

Title	ニキビ発症に関与するアクネ菌遺伝子型の探索
Sub Title	The quest for the genotype of acne-associated Propionibacterium acnes
Author	吉川, 実亜(Yoshikawa, Mia)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	生命と情報 No.22 (2015.) ,p.82- 87
JaLC DOI	
Abstract	<p>ヒトの皮膚には多数の細菌が生息しており、皮膚常在菌叢を形成している。皮膚常在菌叢は個人固有であり、これらの違いが皮膚状態に影響を与えていると考えられる。卒業論文では皮膚常在菌叢の包括的理解に向け「皮膚疾患と皮膚常在菌叢の関係解明」、「皮膚常在菌を用いた個人識別法の構築」の2つのテーマについて報告する。本卒業論文ダイジェストでは、前者のうちニキビ患者を被験者とした研究成果について簡潔にまとめる。ニキビは代表的な皮膚疾患の1つであり、Propionibacterium acnes(アクネ菌)がニキビを発症させる原因菌のひとつとして知られている。アクネ菌は皮脂分泌量の多い部位で増殖し、炎症を誘導することでニキビを発症させると考えられているが、その詳細は不明である。先行研究ではアクネ菌の16S rRNA遺伝子に対しサイクルシーケンシング法を用いることでアクネ菌の遺伝子型を決定し、アクネ菌とニキビ発症との関連が菌株レベルで異なることを明らかとした。これはすなわちアクネ菌株のゲノムレベルでの相違が、ニキビ発症に関与することを示している。しかし従来の分析手法では、一度に解析できる塩基配列の数が少なく、網羅的な解析は不可能であった。そこでわれわれは、アクネ菌遺伝子型の網羅的な解析を行なうため、超並列シーケンサーと分子生物学手法を組み合わせることで、アクネ菌遺伝子の特定部位を網羅的に解析する手法を確立した。本手法を用いて同一個人内におけるニキビ部位と他の体表部位とでアクネ菌遺伝子型を比較した結果、遺伝子型組成が極めて類似していることを見出した。したがって、アクネ菌遺伝子型のみがニキビ発症に関与するわけでない可能性が示唆された。また、細菌叢が有する遺伝子機能を予測した結果、脂質代謝等の遺伝子群の存在量が、ニキビ部位と他の部位で有意に異なっていることが明らかになった。これらの結果から、ニキビ患者はニキビを発症していない部位でも同様のアクネ菌遺伝子型を所有しているが、遺伝子機能が異なる可能性があり、他の微生物や宿主からの皮脂分泌などがあいまってニキビ発症につながると考えられた。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0082

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

皮膚常在菌叢の包括的理解に向けて
卒業論文ダイジェストタイトル
ニキビ発症に関与するアクネ菌遺伝子型の探索
The quest for the genotype of acne-associated *Propionibacterium acnes*

環境情報学部 4年 吉川 実亜
t12956my@sfc.keio.ac.jp

ヒトの皮膚には多数の細菌が生息しており、皮膚常在菌叢を形成している。皮膚常在菌叢は個人固有であり、これらの違いが皮膚状態に影響を与えていると考えられる。卒業論文では皮膚常在菌叢の包括的理解に向け「皮膚疾患と皮膚常在菌叢の関係解明」、「皮膚常在菌を用いた個人識別法の構築」の2つのテーマについて報告する。本卒業論文ダイジェストでは、前者のうちニキビ患者を被験者とした研究成果について簡潔にまとめる。ニキビは代表的な皮膚疾患の1つであり、*Propionibacterium acnes* (アクネ菌) がニキビを発症させる原因菌のひとつとして知られている。アクネ菌は皮脂分泌量の多い部位で増殖し、炎症を誘導することでニキビを発症させると考えられているが、その詳細は不明である。先行研究ではアクネ菌の16S rRNA 遺伝子に対しサイクルシークエンス法を用いることでアクネ菌の遺伝子型を決定し、アクネ菌とニキビ発症との関連が菌株レベルで異なることを明らかとした。これはすなわちアクネ菌株のゲノムレベルでの相違が、ニキビ発症に関与することを示している。しかし従来の分析手法では、一度に解析できる塩基配列の数が少なく、網羅的な解析は不可能であった。そこでわれわれは、アクネ菌遺伝子型の網羅的な解析を行なうため、超並列シークエンサーと分子生物学手法を組み合わせることで、アクネ菌遺伝子の特定部位を網羅的に解析する手法を確立した。本手法を用いて同一個人内におけるニキビ部位と他の体表部位とでアクネ菌遺伝子型を比較した結果、遺伝子型組成が極めて類似していることを見出した。したがって、アクネ菌遺伝子型のみがニキビ発症に関与するわけではない可能性が示唆された。また、細菌叢が有する遺伝子機能を予測した結果、脂質代謝等の遺伝子群の存在量が、ニキビ部位と他の部位で有意に異なっていることが明らかになった。これらの結果から、ニキビ患者はニキビを発症していない部位でも同様のアクネ菌遺伝子型を所有しているが、遺伝子機能が異なる可能性があり、他の微生物や宿主からの皮脂分泌などがあいまってニキビ発症につながると考えられた。

Keywords: ニキビ, 皮膚常在菌, 遺伝子群予測, 手法開発

1. 序論

ニキビは最も一般的な皮膚疾患の1つである。ニキビの原因については様々な議論があるが、一般的には嫌気性グラム陽性の皮膚常在菌である *Propionibacterium acnes* (アクネ菌) が、ニキビの発症に関係していると報告されている [1]。アクネ菌はヒトの皮膚において、ニキビの発症に関わらず同様の割合で存在すると報告されていたが、近年の研究によってニキビはアクネ菌の存在量非依存的であり、存在する株依存的であることが明らかとなった [2]。Fitz-Gibbon らは、ニキビのある49人とニキビのない51人の鼻におけるアクネ菌の16S rRNA 遺伝子配列を詳細に解析し、16S rRNA 遺伝子配列の違い(一塩基多型のパターン)に着目した。この一塩基多型のパターンをリボタイプ (RT) と定義し、検出された量の多い順番に RT の数字を RT1, RT2 のように割り当てていた。その結果、最も多く検出された3つの RT (RT1, 2, 3) はニキビがある人にもニキビがない人にも同等に検出され、RT4, 5, 7, 8, 9, 10 は主にニキビがある人から検出された。一方で RT6 は主にニキビがない人から検出された。これらの結果から、ニキビとの関連の有無がアクネ菌の株(遺伝子型) レベルで異なることが明らかにされている。

こうしたアクネ菌とニキビ発症のメカニズムの解明を目指す上で、従来の研究手法はアクネ菌の単離培養を経てサイクルシークエンスを実施していた。しかしながら本手法はシークエンス可能な塩基配列のリード長が長いという利点がある一方で、一度に解析できる塩基配列の数が少なく、人工的に細菌増殖に最適な環境を作ることの困難さやアクネ菌種内における多様性から、単離培養を通じた研究手法には限界があった。そこでわれわれはまず、超並列シークエンサー-MiSeq (Illumina 社) を活用し、アクネ菌遺伝子型を網羅的に判別する手法を確立した(特願: 2015-217020) (図1)。

この手法は99%の確率でアクネ菌の16S rRNA 遺伝子配列のみを増幅させることや、1塩基レベルでのアクネ菌遺伝子型判別を可能としており、アクネ菌の機能解明に向けた研究における革新的な技術である。本研究ではこの手法を用いて、顔ニキビ患者の体表多部位におけるアクネ菌遺伝子型組成の検討を行うことで、

ニキビにはアクネ菌の遺伝子型のみが寄与しているのか否かを明らかにすることを目指した。

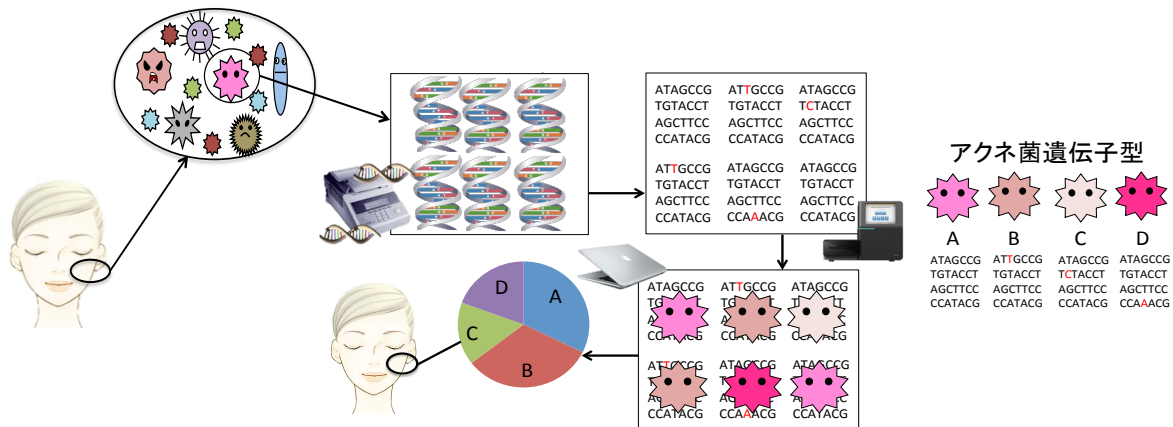


図 1：網羅的遺伝子型判別の流れ

まず皮膚に存在するアクネ菌の遺伝子のみをわれわれが設計したプライマーを用いて増幅させる。PCR 行程を 2 度に分けて実施することで、アクネ菌特異的な増幅を可能とした。その後、アクネ菌塩基配列を網羅的に決定する。われわれが作成したアクネ菌遺伝子型参照配列と比較し、それぞれの配列がどの遺伝子型なのかを一度に検討することで遺伝子型組成を調べる。(特願：2015-217020)

2. 対象と手法

2.1. サンプル採取および DNA 抽出

17名のニキビ患者の頭部、顔面(ニキビ発症部位)、臀部およびニキビ部位から採取された膿を研究対象とした。TE10 (10mM Tris, 10mM EDTA)に浸した滅菌綿棒を各部位に 30 秒間こすりつけ、500 μ L の TE10 に浸したものをサンプルとし、-80°C で冷凍保存した。これらのサンプルは、以下のように DNA 抽出を行った。まず、25 μ L の Lysozyme (300 mg/mL)を加え、37°C でオーバーナイトインキュベートした。次に、15 μ L の Achromopeptidase (20,000 units/mL)を加え、37°C で 8 時間インキュベートした後に、50 μ L の 10% SDS と 15 μ L の Proteinase K (25 mg/mL)を加え、55°C でオーバーナイトインキュベートした。その後、600 μ L の Phenol, Chloroform, Isoamyl alcohol 混合液を加え、Micro Shaker を用いて 3 分間攪拌し、17,800 \times g, 20°C の条件で 10 分間の遠心分離を行った。上清に再度 600 μ L の Phenol, Chloroform, Isoamyl alcohol 混合液を加え、Micro Shaker を用いて 1,500 rpm で 3 分間攪拌し、17,800 \times g, 20°C の条件で 10 分間の遠心分離を行った。水層を回収し、60 μ L の 3M Sodium Acetate (pH 5.2)を加えた後、1.2 mL の 100% エタノールを加えて-80°C で 1 時間冷却した。17,800 \times g, 4°C の条件で 10 分間の遠心分離をした後、上清を除去して 70%エタノールを 500 μ L 加えた。17,800 \times g, 4°C の条件で 5 分遠心分離した後、上清を除去して 50 μ L の 1 \times TE Buffer を加え、Micro Shaker を用いて 5 分間攪拌し、DNA を溶解した。

2.2. *P. acnes* 遺伝子型判別用シーケンス前処理

われわれが設計した*P. acnes*特異的なプライマー (414F : 5'-GGGTTGTAAACCGCTTTCGCCT-3', 1445R : 5'-GTTGTGGGGAGCCGTCGAA-3')を用いて、DNA抽出物の16S rRNA遺伝子を増幅した。その際のPCR条件は初期変性反応を94°Cで5分間行い、その後96°Cを10秒間、64°Cを15秒間、68°Cを1分間の3ステップを30回繰り返す、最終伸長反応を68°Cで2分間行った。次にわれわれが設計した株判別用のプライマー (950F : 5'-AGAACCTTACCTGGGTTTGA-3', 1334R : 5'-GATCTGCGACTTAGCGAC-3')を用いて、再度16S rRNA遺伝子の増幅を行った (Nested PCR)。上記のPCR産物を300倍希釈し、それらをテンプレートとした。その際のPCR条件は初期変性反応を94°Cで2分間行い、その後96°Cを10秒間、64°Cを15秒間、68°Cを30秒間の3ステップを20回繰り返す、最終伸長反応を68°Cで2分間行った。PCR産物の体積モル濃度を算出し、4 nMになるよう、各サンプルを希釈した。われわれが所有しているIndex配列をDNA断片に付加するため、ユニバーサルプライマー (27F_mod : 5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 338R : 5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') [3]の配列を前もって付加させる必要がある。株判別用プライマーにユニバーサルプライマーの配列が付加されたプライマーを用いて、PCRを行った。その際のPCR条件は初期変性反応を94°Cで2分間行い、その後96°Cを10秒間、64°Cを15秒間、68°Cを30秒間の3ステップを5回繰り返す、最終伸長反応を68°Cで2分間行った。その後、PCR産物50 μ Lに対して90 μ Lの精製後は濃度定量を実施し、濃度が1 nMになるよう希釈を行った。その後、

Index PCRを実施した。なお、全てのPCRのポリメラーゼはTks Gflex DNA Polymeraseを用い、PCR後はAgencourt AMPure XP試薬を加えて精製を行った。

2.3. 細菌叢解析用シーケンス前処理

DNA抽出物 1 μ L をテンプレートとし、バクテリア特異的なユニバーサルプライマーを用いて、16S rRNA 遺伝子を増幅した。その際の PCR 条件は初期変性反応を 94°C で 2 分間行い、その後 96°C を 10 秒間、64°C を 15 秒間、68°C を 30 秒間の 3 ステップを 20 回繰り返し、最終伸長反応を 68°C で 2 分間行った。ポリメラーゼは Tks Gflex DNA Polymerase (Takara Bio 社) を用いた。その後、PCR 産物 50 μ L に対して 90 μ L の Agencourt AMPure XP 試薬 (Beckman Coulter 社) を加えて精製を行い、Picogreen (Life Technologies 社) を用いて二本鎖 DNA の濃度定量を行った。これらの結果をもとに PCR 産物の体積モル濃度を算出した。2.6. の PCR で用いるテンプレートの濃度が 1 nM になるよう、各サンプルを希釈した。

2.4. Index PCR

次に、Index PCR を行った。プライマーは、5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-NNNNNNNN-TATGGTAATTGTAGRGTGTTGATYMTGGCTCAG -3'および 5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-NNNNNNNN-AGTCAGTCAG CCTGCTGCCTCCC GTAGGAGT-3'を用いた。なお、上記において N で記載した塩基配列が Index 配列であり、サンプルごとに異なる配列を用いた。その際の PCR 条件は初期変性反応を 98°C で 1 分間行い、その後 98°C を 10 秒間、55°C を 15 秒間、68°C を 30 秒間の 3 ステップを 8 回繰り返し、最終伸長反応を 68°C で 3 分間行った。ポリメラーゼは Tks Gflex DNA Polymerase を用いた。その後、PCR 産物 50 μ L に対して 90 μ L の AMPure XP 試薬を加えて精製を行った。Index PCR 産物の濃度定量を、qPCR, Picogreen, Bioanalyzer 2100 を用いて実施した。これらの結果をふまえ、それぞれのサンプルを 4 nM に希釈した。

2.5. MiSeq によるシーケンシング

4 nM に希釈したサンプルを混合し、MiSeq を用いてシーケンスを実施した。シーケンスは Illumina 社が示すプロトコール通りに行った。

2.6. データ解析

まず初めに、ペアエンドでシーケンスされた塩基配列をFLASH (Version 1.2.11) [4]によってアセンブルした。平均Q-valueが25以下の塩基配列は解析の対象から除いた。その後アクネ菌遺伝子型解析では、シーケンスされた塩基配列から950Fおよび1334Rのプライマー配列を除去した。得られたデータをQiime (Version 1.8.0) [5]を用いて解析した。その後サンプルごとに完全に一致する塩基配列の出現回数を数え、その上で重複する塩基配列は除去した (相同性100%を閾値としたOTUを作成した)。Ribosomal Database Project (RDP) [6]をデータベースとして相同性検索にかけ、最も類似性の高かった種が*P. acnes*であるOTUのみをその後の解析に用いた。RDPでの菌種特定がされなかったOTUはNCBIのBLASTを用いて、Nucleotide collectionをデータベースとして相同性検索を行った。最も類似性の高かった種が*P. acnes*であるOTUをリード数の多い順に並べ、MT (Mutation Type)番号を振り分けた (最も存在量が多いものがMT1)。 *P. acnes* 遺伝子型組成の類似度は、Yue-Clayton theta similarity Index [7]を用いて計算した。細菌叢解析では97%のOTUを組んだ。細菌叢解析結果からPICRUST [8]を用いて細菌の有する遺伝子群を予測した。2群比較はノンパラメトリック検定であるMann-WhitneyのU検定を行った。U検定はR (Version 3.1.2)を用いて解析を行った。

3. 結果

3.1. 多体表部位におけるアクネ菌遺伝子型組成の検討

ニキビ患者の多体表部位におけるアクネ菌遺伝子型組成を解析した (図 2A)。アクネ菌遺伝子型の組成は、同一個人異なる部位のほうが異なる個人の同一部位よりも有意に類似していることが明らかとなった (図 2B)。

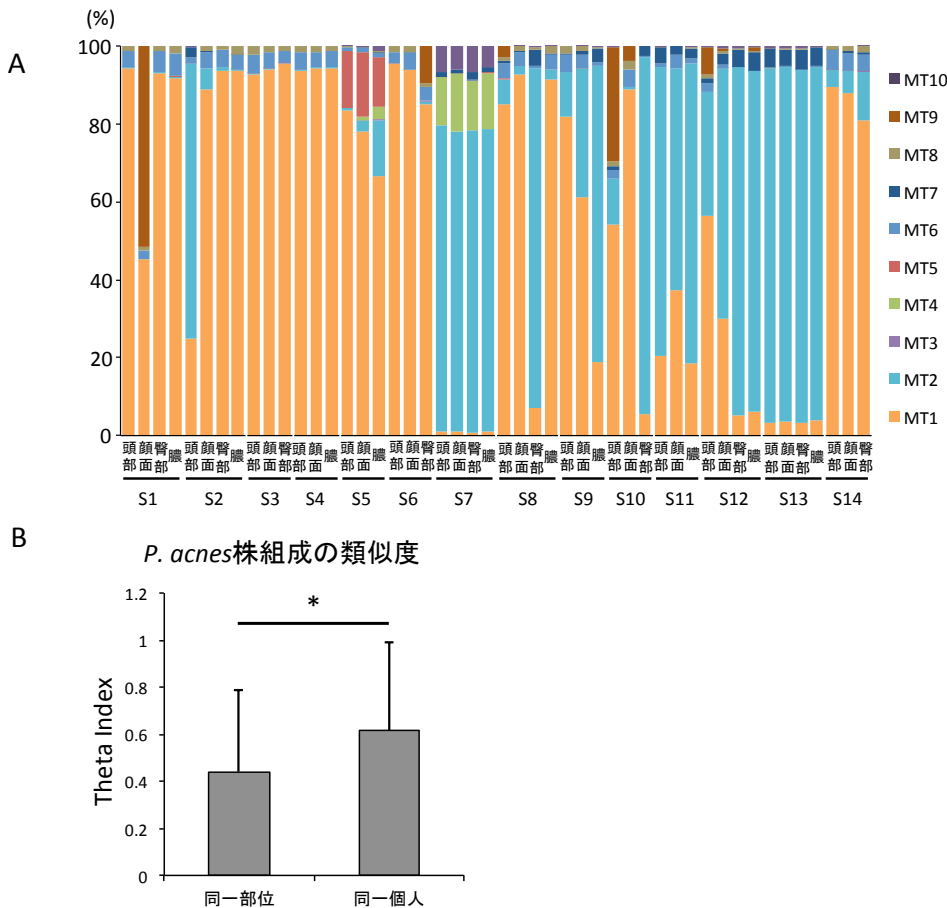


図 2 : ニキビ患者のアクネ菌遺伝子型組成

ニキビ患者の多部位（頭部，顔面，臀部，臍）から採取したサンプルのアクネ菌遺伝子型解析を実施した．A：ニキビ患者において多く検出された 10 種類 (MT 1-10)のアクネ菌遺伝子型組成を記載した．S1-14 は被験者 ID を表す．B：ニキビ患者におけるアクネ菌遺伝子型組成類似度を比較した．異なる個人の同一部位における類似度および，同一個人の異なる部位における類似度を全て計算した．図では異なる個人の同一部位における類似度を同一部位と，同一個人の異なる部位における類似度を同一個人と記載した．類似度の計算には Yue-Clayton theta similarity Index を用い，それぞれの類似度における 2 群比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた．エラーバーは標準偏差で表した．* $P < 0.05$.

3.2. 多体表部位における細菌叢組成の検討

ニキビ患者の多体表部位における細菌叢組成を解析した (図 3A)．細菌叢組成は異なる個人の同一部位のほうが，同一個人の異なる部位よりも類似していた (図 3B)．また，体表部位の細菌叢組成データを用いて細菌叢の遺伝子機能を推定した結果，脂質代謝関連遺伝子群が顔（ニキビ部位）において有意に少ないことが明らかとなった (図 3C)．

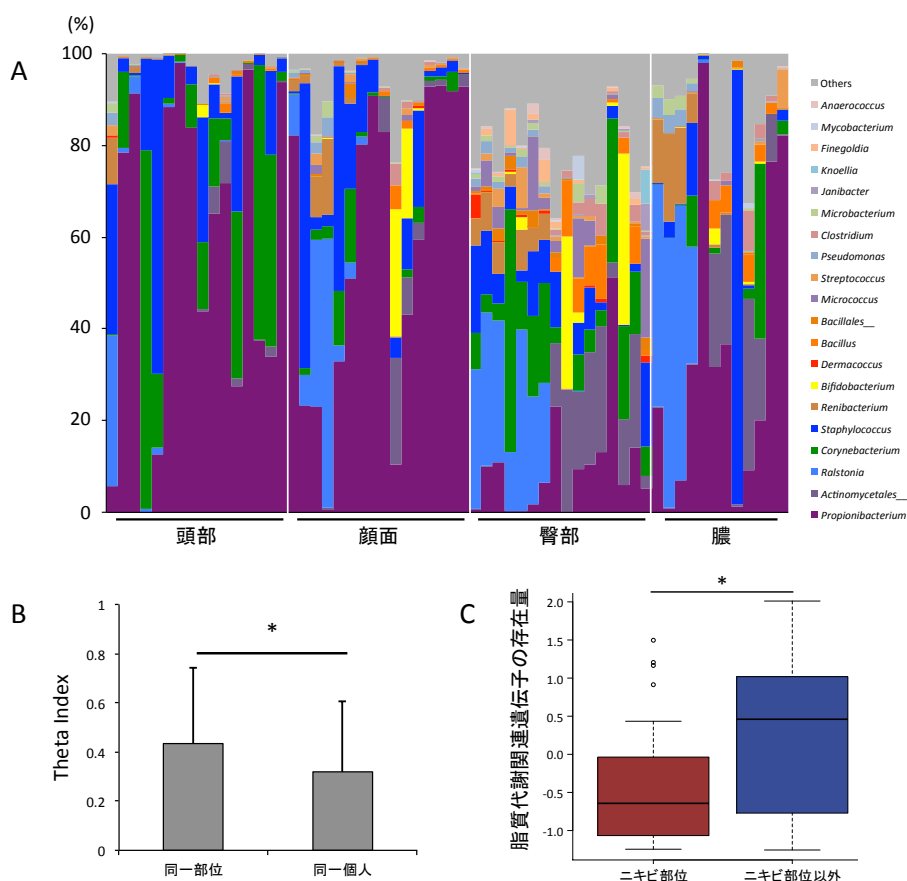


図 3 : 16S rRNA 遺伝子を用いた皮膚細菌叢解析

14 名の多部位から皮膚常在菌を採取し 16S rRNA 遺伝子を用いた網羅的解析を実施した。A : 全被験者全部位の細菌叢組成をそれぞれ示した。縦一列が被験者一名の細菌叢組成である。B : 採取したサンプルの細菌叢組成類似度を比較した。異なる個人の同一部位における類似度および、同一個人異なる部位における類似度を全て計算した。図では異なる個人の同一部位における類似度を同一部位と、同一個人異なる部位における類似度を同一個人と記載した。C : 細菌叢組成から細菌が有する遺伝子群の予測を行い、脂質代謝関連遺伝子の存在量を Z スコアで示した。ニキビ部位は顔面、ニキビ部位以外は頭部、臀部を表す。類似度の計算には Yue-Clayton theta similarity Index を用い、それぞれの類似度における 2 群比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。エラーバーは標準偏差で表した。* $P < 0.05$ 。

4. 議論

従来は 1 サンプルあたり約 100 本の塩基配列断片で議論を行うのが主流であったが、われわれが確立した解析手法を用いることで従来の 100~300 倍の塩基配列を解析することができるようになった。よって、少数存在量の遺伝子型も検出可能となり、さらに多サンプルを扱う遺伝子型検証も比較的容易に可能となった。本手法を用いてニキビ患者多部位のアクネ菌遺伝子型組成を検討した結果、同一個人異なる部位のほうが異なる個人の同一部位よりも有意に類似しており、多くの被験者において同一個人内におけるニキビ部位と他の体表部位とで遺伝子型の組成が極めて類似していることも明らかとなった

(図 1)。先行研究よりニキビ患者はニキビに関与するアクネ菌をニキビ部位に所有していることが報告されている [2]。ニキビはアクネ菌が産生するリパーゼが皮脂中のトリアシルグリセロールを分解し、その際に生じる遊離脂肪酸が毛穴を詰まらせることが原因であると示唆されているが、実際ニキビ発症に関与しないアクネ菌株ではリパーゼ活性が低いこと [9]、トリアシルグリセロールを分解するリパーゼ遺伝子のプロモーター領域の欠損や遺伝子領域中の 1 塩基欠損によるフレームシフトが起こっていることが報告されており [10]、アクネ菌のリパーゼ活性がニキビ発症に関与する可能性が高いと考えられる。こうした報告に加え、本研究では顔にニキビを発症している患者はニキビに関与するアクネ菌を顔以外の部位においても所有していることを明らかとした。これらの結果より、そもそも宿主由来の因子(皮脂等)によりアクネ菌の種類が選択されている可能性が考えられる。

一方、細菌叢組成は異なる個人の同一部位のほうが、同一個人異なる部位よりも類似しており(図 2B)、先行研究に沿った結果を得ることができた [11]。これら多体表部位の細菌叢組成データを用いて細菌叢の遺伝子機能を推定した結果、脂質代謝関連遺伝子群が顔(ニキビ部位)において有意に低いことが明らかとなった(図 3)。これらの結果から、ニキビ部位では、皮膚常在菌叢が宿主由来の脂質を代

謝できていない可能性が考えられる。過去の研究結果ではニキビにはアクネ菌の遺伝子型が重要であることが示唆されていたが [2], 今回の結果からニキビの発症にはアクネ菌の遺伝子型のみならず, 皮膚常在菌叢全体の機能も大きく影響を与えていると考えられた。

5. 展望

以上より, ニキビ発症に関与する可能性の高いアクネ菌は個人固有に存在しており, 他の微生物, 皮脂分泌などがあいまってニキビ発症につながる事が考えられる。先行研究により, ニキビ発症にはアクネ菌が産生するリパーゼが皮脂中のトリアシルグリセロールを分解し, その際に生じる遊離脂肪酸が毛穴を詰まらせることが要因になると報告されている [12]。部位によって皮膚常在菌の組成が異なることから, われわれがこれらのリパーゼ活性を抑制するような機構を持つ他の皮膚常在菌が存在するのではないかと考え, スクリーニングを行っていきたいと考えている。

現在のニキビ治療は, 発症部位の抗生物質による殺菌が主流であるが, 皮膚常在菌はわれわれの生活に欠かせないものであるため抗生物質の使用は乾燥等皮膚状態悪化を誘発する可能性がある。また, 今回の結果から個人にはそれぞれ固有のアクネ菌が存在することが示唆されており, アクネ菌は宿主由来の選択圧に対し生存しやすい種類が定着すると考えられる。よって抗生物質塗布治療を行っても, 同じ種類のアクネ菌が再び定着する可能性が高く, 発症部位のみの抗生物質塗布は根本治療になり得ない。今後は臨床的な応用として, 各個人固有のアクネ菌遺伝子型と細菌叢全体との関係を調べることで, ニキビ発症を誘発するアクネ菌の増殖を抑制できるような皮膚細菌叢の構築など, 皮膚細菌叢の制御によるニキビ治療・予防法確立を目指したい。

謝辞

本研究に際して, 研究面はもちろんのこと精神面も大変サポートしていただいた伊藤優太郎さん, 実験方法やスクリプト作成について大変丁寧にご指導くださった村上慎之介さん, 度重なるミーティングにおいて研究方針や実験に関して多くの有意義なアドバイスを下さった福田真嗣特任准教授に心より感謝申し上げます。また, このような素晴らしい研究環境を与えて下さっている富田勝教授に深く感謝致します。最後に, 私の研究生活を温かく見守りそして辛抱強く支援して下さった両親, 親戚一同に対して深い感謝の意を示したいと思えます。ありがとうございました。

参考文献

- [1] Till, A.E., Goulden, V., Cunliffe, W.J. and Holland, K.T. (2000) The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ. *Br. J. Dermatol.*, **142**, 885-892.
- [2] Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., et al. (2013) Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 2152-2160.
- [3] Hongoh Y, et al. (2008) Complete genome of the uncultured termite group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(14): 5555-5560.
- [4] Magoc T, Salzberg SL (2011) FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**(21): 2957-2963.
- [5] Caporaso JG, et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**(5): 335-336.
- [6] Cole JR, et al. (2003) The ribosomal database project (RDP-II): Previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* **31**(1): 442-443.
- [7] Yue JC, Clayton MK (2005) A similarity measure based on species proportions. *Comm. Stat. Theory Methods* **34**(11): 2123-2131.
- [8] Langille, M.G., Zaneveld, J., et al. (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.*, **31**, 814-821.
- [9] McDowell, A., Perry, A.L., et al. (2008) A new phylogenetic group of Propionibacterium acnes. *J. Med. Microbiol.*, **57**, 218-224.
- [10] Tomida, S., Nguyen, L., et al. (2013) Pan-genome and comparative genome analyses of propionibacterium acnes reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *MBio*, **4**, e00003-13.
- [11] Grice EA, et al. (2009) Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* **324**(5931): 1190-1192.
- [12] Tomida, S., Nguyen, L., et al. (2013) Pan-genome and comparative genome analyses of propionibacterium acnes reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *MBio*, **4**, e00003-13.