減少により、腸の微生物コミュニティの混乱が示唆され、結腸の T 細胞および樹状細胞の活性化、微生物の転座、および血中 T 細胞の活性化が引き起こされます。したがって、HIV-1 型感染は腸微生物相障害を引き起こし、局所および全身性の免疫活性化への下流効果をもたらします。

イルミナ技術: MiSeq Reagent Kit v2

107. Elliott J. H., Wightman F., Solomon A., Ghneim K., Ahlers J., et al. (2014) Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog* 10: e1004473
108. Mascola J. R. (2015) HIV. The modern era of HIV-1 vaccine development. *Science* 349: 139-140
109. Kouri V., Khouri R., Aleman Y., Abrahantes Y., Vercauteren J., et al. (2015) CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine* 2: 244-254
110. Dillon S. M., Lee E. J., Kotter C. V., Austin G. L., Dong Z., et al. (2014) An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol* 7: 983-994
111. Mutlu E. A., Keshavarzian A., Losurdo J., Swanson G., Siewe B., et al. (2014) A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PLoS Pathog* 10: e1003829

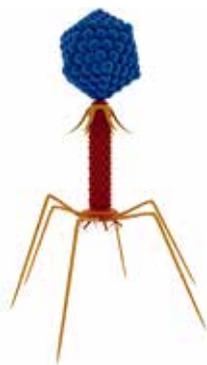
Dudley D. M., Bailey A. L., Mehta S. H., Hughes A. L., Kirk G. D., et al. (2014) Cross-clade simultaneous HIV drug resistance genotyping for reverse transcriptase, protease, and integrase inhibitor mutations by Illumina MiSeq. *Retrovirology* 11:122

ARTへのウイルス耐性は、一般に HIV-1 ウイルスの *pol* 遺伝子内で発生します。現在のジェノタイプリング手法はサブタイプ B ウイルスのために最適化されているため、プロテアーゼおよび逆転写酵素阻害薬に対する耐性を同定できますが、インテグラーゼ阻害はできません。著者らは M HIV サブタイプの *pol* 遺伝子を標的とする汎用プライマーセットを開発しました。これにより、イルミナ MiSeq シーケンスと併用することで、抗ウイルス薬 3 種に対する耐性を検出することができます。このジェノタイプリング手法は 62 サンプルに用いられ、薬剤耐性突然変異の検出に対する一貫性と感受性を示しました。このツールは、抗ウイルス耐性変異の迅速な検出およびトラッキングを支援できる可能性があります。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep, MiSeq

ファージ

バクテリオファージは、生物圏の中ですべての微生物の絶対多数を代表するものです¹¹²。これらの微生物は、バクテリアに感染し、微生物集団を形成する際に顕著な役割を果たすウイルスです¹¹³。集団の遺伝的多様性はきわめて高度で、ファージは数十億年の間活発に進化してきたと考えられます。ファージ内の頻繁な遺伝子水平交換は、その構造の広汎なモザイク性および新たな病原菌の出現をもたらしています¹¹⁴。今日の抗生物質耐性菌がもたらす危機によって、伝染病管理におけるファージ療法および生態的防除アプローチに対する関心が再燃しています¹¹⁵。



バクテリオファージ。

バクテリアは CRISPR 配列をコードすることにより、ファージ感染耐性を備えるものの、ヒトの皮膚にある *P. acnes* 菌種で生じるため、その耐性にはばらつきがあります¹¹⁶。MRSA¹¹⁷ に対する媒介物除染薬剤としてファージを使用することから、抗菌薬に代わる有望な選択肢となりうることが示されています。さらに、病原性菌のファージタイピングを行うことにより、腸病原体集団発生の監視および疫学的調査に有用な情報が得られます¹¹⁸。

バクテリアのバイロームは健康や環境に大きな影響を与える場合があります¹¹⁹。ヒトの腸内には平均して 5 つのバクテリオファージ分類群がさまざまな量で存在します。これらの分類群の一部は、特定の宿主ファージ相互作用を確認しながら特定のヒト集団を特徴づけます¹²⁰。シグネチャーバイロームの変化はかく乱の早期マーカーとなりうるため、将来的に非侵襲性の診断検査を提供できる可能性があります。

ヴィロファージは、補助ウイルスの繁殖を阻害したり弱めたりするサテライトウイルスです。ヴィロファージシーケンスは、ヒトの腸¹²¹ や動物の腸¹²² をはじめグローバルな広がりを見せているものの、それらの役割はまだ究明されていません。

112. Hatfull G. F. and Hendrix R. W. (2011) Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol* 1: 298-303
113. Reyes A., Semenkovich N. P., Whiteson K., Rohwer F. and Gordon J. I. (2012) Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat Rev Microbiol* 10: 607-617
114. Muniesa M., Hammerl J. A., Hertwig S., Appel B. and Brussow H. (2012) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol* 78: 4065-4073
115. Fernandes P. (2006) Antibacterial discovery and development--the failure of success? *Nat Biotechnol* 24: 1497-1503
116. Liu J., Yan R., Zhong Q., Ngo S., Bangayan N. J., et al. (2015) The diversity and host interactions of *Propionibacterium acnes* bacteriophages on human skin. *ISME J* 9: 2078-2093
117. Jensen K. C., Hair B. B., Wienclaw T. M., Murdock M. H., Hatch J. B., et al. (2015) Isolation and Host Range of Bacteriophage with Lytic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Potential Use as a Fomite Decontaminant. *PLoS One* 10: e0131714
118. Cowley L. A., Beckett S. J., Chase-Topping M., Perry N., Dallman T. J., et al. (2015) Analysis of whole genome sequencing for the *Escherichia coli* O157:H7 typing phages. *BMC Genomics* 16: 271
119. Waldron D. (2015) Microbial ecology: Sorting out viral dark matter. *Nat Rev Microbiol* 13: 526-527
120. Waller A. S., Yamada T., Kristensen D. M., Kultima J. R., Sunagawa S., et al. (2014) Classification and quantification of bacteriophage taxa in human gut metagenomes. *ISME J* 8: 1391-1402
121. Zhou J., Zhang W., Yan S., Xiao J., Zhang Y., et al. (2013) Diversity of virophages in metagenomic data sets. *J Virol* 87: 4225-4236
122. Yutin N., Kapitonov V. V. and Koonin E. V. (2015) A new family of hybrid virophages from an animal gut metagenome. *Biol Direct* 10: 19

総説

Krupovic M. and Koonin E. V. (2015) Polintons: a hotbed of eukaryotic virus, transposon and plasmid evolution. *Nat Rev Microbiol* 13: 105-115

参考文献

Cowley L. A., Beckett S. J., Chase-Topping M., Perry N., Dallman T. J., et al. (2015) Analysis of whole genome sequencing for the *Escherichia coli* O157:H7 typing phages. *BMC Genomics* 16: 271

E. coli O157:H7 は溶血尿毒症候群と血性下痢を引き起こします。あるファージがニッチ、年齢集団および重症度と関連するとすれば、ファージタイピングは公衆衛生サーベイランスに役立てることができま。著者らは、16 のタイピングファージ (T4 と T7) のシーケンスを行い、T7 ファージは 3 つのヌクレオチドのみ異なっており、T4 ファージは類似したゲノム配列の 3 つの異なる群に当てはまることを示しました。

イルミナ技術: TruSeq DNA Library Prep Kit, MiSeq 150 bp PE リード, Nextera DNA Library Prep Kit, Genome Analyzer_{IIx}

Jakhetia R. and Verma N. K. (2015) Identification and Molecular Characterisation of a Novel Mu-Like Bacteriophage, SfMu, of *Shigella flexneri*. *PLoS One* 10: e0124053

S. flexneri は開発途上国における赤痢の一般的な原因であり、そのファージの一部が報告されています。著者らは NGS を用いて、Mu 様のファージである SfMu のゲノムの機能および表現型の特性づけを行いました。O 抗原は SfMu 受容体として同定されました。プロファージおよび残遺物が、さまざまな *S. flexneri* セロタイプ中に見つかったことで、それらの転移因子が *S. flexneri* において一般的であることが示されました。ファージ-バクテリア相互作用を理解することが、進化と病原論におけるそれらの役割の解明に役立ちます。

イルミナ技術: MiSeq 250 bp PE リード

Moon B. Y., Park J. Y., Hwang S. Y., Robinson D. A., Thomas J. C., et al. (2015) Phage-mediated horizontal transfer of a *Staphylococcus aureus* virulence-associated genomic island. *Sci Rep* 5: 9784

ほとんどすべての *Staphylococcus aureus* 菌株で見つかった病原性のアイランド vSaβ は、病原性遺伝子の内容がきわめて異なります。このアイランドの多様性および可動性はよく理解されていないままです。この研究では、vSaβ および関連するプロファージのシーケンスを行い特徴づけています。ヒトおよび動物の *S. aureus* への vSaβ の可動性は、多様性の獲得に関与する可能性のある変換可能な粒子が転換を繰り返すことで、このプロファージが媒介しています。こうした所見により、*S. aureus* の病原性の進化におけるファージの役割が強調されています。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq v2

Sangster W., Hegarty J. P. and Stewart D. B., Sr. (2015) Phage tail-like particles kill *Clostridium difficile* and represent an alternative to conventional antibiotics. *Surgery* 157: 96-103

再発性 *C. difficile* 感染 (CDI) を抗生物質投与でコントロールするのは困難です。その結果、*C. difficile* によって産出された、ファージに形態学的に類似したタンパク質である、phage tail-like particles (PTLP) などの代替療法が開発されています。*C. difficile* の臨床サンプルから精製された PTLP は、患者由来の、さまざまなリボタイプの *C. difficile* に比較して検証しました。PTLP のゲノムクラスターのシーケンスおよびアノテーションを行いました。PTLP の殺菌力はリボタイプおよび種に依存し、死滅に必要と推定される遺伝子が同定されました。これらの *in vitro* の結果は、CDI に代わる代替療法の開発にとって明るい話題です。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq 150 bp PE リード

Hare J. M., Ferrell J. C., Witkowski T. A. and Grice A. N. (2014) Prophage induction and differential RecA and UmuDab transcriptome regulation in the DNA damage responses of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *PLoS One* 9: e93861

SOS 応答は、LexA 転写抑制の緩和に RecA を必要とします。*Acinetobacter* 種では、DNA 損傷後の誘導に *umuDab* を代わりに必要とすることから、LexA の類縁物質であることが示唆されます。RNA-Seq により、WT、*recA*、ならびに *A. baylyi* および *A. baumannii* の *umuDab* 突然変異菌株の DNA 損傷トランスクリプトームが明確化され、それらには *recA* および *umuDab* に誘導された SOS 遺伝子に対する差別的な依存性がありました。*A. baumannii* 遺伝子は 3 つのプロファージ領域に密集し、バクテリオファージ粒子はマイトマイシン C 投与後に認められました。こうした結果から、両種が *recA* 依存性および *recA* 独立性のレギュロンに関する強健で複雑な DNA 損傷応答を持つことが示唆されます。さらに、*umuDab* にエラー傾向のあるポリメラーゼの抑制に特化した役割があるものの、追加の制御因子がこれらの種の DNA 損傷に対する転写応答に参加することがこの結果から実証されます。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

ウイルスワクチン開発

天然痘は、1980年代の大規模な予防接種計画により根絶することができました¹²³。それ以降、ポリオウイルス根絶に向けた具体的な進展が見られましたが、数カ国にはまだWTポリオウイルスポケットが存在していました¹²⁴。ポリオウイルスの後、ヒトエンテロウイルス71 (HEV71) が最も恐ろしい神経向性のエンテロウイルス属となっています。アジアパシフィック地域で最近出現しているにも関わらず、有効なワクチンはまだなく¹²⁵、SARSなどの他の重篤な新興病原体も同時に発生する事態になっています。

HIV-1型ワクチンの探索についてはほかにも特徴的な状況があります。HIV-1に対するワクチン開発に努力を惜しかなかったものの、潜伏期や抗原変異などの要因により、わずかに成功を取めただけでした^{126, 127}。逆説的に、こうした努力がもたらした技術的改善は他のワクチン開発プログラムを後押ししました。例えば、改変によってウイルス様粒子 (VLP) と結合したサイトカイン様のアジュバントによりHIVの免疫原性を改善し、このことは、他の病原体にも応用されています¹²⁸。ウイルス感染が関与しているがんもみられます。HPV-18のウイルス配列が卵巣がんサンプル内に同定されたことで、この株を含む現在のワクチン戦略が、この種の腫瘍形成のケース数を減らすのに役立つ可能性があります¹²⁹。

ワクチン開発に固有の問題は数多く存在します。例えば、WT菌株は時間の経過とともにワクチン株を置換することができるため、遺伝的不安定性が報告されています。これらのケースはワクチンの有効性に影響を及ぼすため、免疫処置戦略では、生ワクチンや弱毒化ワクチンの遺伝子モニタリングが重要なツールとなります¹³⁰。

総説

Bande F., Arshad S. S., Bejo M. H., Moeini H. and Omar A. R. (2015) Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J Immunol Res* 2015: 424860

Beasley D. W., McAuley A. J. and Bente D. A. (2015) Yellow fever virus: genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Res* 115: 48-70

Salazar-Gonzalez J. A., Angulo C. and Rosales-Mendoza S. (2015) Chikungunya virus vaccines: Current strategies and prospects for developing plant-made vaccines. *Vaccine* 33: 3650-3658

Sanchez-Sampedro L., Perdiguer B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., et al. (2015) The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses* 7: 1726-1803

Archin N. M., Sung J. M., Garrido C., Soriano-Sarabia N. and Margolis D. M. (2014) Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nat Rev Microbiol* 12: 750-764

参考文献

Fulton B. O., Sachs D., Beaty S. M., Won S. T., Lee B., et al. (2015) Mutational Analysis of Measles Virus Suggests Constraints on Antigenic Variation of the Glycoproteins. *Cell Rep* 11: 1331-1338

はしかウイルス (MeV) の抗原安定の背景にある機序は、完全には究明されていません。この研究では、MeVをトランスポゾン挿入突然変異させ、挿入を忍容したウイルスを回収しました。NGSを用いて、挿入部位およびメトランスポゾンライブラリーの均等性を同定しました。インフルエンザなどの他のウイルスで以前行った研究と比較すると、MeV (FおよびHのタンパク質) の糖タンパク質への挿入はきわめて不十分でした。この研究では、MeVのFおよびHの糖タンパク質の変化は耐容性に優れていないことを示しており、抗体中和を回避するために必要なシーケンス変異が制限されています。この所見では、感染や予防接種後の永続的な耐性を考慮に入れています。

イルミナ技術: TruSeq DNA LT Library Prep Kit, HiSeq 2000 100 bp SE リード

123. World Health Organization (2015) Smallpox.
124. Wassilak S. G., Oberste M. S., Tangermann R. H., Diop O. M., Jafari H. S., et al. (2014) Progress toward global interruption of wild poliovirus transmission, 2010-2013, and tackling the challenges to complete eradication. *J Infect Dis* 210 Suppl 1: S5-15
125. Kok C. C. (2015) Therapeutic and prevention strategies against human enterovirus 71 infection. *World J Virol* 4: 78-95
126. Mascola J. R. (2015) HIV. The modern era of HIV-1 vaccine development. *Science* 349: 139-140
127. Young B. E., Sadarangani S. P. and Leo Y. S. (2015) The avian influenza vaccine Emerflu. Why did it fail? *Expert Rev Vaccines* 14: 1125-1134
128. Feng H., Zhang H., Deng J., Wang L., He Y., et al. (2015) Incorporation of a GPI-anchored engineered cytokine as a molecular adjuvant enhances the immunogenicity of HIV VLPs. *Sci Rep* 5: 11856
129. Roos P., Orlando P. A., Fagerstrom R. M. and Pepper J. W. (2015) In North America, some ovarian cancers express the oncogenes of preventable human papillomavirus HPV-18. *Sci Rep* 5: 8645
130. Gladstone R. A., Jefferies J. M., Tocheva A. S., Beard K. R., Garley D., et al. (2015) Five winters of pneumococcal serotype replacement in UK carriage following PCV introduction. *Vaccine* 33: 2015-2021

Marsh A. K., Ambagala A. P., Perciani C. T., Russell J. N., Chan J. K., et al. (2015) Examining the species-specificity of rhesus macaque cytomegalovirus (RhCMV) in cynomolgus macaques. PLoS One 10: e0121339

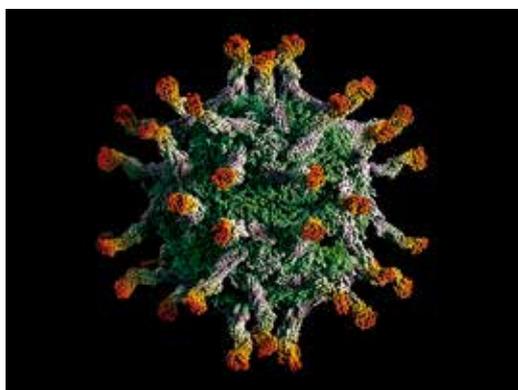
サイトメガロウイルス (CMV) は高度な種特異性を持つため、ワクチンベクターとしての使用が限定されることがあります。この研究では、カニクイザルマカクに、実験室にて改造された組換え型のアカゲザルサイトメガロウイルス (RhCMV) を感染させました。シーケンスを行って、ウイルスの遺伝子情報の完全性および高感度緑色蛍光タンパク質 (eGFP) 挿入部位を決定しました。感染したマカクには、疾患の徴候、組織サンプル中のウイルスの存在あるいは eGFP 発現が認められませんでした。すなわち、データによれば、カニクイザルは RhCMV に生産的には感染しなかったことが示唆されます。著者らは、ワクチン開発における実験室にて改造された主要なウイルスの使用について考察します。

イルミナ技術: MiSeq 150 bp PE リード

Mee E. T., Minor P. D. and Martin J. (2015) High resolution identity testing of inactivated poliovirus vaccines. Vaccine 33: 3533-3541

品質管理はワクチン開発のきわめて重要なコンポーネントです。したがって、ワクチン株を同定し、生物学的混入物を識別するためには信頼性の高い方法が必要とされます。ランダム RT-PCR および高スループットシーケンスを用いて、製造のさまざまなステージにおける 1 価および 3 価のポリオウイルスワクチンから全長ゲノムを回収しました。この手法により、検出されることが想定されていた株を精確に同定でき、セービン 1 菌株およびマホニー菌株から分離できました。さらに、マイナーな変異を明らかにする、また類似した産物を識別する、などの目的で手法に若干の改変を加えることもできます。

イルミナ技術: Nextera XT Library Prep Kit, MiSeq v2 250 bp PE リード



ポリオウイルスキャプシド。

Ang L., Arboleya S., Lihua G., Chuihui Y., Nan Q., et al. (2014) The establishment of the infant intestinal microbiome is not affected by rotavirus vaccination. Sci Rep 4: 7417

抗ロタウイルス経口予防接種が腸内細菌叢の確立に及ぼす効果を評価するため、3 人の乳児の予防接種前および予防接種後の糞便のサンプルがメタゲノミクス、PCR 変性勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) および短鎖脂肪酸解析によって解析されました。マイクロバイオームは機能レベルで類似しており、予防接種は腸内細菌叢の確立に対して検出可能な効果はないと考えられました。

イルミナ技術: HiSeq 2000 100 bp PE リード、CASAVA v1.8.2

Beck A., Tesh R. B., Wood T. G., Widen S. G., Ryman K. D., et al. (2014) Comparison of the live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 strain to its virulent parental strain Asibi by deep sequencing. J Infect Dis 209: 334-344

弱毒性の生ウイルスワクチンの特性評価は、それらの親の株に比べて、ウイルスの減毒、ワクチンの安定性、および毒性の復帰リスクの機序を明らかにします。著者らは、生きた弱毒性黄熱病ウイルス菌株、17D-204 およびその親の株、Asibi のディープシーケンスを行いました。このワクチン株には、疑似種多様性および個別の弱毒突然変異、すなわち、生きたウイルスのワクチンの弱毒性に関連する特徴がないことがわかりました。

イルミナ技術: HiSeq 1000 50 bp PE リード

Zhou W., Gao S., Podgorska K., Stadejek T., Qiu H. J., et al. (2014) Rovac is the possible ancestor of the Russian lapinized vaccines LK-VNIViM and CS strains but not the Chinese strain (C-strain) vaccine against classical swine fever. Vaccine 32: 6639-6642

ウサギ馴化ワクチンはウサギを経由することにより弱毒化されます。古典的な豚コレラウイルス (CSFV) に対するウサギ馴化ワクチンの起源についての情報は過去に失われています。著者らは NGS を用いた解析により、歴史上のロシアの Rovac 株およびそのウサギ馴化ワクチンである、LK-VNIViM および CS の系統発生解析によってワクチンの起源を解明しました。さらに、ウサギ馴化中国株 (C-株) とも比較しました。遺伝子解析では、ロシアの株 Rovac と LK-VNIViM との間の密接な関係が確認され、後者が CS 株およびその派生種である、RUCSFPLUM に対するの祖先的役割をどのように持っていたのかが示されました。著者らの示唆によれば、Rovac ワクチンが C-株ワクチンではなくロシアのワクチン株の祖先である可能性があります。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq

微生物病原論

環境中の莫大な数の微生物のうち、感染症を引き起こすのはわずか数 % です。微生物のゲノムは動的で、遺伝子水平伝播、SNP、遺伝子重複、遺伝子喪失などのプロセスを経ることがあります。バクテリアの pathogenomics では、こうした繰り返し起こる変化のスナップショットが示されます¹³¹。

培養や単離の手法では、原因物質に関する既知の知識が必要とされます。NGS では、微生物が何であるかという仮説の必要なく、問題の微生物に関する機能的な推論が可能であり、病原体生物学および進化について解明することができます。これらの利点は、発症機序を理解する上で基礎となります。これによって、疫学的調査が支援され、公衆衛生に対する脅威が同定でき、従来型ワクチンによって制御されない株の出現を検出することができます¹³²。

総説

Land M., Hauser L., Jun S. R., Nookaew I., Leuze M. R., et al. (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* 15: 141-161

Angelakis E. and Raoult D. (2014) Methods for the discovery of emerging pathogens. *Microb Pathog* 77: 114-118

参考文献

Bruggemann H., Brzuszkiewicz E., Chapeton-Montes D., Plourde L., Speck D., et al. (2015) Genomics of *Clostridium tetani*. *Res Microbiol* 166: 326-331

C. tetani の入手可能なゲノムは 2 種のみです。著者らは NGS を用いて、*C. tetani* 菌株の追加ゲノム 3 種を入手し、以前シーケンスされたゲノム 2 種と比較しました。主な特長として、破傷風毒素をコードするプラスミドや全遺伝子の約 85% を含むコアゲノムなどがあります。非中核染色体には、環境相互作用、防衛および適応機能の要素が含まれています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Guerra-Assuncao J. A., Houben R. M., Crampin A. C., Mzembe T., Mallard K., et al. (2015) Recurrence due to relapse or reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*: a whole-genome sequencing approach in a large, population-based cohort with a high HIV infection prevalence and active follow-up. *J Infect Dis* 211: 1154-1163

結核 (TB) の再発には、元の菌株での再発か新たな菌株での再感染の場合があります。WGS は、マラウイ北部での治療終了後、積極的に経過観察した TB コホートの利用可能な培養物すべてに実施されました。再発は 10 SNP 以下の違いと定義され、再感染は 100 SNP 以上の違いとしました。再感染は HIV 感染に関連していましたが、再発は系統 3 菌種およびイソニアジド耐性に関連していました。いくつかの因子が TB 再起の原因ですが、*M. tuberculosis* ゲノムの差も再発や感染の一因となります。

イルミナ技術: HiSeq 2000 100 bp PE リード

Springer D. J., Billmyre R. B., Filler E. E., Voelz K., Pursall R., et al. (2014) *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. *PLoS Pathog* 10: e1004285

C. gattii 菌類病原体は免疫不全患者に感染します。米国北西部で進行中の集団発生により、カリフォルニアの臨床分離株と環境要因との間の関連性を見出す必要があるとの関心が高まっています。著者らは、感染者の住宅近くの土壌から活性的な *C. gattii* VGIII を単離しました。多座配列タイピング (MLST) および WGS により、こうした環境分離株がヒトの感染源であることが示されました。この研究では、環境要因が HIV 患者の *C. gattii* 感染リスク (かつては過小評価されていたリスク) を示すことを強調しています。

イルミナ技術: HiSeq 2500 100 bp PE リード

-
131. Pallen M. J. and Wren B. W. (2007) Bacterial pathogenomics. *Nature* 449: 835-842
 132. Peacock S. (2014) Health care: Bring microbial sequencing to hospitals. *Nature* 509: 557-559
-

ヒトの健康に重要な微生物

一部の微生物はヒトと動物で感染を引き起こしてきた長い歴史がありますが¹³³、一部のバクテリアは特定の宿主にのみ感染し、その他のバクテリアには広範な親和性があります¹³⁴。しかし、生活習慣の変化、グローバリゼーション¹³⁵、予防接種、および増加している抗生物質耐性により、重要と考えるべき微生物の全体像は再定義されつつあります。疾患の分子機序はゲノムに基づいていますが、微生物コミュニティとその変化する生態系との間の相互作用は、バクテリアの伝染および発症機序の進化において重要な推進役となります^{136, 137, 138}。

ミコバクテリア

成長の遅いミコバクテリアは、ヒトや動物の宿主でさまざまな疾患を引き起こします (表 2)。

表 2: ミコバクテリアと疾患。

名称	宿主	疾患	参考文献
<i>Mycobacterium abscessus</i>	ヒト	CF 患者の主な病原体。臨床的な転帰不良を伴う	139
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	ヒト	CF 患者および軟部組織感染	140
<i>Mycobacterium avium</i> Subsp. <i>hominissuis</i>	ブタ、ヒト	HIV または全身性の免疫抑制のない個人の肺疾患によって感染した個人などの免疫不全宿主に伝播した疾患	141
<i>Mycobacterium lepromatosis</i>	ヒト	び慢性らい腫型ハンセン病および Lucio's phenomenon として知られている反応状態	142
<i>Mycobacterium terrae</i> complex	ヒト	稀であるが重篤な肺疾患	143
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ヒト	結核	144
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	ヒト	ブルーリ潰瘍、潰瘍性皮膚感染	145

グローバルな TB の流行をもたらしている *M. tuberculosis* 北京系統は、多くの場合、薬剤耐性が強化されて検出されます。この病原体の進化を解析するツールである WGS は、グローバルな状況下で分離株を位置づける疫学的調査を支援し¹⁴⁶、迅速に薬剤耐性パターンの一部を決定します¹⁴⁷。

133. Kay G. L., Sergeant M. J., Zhou Z., Chan J. Z., Millard A., et al. (2015) Eighteenth-century genomes show that mixed infections were common at time of peak tuberculosis in Europe. *Nat Commun* 6: 6717
134. Bos K. I., Harkins K. M., Herbig A., Coscolla M., Weber N., et al. (2014) Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 514: 494-497
135. Petty N. K., Ben Zakour N. L., Stanton-Cook M., Skippington E., Totsika M., et al. (2014) Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 5694-5699
136. Wilson D. J. (2012) Insights from genomics into bacterial pathogen populations. *PLoS Pathog* 8: e1002874
137. Ochman H. and Moran N. A. (2001) Genes Lost and Genes Found: Evolution of Bacterial Pathogenesis and Symbiosis. *Science* 292: 1096-1099
138. van Boven M., Mooi F. R., Schellekens J. F., de Melker H. E. and Kretzschmar M. (2005) Pathogen adaptation under imperfect vaccination: implications for pertussis. *Proc Biol Sci* 272: 1617-1624
139. Harris K. A., Underwood A., Kenna D. T., Brooks A., Kavaliunaite E., et al. (2015) Whole-genome sequencing and epidemiological analysis do not provide evidence for cross-transmission of mycobacterium abscessus in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *Clin Infect Dis* 60: 1007-1016
140. Tettelin H., Davidson R. M., Agrawal S., Aitken M. L., Shallom S., et al. (2014) High-level relatedness among *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* strains from widely separated outbreaks. *Emerg Infect Dis* 20: 364-371
141. Uchiya K., Takahashi H., Nakagawa T., Yagi T., Moriyama M., et al. (2015) Characterization of a novel plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *PLoS One* 10: e0117797
142. Singh P., Benjak A., Schuenemann V. J., Herbig A., Avanzi C., et al. (2015) Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 4459-4464
143. Ngeow Y. F., Wong Y. L., Tan J. L., Hong K. W., Ng H. F., et al. (2015) Identification of new genomospecies in the *Mycobacterium terrae* complex. *PLoS One* 10: e0120789
144. Kumar V. and Robbins S. L. (2007) Robbins basic pathology. xiv, 946 p.
145. Ablordey A. S., Vandelanooote K., Frimpong I. A., Ahorot E. K., Amisshah N. A., et al. (2015) Whole genome comparisons suggest random distribution of *Mycobacterium ulcerans* genotypes in a Buruli ulcer endemic region of Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003681
146. Eldholm V., Monteserin J., Rieux A., Lopez B., Sobkowiak B., et al. (2015) Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. *Nat Commun* 6: 7119
147. Coll F., McNerney R., Preston M. D., Guerra-Assuncao J. A., Warry A., et al. (2015) Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med* 7: 51



TB 薬剤を開発する初期の取り組み。結核のマスター菌株から生じる胞子は蒸留水で「懸濁」され、次に調製された液体に注入される。

総説

Galagan J. E. (2014) Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet* 15: 307-320

Lechartier B., Rybniker J., Zumla A. and Cole S. T. (2014) Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. *EMBO Mol Med* 6: 158-168

参考文献

Ali A., Hasan Z., McNerney R., Mallard K., Hill-Cawthorne G., et al. (2015) Whole genome sequencing based characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan. *PLoS One* 10: e0117771

薬剤耐性の (XDR) *M. tuberculosis* の広範な伝播により、これらの菌株やその変異を信頼性高く検出するために改善された手法が求められています。この研究では、WGS をパキスタン由来の XDR 菌株 37 種のシーケンスを行って、薬剤耐性と関係する遺伝子を調査しました。いくつかの変更は追加されましたが、以前に耐性複合体の一部として同定された遺伝子の SNP および突然変異の可変数が観察されました。著者らの推定では、市販用アッセイを用いた表現型および遺伝子型の検査間で一致にはばらつきがあり、*M. tuberculosis* の薬剤耐性検出対照を広げる必要があるとしています。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Colman R. E., Schupp J. M., Hicks N. D., Smith D. E., Buchhagen J. L., et al. (2015) Detection of Low-Level Mixed-Population Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Using High Fidelity Amplicon Sequencing. *PLoS One* 10: e0126626

M. tuberculosis 感染では低レベルの薬剤耐性 (DR) 亜集団は多くの場合検出されず、治療されないため、DR 結核に至ることがあります。著者らは、臨床痰サンプルからきわめて稀な標的アリルを測定するために、「single-molecule-overlapping reads」(SMOR) 解析と NGS を組み合わせる手法を開発しテストを行いました。この手法は、以前検出されなかった低レベルの DR 亜集団の臨床的関連性の評価を可能にし、それらが臨床的に重要になる前に抑制する介入を支援することができます。

イルミナ技術: MiSeq v3 300 bp PE リード

Curtis J., Luo Y., Zenner H. L., Cuchet-Lourenco D., Wu C., et al. (2015) Susceptibility to tuberculosis is associated with variants in the ASAP1 gene encoding a regulator of dendritic cell migration. *Nat Genet* 47: 523-527

TB は開発途上国における重大な健康問題であり、宿主の遺伝的諸因子はその疾患に対する感受性を決定する際に重要となる場合があります。健常者および肺結核コホートの発現アレイ解析により、染色体 8q24 上にある ASAP1 遺伝子のイントロン内の TB と変異との関連性が示されました。実験的に DC の ASAP1 を除去したところ、マトリックス分解および移動が損なわれました。ASAP1 タンパク質はアクチンおよび膜改造に関与しており、ポドソームとも関連があります。したがって、TB の素因となる可能性のある機序は、ASAP1 発現が過度に削減されたため、DC の移動が損なわれたことに関連する可能性があります。

イルミナ技術: イルミナ HT-12 expression array

Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., et al. (2015) Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet* 47: 242-249

著者らは、99カ国から入手した分離株 4,987種の遺伝子解析およびこれまでで最大の解析データセットである110種の代表分離株のWGSによって、北京系統の*M. tuberculosis*の進化の歴史および生物地理学的構造を追跡しました。この系統が極東から始まり、次に産業革命、第一次世界大戦およびHIV流行と時を同じくして、いくつかの波で世界的に伝播したと結論づけられました。MDRクローン2種がアジアとロシアの至る所で付随的に伝播し、旧ソ連の公衆衛生システムが崩壊しました。この研究では、世界中への伝播に成功する可能性のあった毒性に関連した突然変異を同定しています。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq

Periwal V., Patowary A., Vellarikkal S. K., Gupta A., Singh M., et al. (2015) Comparative whole-genome analysis of clinical isolates reveals characteristic architecture of *Mycobacterium tuberculosis* pangenome. *PLoS One* 10: e0122979

比較ゲノム解析は、*M. tuberculosis*など非常に均質と考えられる種の遺伝的多様性の決定に有用な技術です。著者らは、以前に入手したゲノムアセンブルを統合し、新たにシーケンスを行ったインドの*M. tuberculosis*を含めました。「ハードコアゲノム」がすべてに共通して検出され、「ソフトコアゲノム」が菌株の95%以上、およびアクセサリーゲノムで検出されました。この研究では、*M. tuberculosis*はオープン pangenome を持っており、タイピングを分離するために適切な標的を同定し選択する場合には、このアプローチがきわめて重要になることが示唆されています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Rock J. M., Lang U. F., Chase M. R., Ford C. B., Gerrick E. R., et al. (2015) DNA replication fidelity in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by an ancestral prokaryotic proofreader. *Nat Genet* 47: 677-681

DNA複製の正確度は*E. coli*システムでレプリソームのεエキソヌクレアーゼが行うブルーフリーディング活動に依存します。しかし、このユニットは*M. tuberculosis*では必要ではありません。NGSおよび他の技術を*Mycobacterium*に用いて、DnaE1ポリメラーゼのPHP領域がエキソヌクレアーゼ機能を果たすことを示しました。また、その欠如によって突然変異率が有意に増加します。系統発生解析により、PHP領域媒介活動は保存され、祖先の原核生物のブルーフリーダーである場合があることが示されました。これらの所見は、複製の正確度を標的とする抗菌剤の開発に重要となります。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq v2 100 bp PE リード

Venkatasubramanian S., Dhiman R., Paidipally P., Cheekatla S. S., Tripathi D., et al. (2015) A rho GDP dissociation inhibitor produced by apoptotic T-cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 11: e1004617

潜在的な*M. tuberculosis*感染の基礎となる機序はよく理解されないままとなっています。著者らは、ヒトのマクロファージにある*M. tuberculosis*の増殖を阻害することができる、可溶性因子(D4GDI)を産出したCD4細胞(CD4⁺CD25⁺)の亜集団を同定しました。これらの細胞は、IL-1β、TNF-α、およびROSの産生を促進し、感染細胞のアポトーシスを増加させ、さらに*M. tuberculosis*内のdormancy survival regulatorの発現を誘導しました。全体として、この研究は、CD4⁺CD25⁺D4GDI⁺細胞によって*M. tuberculosis*に対する耐性が増強されたことを裏付けます。

イルミナ技術: HumanHT-12_V4 Expression BeadChip arrays

Wada T., Iwamoto T., Tamaru A., Seto J., Ahiko T., et al. (2015) Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *PLoS One* 10: e0118495

M. tuberculosis「M菌株」は、最近日本の至る所で伝播しています。著者らは、その伝播の経緯を明らかにするため、M菌株10種の分離株のディープシーケンスを行いました。分離株すべてに、参照菌株のものと同通の突然変異があり、1塩基多型(SNV)が蓄積されており、これらの分離株が高度なクローン性を有する証拠となりました。詳細な解析により、地理的な起源に偏る3つのサブクローン群への分布が明らかになりました。こうした取り組みは、ビッグデータを解析する効率的な戦略を提供して、TBに対する公衆衛生対策に役立ちます。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx} 75 bp PE リード

Ablordey A. S., Vandelanooote K., Frimpong I. A., Ahortor E. K., Amisah N. A., et al. (2015) Whole genome comparisons suggest random distribution of *Mycobacterium ulcerans* genotypes in a Buruli ulcer endemic region of Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003681

Harris K. A., Underwood A., Kenna D. T., Brooks A., Kavaliunaite E., et al. (2015) Whole-genome sequencing and epidemiological analysis do not provide evidence for cross-transmission of *Mycobacterium abscessus* in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *Clin Infect Dis* 60: 1007-1016

Ngeow Y. F., Wong Y. L., Tan J. L., Hong K. W., Ng H. F., et al. (2015) Identification of new genomospecies in the *Mycobacterium terrae* complex. *PLoS One* 10: e0120789

Anderson S. T., Kaforou M., Brent A. J., Wright V. J., Banwell C. M., et al. (2014) Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. *N Engl J Med* 370:1712-1723

小児 TBのために診断検査を改善する必要があります。この研究では、培養ステータスに従って配置された、南アフリカ、マラウイおよびケニアの小児から採取した宿主血液サンプルの転写シグネチャーを定義しました。著者らは、南アフリカおよびマラウイの小児のTBと他の疾患の相違を示す51の転写シグネチャーを同定しました。培養を確認し培養陰性と診断された場合に感度と特異性を測定するため、ケニアのコホートでこれらの結果の妥当性を確認しました。RNA発現シグネチャーは、HIV感染の有無にかかわらずアフリカの小児のTBと他の疾患とを区別するのに役立ちました。

イルミナ技術: HumanHT-12_V4 Expression BeadChip arrays

Li D., Gao G., Li Z., Sun W., Li X., et al. (2014) Profiling the T-cell receptor repertoire of patient with pleural tuberculosis by high-throughput sequencing. *Immunol Lett* 162: 170-180

胸水は肺結核に一般的な症状です。しかし、胸水単核球 (PEMC) のT細胞レセプター (TCR) の役割およびレパートリーは解明されていません。この研究では、NGSが胸水を呈した患者1名から採取したPEMCおよび末梢血単核球 (PBMC) のNGSを行いました。著者らは、PEMCとPBMCの両方にみられるさまざまなCDR3クローン型およびパターンなど、TCRβチェーン受容体の遺伝プロファイルについて記述しています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Lin P. L., Ford C. B., Coleman M. T., Myers A. J., Gawande R., et al. (2014) Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat Med* 20: 75-79

TBが潜伏感染したままの場合がありますが、この不活性の感染の理由はまだ明らかにされていません。個別にタグ付けされたバクテリアに実験的に感染したマカクザルに、同様なパターンが見つかります。この研究では、各肺病変がシングルセルによってどのように確立される可能性があるかを示しています。しかし、各病変の運命は個人で異なっていました。すなわち、一部の活動病変は宿主によって殺菌されましたが、他のものは進行しました。この研究では、病変レベルの重大な応答が感染の転帰を決定することが示唆されます。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Escherichia coli

環境、食品、および人や動物の腸に一般に認められる、*E. coli*のほとんどの菌株は共生細菌です。しかし、一部の菌株は、高度な伝播性を持ち、しばしば食物由来の集団発生を引き起こす病原体になりえます。病原型志賀菌毒素を産生する*E. coli* (STEC) は、このグループで最も多く認められる例ですが、これ以外にも5つの病原型が認知されています。食物由来の集団発生の発生源を追跡しコントロールするには、迅速な同定が不可欠です¹⁴⁸。

総説

Franz E., Delaquis P., Morabito S., Beutin L., Gobius K., et al. (2014) Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in global food production systems. *Int J Food Microbiol* 187: 57-72

参考文献

Griffing S. M., MacCannell D. R., Schmidtke A. J., Freeman M. M., Hyttia-Trees E., et al. (2015) Canonical Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) for High-Resolution Subtyping of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7. *PLoS One* 10: e0131967

著者らは、利用可能な他の識別法と一致するSTEC O157:H7をサブタイプ分けするSNPパネルを開発することを目標としました。大規模なSNPパネルの最初のスクリーニングでは、一部バクテリアのクラスターを正確に解明できず、DNAリシーケンスによって低解像度で、そのクラスターの2番目のスクリーニングを行って比較せざるをえませんでした。この手法では結果的にSNPパネルサイズが増加し、以前に同定されたSNPが63、多数のクラスターで438発生しました。著者らは、有益なSNPの数が連鎖不均衡によって制限され、これらのSNPは効果的なサブタイプ分けには非効率であると結論付けています。

イルミナ技術: TruSeq DNA Library Prep Kit, MiSeq

-
148. Lambert D., Carrillo C. D., Koziol A. G., Manninger P. and Blais B. W. (2015) Gen-eSippr: a rapid whole-genome approach for the identification and characterization of foodborne pathogens such as priority Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *PLoS One* 10: e0122928
-

Lambert D., Carrillo C. D., Koziol A. G., Manninger P. and Blais B. W. (2015) GeneSippr: a rapid whole-genome approach for the identification and characterization of foodborne pathogens such as priority Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *PLoS One* 10: e0122928

著者らは、調査対象の食物サンプルから回収されたコロニー分離株の当日同定を可能にする WGS アプローチについて記述しています。この方法では 21-nt リードかつ 4 倍のカバレッジを用いた後、GeneSippr と呼ばれるカスタムデータ解析ソフトウェアを使用しました。病原体は、検査されたすべての分離株で正しく同定され、単一コロニーは 9 時間以内に同定されました。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, Nextera XT Index Kit, MiSeq v2

Zhang Y., Rowehl L., Krumsiek J. M., Orner E. P., Shaikh N., et al. (2015) Identification of Candidate Adherent-Invasive *E. coli* Signature Transcripts by Genomic/Transcriptomic Analysis. *PLoS One* 10: e0130902

付着性、侵襲性の *E. coli* (AIEC) は、クローン病患者の粘膜病変で見つかることが多くあります。RNA-Seq を用いて、表現型の差を説明できる非侵襲性の *E. coli* (NIEC) 菌株に関連する AIEC 菌株で差別的に発現した遺伝子が同定されました。その結果、AIEC で 224 の遺伝子を上方制御、241 の遺伝子を下方制御しました。著者らは、これらの濃縮された遺伝子および経路の機能と同様に、AIEC 菌株に限定的な遺伝子および CRISPR-Cas 座について記述しています。これらの調査結果は、IBD での CRISPR-Cas 座の濃縮を裏証した IBD および非 IBD の糞便 RNA サンプルで確認されました。このアプローチは、AIEC シグネチャー転写産物候補を同定するのに有用です。

イルミナ技術: MiSeq 150 bp SE リード

Salipante S. J., Roach D. J., Kitzman J. O., Snyder M. W., Stackhouse B., et al. (2015) Large-scale genomic sequencing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Genome Res* 25: 119-128

von Mentzer A., Connor T. R., Wieler L. H., Semmler T., Iguchi A., et al. (2014) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet* 46: 1321-1326

毒素原性 *E. coli* (ETEC) は、プラスミドにコードされるいくつかの定着因子とともに、熱安定性かつ/または非耐熱性の毒素を産生して下痢を引き起こす主要な原因です。著者らは、特徴的な定着因子および腸毒素プロファイルを有し、グローバルに分布する ETEC 菌株の集合体の WGS を行ないました。従来の概念に反して、これらの最近の系統には、適応度と伝染性を最適化する染色体とプラスミドの組合せを含んでいる場合があり、ETEC 集団発生を追跡できることが示唆されます。

イルミナ技術: HiSeq 2000 100 bp PE リード

Bielaszewska M., Schiller R., Lammers L., Bauwens A., Fruth A., et al. (2014) Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. *EMBO Mol Med* 6: 347-357

Petty N. K., Ben Zakour N. L., Stanton-Cook M., Skippington E., Totsika M., et al. (2014) Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 5694-5699

Xu H., Zhu X., Hu Y., Li Z., Zhang X., et al. (2014) DNA methylome in spleen of avian pathogenic *Escherichia coli*-challenged broilers and integration with mRNA expression. *Sci Rep* 4: 4299

Staphylococcus aureus

このグラム陽性病原菌は、その抗菌耐性能力により悪評を買いました。この菌が病院環境で致命的な感染を引き起こすと、コントロールが困難です。*S. aureus* は、細胞壁ペプチドグリカン (PG) 合成に関与する 4 つ (メチシリン感受性、MSSA) あるいは 5 つ (メチシリン耐性、MRSA) のペニシリン結合タンパク質 (PBP) をコードします。MRSA 中の余剰な PBP2A は、 β ラクタムに対する耐性の決定因子です^{149, 150}。

参考文献

Reed P., Attilano M. L., Alves R., Hoiczky E., Sher X., et al. (2015) *Staphylococcus aureus* Survives with a Minimal Peptidoglycan Synthesis Machine but Sacrifices Virulence and Antibiotic Resistance. *PLoS Pathog* 11: e1004891

ペプチドグリカンは細胞壁の主成分であり、*S. aureus* でそれらを合成するためには 9 つのタンパク質の構造が必要です。この研究は、この構造の 9 つのタンパク質のうちの 7 つを削除した場合のゲノム的およびトランスクリプトーム的作用を検討しました。著者らは、*in vitro* での PG 合成に不可欠な機構として PBP1 と PBP2 を同定しました。しかし、この不可欠な機構は様々な条件の影響を受けやすいため、この複合体の残りの部分もさらに厳しい環境下では不可欠であると考えられます。したがって、この複合体は病原論と抗生物質耐性において一定の役割を果たす可能性があります。

イルミナ技術: MiSeq, HiSeq

-
149. Hartman B. J. and Tomasz A. (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158: 513-516
 150. Pinho M. G., de Lencastre H. and Tomasz A. (2001) An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10886-10891
-

Tong S. Y., Holden M. T., Nickerson E. K., Cooper B. S., Koser C. U., et al. (2015) Genome sequencing defines phylogeny and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a high transmission setting. *Genome Res* 25: 111-118

WGS を行って、伝播が頻繁に発生する 2 つの集中治療室で、MRSA の流入および遺伝的多様性を確立しました。抗生物質耐性の決定因子をコードしたさまざまなプラスミドを保持する、特徴的な ST 239 クレイドに属する合計 79 の分離株のシーケンスを行い、しました。病棟間および病棟内伝播事象および複数のクレイドによる多数の菌の定着が同定されました。WGS は MRSA の伝播および拡散に関する知見を提供するため、このアプローチはさまざまな状況に適用することができます。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx} 100 bp PE リード、HiSeq 75 bp PE リード

Brady R. A., Bruno V. M. and Burns D. L. (2015) RNA-Seq Analysis of the Host Response to *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infection in a Mouse Model. *PLoS One* 10: e0124877

Ellington M. J., Reuter S., Harris S. R., Holden M. T., Cartwright E. J., et al. (2015) Emergent and evolving antimicrobial resistance cassettes in community-associated fusidic acid and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 45: 477-484

Everitt R. G., Didelot X., Batty E. M., Miller R. R., Knox K., et al. (2014) Mobile elements drive recombination hotspots in the core genome of *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun* 5: 3956

S. aureus のようなバクテリアクローンのコアゲノムで起こる遺伝子交換は、可動要素が継続的に裏付けられているにもかかわらず、完全には解明されていません。著者らは、MRSA と MSSA の既存対照、海外、ヒトおよび動物の菌株を用いて WGS を行ない、コアゲノムに関する知見を得ました。既知の可動要素に非常に類似した組換えホットスポットを見つけることができました。コアゲノム転移によるこの種の可動要素は、バクテリアクローンについての私たちの理解を広げ、表現型 - 遺伝子型マッピングに影響を及ぼす可能性があります。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx} HiSeq 2000 100 bp PE リード

Salmonella

Salmonella enterica 血清型 Enteritidis および血清型 Typhimurium は、食物に由来するヒトの胃腸炎の重要かつ主要な原因ですが、他にも多くの血清型がヒトや動物の健康を脅かしています。血清型 Enteritidis は養鶏業で広く知られており、鶏卵内で非常に効率的に複製できるため、食物由来の集団発生を監視しコントロールするには、血清型 Enteritidis を同定し起源を追跡することがきわめて重要になります。*Salmonella* は遺伝学的に均質な細菌であり、ゲノムシーケンスにより、各株を菌種内で正確に鑑別することが可能です¹⁵¹。



食物由来の *Salmonella* Enteritidis の集団発生の多くは、鶏卵および鶏肉製品に関与しています。NGS は、公衆衛生サーベイランスを促進し、遺伝学的に均質な菌株内の株の識別を可能にします。

総説

Park S. H., Aydin M., Khatiwara A., Dolan M. C., Gilmore D. F., et al. (2014) Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol* 38: 250-262

151. den Bakker H. C., Allard M. W., Bopp D., Brown E. W., Fontana J., et al. (2014) Rapid whole-genome sequencing for surveillance of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Emerg Infect Dis* 20: 1306-1314

参考文献

Inns T., Lane C., Peters T., Dallman T., Chatt C., et al. (2015) A multi-country *Salmonella* Enteritidis phage type 14b outbreak associated with eggs from a German producer: 'near real-time' application of whole genome sequencing and food chain investigations, United Kingdom, May to September 2014. *Euro Surveill* 20:

著者らは、英国における *Salmonella* Enteritidis ファージ型 14b (PT14b) の集団発生について報告しています。この集団発生は、欧州連合の他の国々で同時に発生した特定の反復配列多型解析法 (MLVA) パターンに関連していました。疫学的データ、MLVA パターン、および WGS により、この集団発生はあるドイツの会社の鶏卵に結びつけることができることを実証しました。これは、食物由来の集団発生を発生源までタイムリーに追跡して、抑制措置を実行することができたため、ゲノムシーケンス情報を有効に活用した事例といえます。

イルミナ技術: HiSeq 2500

Feasey N. A., Gaskell K., Wong V., Msefula C., Selemani G., et al. (2015) Rapid emergence of multidrug resistant, H58-lineage *Salmonella* typhi in Blantyre, Malawi. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003748

Hamidian M., Holt K. E. and Hall R. M. (2015) The complete sequence of *Salmonella* genomic island SGI1-K. *J Antimicrob Chemother* 70: 305-306

Schreiber F., Kay S., Frankel G., Clare S., Goulding D., et al. (2015) The Hd, Hj, and Hz66 flagella variants of *Salmonella enterica* serovar Typhi modify host responses and cellular interactions. *Sci Rep* 5: 7947

Deng X., Desai P. T., den Bakker H. C., Mikoleit M., Tolar B., et al. (2014) Genomic epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis based on population structure of prevalent lineages. *Emerg Infect Dis* 20: 1481-1489

世界中で *Salmonella enterica* を主な原因とする食物由来の胃腸炎は世界規模で発生しており、集団発生中に抑制措置を実行するために実施されるサーベイランスはきわめて重要です。しかし、遺伝学的に均質なため、サブタイプ別けが困難です。著者らは、WGS を行って、125 の *S. enterica* Enteritidis および 3 つの *S. enterica* Nitra 菌株を特性づけ、SNP 解析によって互いにすべての分離株を鑑別した 4,887 座を同定しました。このアプローチでは、5 つの主要な遺伝系統を同定しましたが、これらは、17~18 世紀に菌株が植え付けられ、1920 年代と 1950 年代に多様化した地理的および疫学的パターンに関連している可能性があります。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Leekitcharoenphon P., Nielsen E. M., Kaas R. S., Lund O. and Aarestrup F. M. (2014) Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One* 9: e87991

Salmonella enterica の信頼できるサブタイプ別けはサーベイランスと食物由来の集団発生への応答にとって不可欠です。ここでは、34 の *S. Typhimurium*、8 つの *S. Enteritidis*、および 5 つの *S. Derby* 分離株のシーケンスを行い、疫学的型別けツールとして WGS を評価しました。*S. Typhimurium* のデータで 4 つの異なる系統発生解析 (全ゲノム、K-mer、SNP、ヌクレオチド差異ツリー) を行い、パルスフィールドゲル電気泳動からのデータと比較しました。その結果、従来のタイピング手法に比べ、WGS はより高い性能を実現したことが示されました。WGS データを用いた SNP およびヌクレオチド差異解析的アプローチは、他のアプローチより優れた疫学的型別け手法となりました。しかし、疫学的データを WGS で利用することは集団発生に菌株を関連づけるために依然として必要です。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Maudet C., Mano M., Sunkavalli U., Sharan M., Giacca M., et al. (2014) Functional high-throughput screening identifies the miR-15 microRNA family as cellular restriction factors for *Salmonella* infection. *Nat Commun* 5: 4718

抗菌耐性

抗菌化合物に対する耐性は公衆衛生上の緊急課題であり、患者死亡数や医療費を増加させています¹⁵²。遺伝学的に多重にコードされた機序が耐性の一因となっており、バクテリア間の可動因子によって転送され、単一または複数の抗菌剤に対する耐性が蔓延する結果となっています。

152. de Castro A. P., Fernandes Gda R. and Franco O. L. (2014) Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Front Microbiol* 5: 489

抗生物質耐性遺伝子は昔からあって遍在性があり¹⁵³、ヒト、動物および環境との接触により、その選択と蔓延が促進される可能性があります¹⁵⁴。農作業によっても、土壌や動物性食品内の抗生物質耐性遺伝子は伝播します¹⁵⁵。水産養殖での慣習として、サケを産出する国々では極端な量の抗生物質を用いており¹⁵⁶、グローバルレベルの抗菌剤消費は2030年までに家畜動物で67%増加すると予想されています¹⁵⁷。ゲノム解析情報を活用すれば、サーベイランスを支援し、抗菌剤耐性を示す病原体を追跡することが可能な、培養に依存しない、*in silico*での抗菌感受性検査を¹⁵⁸行うことができます。

ゲノム的アプローチは、これらの遺伝子の多くを明らかにし、新規の遺伝子を同定して、*in situ*での耐性機序を明らかにし、抗菌化合物をコードする可能性のある遺伝子を同定するのに役立つことが期待されます。土はおそらく抗菌剤および抗菌耐性の遺伝子に関する最も豊富な情報源であり^{159, 160}、培養できないバクテリアの世界に未だ多くの化合物が閉じ込められています¹⁶¹。



抗菌耐性に関するゲノム情報は、医療システムにおいて抑制措置の実施とその有効性を評価するのに有効な情報を与えることができます。

総説

Hughes D. and Andersson D. I. (2015) Evolutionary consequences of drug resistance: shared principles across diverse targets and organisms. *Nat Rev Genet* 16: 459-471

Mather A. E. (2015) There's no place like home. *Nat Rev Microbiol* 13: 331

Nesme J. and Simonet P. (2015) The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ Microbiol* 17: 913-930

van Schaik W. (2015) The human gut resistome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370: 20140087doi: 10.1098/rstb.2014.0087

Woolhouse M., Ward M., van Bunnik B. and Farrar J. (2015) Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370: 20140083

de Castro A. P., Fernandes Gda R. and Franco O. L. (2014) Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Front Microbiol* 5: 489

Koser C. U., Ellington M. J. and Peacock S. J. (2014) Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet* 30: 401-407

Mullany P. (2014) Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. *Virulence* 5: 443-447

153. Bhullar K., Waglechner N., Pawlowski A., Koteva K., Banks E. D., et al. (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 7: e34953

154. Li B., Yang Y., Ma L., Ju F., Guo F., et al. (2015) Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J*

155. Udikovic-Kolic N., Wichmann F., Broderick N. A. and Handelsman J. (2014) Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 15202-15207

156. Henriksson P. J., Troell M. and Rico A. (2015) Antimicrobial use in aquaculture: Some complementing facts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E3317

157. Van Boeckel T. P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., et al. (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5649-5654

158. Fricke W. F. and Rasko D. A. (2014) Bacterial genome sequencing in the clinic: bioinformatic challenges and solutions. *Nat Rev Genet* 15: 49-55

159. de Castro A. P., Fernandes Gda R. and Franco O. L. (2014) Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Front Microbiol* 5: 489

160. Nesme J., Cecillon S., Delmont T. O., Monier J. M., Vogel T. M., et al. (2014) Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr Biol* 24: 1096-1100

161. Ling L. L., Schneider T., Peoples A. J., Spoering A. L., Engels I., et al. (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517: 455-459

参考文献

Hsu L. Y., Harris S. R., Chlebowicz M. A., Lindsay J. A., Koh T. H., et al. (2015) Evolutionary dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within a healthcare system. *Genome Biol* 16: 81

MRSA ST239 は、抗菌療法に対してより高い感受性を示す ST22 クローンの一部が過去数年にわたって置換されたものと考えられます。歴史的、進化的な特徴を理解するために、著者らは、シンガポールの病院の ST239 および ST22 の WGS および系統発生解析を行いました。ST239 は隣接地区から導入され、その後医療システム内で蔓延したことがわかりました。ST22 は 2000 年頃もたらされ、ST239 に取って代わりました。ST239 の遺伝的多様性は、ST22 による置換により減少すると考えられました。しかし、多様性は 2007 年頃以降、再度増加しました。この研究は、病原体の進化を推進する病院内の慣習およびクローン間の競争の重要性を示しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}、HiSeq

Pecora N. D., Li N., Allard M., Li C., Albano E., et al. (2015) Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System. *MBio* 6: e01030

WGS により、耐性遺伝子をコードする染色体形質および関連する可動遺伝因子を精緻に追跡することができます。この情報を用いて、感染の伝播を阻害するよう病院に警報を出すことができます。カルバペネム系抗生物質に対する耐性を備えた *Klebsiella pneumoniae* および *Enterobacter cloacae* の分離株のシーケンスを行いました。この研究では、菌株異質性を提供した特徴的な可動因子に存在する多数のカルバペネマーゼ遺伝子が同定されました。著者らは、病院環境でのカルバペネマーゼの侵入および移動の時間的経緯を記述することができました。この種の研究は、感染を管理する資源や耐性遺伝子レポーターの開発を施設レベルで行う際に役立てられます。

イルミナ技術：Nextera XT DNA Library Prep Kit、MiSeq v1 150 bp PE リード、MiSeq v3 300 bp PE リード

162. Sutton P. (2015) At last, vaccine-induced protection against *Helicobacter pylori*. *Lancet*
163. Moustafa D. A., Scarff J. M., Garcia P. P., Cassidy S. K., DiGiandomenico A., et al. (2015) Recombinant *Salmonella* Expressing *Burkholderia mallei* LPS O Antigen Provides Protection in a Murine Model of Melioidosis and Glanders. *PLoS One* 10: e0132032.
164. Xu X., Hegazy W. A., Guo L., Gao X., Courtney A. N., et al. (2014) Effective cancer vaccine platform based on attenuated *salmonella* and a type III secretion system. *Cancer Res* 74: 6260-6270
165. Saxena M., Van T. T., Baird F. J., Coloe P. J. and Smooker P. M. (2013) Pre-existing immunity against vaccine vectors--friend or foe? *Microbiology* 159: 1-11

細菌ワクチン

抗 *C. tetani* ワクチンは有効性が高く、日常的に使用されています。一方、*H. pylori* などの微生物のワクチン開発は、潰瘍性疾患や胃腺がん予防に有用である可能性があるにもかかわらず、未だに解明の進まない状況になっています¹⁶²。

長い間恐れられた微生物は今、抗原発現のプラットフォームとして免疫療法に貢献する機会を得ています。*B. mallei* LPS O 抗原を発現する弱毒化した *Salmonella* Typhimurium は、致死的な抗原投与からマウスを防御することに成功しました¹⁶³。同様に、*Salmonella* T3SS は、腫瘍の抗原を送達することで抗腫瘍免疫を増強し、結腸がんマウスモデルで腫瘍退縮の誘導に用いられています¹⁶⁴。こうしたベクターに対して、先在する耐性は実際に免疫原性を増強する可能性があります¹⁶⁵。

参考文献

Croucher N. J., Chewapreecha C., Hanage W. P., Harris S. R., McGee L., et al. (2014) Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. *Genome Biol Evol* 6: 1589-1602

S. pneumoniae PMEM14 セロタイプ 19F は PCV7 の 7 個のワクチンの標的となりますが、残念ながら、ワクチン回避変異が出現します。著者らは、173 の PMEM14 あるいは類縁体の WGS を行い、その進化を特徴づけました。PMEM14 は、19A への 4 個のセロタイプスイッチを持つ単一の系統であり、それらすべてが、ワクチンを接種しない場合にも発生する相同組換えによって、 β ラクタムに対するさまざまな耐性を備えています。これらの調査結果から、淘汰圧の変化により肺炎球菌の遺伝子型が、結果的には多数の突然変異体を並行して出現させる、永続的な変異をプールすることが示唆されます。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}、HiSeq

Cohen-Gihon I., Israeli O., Beth-Din A., Levy H., Cohen O., et al. (2014) Whole-Genome Sequencing of the Nonproteolytic *Bacillus anthracis* V770-NP1-R Strain Reveals Multiple Mutations in Peptidase Loci. *Genome Announc* 2: e00075-14.

炭疽は *B. anthracis* 孢子吸入や摂取によって、あるいは皮膚擦過傷への接触によって引き起こされる重度疾患です。この孢子は増殖性の桿菌を産生し、重度の菌血症および毒血症を発症させます。著者らは非タンパク質分解性の *Bacillus anthracis* V770-NP1-R 菌株のドラフト全ゲノム配列を生成しました。他の *B. anthracis* 菌株のものと比較して、このゲノムは複数の標的のタンパク質分解機能に影響を与える独特な突然変異を示します。これらの突然変異のうちの 1 つは、NprA プロテアーゼの NprR クオラムセンシング調節因子を阻害する欠失です。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

微生物集団

既定量のサンプル中の微生物を同定し存在量を測定するには、アンプリコンシーケンスおよび全ゲノムショットガンシーケンスの 2 つのシーケンスアプローチがあります。(表 3)。アンプリコンシーケンスでは、単一の有益なマーカーとして、16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅およびシーケンスを行います¹⁶⁶。全ゲノムショットガンシーケンスでは、全抽出された DNA をランダムに断片化し、その後 small DNA 断片のシーケンスを行うことを指します。両方のアプローチには特徴的な利点およびトレードオフがあります。必要な情報の種類に応じて、適切なアプローチを選択します。

総説

Gasc C., Ribiere C., Parisot N., Beugnot R., Defois C., et al. (2015) Capturing prokaryotic dark matter genomes. *Res Microbiol*

Reuter J. A., Spacek D. V. and Snyder M. P. (2015) High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* 58: 586-597

McAdam P. R., Richardson E. J. and Fitzgerald J. R. (2014) High-throughput sequencing for the study of bacterial pathogen biology. *Curr Opin Microbiol* 19: 106-113

166. Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., et al. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6955-6959

167. Diaz P. I., Dupuy A. K., Abusleme L., Reese B., Oberfell C., et al. (2012) Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Mol Oral Microbiol* 27: 182-201

168. Barone R., De Santi C., Palma Esposito F., Tedesco P., Galati F., et al. (2014) Marine metagenomics, a valuable tool for enzymes and bioactive compounds discovery. *Frontiers in Marine Science* 1:

169. Solli L., Havelsrud O. E., Horn S. J. and Rike A. G. (2014) A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnol Biofuels* 7: 146

170. Olson N. D., Lund S. P., Zook J. M., Rojas-Cornejo F., Beck B., et al. (2015) International interlaboratory study comparing single organism 16S rRNA gene sequencing data: Beyond consensus sequence comparisons. *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 17-24

171. Handelsman J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 669-685

172. Poretzky R., Rodriguez R. L., Luo C., Tsementzi D. and Konstantinidis K. T. (2014) Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One* 9: e93827

表 3: アンプリコンおよび全ゲノムショットガンシーケンス。

特長	16s rRNA (アンプリコンシーケンス) ¹⁶⁷	全ゲノムショットガンシーケンス ^{168, 169}
生成される情報のタイプ	操作上の分類単位としての分類学的構成およびコミュニティ構造 ¹⁷⁰	コミュニティ全体に潜在する機能についての特性評価、各コミュニティメンバーのドラフトゲノム再構築
アプリケーション	集団のモニタリング ¹⁷¹	新規のメンバーおよび遺伝子の検出、複雑な集団の解明
同一群中の希少メンバーを検出する能力	全バクテリア RNA の 80% に相当する単一標的に対する高い感度	同レベルの感度を達成するためにはディープシーケンスが必要
バイアス	プローブおよび増幅バイアス。全ゲノムのコンテンツを表示できないこと ¹⁷²	シーケンスに起因するバイアス
遺伝子のイベントリー	機能の大部分は未知	幅広いイベントリーおよび部分的なゲノム、新たな遺伝子および生物学的経路の発見

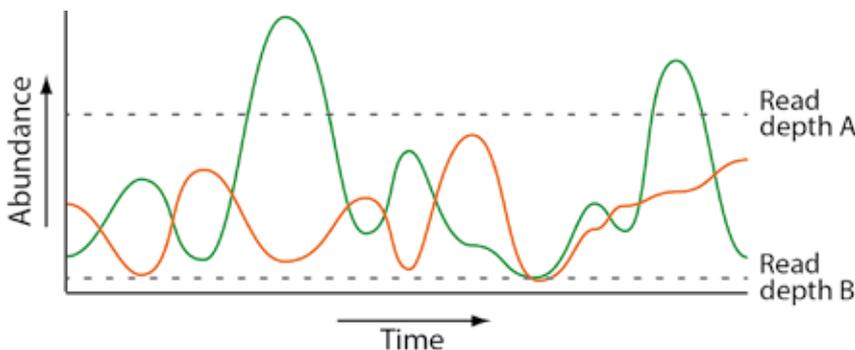
アンプリコンシーケンス: 16SリボソームRNA

16S rRNA 遺伝子などの単一遺伝子マーカーの特性評価は、系統発生学および分類学研究で行う微生物集団の多様性評価に幅広く使用されています。16S rRNA 遺伝子はあらゆるバクテリアに存在し、比較的保存された領域に隣接する点存在した可変領域からなります¹⁷³。保存された領域にプローブをハイブリダイズし、類似性の程度によって操作上の分類単位 (OTU) に密集する可変領域の PCR 増幅およびシーケンスを行います¹⁷⁴。この古典的アプローチにより、体系的な配列比較やヒトのマイクロバイオームプロジェクトなどの大規模なプロジェクトに適用可能な進化的解析を行う包括的なデータベースが構築されてきました¹⁷⁵。

単一マーカーとして、16S rRNA シーケンスは多様なバクテリアコミュニティの幅広い変化を捕捉することができ、ゲノムの小さな部分のみを低コストでシーケンスできる魅力的な手法です。しかし、アンプリコンシーケンスでは、そのコミュニティに潜在するゲノム機能に関する情報は得られませんし、ウイルスの検出も行いません。

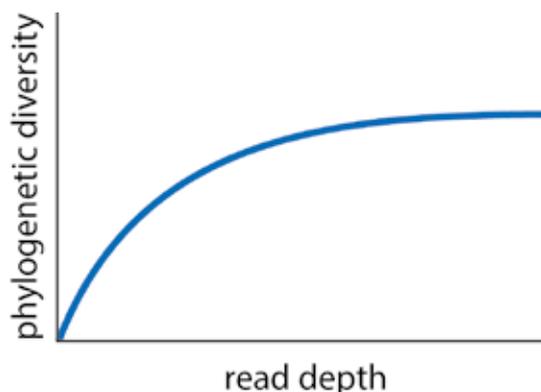
複雑な集団の特性付けを行うディープシーケンス

ディープシーケンスは、ゲノム領域を数千回にわたってリシーケンスすることを指します。この手法により、低存在量の種を含むコミュニティの全メンバーをより正確に表すことができます。自然界においてバクテリアは、きわめて多様な集団内に生息しており、時間や空間とともに変化したりします。さらに、同種または異種から、個体内および個体間において、変化が生じる場合があります¹⁷⁶。コミュニティ内では、一部の微生物は存在量が少ないものの、そのコミュニティや健康状態に著しい影響を与える場合があります。一般に、存在量や機能が生態系の変化に適応する場合には、こうした現象が顕著になります^{177, 178}。ディープシーケンスの識別力は、異種混合のコミュニティを完全に特性づけ、微妙な微生物学的変化をより良く理解するためにきわめて重要です。



さまざまな深度でサンプリングした存在量の多い (緑色) 微生物集団および少ない (オレンジ) 微生物集団。ディープシーケンス (Read depth A) により、両タイプの集団の存在量の変化を捕えることができます。存在量が Read depth B の検出限界未満まで低下すると、こうした変化は捕捉されません。

173. Vinje H., Almoy T., Liland K. H. and Snipen L. (2014) A systematic search for discriminating sites in the 16S ribosomal RNA gene. *Microb Inform Exp* 4: 2
174. Schmidt T. S., Matias Rodrigues J. F. and von Mering C. (2014) Ecological consistency of SSU rRNA-based operational taxonomic units at a global scale. *PLoS Comput Biol* 10: e1003594
175. McDonald D., Price M. N., Goodrich J., Nawrocki E. P., DeSantis T. Z., et al. (2012) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 6: 610-618
176. Chiarello M., Villeger S., Bouvier C., Bettarel Y. and Bouvier T. (2015) High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiol Ecol* 91:
177. Neuenschwander S. M., Pernthaler J., Posch T. and Salcher M. M. (2015) Seasonal growth potential of rare lake water bacteria suggest their disproportional contribution to carbon fluxes. *Environ Microbiol* 17: 781-795
178. Shade A., Jones S. E., Caporaso J. G., Handelsman J., Knight R., et al. (2014) Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *MBio* 5: e01371-01314



環境調査から最大の分類群が発見されるのは、この十年以内に実現する見込みです¹⁷⁹。系統発生の多様性はリード深度につれて増加し、リード深度は多様性がこれ以上増加しない場合に最適になります。

増幅バイアス

PCR 増幅およびクローニング関連バイアスは、微生物の多様性を測定する際に妨げとなります。正確性はプライマー選択に依存します（表 4）。

表 4: 増幅バイアス

因子	影響
プライマー選択	カバレッジ プライマーテンプレートの結合親和力 偽性産物 アニーリング能力および増幅効率 ¹⁸⁰
ユニバーサルプライマー一致の不足	細菌の多様性を研究および包括的なカバレッジ間で比較することを阻害 ¹⁸¹
テンプレート濃度	微生物コミュニティの構成および存在量の決定へのバイアス ¹⁸²

クローニングバイアス

メタゲノムのクローンライブラリーは *E. coli* のように十分に特徴づけられた宿主ベクター内で増幅されるコスミドあるいはフォスミド内に大きなゲノム断片をクローニングすることにより作製できます¹⁸³。こうしたライブラリーは多くの場合、GC バイアス、クローン DNA の弱い転写活動¹⁸⁴、および発現した遺伝子が毒性を示すこともあります¹⁸⁵。長期保存すると、一部のクローンが他を抑えて異常繁殖するため、全体的なライブラリーの多様性に歪みが生じます¹⁸⁶。

ゲノム内不均一性

さまざまな細菌の分類群全体および種内での 16S rRNA シーケンスの多様なコピー数ならびに多様性は一般的です。細菌は 1 つのゲノムあたり平均 4 つの 16S rRNA 遺伝子のコピーを含んでおり、一部の *Fusobacteria* では最大 15 コピーに達しており、配列のばらつきはコピー数と共に増加します¹⁸⁷。16S rRNA のコピー数のばらつきにより、アンプリコンシーケンスでは、細菌のコミュニティ濃度や存在量を精確に評価する能力に限界があります。さらに重要なこととして、アンプリコンシーケンスは、コミュニティの遺伝可能性について情報を提供することができません¹⁸⁸。

179. Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glockner F. O., Ludwig W., et al. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12: 635-645
180. Ibarbalz F. M., Perez M. V., Figuerola E. L. and Erijman L. (2014) The bias associated with amplicon sequencing does not affect the quantitative assessment of bacterial community dynamics. *PLoS One* 9: e99722
181. Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T. and Nishijima M. (2014) Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One* 9: e105592
182. Chandler D. P., Fredrickson J. K. and Brockman F. J. (1997) Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol Ecol* 6: 475-482
183. Cretoiu M. S., Berini F., Kielak A. M., Marinelli F. and van Elsas J. D. (2015) A novel salt-tolerant chitinobiosidase discovered by genetic screening of a metagenomic library derived from chitin-amended agricultural soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 8199-8215
184. Lam K. N. and Charles T. C. (2015) Strong spurious transcription likely contributes to DNA insert bias in typical metagenomic clone libraries. *Microbiome* 3: 22
185. Kimelman A., Levy A., Sberro H., Kidron S., Leavitt A., et al. (2012) A vast collection of microbial genes that are toxic to bacteria. *Genome Res* 22: 802-809
186. Chandler D. P., Brockman F. J. and Fredrickson J. K. (1997) Use of 16S rDNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from ex situ perturbation of a subsurface sediment. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 217-230
187. Vetrovsky T. and Baldrian P. (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* 8: e57923
188. Rajendhran J. and Gunasekaran P. (2011) Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res* 166: 99-110

遺伝子水平伝播およびモザイク現象

16S rRNA アンプリコンシーケンスでは、16S rRNA 遺伝子内外での遺伝子水平伝播やゲノム再編成を評価することはできません。完全な 16S rRNA 遺伝子の種間交換および遺伝子水平伝播によるオペロン内のモザイク現象は、機能的に柔軟性のある第 2、第 3 のリボソーム構造が保存されているため、自然および実験条件下で忍容性を示します¹⁸⁹。アンプリコンシーケンスによる種の同定では、正しくない分類群割り振りや存在量のバイアスに至る場合があります¹⁹⁰。

メタゲノムシーケンス： 全ゲノムショットガンメタゲノミクス

メタゲノムシーケンス（すなわち、全ゲノムショットガンシーケンス）（表 5）とは、微生物集団内の完全な遺伝子レパートリーから得られる DNA 断片を大量並列的にシーケンスすることをいいます。ショットガン WGS の主な利点の 1 つは、1 回の実験で、コミュニティの機能的プロファイリングだけでなく正確な系統発生ツリーを得ることができる能力にあります。機能的プロファイリングでは、コミュニティ内に示される生物学的経路が再構成され、コミュニティが携わっている主要な活動を決定します。

CRISPR/Cas エlement は、外来 DNA からバクテリアを防御する際にきわめて重要になります。生物工学で CRISPR/Cas エlement を利用することが、遺伝子発現の調節^{192, 193} からバクテリア内の抗生物質耐性遺伝子の除去^{194, 195} に至るまで、医学に応用できる可能性¹⁹¹ があることから、現在注目を集めています。

表 5：メタゲノムシーケンスのためのアプリケーション。

アプリケーション	参考文献
希少微生物の発見	196
培養不能な微生物の特性評価（「微生物の暗黒物質」）	197
伝播事象の疫学研究	198
免疫回避の変異および薬剤耐性ネットワークの発見	199
進化の力学の追跡およびゲノムシーケンスの再構築	200
微生物コミュニティ内で機能的であるが、単一培養において不活性または検出できない遺伝子産物の発見	201
生物学的経路の特性評価を行って新しい化合物を発見	202
自然の生息地でのバクテリアコミュニティから高スループット <i>in situ</i> 培養による化合物の発見	203, 204
CRISPR/Cas システムの同定	205

189. Kitahara K., Yasutake Y. and Miyazaki K. (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 19220-19225
190. Rajendhran J. and Gunasekaran P. (2011) Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res* 166: 99-110
191. Polstein L. R., Perez-Pinera P., Kocak D. D., Vockley C. M., Bledsoe P., et al. (2015) Genome-wide specificity of DNA binding, gene regulation, and chromatin remodeling by TALE- and CRISPR/Cas9-based transcriptional activators. *Genome Res* 25: 1158-1169
192. Polstein L. R. and Gersbach C. A. (2015) A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat Chem Biol* 11: 198-200
193. Nihongaki Y., Kawano F., Nakajima T. and Sato M. (2015) Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol* 33: 755-760
194. Yosef I., Manor M., Kiro R. and Qimron U. (2015) Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 7267-7272
195. Skennerton C. T., Imelfort M. and Tyson G. W. (2013) Crass: identification and reconstruction of CRISPR from unassembled metagenomic data. *Nucleic Acids Res* 41: e105
196. Lynch M. D. and Neufeld J. D. (2015) Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol* 13: 217-229
197. Panigrahi K., Applegate G. A., Malik G. and Berkowitz D. B. (2015) Combining a Clostridial enzyme exhibiting unusual active site plasticity with a remarkably facile sigmatropic rearrangement: rapid, stereocontrolled entry into densely functionalized fluorinated phosphonates for chemical biology. *J Am Chem Soc* 137: 3600-3609
198. Bryant J. M., Schurch A. C., van Deutekom H., Harris S. R., de Beer J. L., et al. (2013) Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis* 13: 110
199. Li B., Yang Y., Ma L., Ju F., Guo F., et al. (2015) Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J*
200. Spang A., Saw J. H., Jorgensen S. L., Zaremba-Niedzwiedzka K., Martijn J., et al. (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521: 173-179
201. Franzosa E. A., Hsu T., Sirota-Madi A., Shafquat A., Abu-Ali G., et al. (2015) Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 13: 360-372
202. Harvey A. L., Edrada-Ebel R. and Quinn R. J. (2015) The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov* 14: 111-129
203. Nichols D., Cahoon N., Trakhtenberg E. M., Pham L., Mehta A., et al. (2010) Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species. *Appl Environ Microbiol* 76: 2445-2450
204. Ling L. L., Schneider T., Peoples A. J., Spoering A. L., Engels I., et al. (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517: 455-459
205. Skennerton C. T., Imelfort M. and Tyson G. W. (2013) Crass: identification and reconstruction of CRISPR from unassembled metagenomic data. *Nucleic Acids Res* 41: e105

総説

Banerjee J., Mishra N. and Dhas Y. (2015) Metagenomics: A new horizon in cancer research. *Meta Gene* 5: 84-89

Doudna J. A. and Charpentier E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096

van Dijk E. L., Auger H., Jaszczyszyn Y. and Thermes C. (2014) Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 30: 418-426

真核生物

マイクロおよびマクロの真核生物は、環境中の存在量が多く、多様性に富み、至る所に存在します²⁰⁶。哺乳類の腸内で、これらの微生物は健康と疾患に影響を与える複雑なコミュニティを組織しており、バクテリアの環境に影響を与えます²⁰⁷。培養ベースの手法や顕微鏡検査技術では、曖昧な表現型のためにマイクロ真核生物を同定することに通常失敗します²⁰⁸。NGSは運良く表現型による制限を受けないため、この不可解なグループに関する理解を深めてくれます。ただし、特徴づけられていない遺伝子の未知の配列が依然として多く存在しています²⁰⁹。

総説

Richards S. (2015) It's more than stamp collecting: how genome sequencing can unify biological research. *Trends Genet* 31: 411-421

Grattepance J. D., Santoferrara L. F., McManus G. B. and Katz L. A. (2014) Diversity of diversity: conceptual and methodological differences in biodiversity estimates of eukaryotic microbes as compared to bacteria. *Trends Microbiol* 22: 432-437

参考文献

Calderon-Norena D. M., Gonzalez-Novo A., Orellana-Munoz S., Gutierrez-Escribano P., Arnaiz-Pita Y., et al. (2015) A single nucleotide polymorphism uncovers a novel function for the transcription factor Ace2 during *Candida albicans* hyphal development. *PLoS Genet* 11: e1005152

Frykman P. K., Nordenskjold A., Kawaguchi A., Hui T. T., Granstrom A. L., et al. (2015) Characterization of Bacterial and Fungal Microbiome in Children with Hirschsprung Disease with and without a History of Enterocolitis: A Multicenter Study. *PLoS One* 10: e0124172

Heisel T., Podgorski H., Staley C. M., Knights D., Sadowsky M. J., et al. (2015) Complementary amplicon-based genomic approaches for the study of fungal communities in humans. *PLoS One* 10: e0116705

Hill J. A., O' Meara T. R. and Cowen L. E. (2015) Fitness Trade-Offs Associated with the Evolution of Resistance to Antifungal Drug Combinations. *Cell Rep*

Linde J., Duggan S., Weber M., Horn F., Sieber P., et al. (2015) Defining the transcriptomic landscape of *Candida glabrata* by RNA-Seq. *Nucleic Acids Res* 43: 1392-1406

Ma X., Baron J. L., Vikram A., Stout J. E. and Bibby K. (2015) Fungal diversity and presence of potentially pathogenic fungi in a hospital hot water system treated with on-site monochloramine. *Water Res* 71: 197-206

O' Meara T. R., Veri A. O., Ketela T., Jiang B., Roemer T., et al. (2015) Global analysis of fungal morphology exposes mechanisms of host cell escape. *Nat Commun* 6: 6741

Pi B., Yu D., Dai F., Song X., Zhu C., et al. (2015) A genomics based discovery of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Aspergillus ustus*. *PLoS One* 10: e0116089

Piotrowski J. S., Okada H., Lu F., Li S. C., Hinchman L., et al. (2015) Plant-derived antifungal agent poacic acid targets beta-1,3-glucan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E1490-1497

Ramaprasad A., Mourier T., Naeem R., Malas T. B., Moussa E., et al. (2015) Comprehensive evaluation of *Toxoplasma gondii* VEG and *Neospora caninum* LIV genomes with tachyzoite stage transcriptome and proteome defines novel transcript features. *PLoS One* 10: e0124473

206. Andersen L. O., Vedel Nielsen H. and Stensvold C. R. (2013) Waiting for the human intestinal Eukaryotome. *ISME J* 7: 1253-1255

207. Flegontov P., Votycka J., Skalicky T., Logacheva M. D., Penin A. A., et al. (2013) Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr Biol* 23: 1787-1793

208. Scanlan P. D. and Marchesi J. R. (2008) Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *ISME J* 2: 1183-1193

209. de Vargas C., Audic S., Henry N., Decelle J., Mahe F., et al. (2015) Ocean plankton. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* 348: 1261605

Hugerth L. W., Muller E. E., Hu Y. O., Lebrun L. A., Roume H., et al. (2014) Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS One* 9: e95567

18S rRNA 遺伝子高スループットシーケンスによる幅広い分類学同定のためには、適切なプライマーセットを生成する必要があります。著者は、アノテーションされた真核生物の 18S rRNA 配列についてすべてのアライメント位置で縮重プライマーを設計しました。プライマーを *in silico* でテストし、最も性能の良いペアは、さまざまなソースに由来する DNA のアンプリコンシーケンスによってさらにテストを行いました。領域 V4 および V5 は最も有益なもので、類似ソースからのテストサンプルと過去データが一致しました。プライマーの組合せにより、NGS はきわめて識別力の高い配列を生成することができます。しかし、最も性能の優れたセットでは、属レベル割振りで 79% の正確性に達しますが、18S コピー数多型において、半定量的なアプローチでの使用に制限されます。それにもかかわらず、これらのプライマーは複雑なサンプル内の真核生物コミュニティの質的評価を行うことができます。

イルミナ技術: Nextera DNA Library Prep Kit, MiSeq

Calo S., Shertz-Wall C., Lee S. C., Bastidas R. J., Nicolas F. E., et al. (2014) Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature* 513: 555-558

-
210. Franzosa E. A., Hsu T., Sirota-Madi A., Shafquat A., Abu-Ali G., et al. (2015) Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 13: 360-372
 211. Wu A. R., Neff N. F., Kalisky T., Dalerba P., Treutlein B., et al. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods* 11: 41-46
 212. Ning L., Liu G., Li G., Hou Y., Tong Y., et al. (2014) Current challenges in the bioinformatics of single cell genomics. *Front Oncol* 4: 7
 213. Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126
-

シングルセルシーケンス (SCS)

SCS では、病原性、伝播性および抗生物質耐性の基本となる機能的相違点を明らかにすることができます²¹⁰。こうした相違点は混合細胞集団内では見えない場合があります。純粋な培養ができない、培養不能な微生物で、SCS はシングルセルから完全なゲノム、トランスクリプトーム、またはプラスミドデータを産出することができます。この技術により、ヒトの健康にとっての「微生物の暗黒物質」の進化、系統発生、および生物学的機能に関する知見が得られます。

トランスクリプトミクスにおいて、シングルセル RNA-Seq には、集団内で平均発現レベルに歪みを生じさせる、高度に遺伝子発現した少数の細胞によるバイアスを解消できるという重要な利点があります²¹¹。SCS の主な課題には、シングルセルの捕捉、軽微な量の核酸の増幅、データ解析などがあります。こうした課題に応えるため、技術やバイオインフォマティクスツールの開発は飛躍的な進歩を遂げました^{212, 213}。

シングルセル DNA シーケンスの包括的な文献に関しては、以下を参照してください：

- イルミナ論文レビュー (<http://jp.illumina.com/science/publications/publications-review.html>)
- シーケンス手法論文集 (http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/research_reviews/sequencing-methods-review.pdf)
- シングルセル研究論文集 (http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/research_reviews/single-cell-sequencing-research-review.pdf)

総説

Stegle O., Teichmann S. A. and Marioni J. C. (2015) Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat Rev Genet* 16: 133-145

Wang Y. and Navin N. E. (2015) Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell* 58: 598-609

Lasken R. S. and McLean J. S. (2014) Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nat Rev Genet* 15: 577-584

参考文献

Wu A. R., Neff N. F., Kalisky T., Dalerba P., Treutlein B., et al. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods* 11: 41-46

正確なシングルセル RNA-Seq により、貴重なサンプルから発現パターンが明らかとなり、少数の細胞によるバイアスを回避できることは興味深いことです。著者らは、2つの異なる RNA 増幅手法で得られたシングルセルトランスクリプトームを、Nextera によりライブラリー調製し、HiSeq でシーケンスを行って評価しました。ヒト培養細胞からのシングルセルトランスクリプトームをバルクサンプルの qPCR および RNA-Seq と比較しました。プールしたシングルセルデータは、実際のバルクサンプルのトランスクリプトームに類似していました。著者らは、マイクロフルイディクスによって得られたシングルセルトランスクリプトームが正確なトランスクリプトームを産出すると結論付けています。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, HiSeq 2000 150 bp PE リード

プラスミドーム

プラスミドは、集団内の微生物の遺伝子を水平に伝播することがする、自己再生を行う染色体外遺伝因子です^{214, 215, 216}。メタゲノムは、宿主由来の DNA だけでなく、宿主が保有するプラスミドも含んでいます。プラスミドのサイズは小さいため、その DNA は宿主 DNA と比べると圧倒的に少量です。そのため、DNA 抽出法およびプラスミドコピー数は、正確で完全なプラスミドームを得るためにきわめて重要です。トランスポゾンによるプラスミドの捕捉 (TRACA)²¹⁷ や多置換増幅 (MDA) と NGS を組み合わせることで、これらの因子の解像度が改善されています²¹⁸。

総説

Dib J. R., Wagenknecht M., Farias M. E. and Meinhardt F. (2015) Strategies and approaches in plasmidome studies-uncovering plasmid diversity disregarding of linear elements? *Front Microbiol* 6: 463

Krupovic M. and Koonin E. V. (2015) Polintons: a hotbed of eukaryotic virus, transposon and plasmid evolution. *Nat Rev Microbiol* 13: 105-115

Jorgensen T. S., Kiil A. S., Hansen M. A., Sorensen S. J. and Hansen L. H. (2014) Current strategies for mobilome research. *Front Microbiol* 5: 750

参考文献

Fu Y., Liu L., Li X., Chen Y., Jiang Y., et al. (2015) Spread of a common bla_{NDM-1}-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species. *Infect Genet Evol* 32: 30-33

カルバペネム耐性は遺伝子、ニューデリーメタロβラクタマーゼ1 (NDM-1) により媒介されます。この遺伝子は、重篤な腸病原体に *Acinetobacter* によって伝播された可能性のあるプラスミドが保有しています。著者らは、PCR、16S rRNA、および bla_{OXA-5} 遺伝子シーケンスと生化学的手法を用いて、bla_{NDM-1} 遺伝子を保有する *Acinetobacter* 分離株を特徴づけました。多様な *Acinetobacter* 種に広く拡散した、よく知られる新たなプラスミドを同定しました。共通の主鎖構造は、このプラスミドがこうした異なる種内での bla_{NDM-1} 遺伝子の伝播に不可欠であることを示します。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Nigro S. J., Holt K. E., Pickard D. and Hall R. M. (2015) Carbapenem and amikacin resistance on a large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid. *J Antimicrob Chemother* 70: 1259-1261

著者らは NGS を用いて、広範に耐性を示す *A. baumannii* 分離株 D46 およびカルバペネムとアミノグリコシドに同時に耐性を伝播するプラスミド pD46-3 の完全な配列情報を取得しました。このプラスミドの主鎖構造は、pD72-2 および pAb-G7-2 (repAci6 プラスミド) の構造に似ています。bla_{OXA-23} 遺伝子が獲得され、*A. baumannii* でのカルバペネム耐性の播種の役割が示されました。

イルミナ技術: HiSeq

214. Bleicher A., Schofl G., Rodicio Mdel R. and Saluz H. P. (2013) The plasmidome of a *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pork meat. *Plasmid* 69: 202-210

215. Brolund A., Franzen O., Melefors O., Tegmark-Wisell K. and Sandegren L. (2013) Plasmidome-analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* using conventional typing and high-throughput sequencing. *PLoS One* 8: e65793

216. Song X., Sun J., Mikalsen T., Roberts A. P. and Sundsfjord A. (2013) Characterisation of the plasmidome within *Enterococcus faecalis* isolated from marginal periodontitis patients in Norway. *PLoS One* 8: e62248

217. Jones B. V. and Marchesi J. R. (2007) Transposon-aided capture (TRACA) of plasmids resident in the human gut mobile metagenome. *Nat Methods* 4: 55-61

218. Brown Kav A., Benhar I. and Mizrahi I. (2013) A method for purifying high quality and high yield plasmid DNA for metagenomic and deep sequencing approaches. *J Microbiol Methods* 95: 272-279

219. van Opijnen T. and Camilli A. (2013) Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 11: 435-442

Yamaichi Y., Chao M. C., Sasabe J., Clark L., Davis B. M., et al. (2015) High-resolution genetic analysis of the requirements for horizontal transmission of the ESBL plasmid from *Escherichia coli* O104:H4. *Nucleic Acids Res* 43: 348-360

広域スペクトルベータラクタマーゼ (ESBL) の播種の調節機構についてはほとんど知られていません。著者らは、トランスポゾンによるシーケンス解析 (TnSeq)²¹⁹ を行って、pESBL (*E. coli* O104:H4 から分離されたプラスミド) の維持および伝播を可能にする遺伝子を同定しました。このプラスミドの伝播をコントロールする新たな調節システムを構成していたのは、2 つの短い領域でした。さらに、pESBL によってコードされたメチルトランスフェラーゼが新たな宿主の制約から pESBL を保護していることから、宿主域の拡張に関与する可能性が示唆されました。

イルミナ技術: MiSeq

Uchiya K., Takahashi H., Nakagawa T., Yagi T., Moriyama M., et al. (2015) Characterization of a novel plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *PLoS One* 10: e0117797

Mycobacterium avium subsp. *hominissuis* は、免疫抑制されていないヒトおよびブタで肺疾患を引き起こします。著者らは、NGS を用いて、HIV 陰性の肺疾患の患者から分離された *M. avium* に由来するプラスミド pMAH135 の完全なゲノム配列を取得しました。pMAH135 には、ミコバクチン生合成タンパク質、VII 型分泌機構タンパク質および多剤排出トランスポーターの推定領域への配列相同性があります。このプラスミドによって保有される遺伝子は、臨床の肺疾患の分離株には頻りに存在し、ブタでは存在していませんでした。著者らは、このプラスミドが病理学および宿主特異性の両方に影響を及ぼすと結論付けています。

イルミナ技術: HiSeq 2000 100 bp PE リード

Hamidian M., Kenyon J. J., Holt K. E., Pickard D. and Hall R. M. (2014) A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-23 in AbaR4 in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J Antimicrob Chemother* 69: 2625-2628

NGS を用いて、オーストラリアの *A. baumannii* A85 の分離株 (グローバルクローン 1)、すなわち Tn2006 に blaOXA-23 を秘匿する広範な耐性菌のシーケンスを行いました。古い抗生物質に耐性を示す遺伝子は、染色体内、AbaR3 耐性アイランド内にあります。Tn6168 内の ampC 遺伝子の二次コピーはセファロスポリン耐性を与え、gyrA と parC の遺伝子にはフルオロキノロン耐性に至る突然変異があります。86,335 bp repAci6 プラスミド (pA85-3、AbaR4 内の Tn2006 の中の blaOXA-23 を保有) はイミペネム、メロペネムに耐性を伝播し、チカルシリン/クラバンを感受性のある受容者に伝播することが示されました。A85 は、さらに 2.7~8.7 kb の 2 つの小さな潜在プラスミドを含んでおり、新しい KL15 カプセル座位および OCL3 外核座位を保有します。

イルミナ技術: HiSeq

Skarin H. and Segerman B. (2014) Plasmidome interchange between *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* converts strains of independent lineages into distinctly different pathogens. *PLoS One* 9: e107777

Clostridium novyi sensu lato は、染色体外の可動要素に関連したさまざまな病原性の表現型を持つ近縁種である *C. botulinum*、*C. novyi*、および *C. haemolyticum* を含みます。*Clostridium novyi sensu lato* の代表的な 24 菌株およびそれぞれのプラスミドームの WGS を実施しました。さらに、*Clostridium novyi sensu lato* の 4 系統、および 13 のプラスミド群 (PG1~PG13) からなる 1 つの大きな可変プラスミドームが得られました。PG1 は不安定なプロファージであり、BoNT 遺伝子クラスターおよび C3 毒素をコードしています。プラスミド PG3、PG4、および PG6 は、C2 毒素、ホスホリパーゼ C、およびイブシロン毒素 B に関わる遺伝子を保有しており、その一方で PG8~PG11 は α 毒素コーディングプロファージを含みます。種と系統の間にはある程度の相関がありますが、これはおそらく系統間の毒素をコードするプラスミドおよびファージの移動性が制限されているためです。この観察は、これらの種の複雑な遺伝的関係を示唆しています。すなわち、モジュール交換された可能性のある、プラスミドとファージが、こうした系統の病原性の特性を作成する可能性があります。

イルミナ技術: TruSeq DNA Library Prep Kit, HiSeq 2000 100 bp PE リード

トランスクリプトームシーケンシング

トランスクリプトームシーケンシングでは、遺伝子および生物学的経路の活性化に関する情報が得られます。この情報から、「微生物は何をしているのか」という質問に答えるために、微生物が従事する活動に関する知見が得られます。トランスクリプトーム配列とゲノム配列とを比較すると、遺伝子、制御因子、およびオペロン構造をマッピングし特徴づけることが可能です。例えば、メタトランスクリプトーム解析により、遺伝子間領域でコードされた small RNA (sRNA) が古細菌とバクテリアに多数の調節機能を有していることを明らかにしました²²⁰。メタトランス

220. Kopf M. and Hess W. R. (2015) Regulatory RNAs in photosynthetic cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 39: 301-315

リプトーム解析では、共有資源を効率的に利用するためにコミュニティーメンバー間の複雑な相互作用を明らかにすることができます。

追加の実験技術をトランスクリプトミクスに組み合わせると、伝播と疾患に関与する病原性プロセスおよび特定経路に対する詳細な知見が得られる場合があります²²¹。このアプローチは、*Salmonella enterica* 血清型 Enteritidis などの遺伝学的に均質の微生物に十分に有益です。トランスクリプトミクスプロファイルにより、さまざまな病原性の表現型に関連した経路を識別することができます²²²。腫瘍内に病原体トランスクリプトミクスシグネチャーが発見されたことから、がん研究における病原体の役割に対して関心が高まりつつあります。この発見により、宿主病原体の相互作用における免疫応答と炎症の役割が強調されます²²³。

総説

Creecy J. P. and Conway T. (2015) Quantitative bacterial transcriptomics with RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 23: 133-140

Miyakoshi M., Chao Y. and Vogel J. (2015) Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs. *Curr Opin Microbiol* 24: 132-139

参考文献

Yost S., Duran-Pinedo A. E., Teles R., Krishnan K. and Frias-Lopez J. (2015) Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med* 7: 27

歯周病は世界的に一般的であり、現在のモデルには歯根膜炎進行の原因となる口腔マイクロバイオーム腸内毒素症があります。著者らは歯肉下のバイオフィルムの微生物のコミュニティーのメタトランスクリプトーム解析およびメタゲノムの解析を行うことで、コミュニティー組成および発現ネットワークの変化を同定しました。全体的な代謝シグネチャーは、疾患に関連しなかった微生物からと既知の歯周病原因菌からとの毒性因子の上方制御による疾患進行と一致していました。疾患進行を既知の病原体毒性因子単独で原因があるとはできないものの、疾患を引き起こす遺伝子の発現を好むコミュニティーの代謝シグネチャーの変化に起因すると考えることはできます。この研究は、歯周病を理解する際にトランスクリプトミクス試験の重要性を強調しています。

イルミナ技術: Nextera XT DNA Library Prep Kit, MiSeq v2 150 bp PE リード

Shah D. H. (2014) RNA sequencing reveals differences between the global transcriptomes of *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains with high and low pathogenicities. *Appl Environ Microbiol* 80: 896-906

S. enterica 血清型 Enteritidis (SE) は、主に鶏卵および鶏肉製品によって伝播される食物由来の細菌性胃腸炎を引き起こします。菌株は表現型が多様で、その遺伝的等質性にもかかわらず、毒性の可能性にはさまざまなものがあります。RNA-Seq を用いて、鳥類の体温で高病原性および低病原性の SE 菌株の全体的なトランスクリプトームの *in vitro* における差異を特徴づけました。この研究では、252 の発現量の異なる遺伝子を同定しましたが、ほとんどが下方修正されており、転写調節因子、毒性、および低病原性の菌株の運動性に関連がありました。この研究は、SE の病原性レベルに関連した転写シグネチャーについての簡潔な見解を示しています。こうしたシグネチャーは、毒性が果たす役割の可能性のために、機能的な特性評価試験の標的となる可能性があります。

イルミナ技術: TruSeq RNA Library Prep Kit, HiSeq 2000 v3

Edlund A., Yang Y., Yooseph S., Hall A. P., Nguyen D. D., et al. (2015) Meta-omics uncover temporal regulation of pathways across oral microbiome genera during *in vitro* sugar metabolism. *ISME J*

Kernell Burke A., Guthrie L. T., Modise T., Cormier G., Jensen R. V., et al. (2015) OpaR controls a network of downstream transcription factors in *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP. *PLoS One* 10: e0121863

Kopf M., Klahn S., Scholz I., Hess W. R. and Voss B. (2015) Variations in the non-coding transcriptome as a driver of inter-strain divergence and physiological adaptation in bacteria. *Sci Rep* 5: 9560

Papenfors K., Forstner K. U., Cong J. P., Sharma C. M. and Bassler B. L. (2015) Differential RNA-seq of *Vibrio cholerae* identifies the VqmR small RNA as a regulator of biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E766-775

Franzosa E. A., Morgan X. C., Segata N., Waldron L., Reyes J., et al. (2014) Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2329-2338

221. Rosinski-Chupin I., Sauvage E., Sismeiro O., Villain A., Da Cunha V., et al. (2015) Single nucleotide resolution RNA-seq uncovers new regulatory mechanisms in the opportunistic pathogen *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics* 16: 419

222. Shah D. H. (2014) RNA sequencing reveals differences between the global transcriptomes of *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains with high and low pathogenicities. *Appl Environ Microbiol* 80: 896-906

223. Chen Y. and Wei J. (2015) Identification of Pathogen Signatures in Prostate Cancer Using RNA-seq. *PLoS One* 10: e0128955

用語解説

AL	人為的な同腹児
antagomir	特定の miRNA に完全に相補的な合成 small RNA
As	ヒ素
Cryosols	表面から 1m 以内の、雪解けの期間に水浸しになることで特徴づけられる凍土
DDT	ジクロロジフェニルトリクロロエタン
Endosymbionts	宿主微生物内部で生きている小さな共生パートナー
HMP	Human Microbiome Project : ヒトマイクロバイオームプロジェクト
HPV	Human papillomavirus : ヒトパピローマウイルス
iHMP	Integrative Human Microbiome Project : 統合ヒトマイクロバイオームプロジェクト
MERS-CoV	中東呼吸器症候群コロナウイルス
MMETSP	海の微生物真核生物トランスクリプトーム シーケンスプロジェクト
NGS	次世代シーケンサー、高スループットシーケンサーとも言う
PIT	素粒子遮断トラップ
reassortment	ゲノム物質の組換え、 特に関連するウイルスに自然に生じる場合
SARS	Severe acute respiratory syndrome : 重症急性呼吸器症候群
SARS-CoV	SARS に関連するコロナウイルス
Sb	アンチモン
tropism	ウイルスの屈性は特定の宿主組織に対するウイルスの 特異性です。
WBD	White Band disease、 病変部が白く線状になったサンゴの病気の一つ

参考文献一覧

- Abeles S. R., Robles-Sikisaka R., Ly M., Lum A. G., Salzman J., et al. (2014) Human oral viruses are personal, persistent and gender-consistent. *ISME J* 8: 1753-1767
- Ablordey A. S., Vandelannoote K., Frimpong I. A., Ahortor E. K., Amisshah N. A., et al. (2015) Whole genome comparisons suggest random distribution of *Mycobacterium ulcerans* genotypes in a Buruli ulcer endemic region of Ghana. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003681
- Ali A., Hasan Z., McEnerney R., Mallard K., Hill-Cawthorne G., et al. (2015) Whole genome sequencing based characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan. *PLoS One* 10: e0117771
- Allen H. K., Bunge J., Foster J. A., Bayles D. O. and Stanton T. B. (2013) Estimation of viral richness from shotgun metagenomes using a frequency count approach. *Microbiome* 1: 5
- Andersen K. G., Shapiro B. J., Matranga C. B., Sealfon R., Lin A. E., et al. (2015) Clinical Sequencing Uncovers Origins and Evolution of Lassa Virus. *Cell* 162: 738-750
- Andersen L. O., Vedel Nielsen H. and Stensvold C. R. (2013) Waiting for the human intestinal Eukaryotome. *ISME J* 7: 1253-1255
- Anderson S. T., Kaforou M., Brent A. J., Wright V. J., Banwell C. M., et al. (2014) Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. *N Engl J Med* 370: 1712-1723
- Ang L., Arboleya S., Lihua G., Chuihui Y., Nan Q., et al. (2014) The establishment of the infant intestinal microbiome is not affected by rotavirus vaccination. *Sci Rep* 4: 7417
- Angelakis E. and Raoult D. (2014) Methods for the discovery of emerging pathogens. *Microb Pathog* 77: 114-118
- Archin N. M., Sung J. M., Garrido C., Soriano-Sarabia N. and Margolis D. M. (2014) Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nat Rev Microbiol* 12: 750-764
- Arthur J. C., Gharaibeh R. Z., Muhlbauer M., Perez-Chanona E., Uronis J. M., et al. (2014) Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat Commun* 5: 4724
- Bande F., Arshad S. S., Bejo M. H., Moeini H. and Omar A. R. (2015) Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J Immunol Res* 2015: 424860
- Banerjee J., Mishra N. and Dhas Y. (2015) Metagenomics: A new horizon in cancer research. *Meta Gene* 5: 84-89
- Barone R., De Santi C., Palma Esposito F., Tedesco P., Galati F., et al. (2014) Marine metagenomics, a valuable tool for enzymes and bioactive compounds discovery. *Frontiers in Marine Science* 1:
- Beasley D. W., McAuley A. J. and Bente D. A. (2015) Yellow fever virus: genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Res* 115: 48-70
- Beck A., Tesh R. B., Wood T. G., Widen S. G., Ryman K. D., et al. (2014) Comparison of the live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 strain to its virulent parental strain Asibi by deep sequencing. *J Infect Dis* 209: 334-344
- Bell E. T., Suchodolski J. S., Isaiah A., Fleeman L. M., Cook A. K., et al. (2014) Faecal microbiota of cats with insulin-treated diabetes mellitus. *PLoS One* 9: e108729
- Belshaw R., Pereira V., Katzourakis A., Talbot G., Paces J., et al. (2004) Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4894-4899
- Bhat R. K., Rudnick W., Antony J. M., Maingat F., Ellestad K. K., et al. (2014) Human endogenous retrovirus-K(II) envelope induction protects neurons during HIV/AIDS. *PLoS One* 9: e97984
- Bhullar K., Waglechner N., Pawlowski A., Koteva K., Banks E. D., et al. (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 7: e34953
- Bichaud L., de Lamballerie X., Alkan C., Izri A., Gould E. A., et al. (2014) Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microb Pathog* 77: 136-141
- Bielaszewska M., Schiller R., Lammers L., Bauwens A., Fruth A., et al. (2014) Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. *EMBO Mol Med* 6: 347-357
- Bindels L. B., Neyrinck A. M., Salazar N., Taminiau B., Druart C., et al. (2015) Non Digestible Oligosaccharides Modulate the Gut Microbiota to Control the Development of Leukemia and Associated Cachexia in Mice. *PLoS One* 10: e0131009
- Bleicher A., Schoff G., Rodicio Mdel R. and Saluz H. P. (2013) The plasmidome of a *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pork meat. *Plasmid* 69: 202-210
- Bos K. I., Harkins K. M., Herbig A., Coscolla M., Weber N., et al. (2014) Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 514: 494-497
- Bouslimani A., Porto C., Rath C. M., Wang M., Guo Y., et al. (2015) Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E2120-2129
- Boutin S., Graeber S. Y., Weitnauer M., Panitz J., Stahl M., et al. (2015) Comparison of microbiomes from different niches of upper and lower airways in children and adolescents with cystic fibrosis. *PLoS One* 10: e0116029
- Brady R. A., Bruno V. M. and Burns D. L. (2015) RNA-Seq Analysis of the Host Response to *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infection in a Mouse Model. *PLoS One* 10: e0124877
- Briese T., Mishra N., Jain K., Zalmout I. S., Jabado O. J., et al. (2014) Middle East respiratory syndrome coronavirus quasispecies that include homologues of human isolates revealed through whole-genome analysis and virus cultured from dromedary camels in Saudi Arabia. *MBio* 5: e01146-01114
- Bringiotti R., Ierardi E., Lovero R., Losurdo G., Di Leo A., et al. (2014) Intestinal microbiota: The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease? *World J Gastrointest Pathophysiol* 5: 550-559
- Brolund A., Franzen O., Melefors O., Tegmark-Wisell K. and Sandegren L. (2013) Plasmidome-analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* using conventional typing and high-throughput sequencing. *PLoS One* 8: e65793
- Brown B. A., Nix W. A., Sheth M., Frace M. and Oberste M. S. (2014) Seven Strains of Enterovirus D68 Detected in the United States during the 2014 Severe Respiratory Disease Outbreak. *Genome Announc* 2:
- Brown J. R., Morfopoulou S., Hubb J., Emmett W. A., Ip W., et al. (2015) Astrovirus VA1/HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 60: 881-888
- Brown Kav A., Benhar I. and Mizrahi I. (2013) A method for purifying high quality and high yield plasmid DNA for metagenomic and deep sequencing approaches. *J Microbiol Methods* 95: 272-279
- Bruggemann H., Brzuszkiewicz E., Chapeton-Montes D., Plourde L., Speck D., et al. (2015) Genomics of *Clostridium tetani*. *Res Microbiol* 166: 326-331
- Bryant J. M., Schurch A. C., van Deutekom H., Harris S. R., de Beer J. L., et al. (2013) Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis* 13: 110
- Buffie C. G., Bucci V., Stein R. R., McKenney P. T., Ling L., et al. (2015) Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517: 205-208

- Bzhalava D., Muhr L. S., Lagheden C., Ekstrom J., Forslund O., et al. (2014) Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci Rep* 4: 5807
- Calderon-Norena D. M., Gonzalez-Novo A., Orellana-Munoz S., Gutierrez-Escribano P., Arnaiz-Pita Y., et al. (2015) A single nucleotide polymorphism uncovers a novel function for the transcription factor *Ace2* during *Candida albicans* hyphal development. *PLoS Genet* 11: e1005152
- Calo S., Shertz-Wall C., Lee S. C., Bastidas R. J., Nicolas F. E., et al. (2014) Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature* 513: 555-558
- Cammarota G., Ianiro G., Cianci R., Bibbo S., Gasbarrini A., et al. (2015) The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: potential for therapy. *Pharmacol Ther* 149: 191-212
- Candela M., Turrioni S., Biagi E., Carbonero F., Rampelli S., et al. (2014) Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J Gastroenterol* 20: 908-922
- Carroll M. W., Matthews D. A., Hiscox J. A., Elmore M. J., Pollakis G., et al. (2015) Temporal and spatial analysis of the 2014-2015 Ebola virus outbreak in West Africa. *Nature* 524: 97-101
- Genit M. C., Matzaraki V., Tigchelaar E. F. and Zhernakova A. (2014) Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1842: 1981-1992
- Chan B. K., Wilson T., Fischer K. F. and Kriesel J. D. (2014) Deep sequencing to identify the causes of viral encephalitis. *PLoS One* 9: e93993
- Chandler D. P., Brockman F. J. and Fredrickson J. K. (1997) Use of 16S rDNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from ex situ perturbation of a subsurface sediment. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 217-230
- Chandler D. P., Fredrickson J. K. and Brockman F. J. (1997) Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol Ecol* 6: 475-482
- Chandler J. A., Thongsripong P., Green A., Kittayapong P., Wilcox B. A., et al. (2014) Metagenomic shotgun sequencing of a Bunyavirus in wild-caught *Aedes aegypti* from Thailand informs the evolutionary and genomic history of the Phleboviruses. *Virology* 464-465: 312-319
- Chase D., Goulder A., Zenhausern F., Monk B. and Herbst-Kralovetz M. (2015) The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: a review of applications in etiology, symptoms and treatment. *Gynecol Oncol* 138: 190-200
- Chassaing B., Koren O., Goodrich J. K., Poole A. C., Srinivasan S., et al. (2015) Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519: 92-96
- Chen J., Xue Y., Poidinger M., Lim T., Chew S. H., et al. (2014) Mapping of HPV transcripts in four human cervical lesions using RNAseq suggests quantitative rearrangements during carcinogenic progression. *Virology* 462-463: 14-24
- Chen Y. and Wei J. (2015) Identification of Pathogen Signatures in Prostate Cancer Using RNA-seq. *PLoS One* 10: e0128955
- Chen Y., Zhao Y., Cheng Q., Wu D. and Liu H. (2015) The Role of Intestinal Microbiota in Acute Graft-versus-Host Disease. *J Immunol Res* 2015: 145859
- Chiarello M., Villeger S., Bouvier C., Bettarel Y. and Bouvier T. (2015) High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiol Ecol* 91:
- Cho I. and Blaser M. J. (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 13: 260-270
- Cohen-Gihon I., Israeli O., Beth-Din A., Levy H., Cohen O., et al. (2014) Whole-Genome Sequencing of the Nonproteolytic *Bacillus anthracis* V770-NP1-R Strain Reveals Multiple Mutations in Peptidase Loci. *Genome Announc* 2:
- Coll F., McNerney R., Preston M. D., Guerra-Assuncao J. A., Warry A., et al. (2015) Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med* 7: 51
- Colman R. E., Schupp J. M., Hicks N. D., Smith D. E., Buchhagen J. L., et al. (2015) Detection of Low-Level Mixed-Population Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Using High Fidelity Amplicon Sequencing. *PLoS One* 10: e0126626
- Colson P., La Scola B. and Raoult D. (2013) Giant viruses of amoebae as potential human pathogens. *Intervirology* 56: 376-385
- Cooper D. A., Jha B. K., Silverman R. H., Hesselberth J. R. and Barton D. J. (2014) Ribonuclease L and metal-ion-independent endoribonuclease cleavage sites in host and viral RNAs. *Nucleic Acids Res* 42: 5202-5216
- Cotillard A., Kennedy S. P., Kong L. C., Prifti E., Pons N., et al. (2013) Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500: 585-588
- Cotten M., Oude Munnink B., Canuti M., Deijis M., Watson S. J., et al. (2014) Full genome virus detection in fecal samples using sensitive nucleic acid preparation, deep sequencing, and a novel iterative sequence classification algorithm. *PLoS One* 9: e93269
- Cowley L. A., Beckett S. J., Chase-Topping M., Perry N., Dallman T. J., et al. (2015) Analysis of whole genome sequencing for the *Escherichia coli* O157:H7 typing phages. *BMC Genomics* 16: 271
- Creedy J. P. and Conway T. (2015) Quantitative bacterial transcriptomics with RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 23: 133-140
- Cretoiou M. S., Berini F., Kielak A. M., Marinelli F. and van Elsas J. D. (2015) A novel salt-tolerant chitinobiosidase discovered by genetic screening of a metagenomic library derived from chitin-amended agricultural soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 8199-8215
- Croucher N. J., Chewapreecha C., Hanage W. P., Harris S. R., McGee L., et al. (2014) Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. *Genome Biol Evol* 6: 1589-1602
- Curtis J., Luo Y., Zenner H. L., Cuchet-Lourenco D., Wu C., et al. (2015) Susceptibility to tuberculosis is associated with variants in the *ASAP1* gene encoding a regulator of dendritic cell migration. *Nat Genet* 47: 523-527
- Dacheux L., Cervantes-Gonzalez M., Guigon G., Thiberge J. M., Vandebogaert M., et al. (2014) A preliminary study of viral metagenomics of French bat species in contact with humans: identification of new mammalian viruses. *PLoS One* 9: e87194
- Daft J. G., Ptacek T., Kumar R., Morrow C. and Lorenz R. G. (2015) Cross-fostering immediately after birth induces a permanent microbiota shift that is shaped by the nursing mother. *Microbiome* 3: 17
- Darch S. E., McNally A., Harrison F., Corander J., Barr H. L., et al. (2015) Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a *Pseudomonas aeruginosa* population during cystic fibrosis infection. *Sci Rep* 5: 7649
- David L. A., Weil A., Ryan E. T., Calderwood S. B., Harris J. B., et al. (2015) Gut microbial succession follows acute secretory diarrhea in humans. *MBio* 6: e00381-00315
- de Castro A. P., Fernandes Gda R. and Franco O. L. (2014) Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Front Microbiol* 5: 489
- de Vargas C., Audic S., Henry N., Decelle J., Mahe F., et al. (2015) Ocean plankton. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* 348: 1261605
- den Bakker H. C., Allard M. W., Bopp D., Brown E. W., Fontana J., et al. (2014) Rapid whole-genome sequencing for surveillance of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Emerg Infect Dis* 20: 1306-1314
- Deng X., Desai P. T., den Bakker H. C., Mikoleit M., Tolar B., et al. (2014) Genomic epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis based on population structure of prevalent lineages. *Emerg Infect Dis* 20: 1481-1489
- Dennis F. E., Fujii Y., Haga K., Damanka S., Lartey B., et al. (2014) Identification of novel Ghanaian G8P[6] human-bovine reassortant rotavirus strain by next generation sequencing. *PLoS One* 9: e100699
- DeWeerd S. (2015) Microbiome: Microbial mystery. *Nature* 521: S10-11

- Diaz P. I., Dupuy A. K., Abusleme L., Reese B., Oberfell C., et al. (2012) Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Mol Oral Microbiol* 27: 182-201
- Diaz P. I., Strausbaugh L. D. and Dongari-Bagtzoglou A. (2014) Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 101
- Dib J. R., Wagenknecht M., Farias M. E. and Meinhardt F. (2015) Strategies and approaches in plasmidome studies-uncovering plasmid diversity disregarding of linear elements? *Front Microbiol* 6: 463
- Dieter R. R. and Silbergeld E. K. (2015) Biomarkers for the 21st century: listening to the microbiome. *Toxicol Sci* 144: 208-216
- Dillon S. M., Lee E. J., Kotter C. V., Austin G. L., Dong Z., et al. (2014) An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol* 7: 983-994
- DiMaio F., Yu X., Rensen E., Krupovic M., Prangishvili D., et al. (2015) Virology. A virus that infects a hyperthermophile encapsidates A-form DNA. *Science* 348: 914-917
- Dominguez-Bello M. G., Costello E. K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., et al. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11971-11975
- Doudna J. A. and Charpentier E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096
- Dudley D. M., Bailey A. L., Mehta S. H., Hughes A. L., Kirk G. D., et al. (2014) Cross-clade simultaneous HIV drug resistance genotyping for reverse transcriptase, protease, and integrase inhibitor mutations by Illumina MiSeq. *Retrovirology* 11: 122
- Duran-Pinedo A. E., Chen T., Teles R., Starr J. R., Wang X., et al. (2014) Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME J* 8: 1659-1672
- Duran-Pinedo A. E. and Frias-Lopez J. (2015) Beyond microbial community composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes Infect* 17: 505-516
- Edlund A., Yang Y., Yooseph S., Hall A. P., Nguyen D. D., et al. (2015) Meta-omics uncover temporal regulation of pathways across oral microbiome genera during *in vitro* sugar metabolism. *ISME J*
- Eldholm V., Monteserin J., Rieux A., Lopez B., Sobkowiak B., et al. (2015) Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. *Nat Commun* 6: 7119
- Ellington M. J., Reuter S., Harris S. R., Holden M. T., Cartwright E. J., et al. (2015) Emergent and evolving antimicrobial resistance cassettes in community-associated fusidic acid and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 45: 477-484
- Elliott J. H., Wightman F., Solomon A., Ghneim K., Ahlers J., et al. (2014) Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog* 10: e1004473
- Erny D., Hrabec de Angelis A. L., Jaitin D., Wieghofer P., Staszewski O., et al. (2015) Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18: 965-977
- Escalera-Zamudio M., Nelson M. I., Cobian Guemes A. G., Lopez-Martinez I., Cruz-Ortiz N., et al. (2014) Molecular epidemiology of influenza A/H3N2 viruses circulating in Mexico from 2003 to 2012. *PLoS One* 9: e102453
- Everard A., Lazarevic V., Gaia N., Johansson M., Stahlman M., et al. (2014) Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *ISME J* 8: 2116-2130
- Everitt R. G., Didelot X., Batty E. M., Miller R. R., Knox K., et al. (2014) Mobile elements drive recombination hotspots in the core genome of *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun* 5: 3956
- Feasey N. A., Gaskell K., Wong V., Msefula C., Selemani G., et al. (2015) Rapid emergence of multidrug resistant, H58-lineage *Salmonella typhi* in Blantyre, Malawi. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003748
- Feng H., Zhang H., Deng J., Wang L., He Y., et al. (2015) Incorporation of a GPI-anchored engineered cytokine as a molecular adjuvant enhances the immunogenicity of HIV VLPs. *Sci Rep* 5: 11856
- Feng Q., Liang S., Jia H., Stadlmayr A., Tang L., et al. (2015) Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun* 6: 6528
- Fernandes P. (2006) Antibacterial discovery and development--the failure of success? *Nat Biotechnol* 24: 1497-1503
- Ferreira C. M., Vieira A. T., Vinolo M. A., Oliveira F. A., Curi R., et al. (2014) The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res* 2014: 689492
- Flegontov P., Votykka J., Skalicky T., Logacheva M. D., Penin A. A., et al. (2013) Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr Biol* 23: 1787-1793
- Foxman B. and Rosenthal M. (2013) Implications of the human microbiome project for epidemiology. *Am J Epidemiol* 177: 197-201
- Frank D. N., Bales E. S., Monks J., Jackman M. J., MacLean P. S., et al. (2015) Perilipin-2 Modulates Lipid Absorption and Microbiome Responses in the Mouse Intestine. *PLoS One* 10: e0131944
- Franz E., Delaquis P., Morabito S., Beutin L., Gobius K., et al. (2014) Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in global food production systems. *Int J Food Microbiol* 187: 57-72
- Franzosa E. A., Morgan X. C., Segata N., Waldron L., Reyes J., et al. (2014) Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2329-2338
- Franzosa E. A., Hsu T., Sirota-Madi A., Shafquat A., Abu-Ali G., et al. (2015) Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 13: 360-372
- Fricke W. F. and Rasko D. A. (2014) Bacterial genome sequencing in the clinic: bioinformatic challenges and solutions. *Nat Rev Genet* 15: 49-55
- Frykman P. K., Nordenskjold A., Kawaguchi A., Hui T. T., Granstrom A. L., et al. (2015) Characterization of Bacterial and Fungal Microbiome in Children with Hirschsprung Disease with and without a History of Enterocolitis: A Multicenter Study. *PLoS One* 10: e0124172
- Fu Y., Liu L., Li X., Chen Y., Jiang Y., et al. (2015) Spread of a common bla_{NDM-1}-carrying plasmid among diverse *Acinetobacter* species. *Infect Genet Evol* 32: 30-33
- Fulton B. O., Sachs D., Beaty S. M., Won S. T., Lee B., et al. (2015) Mutational Analysis of Measles Virus Suggests Constraints on Antigenic Variation of the Glycoproteins. *Cell Rep* 11: 1331-1338
- Galagan J. E. (2014) Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet* 15: 307-320
- Gasc C., Ribiere C., Parisot N., Beugnot R., Defois C., et al. (2015) Capturing prokaryotic dark matter genomes. *Res Microbiol*
- Ge X. Y., Li J. L., Yang X. L., Chmura A. A., Zhu G., et al. (2013) Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503: 535-538
- Ghartey J. P., Smith B. C., Chen Z., Buckley N., Lo Y., et al. (2014) *Lactobacillus crispatus* dominant vaginal microbiome is associated with inhibitory activity of female genital tract secretions against *Escherichia coli*. *PLoS One* 9: e96659
- Gire S. K., Goba A., Andersen K. G., Sealfon R. S., Park D. J., et al. (2014) Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 345: 1369-1372
- Gkouskou K. K., Deligianni C., Tsatsanis C. and Eliopoulos A. G. (2014) The gut microbiota in mouse models of inflammatory bowel disease. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 28

- Gladstone R. A., Jefferies J. M., Tocheva A. S., Beard K. R., Garley D., et al. (2015) Five winters of pneumococcal serotype replacement in UK carriage following PCV introduction. *Vaccine* 33: 2015-2021
- Gomes A. C., Bueno A. A., de Souza R. G. and Mota J. F. (2014) Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutr J* 13: 60
- Goodrich J. K., Waters J. L., Poole A. C., Sutter J. L., Koren O., et al. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159: 789-799
- Gratsepanche J. D., Santoferrara L. F., McManus G. B. and Katz L. A. (2014) Diversity of diversity: conceptual and methodological differences in biodiversity estimates of eukaryotic microbes as compared to bacteria. *Trends Microbiol* 22: 432-437
- Greenblum S., Carr R. and Borenstein E. (2015) Extensive strain-level copy-number variation across human gut microbiome species. *Cell* 160: 583-594
- Grice E. A. (2014) The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Semin Cutan Med Surg* 33: 98-103
- Griffing S. M., MacCannell D. R., Schmidtke A. J., Freeman M. M., Hyytia-Trees E., et al. (2015) Canonical Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) for High-Resolution Subtyping of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7. *PLoS One* 10: e0131967
- Gritz E. C. and Bhandari V. (2015) The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Front Pediatr* 3: 17
- Grow E. J., Flynn R. A., Chavez S. L., Bayless N. L., Wossido M., et al. (2015) Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. *Nature* 522: 221-225
- Guerra-Assuncao J. A., Houben R. M., Crampin A. C., Mzembe T., Mallard K., et al. (2015) Recurrence due to relapse or reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*: a whole-genome sequencing approach in a large, population-based cohort with a high HIV infection prevalence and active follow-up. *J Infect Dis* 211: 1154-1163
- Gulden E., Wong F. S. and Wen L. (2015) The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clin Immunol* 159: 143-153
- Hall R. J., Wang J., Todd A. K., Bissielo A. B., Yen S., et al. (2014) Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *J Virol Methods* 195: 194-204
- Hamidian M., Kenyon J. J., Holt K. E., Pickard D. and Hall R. M. (2014) A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-23 in AbaR4 in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J Antimicrob Chemother* 69: 2625-2628
- Hamidian M., Holt K. E. and Hall R. M. (2015) The complete sequence of *Salmonella* genomic island SGI1-K. *J Antimicrob Chemother* 70: 305-306
- Han H. J., Wen H. L., Zhou C. M., Chen F. F., Luo L. M., et al. (2015) Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res* 205: 1-6
- Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J. and Goodman R. M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5: R245-249
- Handelsman J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 669-685
- Hansen T. H., Gobel R. J., Hansen T. and Pedersen O. (2015) The gut microbiome in cardio-metabolic health. *Genome Med* 7: 33
- Hare J. M., Ferrell J. C., Witkowski T. A. and Grice A. N. (2014) Prophage induction and differential RecA and UmuDAb transcriptome regulation in the DNA damage responses of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *PLoS One* 9: e93861
- Harris K. A., Underwood A., Kenna D. T., Brooks A., Kavaliunaite E., et al. (2015) Whole-genome sequencing and epidemiological analysis do not provide evidence for cross-transmission of *Mycobacterium abscessus* in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *Clin Infect Dis* 60: 1007-1016
- Hartman B. J. and Tomasz A. (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158: 513-516
- Harvey A. L., Edrada-Ebel R. and Quinn R. J. (2015) The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov* 14: 111-129
- Hatfull G. F. and Hendrix R. W. (2011) Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol* 1: 298-303
- He B., Zhang Y., Xu L., Yang W., Yang F., et al. (2014) Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China. *J Virol* 88: 7070-7082
- He B., Nohara K., Ajami N. J., Michalek R. D., Tian X., et al. (2015) Transmissible microbial and metabolomic remodeling by soluble dietary fiber improves metabolic homeostasis. *Sci Rep* 5: 10604
- He C., Shan Y. and Song W. (2015) Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. *Nutr Res* 35: 361-367
- Heisel T., Podgorski H., Staley C. M., Knights D., Sadowsky M. J., et al. (2015) Complementary amplicon-based genomic approaches for the study of fungal communities in humans. *PLoS One* 10: e0116705
- Henriksson P. J., Troell M. and Rico A. (2015) Antimicrobial use in aquaculture: Some complementing facts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E3317
- Hill J. A., O'Meara T. R. and Cowen L. E. (2015) Fitness Trade-Offs Associated with the Evolution of Resistance to Antifungal Drug Combinations. *Cell Rep*
- Hoffman L. R., Pope C. E., Hayden H. S., Heltsh S., Levy R., et al. (2014) *Escherichia coli* dysbiosis correlates with gastrointestinal dysfunction in children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 58: 396-399
- Hoffmann B., Tappe D., Hoper D., Herden C., Boldt A., et al. (2015) A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N Engl J Med* 373: 154-162
- Holt P. G. (2015) The mechanism or mechanisms driving atopic asthma initiation: The infant respiratory microbiome moves to center stage. *J Allergy Clin Immunol* 136: 15-22
- Hsiao A., Ahmed A. M., Subramanian S., Griffin N. W., Drewry L. L., et al. (2014) Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature* 515: 423-426
- Hsu L. Y., Harris S. R., Chlebowicz M. A., Lindsay J. A., Koh T. H., et al. (2015) Evolutionary dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within a healthcare system. *Genome Biol* 16: 81
- Hu C., Wong F. S. and Wen L. (2015) Type 1 diabetes and gut microbiota: Friend or foe? *Pharmacol Res* 98: 9-15
- Huang J. H., Jing X. and Douglas A. E. (2015) The multi-tasking gut epithelium of insects. *Insect Biochem Mol Biol*
- Huang Y. J., Sethi S., Murphy T., Nariya S., Boushey H. A., et al. (2014) Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 52: 2813-2823
- Hugerth L. W., Muller E. E., Hu Y. O., Lebrun L. A., Roume H., et al. (2014) Systematic design of 18S rRNA gene primers for determining eukaryotic diversity in microbial consortia. *PLoS One* 9: e95567
- Hughes D. and Andersson D. I. (2015) Evolutionary consequences of drug resistance: shared principles across diverse targets and organisms. *Nat Rev Genet* 16: 459-471
- Human Microbiome Project C. (2012) A framework for human microbiome research. *Nature* 486: 215-221
- Hussain M. and Asgari S. (2014) MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 2746-2751
- Hyman R. W., Fukushima M., Jiang H., Fung E., Rand L., et al. (2014) Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reprod Sci* 21: 32-40
- Ibarbalz F. M., Perez M. V., Figuerola E. L. and Erijman L. (2014) The bias associated with amplicon sequencing does not affect the quantitative assessment of bacterial community dynamics. *PLoS One* 9: e99722

- Inns T., Lane C., Peters T., Dallman T., Chatt C., et al. (2015) A multi-country *Salmonella* Enteritidis phage type 14b outbreak associated with eggs from a German producer: 'near real-time' application of whole genome sequencing and food chain investigations, United Kingdom, May to September 2014. *Euro Surveill* 20:
- Integrative H. M. P. R. N. C. (2014) The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell Host Microbe* 16: 276-289
- Jacobsen U. P., Nielsen H. B., Hildebrand F., Raes J., Sicheritz-Ponten T., et al. (2013) The chemical interactome space between the human host and the genetically defined gut metatypes. *ISME J* 7: 730-742
- Jakhetia R. and Verma N. K. (2015) Identification and Molecular Characterisation of a Novel Mu-Like Bacteriophage, SfMu, of *Shigella flexneri*. *PLoS One* 10: e0124053
- Jensen K. C., Hair B. B., Wienclaw T. M., Murdock M. H., Hatch J. B., et al. (2015) Isolation and Host Range of Bacteriophage with Lytic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Potential Use as a Fomite Decontaminant. *PLoS One* 10: e0131714
- Jensen R. H., Mollerup S., Mourier T., Hansen T. A., Fridholm H., et al. (2015) Target-dependent enrichment of virions determines the reduction of high-throughput sequencing in virus discovery. *PLoS One* 10: e0122636
- Jia W., Li H., Zhao L. and Nicholson J. K. (2008) Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 7: 123-129
- Jiang P., Zhou N., Chen X., Zhao X., Li D., et al. (2015) Integrative analysis of differentially expressed microRNAs of pulmonary alveolar macrophages from piglets during H1N1 swine influenza A virus infection. *Sci Rep* 5: 8167
- Jones-Hall Y. L., Kozik A. and Nakatsu C. (2015) Ablation of tumor necrosis factor is associated with decreased inflammation and alterations of the microbiota in a mouse model of inflammatory bowel disease. *PLoS One* 10: e0119441
- Jones B. V. and Marchesi J. R. (2007) Transposon-aided capture (TRACA) of plasmids resident in the human gut mobile metagenome. *Nat Methods* 4: 55-61
- Jorgensen T. S., Kilil A. S., Hansen M. A., Sorensen S. J. and Hansen L. H. (2014) Current strategies for mobilome research. *Front Microbiol* 5: 750
- Kamada N. and Nunez G. (2013) Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells. *J Immunol* 190: 1389-1395
- Kamada N., Seo S. U., Chen G. Y. and Nunez G. (2013) Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 13: 321-335
- Karlsson F. H., Tremaroli V., Nookaew I., Bergstrom G., Behre C. J., et al. (2013) Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498: 99-103
- Kay G. L., Sergeant M. J., Zhou Z., Chan J. Z., Millard A., et al. (2015) Eighteenth-century genomes show that mixed infections were common at time of peak tuberculosis in Europe. *Nat Commun* 6: 6717
- Kernbauer E., Ding Y. and Cadwell K. (2014) An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature advance online publication*:
- Kernell Burke A., Guthrie L. T., Modise T., Cormier G., Jensen R. V., et al. (2015) OpaR controls a network of downstream transcription factors in *Vibrio parahaemolyticus* BB22OP. *PLoS One* 10: e0121863
- Kim D. H. (2015) Gut Microbiota-Mediated Drug-Antibiotic Interactions. *Drug Metab Dispos* 43: 1581-1589
- Kimelman A., Levy A., Sberro H., Kidron S., Leavitt A., et al. (2012) A vast collection of microbial genes that are toxic to bacteria. *Genome Res* 22: 802-809
- Kitahara K., Yasutake Y. and Miyazaki K. (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 19220-19225
- Knights D., Silverberg M. S., Weersma R. K., Gevers D., Dijkstra G., et al. (2014) Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med* 6: 107
- Koch L. (2015) Metagenomics: Shaping the gut microbiome. *Nat Rev Genet* 16: 2
- Kok C. C. (2015) Therapeutic and prevention strategies against human enterovirus 71 infection. *World J Virol* 4: 78-95
- Kopf M. and Hess W. R. (2015) Regulatory RNAs in photosynthetic cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 39: 301-315
- Kopf M., Klahn S., Scholz I., Hess W. R. and Voss B. (2015) Variations in the non-coding transcriptome as a driver of inter-strain divergence and physiological adaptation in bacteria. *Sci Rep* 5: 9560
- Koser C. U., Ellington M. J. and Peacock S. J. (2014) Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet* 30: 401-407
- Kouri V., Khouri R., Aleman Y., Abrahantes Y., Vercauteren J., et al. (2015) CRF19_cpx is an Evolutionary fit HIV-1 Variant Strongly Associated With Rapid Progression to AIDS in Cuba. *EBioMedicine* 2: 244-254
- Kramer R., Sauer-Heilborn A., Welte T., Jauregui R., Brettar I., et al. (2015) High individuality of respiratory bacterial communities in a large cohort of adult cystic fibrosis patients under continuous antibiotic treatment. *PLoS One* 10: e0117436
- Krupovic M. and Koonin E. V. (2015) Pointons: a hotbed of eukaryotic virus, transposon and plasmid evolution. *Nat Rev Microbiol* 13: 105-115
- Krupovic M., Zhi N., Li J., Hu G., Koonin E. V., et al. (2015) Multiple layers of chimerism in a single-stranded DNA virus discovered by deep sequencing. *Genome Biol Evol* 7: 993-1001
- Kugelman J. R., Wiley M. R., Mate S., Ladner J. T., Beitzel B., et al. (2015) Monitoring of Ebola Virus Makona Evolution through Establishment of Advanced Genomic Capability in Liberia. *Emerg Infect Dis* 21: 1135-1143
- Kumar V. and Robbins S. L. (2007) Robbins basic pathology. xiv, 946 p.
- Labbe A., Ganopolsky J. G., Martoni C. J., Prakash S. and Jones M. L. (2014) Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. *PLoS One* 9: e115175
- Lam K. N. and Charles T. C. (2015) Strong spurious transcription likely contributes to DNA insert bias in typical metagenomic clone libraries. *Microbiome* 3: 22
- Lambert D., Carrillo C. D., Koziol A. G., Manninger P. and Blais B. W. (2015) GeneSippr: a rapid whole-genome approach for the identification and characterization of foodborne pathogens such as priority Shiga toxinogenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 10: e0122928
- Lambert J. E., Myslicki J. P., Bornhof M. R., Belke D. D., Shearer J., et al. (2015) Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 40: 749-752
- Land M., Hauser L., Jun S. R., Nookaew I., Leuze M. R., et al. (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* 15: 141-161
- Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., et al. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6955-6959
- Lasken R. S. and McLean J. S. (2014) Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nat Rev Genet* 15: 577-584
- Lax S., Smith D. P., Hampton-Marcell J., Owens S. M., Handley K. M., et al. (2014) Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 345: 1048-1052
- Lechartier B., Rybniker J., Zumla A. and Cole S. T. (2014) Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. *EMBO Mol Med* 6: 158-168
- Lee J. S., Rhee J. S., Kim R. O., Hwang D. S., Han J., et al. (2010) The copepod *Tigriopus japonicus* genomic DNA information (574Mb) and molecular anatomy. *Mar Environ Res* 69 Suppl: S21-23
- Leekitcharoenphon P., Nielsen E. M., Kaas R. S., Lund O. and Aarestrup F. M. (2014) Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS One* 9: e87991

- Leishman S. J., Do H. L. and Ford P. J. (2010) Cardiovascular disease and the role of oral bacteria. *J Oral Microbiol* 2: 5781
- Lemey P., Rambaut A., Bedford T., Faria N., Bielejec F., et al. (2014) Unifying viral genetics and human transportation data to predict the global transmission dynamics of human influenza H3N2. *PLoS Pathog* 10: e1003932
- Leroy E. M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., et al. (2005) Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438: 575-576
- Leroy E. M., Epelboin A., Mondonge V., Pourrut X., Gonzalez J. P., et al. (2009) Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 723-728
- Li B., Yang Y., Ma L., Ju F., Guo F., et al. (2015) Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J*
- Li D., Gao G., Li Z., Sun W., Li X., et al. (2014) Profiling the T-cell receptor repertoire of patient with pleural tuberculosis by high-throughput sequencing. *Immunol Lett* 162: 170-180
- Li D. J., Verma D., Mosbrugger T. and Swaminathan S. (2014) CTCF and Rad21 act as host cell restriction factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) lytic replication by modulating viral gene transcription. *PLoS Pathog* 10: e1003880
- Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., et al. (2014) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32: 834-841
- Liang G., Gao X. and Gould E. A. (2015) Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect* 4: e18
- Lin P. L., Ford C. B., Coleman M. T., Myers A. J., Gawande R., et al. (2014) Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat Med* 20: 75-79
- Linde J., Duggan S., Weber M., Horn F., Sieber P., et al. (2015) Defining the transcriptomic landscape of *Candida glabrata* by RNA-Seq. *Nucleic Acids Res* 43: 1392-1406
- Ling L. L., Schneider T., Peoples A. J., Spoering A. L., Engels I., et al. (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517: 455-459
- Lipkin W. I. (2013) The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat Rev Microbiol* 11: 133-141
- Liu J., Yan R., Zhong Q., Ngo S., Bangayan N. J., et al. (2015) The diversity and host interactions of *Propionibacterium acnes* bacteriophages on human skin. *ISME J* 9: 2078-2093
- Lopez-Collazo E., Jurado T., de Dios Caballero J., Perez-Vazquez M., Vindel A., et al. (2015) *In vivo* attenuation and genetic evolution of a ST247-SCCmecI MRSA clone after 13 years of pathogenic bronchopulmonary colonization in a patient with cystic fibrosis: implications of the innate immune response. *Mucosal Immunol* 8: 362-371
- Lukens J. R., Gurung P., Vogel P., Johnson G. R., Carter R. A., et al. (2014) Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease. *Nature* 516: 246-249
- Lynch M. D. and Neufeld J. D. (2015) Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol* 13: 217-229
- Ma X., Baron J. L., Vikram A., Stout J. E. and Bibby K. (2015) Fungal diversity and presence of potentially pathogenic fungi in a hospital hot water system treated with on-site monochloramine. *Water Res* 71: 197-206
- Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126
- MacIntyre D. A., Chandiramani M., Lee Y. S., Kindinger L., Smith A., et al. (2015) The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci Rep* 5: 8988
- Markle J. G., Mortin-Toth S., Wong A. S., Geng L., Hayday A., et al. (2013) gammadelta T cells are essential effectors of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model. *J Immunol* 190: 5392-5401
- Markus A., Lebenthal-Loinger I., Yang I. H., Kinchington P. R. and Goldstein R. S. (2015) *An in vitro* model of latency and reactivation of varicella zoster virus in human stem cell-derived neurons. *PLoS Pathog* 11: e1004885
- Marsh A. K., Ambagala A. P., Perciani C. T., Russell J. N., Chan J. K., et al. (2015) Examining the species-specificity of rhesus macaque cytomegalovirus (RhCMV) in cynomolgus macaques. *PLoS One* 10: e0121339
- Martinez I., Stegen J. C., Maldonado-Gomez M. X., Eren A. M., Siba P. M., et al. (2015) The gut microbiota of rural papua new guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Rep* 11: 527-538
- Mascola J. R. (2015) HIV. The modern era of HIV-1 vaccine development. *Science* 349: 139-140
- Mather A. E. (2015) There's no place like home. *Nat Rev Microbiol* 13: 331
- Maudet C., Mano M., Sunkavalli U., Sharan M., Giacca M., et al. (2014) Functional high-throughput screening identifies the miR-15 microRNA family as cellular restriction factors for *Salmonella* infection. *Nat Commun* 5: 4718
- McAdam P. R., Richardson E. J. and Fitzgerald J. R. (2014) High-throughput sequencing for the study of bacterial pathogen biology. *Curr Opin Microbiol* 19: 106-113
- McBride C. S., Baier F., Omondi A. B., Spitzer S. A., Lutomiah J., et al. (2014) Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature* 515: 222-227
- McDonald D., Price M. N., Goodrich J., Nawrocki E. P., DeSantis T. Z., et al. (2012) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 6: 610-618
- McElroy K., Thomas T. and Luciani F. (2014) Deep sequencing of evolving pathogen populations: applications, errors, and bioinformatic solutions. *Microb Inform Exp* 4: 1
- McLean J. S. (2014) Advancements toward a systems level understanding of the human oral microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 98
- Mee E. T., Minor P. D. and Martin J. (2015) High resolution identity testing of inactivated poliovirus vaccines. *Vaccine* 33: 3533-3541
- Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Frebourg N., Lecher S., et al. (2015) Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet* 47: 242-249
- Milne-Price S., Miazgowiec K. L. and Munster V. J. (2014) The emergence of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Pathog Dis* 71: 121-136
- Misic A. M., Davis M. F., Tyldsley A. S., Hodgkinson B. P., Tolomeo P., et al. (2015) The shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from *Staphylococcus* carriage sites. *Microbiome* 3: 2
- Miyakoshi M., Chao Y. and Vogel J. (2015) Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs. *Curr Opin Microbiol* 24: 132-139
- Moeller A. H., Li Y., Mpoudi Ngole E., Ahuka-Mundeke S., Lonsdorf E. V., et al. (2014) Rapid changes in the gut microbiome during human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16431-16435
- Mohammadi P., di Iulio J., Munoz M., Martinez R., Bartha I., et al. (2014) Dynamics of HIV latency and reactivation in a primary CD4+ T cell model. *PLoS Pathog* 10: e1004156
- Moon B. Y., Park J. Y., Hwang S. Y., Robinson D. A., Thomas J. C., et al. (2015) Phage-mediated horizontal transfer of a *Staphylococcus aureus* virulence-associated genomic island. *Sci Rep* 5: 9784
- Moon J. H., Lee J. H. and Lee J. Y. (2015) Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in Korean chronic periodontitis patients. *Mol Oral Microbiol* 30: 227-241
- Morgan A. P., Crowley J. J., Nonneman R. J., Quackenbush C. R., Miller C. N., et al. (2014) The antipsychotic olanzapine interacts with the gut microbiome to cause weight gain in mouse. *PLoS One* 9: e115225
- Morgan X. C., Segata N. and Huttenhower C. (2013) Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet* 29: 51-58

- Morgan X. C., Kabackchiev B., Waldron L., Tyler A. D., Tickle T. L., et al. (2015) Associations between host gene expression, the mucosal microbiome, and clinical outcome in the pelvic pouch of patients with inflammatory bowel disease. *Genome Biol* 16: 67
- Moustafa D. A., Scarff J. M., Garcia P. P., Cassidy S. K., DiGiandomenico A., et al. (2015) Recombinant Salmonella Expressing Burkholderia mallei LPS O Antigen Provides Protection in a Murine Model of Melioidosis and Glanders. *PLoS One* 10: e0132032
- Mullany P. (2014) Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. *Virulence* 5: 443-447
- Muniesa M., Hammerl J. A., Hertwig S., Appel B. and Brussow H. (2012) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl Environ Microbiol* 78: 4065-4073
- Mutlu E. A., Keshavarzian A., Losurdo J., Swanson G., Siewe B., et al. (2014) A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PLoS Pathog* 10: e1003829
- Nakayama J., Watanabe K., Jiang J., Matsuda K., Chao S. H., et al. (2015) Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep* 5: 8397
- Narasimhan S. and Fikrig E. (2015) Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol* 31: 315-323
- National Institutes of H. (2012) NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body. 2015:
- Nayfach S., Fischbach M. A. and Pollard K. S. (2015) MetaQuery: a web server for rapid annotation and quantitative analysis of specific genes in the human gut microbiome. *Bioinformatics*
- Neis E. P., Dejong C. H. and Rensen S. S. (2015) The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients* 7: 2930-2946
- Nesme J., Cecillon S., Delmont T. O., Monier J. M., Vogel T. M., et al. (2014) Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr Biol* 24: 1096-1100
- Nesme J. and Simonet P. (2015) The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ Microbiol* 17: 913-930
- Neuenschwander S. M., Pernthaler J., Posch T. and Salcher M. M. (2015) Seasonal growth potential of rare lake water bacteria suggest their disproportional contribution to carbon fluxes. *Environ Microbiol* 17: 781-795
- Ngeow Y. F., Wong Y. L., Tan J. L., Hong K. W., Ng H. F., et al. (2015) Identification of new genomospecies in the Mycobacterium terrae complex. *PLoS One* 10: e0120789
- Nichols D., Cahoon N., Trakhtenberg E. M., Pham L., Mehta A., et al. (2010) Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species. *Appl Environ Microbiol* 76: 2445-2450
- Nielsen D. S., Krych L., Buschard K., Hansen C. H. and Hansen A. K. (2014) Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. *FEBS Lett* 588: 4234-4243
- Nigro S. J., Holt K. E., Pickard D. and Hall R. M. (2015) Carbapenem and amikacin resistance on a large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid. *J Antimicrob Chemother* 70: 1259-1261
- Nihongaki Y., Kawano F., Nakajima T. and Sato M. (2015) Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol* 33: 755-760
- Ning L., Liu G., Li G., Hou Y., Tong Y., et al. (2014) Current challenges in the bioinformatics of single cell genomics. *Front Oncol* 4: 7
- Nordahl Petersen T., Rasmussen S., Hasman H., Caroe C., Baelum J., et al. (2015) Meta-genomic analysis of toilet waste from long distance flights; a step towards global surveillance of infectious diseases and antimicrobial resistance. *Sci Rep* 5: 11444
- O'Meara T. R., Veri A. O., Ketela T., Jiang B., Roemer T., et al. (2015) Global analysis of fungal morphology exposes mechanisms of host cell escape. *Nat Commun* 6: 6741
- O'Shea T. J., Cryan P. M., Cunningham A. A., Fooks A. R., Hayman D. T., et al. (2014) Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg Infect Dis* 20: 741-745
- Obregon-Tito A. J., Tito R. Y., Metcalf J., Sankaranarayanan K., Clemente J. C., et al. (2015) Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat Commun* 6: 6505
- Ochman H. and Moran N. A. (2001) Genes Lost and Genes Found: Evolution of Bacterial Pathogenesis and Symbiosis. *Science* 292: 1096-1099
- Oh J., Byrd A. L., Deming C., Conlan S., Program N. C. S., et al. (2014) Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 514: 59-64
- Ohman L., Tornblom H. and Simren M. (2015) Crosstalk at the mucosal border: importance of the gut microenvironment in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12: 36-49
- Olson N. D., Lund S. P., Zook J. M., Rojas-Cornejo F., Beck B., et al. (2015) International interlaboratory study comparing single organism 16S rRNA gene sequencing data: Beyond consensus sequence comparisons. *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 17-24
- Org E., Mehrabian M. and Lusis A. J. (2015) Unraveling the environmental and genetic interactions in atherosclerosis: Central role of the gut microbiota. *Atherosclerosis* 241: 387-399
- Pallen M. J. and Wren B. W. (2007) Bacterial pathogenomics. *Nature* 449: 835-842
- Panigrahi K., Applegate G. A., Malik G. and Berkowitz D. B. (2015) Combining a Clostridial enzyme exhibiting unusual active site plasticity with a remarkably facile sigmatropic rearrangement: rapid, stereocontrolled entry into densely functionalized fluorinated phosphonates for chemical biology. *J Am Chem Soc* 137: 3600-3609
- Papenfert K., Forstner K. U., Cong J. P., Sharma C. M. and Bassler B. L. (2015) Differential RNA-seq of *Vibrio cholerae* identifies the VqmR small RNA as a regulator of biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E766-775
- Parameswaran P., Sklan E., Wilkins C., Burgon T., Samuel M. A., et al. (2010) Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog* 6: e1000764
- Parekh P. J., Balart L. A. and Johnson D. A. (2015) The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease. *Clin Transl Gastroenterol* 6: e91
- Park D. J., Dudas G., Wohl S., Goba A., Whitmer S. L., et al. (2015) Ebola Virus Epidemiology, Transmission, and Evolution during Seven Months in Sierra Leone. *Cell* 161: 1516-1526
- Park S. H., Aydin M., Khatiwara A., Dolan M. C., Gilmore D. F., et al. (2014) Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of Salmonella in poultry and poultry products. *Food Microbiol* 38: 250-262
- Payne M. S. and Bayatibojakhi S. (2014) Exploring preterm birth as a polymicrobial disease: an overview of the uterine microbiome. *Front Immunol* 5: 595
- Peacock S. (2014) Health care: Bring microbial sequencing to hospitals. *Nature* 509: 557-559
- Pecora N. D., Li N., Allard M., Li C., Albano E., et al. (2015) Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System. *MBio* 6: e01030
- Penders J., Stobberingh E. E., Savelkoul P. H. and Wolffs P. F. (2013) The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front Microbiol* 4: 87
- Peng X., Alfoldi J., Gori K., Eisefeld A. J., Tyler S. R., et al. (2014) The draft genome sequence of the ferret (*Mustela putorius furo*) facilitates study of human respiratory disease. *Nat Biotechnol* 32: 1250-1255
- Periwal V., Patowary A., Vellarikkal S. K., Gupta A., Singh M., et al. (2015) Comparative whole-genome analysis of clinical isolates reveals characteristic architecture of Mycobacterium tuberculosis pangenome. *PLoS One* 10: e0122979
- Petty N. K., Ben Zakour N. L., Stanton-Cook M., Skippington E., Totsika M., et al. (2014) Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 5694-5699

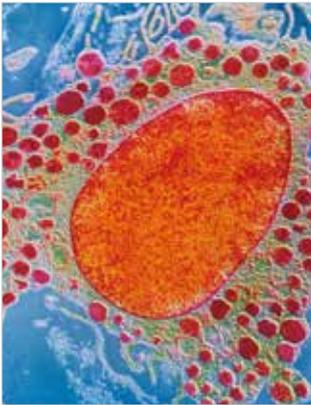
- Pi B., Yu D., Dai F., Song X., Zhu C., et al. (2015) A genomics based discovery of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Aspergillus ustus*. *PLoS One* 10: e0116089
- Pinho M. G., de Lencastre H. and Tomasz A. (2001) An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10886-10891
- Plotowski J. S., Okada H., Lu F., Li S. C., Hinchman L., et al. (2015) Plant-derived antifungal agent poacic acid targets beta-1,3-glucan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E1490-1497
- Polstein L. R. and Gersbach C. A. (2015) A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat Chem Biol* 11: 198-200
- Polstein L. R., Perez-Pinera P., Kocak D. D., Vockley C. M., Bledsoe P., et al. (2015) Genome-wide specificity of DNA binding, gene regulation, and chromatin remodeling by TALE- and CRISPR/Cas9-based transcriptional activators. *Genome Res* 25: 1158-1169
- Ponnusamy L., Gonzalez A., Van Treuren W., Weiss S., Parobek C. M., et al. (2014) Diversity of Rickettsiales in the microbiome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol* 80: 354-359
- Poretsky R., Rodriguez R. L., Luo C., Tsementzi D. and Konstantinidis K. T. (2014) Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One* 9: e93827
- Preidis G. A. and Hotez P. J. (2015) The newest "omics"--metagenomics and metabolomics--enter the battle against the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003382
- Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., et al. (2012) A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490: 55-60
- Qin X. C., Shi M., Tian J. H., Lin X. D., Gao D. Y., et al. (2014) A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6744-6749
- Quinones-Mateu M. E., Avila S., Reyes-Teran G. and Martinez M. A. (2014) Deep sequencing: becoming a critical tool in clinical virology. *J Clin Virol* 61: 9-19
- Rajendhran J. and Gunasekaran P. (2011) Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res* 166: 99-110
- Ramaprasad A., Mourier T., Naeem R., Malas T. B., Moussa E., et al. (2015) Comprehensive evaluation of *Toxoplasma gondii* VEG and *Neospora caninum* LIV genomes with tachyzoite stage transcriptome and proteome defines novel transcript features. *PLoS One* 10: e0124473
- Rath C. M. and Dorrestein P. C. (2012) The bacterial chemical repertoire mediates metabolic exchange within gut microbiomes. *Curr Opin Microbiol* 15: 147-154
- Reed P., Atilano M. L., Alves R., Hoiczky E., Sher X., et al. (2015) *Staphylococcus aureus* Survives with a Minimal Peptidoglycan Synthesis Machine but Sacrifices Virulence and Antibiotic Resistance. *PLoS Pathog* 11: e1004891
- Reuter J. A., Spacek D. V. and Snyder M. P. (2015) High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* 58: 586-597
- Reyes A., Semenkovich N. P., Whiteson K., Rohwer F. and Gordon J. I. (2012) Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat Rev Microbiol* 10: 607-617
- Richards S. (2015) It's more than stamp collecting: how genome sequencing can unify biological research. *Trends Genet* 31: 411-421
- Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., et al. (2015) The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect* 6: 22-29
- Rock J. M., Lang U. F., Chase M. R., Ford C. B., Gerrick E. R., et al. (2015) DNA replication fidelity in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by an ancestral prokaryotic proofreader. *Nat Genet* 47: 677-681
- Rooks M. G., Veiga P., Wardwell-Scott L. H., Tickle T., Segata N., et al. (2014) Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. *ISME J* 8: 1403-1417
- Roos P., Orlando P. A., Fagerstrom R. M. and Pepper J. W. (2015) In North America, some ovarian cancers express the oncogenes of preventable human papillomavirus HPV-18. *Sci Rep* 5: 8645
- Rosinski-Chupin I., Sauvage E., Sismeiro O., Villain A., Da Cunha V., et al. (2015) Single nucleotide resolution RNA-seq uncovers new regulatory mechanisms in the opportunistic pathogen *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics* 16: 419
- Rossee L., Ozhelvaci O., Freimanis G. and Van Borm S. (2015) Evaluation of convenient pretreatment protocols for RNA virus metagenomics in serum and tissue samples. *J Virol Methods* 222: 72-80
- Rosser E. C., Oleinika K., Tonon S., Doyle R., Bosma A., et al. (2014) Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. *Nat Med* 20: 1334-1339
- Sack D. A., Sack R. B., Nair G. B. and Siddique A. K. (2004) Cholera. *Lancet* 363: 223-233
- Salava A. and Lauerman A. (2014) Role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Clin Transl Allergy* 4: 33
- Salazar-Gonzalez J. A., Angulo C. and Rosales-Mendoza S. (2015) Chikungunya virus vaccines: Current strategies and prospects for developing plant-made vaccines. *Vaccine* 33: 3650-3658
- Salazar N., Arboleya S., Valdes L., Stanton C., Ross P., et al. (2014) The human intestinal microbiome at extreme ages of life. Dietary intervention as a way to counteract alterations. *Front Genet* 5: 406
- Salipante S. J., Roach D. J., Kitzman J. O., Snyder M. W., Stackhouse B., et al. (2015) Large-scale genomic sequencing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Genome Res* 25: 119-128
- Sanchez-Sampedro L., Perdiguerro B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., et al. (2015) The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses* 7: 1726-1803
- Sangster W., Hegarty J. P. and Stewart D. B., Sr. (2015) Phage tail-like particles kill *Clostridium difficile* and represent an alternative to conventional antibiotics. *Surgery* 157: 96-103
- Sato Y., Yamagishi J., Yamashita R., Shinozaki N., Ye B., et al. (2015) Inter-Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra-Day Fluctuations in Individuals. *PLoS One* 10: e0131607
- Saxena M., Van T. T., Baird F. J., Coloe P. J. and Smooker P. M. (2013) Pre-existing immunity against vaccine vectors--friend or foe? *Microbiology* 159: 1-11
- Scanlan P. D. and Marchesi J. R. (2008) Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *ISME J* 2: 1183-1193
- Schaubeck M., Clavel T., Calasan J., Lagkouvardos I., Haange S. B., et al. (2015) Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut*
- Schmidt T. S., Matias Rodrigues J. F. and von Mering C. (2014) Ecological consistency of SSU rRNA-based operational taxonomic units at a global scale. *PLoS Comput Biol* 10: e1003594
- Schnorr S. L., Candela M., Rampelli S., Centanni M., Consolandi C., et al. (2014) Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 5: 3654
- Schreiber F., Kay S., Frankel G., Clare S., Goulding D., et al. (2015) The Hd, HJ, and HZ66 flagella variants of *Salmonella enterica* serovar Typhi modify host responses and cellular interactions. *Sci Rep* 5: 7947
- Schwab C., Berry D., Rauch I., Rennisch I., Ramesmayer J., et al. (2014) Longitudinal study of murine microbiota activity and interactions with the host during acute inflammation and recovery. *ISME J* 8: 1101-1114
- Shade A., Jones S. E., Caporaso J. G., Handelsman J., Knight R., et al. (2014) Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *MBio* 5: e01371-01314

- Shah D. H. (2014) RNA sequencing reveals differences between the global transcriptomes of *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains with high and low pathogenicities. *Appl Environ Microbiol* 80: 896-906
- Shallcross L. J., Howard S. J., Fowler T. and Davies S. C. (2015) Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370: 20140082
- Sharland M., Saroey P. and Berezin E. N. (2015) The global threat of antimicrobial resistance - The need for standardized surveillance tools to define burden and develop interventions. *J Pediatr (Rio J)* 91: 410-412
- Shi B., Chang M., Martin J., Mitreva M., Lux R., et al. (2015) Dynamic changes in the subgingival microbiome and their potential for diagnosis and prognosis of periodontitis. *MBio* 6: e01926-01914
- Shono Y., Docampo M. D., Peled J. U., Perobelli S. M. and Jenq R. R. (2015) Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 101: 428-437
- Shrinet J., Jain S., Jain J., Bhatnagar R. K. and Sunil S. (2014) Next generation sequencing reveals regulation of distinct *Aedes* microRNAs during chikungunya virus development. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2616
- Sikora D., Rocheleau L., Brown E. G. and Pelchat M. (2014) Deep sequencing reveals the eight facets of the influenza A/HongKong/1/1968 (H3N2) virus cap-snatching process. *Sci Rep* 4: 6181
- Silva P. E., Costa P. S., Avila M. P., Suhadolnik M. L., Reis M. P., et al. (2015) Leprous lesion presents enrichment of opportunistic pathogenic bacteria. *Springerplus* 4: 187
- Simon-Loriere E., Faye O., Faye O., Koivogui L., Magassouba N., et al. (2015) Distinct lineages of Ebola virus in Guinea during the 2014 West African epidemic. *Nature* 524: 102-104
- Singh P., Benjak A., Schuenemann V. J., Herbig A., Avanzi C., et al. (2015) Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 4459-4464
- Singh R., Nieuwdorp M., ten Berge I. J., Bemelman F. J. and Geerlings S. E. (2014) The potential beneficial role of faecal microbiota transplantation in diseases other than *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 20: 1119-1125
- Skarin H. and Segerman B. (2014) Plasmidome interchange between *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* converts strains of independent lineages into distinctly different pathogens. *PLoS One* 9: e107777
- Skenner C. T., Imelfort M. and Tyson G. W. (2013) Crass: identification and reconstruction of CRISPR from unassembled metagenomic data. *Nucleic Acids Res* 41: e105
- Solli L., Havelsrud O. E., Horn S. J. and Rike A. G. (2014) A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnol Biofuels* 7: 146
- Song X., Sun J., Mikalsen T., Roberts A. P. and Sundsfjord A. (2013) Characterisation of the plasmidome within *Enterococcus faecalis* isolated from marginal periodontitis patients in Norway. *PLoS One* 8: e62248
- Spang A., Saw J. H., Jorgensen S. L., Zaremba-Niedzwiedzka K., Martijn J., et al. (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521: 173-179
- Springer D. J., Billmyre R. B., Filler E. E., Voelz K., Pursall R., et al. (2014) *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. *PLoS Pathog* 10: e1004285
- Sridhar S., To K. K., Chan J. F., Lau S. K., Woo P. C., et al. (2015) A systematic approach to novel virus discovery in emerging infectious disease outbreaks. *J Mol Diagn* 17: 230-241
- Stefka A. T., Feehley T., Tripathi P., Qiu J., McCoy K., et al. (2014) Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 13145-13150
- Stegle O., Teichmann S. A. and Marioni J. C. (2015) Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat Rev Genet* 16: 133-145
- Stenglein M. D., Jacobson E. R., Chang L. W., Sanders C., Hawkins M. G., et al. (2015) Widespread recombination, reassortment, and transmission of unbalanced compound viral genotypes in natural arenavirus infections. *PLoS Pathog* 11: e1004900
- Stremlau M. H., Andersen K. G., Folarin O. A., Grove J. N., Odia I., et al. (2015) Discovery of novel rhabdoviruses in the blood of healthy individuals from West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003631
- Suez J., Korem T., Zeevi D., Zilberman-Schapira G., Thaiss C. A., et al. (2014) Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 514: 181-186
- Sutton P. (2015) At last, vaccine-induced protection against *Helicobacter pylori*. *Lancet*
- Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T. and Nishijima M. (2014) Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One* 9: e105592
- Tettelin H., Davidson R. M., Agrawal S., Aitken M. L., Shallom S., et al. (2014) High-level relatedness among *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* strains from widely separated outbreaks. *Emerg Infect Dis* 20: 364-371
- Tong S. Y., Holden M. T., Nickerson E. K., Cooper B. S., Koser C. U., et al. (2015) Genome sequencing defines phylogeny and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a high transmission setting. *Genome Res* 25: 111-118
- Tremaroli V. and Backhed F. (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489: 242-249
- Trocraz M., Gaia N., Beccucci S., Schrenzel J., Cayeux I., et al. (2015) Mapping axillary microbiota responsible for body odours using a culture-independent approach. *Microbiome* 3: 3
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., Magrini V., Mardis E. R., et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031
- Turner K. H., Wessel A. K., Palmer G. C., Murray J. L. and Whiteley M. (2015) Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 4110-4115
- Uchiya K., Takahashi H., Nakagawa T., Yagi T., Moriyama M., et al. (2015) Characterization of a novel plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *PLoS One* 10: e0117797
- Udikovic-Kolic N., Wichmann F., Broderick N. A. and Handelsman J. (2014) Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 15202-15207
- Van Boeckel T. P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., et al. (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5649-5654
- van Boven M., Mooi F. R., Schellekens J. F., de Melker H. E. and Kretzschmar M. (2005) Pathogen adaptation under imperfect vaccination: implications for pertussis. *Proc Biol Sci* 272: 1617-1624
- van de Wijgert J. H., Borgdorff H., Verhelst R., Crucitti T., Francis S., et al. (2014) The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One* 9: e105998
- van Dijk E. L., Auger H., Jaszczyszyn Y. and Thermes C. (2014) Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 30: 418-426
- van Mierlo J. T., Overheul G. J., Obadia B., van Cleef K. W., Webster C. L., et al. (2014) Novel *Drosophila* viruses encode host-specific suppressors of RNAi. *PLoS Pathog* 10: e1004256
- van Opijnen T. and Camilli A. (2013) Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 11: 435-442
- van Schaik W. (2015) The human gut resistome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370: 20140087

- Veiga P., Pons N., Agrawal A., Oozeer R., Guyonnet D., et al. (2014) Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. *Sci Rep* 4: 6328
- Venkatasubramanian S., Dhiman R., Paidipally P., Cheekatla S. S., Tripathi D., et al. (2015) A rho GDP dissociation inhibitor produced by apoptotic T-cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 11: e1004617
- Vetrovsky T. and Baldrian P. (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* 8: e57923
- Vinje H., Almoy T., Liland K. H. and Snipen L. (2014) A systematic search for discriminating sites in the 16S ribosomal RNA gene. *Microb Inform Exp* 4: 2
- Virgin H. W. (2014) The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* 157: 142-150
- von Mentzer A., Connor T. R., Wieler L. H., Semmler T., Iguchi A., et al. (2014) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet* 46: 1321-1326
- Wada T., Iwamoto T., Tamaru A., Seto J., Ahiko T., et al. (2015) Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *PLoS One* 10: e0118495
- Wade W. (2002) Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections. *Journal of the Royal Society of Medicine* 95: 81-83
- Waldron D. (2015) Microbial ecology: Sorting out viral dark matter. *Nat Rev Microbiol* 13: 526-527
- Walker A. W., Duncan S. H., Louis P. and Flint H. J. (2014) Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends Microbiol* 22: 267-274
- Walker P. J., Firth C., Widen S. G., Blasdell K. R., Guzman H., et al. (2015) Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae. *PLoS Pathog* 11: e1004664
- Waller A. S., Yamada T., Kristensen D. M., Kultima J. R., Sunagawa S., et al. (2014) Classification and quantification of bacteriophage taxa in human gut metagenomes. *ISME J* 8: 1391-1402
- Walters W. A., Xu Z. and Knight R. (2014) Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett* 588: 4223-4233
- Walther-Antonio M. R., Jeraldo P., Berg Miller M. E., Yeoman C. J., Nelson K. E., et al. (2014) Pregnancy's stronghold on the vaginal microbiome. *PLoS One* 9: e98514
- Wang J., Linnenbrink M., Kunzel S., Fernandes R., Nadeau M. J., et al. (2014) Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2703-2710
- Wang J., Moore N. E., Murray Z. L., McInnes K., White D. J., et al. (2015) Discovery of novel virus sequences in an isolated and threatened bat species, the New Zealand lesser short-tailed bat (*Mystacina tuberculata*). *J Gen Virol* 96: 2442-2452
- Wang W., Jovel J., Halloran B., Wine E., Patterson J., et al. (2015) Metagenomic analysis of microbiome in colon tissue from subjects with inflammatory bowel diseases reveals interplay of viruses and bacteria. *Inflamm Bowel Dis* 21: 1419-1427
- Wang Y. and Navin N. E. (2015) Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell* 58: 598-609
- Wassilak S. G., Oberste M. S., Tangermann R. H., Diop O. M., Jafari H. S., et al. (2014) Progress toward global interruption of wild poliovirus transmission, 2010-2013, and tackling the challenges to complete eradication. *J Infect Dis* 210 Suppl 1: S5-15
- Waters V. (2014) Editorial commentary: how can understanding the phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* lead to more successful eradication strategies in cystic fibrosis? *Clin Infect Dis* 59: 632-634
- Weingarden A., Gonzalez A., Vazquez-Baeza Y., Weiss S., Humphry G., et al. (2015) Dynamic changes in short- and long-term bacterial composition following fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Microbiome* 3: 10
- Weng K. F., Hung C. T., Hsieh P. T., Li M. L., Chen G. W., et al. (2014) A cytoplasmic RNA virus generates functional viral small RNAs and regulates viral IRES activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 42: 12789-12805
- Whiteson K. L., Meinardi S., Lim Y. W., Schmieder R., Maughan H., et al. (2014) Breath gas metabolites and bacterial metagenomes from cystic fibrosis airways indicate active pH neutral 2,3-butanedione fermentation. *ISME J* 8: 1247-1258
- Wikoff W. R., Anfora A. T., Liu J., Schultz P. G., Lesley S. A., et al. (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3698-3703
- Wilson D. J. (2012) Insights from genomics into bacterial pathogen populations. *PLoS Pathog* 8: e1002874
- Woo P. C., Lau S. K., Teng J. L., Tsang A. K., Joseph M., et al. (2014) Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses. *Virology* 471-473: 117-125
- Woolhouse M., Ward M., van Bunnik B. and Farrar J. (2015) Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370: 20140083
- World Health Organization (2015) Smallpox.
- Wu A. R., Neff N. F., Kalisky T., Dalerba P., Treutlein B., et al. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods* 11: 41-46
- Wu G. D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y. Y., et al. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334: 105-108
- Wu Z., Yang L., Ren X., He G., Zhang J., et al. (2015) Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases. *ISME J*
- Wylie K. M., Wylie T. N., Orvedahl A., Buller R. S., Herter B. N., et al. (2015) Genome sequence of enterovirus D68 from St. Louis, Missouri, USA. *Emerg Infect Dis* 21: 184-186
- Xu G. J., Kula T., Xu Q., Li M. Z., Vernon S. D., et al. (2015) Viral immunology. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. *Science* 348: aaa0698
- Xu H., Zhu X., Hu Y., Li Z., Zhang X., et al. (2014) DNA methylome in spleen of avian pathogenic *Escherichia coli*-challenged broilers and integration with mRNA expression. *Sci Rep* 4: 4299
- Xu P. and Gunsolley J. (2014) Application of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence* 5: 424-432
- Xu X., Hegazy W. A., Guo L., Gao X., Courtney A. N., et al. (2014) Effective cancer vaccine platform based on attenuated salmonella and a type III secretion system. *Cancer Res* 74: 6260-6270
- Yamaichi Y., Chao M. C., Sasabe J., Clark L., Davis B. M., et al. (2015) High-resolution genetic analysis of the requirements for horizontal transmission of the ESBL plasmid from *Escherichia coli* O104:H4. *Nucleic Acids Res* 43: 348-360
- Yang L., Wu Z., Ren X., Yang F., Zhang J., et al. (2014) MERS-related betacoronavirus in *Vespertilio superans* bats, China. *Emerg Infect Dis* 20: 1260-1262
- Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glockner F. O., Ludwig W., et al. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12: 635-645
- Yasir M., Angelakis E., Bibi F., Azhar E. I., Bachar D., et al. (2015) Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia. *Nutr Diabetes* 5: e153
- Yatsunenkov T., Rey F. E., Manary M. J., Trehan I., Dominguez-Bello M. G., et al. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222-227
- Yin J., M P., Wang S., Liao S. X., Peng X., et al. (2015) Different Dynamic Patterns of beta-Lactams, Quinolones, Glycopeptides and Macrolides on Mouse Gut Microbial Diversity. *PLoS One* 10: e0126712

- Yosef I., Manor M., Kiro R. and Qimron U. (2015) Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 7267-7272
- Yost S., Duran-Pinedo A. E., Teles R., Krishnan K. and Frias-Lopez J. (2015) Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med* 7: 27
- Young B. E., Sadarangani S. P. and Leo Y. S. (2015) The avian influenza vaccine Emerflu. Why did it fail? *Expert Rev Vaccines* 14: 1125-1134
- Yutin N., Kapitonov V. V. and Koonin E. V. (2015) A new family of hybrid virophages from an animal gut metagenome. *Biol Direct* 10: 19
- Zanella Terrier M. C., Simonet M. L., Bichard P. and Frossard J. L. (2014) Recurrent *Clostridium difficile* infections: the importance of the intestinal microbiota. *World J Gastroenterol* 20: 7416-7423
- Zaraket H., Baranovich T., Kaplan B. S., Carter R., Song M. S., et al. (2015) Mammalian adaptation of influenza A(H7N9) virus is limited by a narrow genetic bottleneck. *Nat Commun* 6: 6553
- Zaura E., Nicu E. A., Krom B. P. and Keijsers B. J. (2014) Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 85
- Zhang Y., Rowehl L., Krumsiek J. M., Orner E. P., Shaikh N., et al. (2015) Identification of Candidate Adherent-Invasive *E. coli* Signature Transcripts by Genomic/Transcriptomic Analysis. *PLoS One* 10: e0130902
- Zheng H., Xu L., Wang Z., Li L., Zhang J., et al. (2015) Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Sci Rep* 5: 10948
- Zheng W., Zhang Z., Liu C., Qiao Y., Zhou D., et al. (2015) Metagenomic sequencing reveals altered metabolic pathways in the oral microbiota of sailors during a long sea voyage. *Sci Rep* 5: 9131
- Zhou J., Zhang W., Yan S., Xiao J., Zhang Y., et al. (2013) Diversity of virophages in metagenomic data sets. *J Virol* 87: 4225-4236
- Zhou J., He Z., Yang Y., Deng Y., Tringe S. G., et al. (2015) High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *MBio* 6:
- Zhou W., Gao S., Podgorska K., Stadejek T., Qiu H. J., et al. (2014) Rovac is the possible ancestor of the Russian lapinized vaccines LK-VNIViM and CS strains but not the Chinese strain (C-strain) vaccine against classical swine fever. *Vaccine* 32: 6639-6642
- Zhou X., Brown C. J., Abdo Z., Davis C. C., Hansmann M. A., et al. (2007) Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J* 1: 121-133
- Zhou Z., Li X., Liu J., Dong L., Chen Q., et al. (2015) Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res* 25: 39-49
- Zhuang L., Zhang Z., An X., Fan H., Ma M., et al. (2014) An efficient strategy of screening for pathogens in wild-caught ticks and mosquitoes by reusing small RNA deep sequencing data. *PLoS One* 9: e90831

jp.illumina.com/pubreviews に、研究論文集を掲載しています。

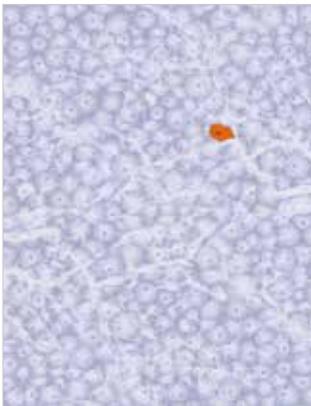


免疫学研究論文集

免疫レパートリーのシーケンスにより、血液がん、自己免疫疾患、アレルギー反応など疾患感受性の高い人にみられる受容体固有の遺伝子変異の同定が可能になっています。

イルミナの次世代シーケンスは、ヒトの免疫反応研究で高解像度のマッピングを行うために求められる品質、スループット、リード長をご提供します。フェージングシーケンスやシングルセルシーケンスなどの新たなアプローチにより、

この分野の知識基盤が大きく進展することが期待されます。



シングルセル研究論文集

シングルセル組織シーケンスの推進力はほとんどが、細胞系譜や残存病変の検出が最重要課題となるがん研究に由来しています。神経発達や免疫系など、極めて複雑な生物学的システムについての理解を深めるために、同様のアプローチが用いられています。

本書では、シングルセルのシーケンスおよび超微量インプットサンプルのアプリケーションと技術にイルミナテクノロジーを利用できることを実証する最新の文献をクローズアップしています。

本研究論文集はイルミナ株式会社が提供しています。

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階

Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810

jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPro, DASL, Design Studio, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。

その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. 1270-2015-004 01JUN2016

