

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年8月28日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08488

研究課題名（和文）プラスミド・ネットワーク解析による臨床由来薬剤耐性プラスミドの動態解明

研究課題名（英文）Dynamics of clinically derived drug-resistant plasmid by plasmid network analysis

研究代表者

山下 明史（Yamashita, Akifumi）

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官

研究者番号：00573180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では類縁関係にあるプラスミドは同一起源の遺伝子を共有することを利用し、ネットワーク解析の技法を用いてプラスミドの類縁関係を俯瞰的に把握するためのwebアプリケーション open iPAT を作成した。Open iPAT を用いると公共データベースに登録された類縁関係にあるプラスミドを、ネットワーク図上に示すことができるだけでなく、薬剤耐性遺伝子リスト、不和合性タイピング、採取された国、ホスト、採取年などの情報を容易に取得することができる。さらに、パンゲノム解析やコアゲノム解析を行い結果をグラフィカルに表示する機能を実装し、プラスミドの類縁関係を詳細に解析することを可能にした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we created a web application named open iPAT to explore the relationship of plasmids in a bird's-eye view by using network analysis techniques by utilizing the fact that related plasmids share genes of the same origin. The open iPAT enabled not only to display related plasmids registered in the public database on the network diagram, but also to display the list of drug resistance genes, incompatibility typing, collected countries, hosts, collection year, etc. In addition, we implemented a function to graphically display the results by pangenomic analysis and core genome analysis, making it possible to analyze the relationship of plasmids in detail.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：プラスミド 薬剤耐性 ネットワーク解析 バイオインフォマティクス 臨床由来株

1. 研究開始当初の背景

医療現場では抗菌剤が効かない細菌によって治療が不可能または困難になる事例が増大している。特に薬剤耐性遺伝子がプラスミド上に存在している場合には容易に他菌株へ伝達しうるため対策がより困難となる。院内感染対策では原因菌の伝播経路の特定が重要な役割を果たすが、プラスミドはホストの生存に必ずしも必須の要素ではないため組み換えなどが起こりやすく、院内感染などで薬剤耐性プラスミドが広がった場合に全容をつかむことが極めて難しくなる。

2. 研究の目的

プラスミドが同一起源の起源をもつ場合には同一起源の遺伝子を共有する場合があることを利用し、ネットワーク解析の手法を用いてプラスミドの類縁関係性を俯瞰的に把握する仕組みを構築する。この仕組みを用いて臨床由来薬剤耐性プラスミドを含むプラスミドの動態を解明することを目指す。

3. 研究の方法

公共データベースにある完全長プラスミド配列情報を可能な限り取得し、プラスミド上の遺伝子リスト、宿主、地域、時期、薬剤耐性遺伝子や不和合性タイプなどの情報をデータベース上に蓄積する。次に、これらのデータベースと任意のプラスミド配列を比較し、共有する遺伝子の有無をblastなどの相動性検索ツールを用いて検索し、共有遺伝子の有無情報を用いてネットワーク解析を行い、プラスミド同士の類縁関係を推定するwebアプリケーションを構築する。構築したネットワークに薬剤耐性遺伝子や不和合性遺伝子などの情報を追加し、薬剤耐性遺伝子の伝播経路などについて解析する。

4. 研究成果

任意のプラスミド配列をサブミットすると類縁関係のある公共データベースに登録されたプラスミドを見つけだし、類縁関係をネットワークとして表示するwebアプリケーション open iPAT を作成した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

- Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yoshiro Murase, Tomotada Iwamoto, Satoshi Mitarai, Seiya Kato, Makoto Kuroda. TGS-TB: Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis Using Short-Read Whole-Genome Sequencing. *PLoS one*, 2015, **10**, 142951.
- Akiko Kinumaki, Tsuyoshi Sekizuka, Hiromichi Hamada, Kengo Kato, Akifumi

Yamashita, Makoto Kuroda. Characterization of the gut microbiota of Kawasaki disease patients by metagenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 2015, **6**, 824.

- Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda. VirusTAP: Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline. *Frontiers in Microbiology*, 2016, **7**, 32.
- Akiba M, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Fujii Y, Murata M, Lee K, Joshua DI, Balakrishna K, Bairy I, Subramanian K, Krishnan P, Munuswamy N, Sinha RK, Iwata T, Kusumoto M, Guruge KS. Distribution and Relationships of Antimicrobial Resistance Determinants among Extended-Spectrum-Cephalosporin-Resistant or Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Rivers and Sewage Treatment Plants in India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016, **60**, 2972.
- Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, Kato K, Takasaki T, Kuroda M. DGV: Dengue Genographic Viewer. *Front Microbiol*. 2016, **7**, 875.
- Nakayama E, Kotaki A, Tajima S, Kawada M, Miura K, Gemma A, Adachi T, Sekizuka T, Kato K, Yamashita A, Moi ML, Ikeda M, Yagasaki K, Shibasaki K, Saijo M, Kuroda M, Takasaki T. Two different dengue virus strains in the Japanese epidemics of 2014. *Virus Genes*. 2016, **52**, 722-6.
- Kawanishi M, Abo H, Ozawa M, Uchiyama M, Shirakawa T, Suzuki S, Shima A, Yamashita A, Sekizuka T, Kato K, Kuroda M, Koike R, Kijima M. Prevalence of Colistin Resistance Gene mcr-1 and Absence of mcr-2 in *Escherichia coli* Isolated from Healthy Food-Producing Animals in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016, **61**, e02057-16.
- Hasegawa N, Sekizuka T, Sugi Y, Kawakami N, Ogasawara Y, Kato K, Yamashita A, Takeuchi F, Kuroda M. Characterization of the Pathogenicity of *Streptococcus intermedius* TYG1620 Isolated from a Human Brain Abscess Based on the Complete Genome Sequence with Transcriptome Analysis and Transposon Mutagenesis in a Murine Subcutaneous Abscess Model. *Infect Immun*. 2016, **85**, e00886-16.
- Sekizuka Tsuyoshi, Kawanishi Michiko, Ohnishi Mamoru, Shima Ayaka, Kato

Kengo, Yamashita Akifumi, Matsui Mari, Suzuki Satowa, Kuroda Makoto. Elucidation of quantitative structural diversity of remarkable rearrangement regions, shufflons, in Inc12 plasmids. *Scientific Reports*, 2017, 7.

- Motoya Takumi, Nagasawa Koo, Matsushima Yuki, Nagata Noriko, Ryo Akihide, Sekizuka Tsuyoshi, Yamashita Akifumi, Kuroda Makoto, Morita Yukio, Suzuki Yoshiyuki, Sasaki Nobuya, Katayama Kazuhiko, Kimura Hirokazu. Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974-2015. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8.
 - Ozawa H, Tajima S, Nakayama E, Kato K, Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M, Usuku S. Isolation and Complete Genome Sequencing of Zika Virus Imported from the Dominican Republic to Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2018, 1, 72-74.
 - Nakayama Eri, Tajima Shigeru, Kotaki Akira, Shibasaki Ken-ichi, Itokawa Kentaro, Kato Kengo, Yamashita Akifumi, Sekizuka Tsuyoshi, Kuroda Makoto, Tomita Takashi, Saijo Masayuki, Takasaki Tomohiko. A summary of the imported cases of Chikungunya fever in Japan from 2006 to June 2016. *Journal of Travel Medicine*, 2017, 25.
 - Shigemura Hiroaki, Matsui Mari, Sekizuka Tsuyoshi, Onozuka Daisuke, Noda Tamie, Yamashita Akifumi, Kuroda Makoto, Suzuki Satowa, Kimura Hirokazu, Fujimoto Shuji, Oishi Kazunori, Sera Nobuyuki, Inoshima Yasuo, Murakami Koichi Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 274, 45-51.
- [学会発表](計 12 件)
- Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yoshiro Murase, Tomotada Iwamoto, Satoshi Mitarai, Seiya Kato, Makoto Kuroda. TGS-TB: Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis using short-read whole-genome sequencing. 8th Meeting on Global Microbial Identifier (GMI) (国際学会) 2015 年 05 月 11 日~2015 年 05 月 13 日 Sunworld Dynasty Hotel, 50 Wangfujing Avenue, Beijing, China
 - Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yoshihiro Murase, Tomotada Iwamoto,

Satoshi Mitarai, Seiya Kato, Makoto Kuroda. TGS-TB: Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis using short-read whole-genome sequencing. 1st ASM Conference on Rapid Next-Generation Sequencing and Bioinformatic Pipelines for Enhanced Molecular Epidemiologic Investigation of Pathogens (国際学会) 2015 年 09 月 24 日~2015 年 09 月 27 日 Omni Shoreham Hotel 2500 Calvert St NW, Washington, DC

- Akifumi Yamashita, Tetsuya Sakamoto, Tsuyoshi Sekizuka, and Makoto Kuroda. Geographical view of dengue genotype distribution. DENGUE SURVEILLANCE: INFORMATION-SHARING AMONG ASIAN COUNTRIES FOR A BETTER PREPARED REGION (国際学会) 2015 年 09 月 30 日~2015 年 10 月 02 日国立感染症研究所戸山庁舎
- Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yoshihiro Murase, Tomotada Iwamoto, Satoshi Mitarai, Seiya Kato, Makoto Kuroda. TGS-TB: Total Genotyping Solution for M. tuberculosis using short-read whole-genome sequencing. 第 89 回日本細菌学会 2016 年 03 月 23 日~2016 年 03 月 25 日大阪国際交流センター
- 山下明史、加藤健吾、岩本朋忠、関塚剛史、村瀬良朗、瀧井猛将、手洗聡、加藤誠也、黒田誠 Prediction Tool for Drug-resistant Genetic Marker Based on Whole Genome Sequence of TB. 第 90 回日本細菌学会総会 2017 年 03 月 19 日~2017 年 03 月 21 日 宮城県仙台市青葉区青葉山 仙台国際センター
- 山下明史、黒田誠 プラスミドネットワーク解析ツール iPAT (inter Plasmid Analyzing Tool) 第 64 回日本化学療法学会総会 2016 年 06 月 09 日~2016 年 06 月 11 日 神戸市中央区港島中町 神戸国際会議場
- 山下明史、関塚剛史、黒田誠 Virus genome-targeted assembly pipeline: VirusTAP 第 5 回生命医薬情報学連合大会 2016 年 09 月 29 日~2016 年 10 月 01 日東京都江東区青海 東京国際交流プラザ平成
- 山下明史、関塚剛史、加藤健吾、高崎智彦、黒田誠 DGV: Gengue Genographic Viewer JOINT INTERNATIONAL TROPICAL MEDICINE MEETING 2016 (国際学会) 2016 年 12 月 07 日~2016 年 12 月 09 日 Amari Watergate, Bangkok, Thailand
- 山下明史、関塚剛史、加藤健吾、高崎智彦、黒田誠 DGV: Gengue Genographic Viewer The 11th Japan-China International Conference of Virology

(国際学会) 2016年07月01日~2016年07月02日香川県観音寺市琴弾荘

- 山下明史、瀧井猛将、御手洗聡、黒田誠
Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis (TGS-TB) による結核菌薬剤耐性マーカー検出と感受性予測法の構築 第65回化学療法学会学術集会 2017年
- Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka, Kengo Kato, Tomohiko Takasaki, Makoto Kuroda. DGV: Dengue Genographic Viewer 第52回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2017年
- Akifumi Yamashita, Tomotada Iwamoto, Tsuyoshi Sekizuka, Yoshiro Murase, Takekasa Takii, Satoshi Mitarai, Kengo Kato, Seiya Kato, and Makoto Kuroda. Genetic prediction tool for antimicrobial susceptibility of Mycobacterium tuberculosis using TGS-TBamr. ICC2017 (国際学会) 2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
inter Plasmid Analyzing Tool (open iPAT)
<https://gph.niid.go.jp/cgi-bin/ipat/index.cgi>
TGS-TB
<https://gph.niid.go.jp/tgs-tb/>
VirusTAP
<https://gph.niid.go.jp/cgi-bin/virustap/index.cgi>
DGV: Dengue Genographic Viewer
<https://gph.niid.go.jp/genepid-j/dgv>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下明史 (YAMASHITA AKIFUMI)
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官
研究者番号：00573180

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

黒田 誠 (KURODA MAKOTO)
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長
研究者番号：80317411