

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14417

研究課題名(和文) ナノポアシーケンサーを用いた不明熱病原体ゲノムの同定

研究課題名(英文) Detection of Pathogens in unknown fever cases using Nanopore Sequencer

研究代表者

鈴木 穰 (Suzuki, Yutaka)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40323646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではナノポアシーケンサーを用いて熱帯感染症不明熱病原体を同定する方法論開発を試みた。ランダムプライマーを用いた増幅系については実験ノイズが大きく安定したプロトコルを確立することができなかったが、代表的なウイルス性、細菌性、寄生虫性感染源であるデングウイルス、16S rRNAによる汎細菌性感染源、熱帯熱マラリア原虫については安定した検出系を構築することができた。また開発された実験系を用いて、インドネシアマナド地域で50症例の感染症患者から感染源を同定できた。そのゲノムについて薬剤耐性関連遺伝子の塩基多型を解析することが可能であり患者治療戦略の策定に際し重要な情報を与えると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have attempted to develop a method to detect pathogens in patients having unknown fevers. Even though we were not able to develop the method based on the random-primer amplification due to the high-level noises, we successfully develop the method, by which representative viral, bacterial and parasite pathogens, such as dengue viruses, 16S rRNA sequencing for pan-bacterial detections, and malaria parasites, respectively, could be robustly detected. We actually applied the developed method to diagnose the feverish patients in Manado, Indonesia. We have reported the successful diagnosis from more than 50 cases regarding their infecting pathogens. Moreover, it was possible to identify the SNPs in their genomes. Especially, we found that the SNPs residing in the drug-resistance related genes should have particularly important clinical relevance, when the therapeutic strategy of the patients should be decided.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：ゲノム 簡易型シーケンサー 熱帯感染症 迅速診断

1. 研究開始当初の背景

本研究では新型使い捨て型シークエンサーを駆使して、熱帯感染症病原体の種同定・ゲノム多型を解析する一連の方法論的開発を行う。

2. 研究の目的

本研究では、ナノポアシークエンサーを用いて不明熱患者の原因病原体の同定を可能とする手法の方法論的開発を行う。MDA法を用いて血清中のDNA/RNAを増幅し、シークエンスアダプターを付加した後、ナノポアシークエンス解析を行うものである。本検出系では前処理反応はすべて乾燥化試薬を用いた1チューブ内での等温反応で進行し、高価な事前の解析設備を一切要しない。またシークエンサー自体も携帯可能な使い捨て型であり、電源もノートPCから供給可能、ベースコールから配列解析に至るまで一連の処理を現場で行うことができる。本手法は、未知の最近発生した輸入症例への対応時に際して、本邦野外あるいは特に途上国において、現場での迅速簡便な1次診断を可能とし、速やかな治療方針の決定と拡散防止施策について抜本的な革新をもたらすと考えられる。

3. 研究の方法

本研究課題では、1mlの血清試料からMDA法によりウイルスゲノムを増幅する。MDA反応にはRNA型ウイルスゲノムの増幅を想定し、逆転写活性の強いBst-polymeraseBstを用いるか、RT酵素とPhi29との組み合わせによるPhi29ポリメラーゼと共存下でMDA反応を行う。ランダムプライマーから多重置換反応により増幅されたDNA断片に対して、標準的なプロトコルでMinION用シークエンスアダプターを付加する。鋳型反応生成物をバイオアナライザーにより確認した後、MinIONシークエンスを行う。1検体につきフローセル1枚を用い、別途用意するクラウドシステムに生データを送致、外部計算機において塩基配列へと変換する。ノートPCに必要なプログラム群をインストールしてのインターネットが使用できない環境での解析にも対応する。いずれの解析系でも、得られた塩基配列に対して相同検索、あるいはそれぞれの病原体についてのペアワイズのアラインメントを行う。配列アラインメントの結果から正しくそれぞれの病原性微生物を検出できているかを評価する。ペアワイズのアラインメントの結果をもとに、さらに参照ゲノム配列を軸に同一箇所を繰り返し読まれた塩基について塩基報を集約し、野外株での塩基多型の検出可能性についても検証する。

シークエンスに用いた鋳型は同様にイルミナシークエンサーを用いても読み取りが可能であるために、イルミナシークエンサーから得られた塩基配列を正解として出力された塩基配列を相互に比較することにより検

出された塩基多型の妥当性を評価する。

4. 研究成果

本研究では、使い捨て簡易型USBシークエンサーMinIONを駆使して、熱帯感染症病原性微生物の種同定とゲノム解析を行った。熱帯熱マラリア原虫、デングウイルス感染患者、細菌感染患者について、血液から簡易核酸増幅法を用いてそれぞれのゲノムを増幅、単離したのちにMinIONシークエンサーで解読して、その配列相動性から、微生物の同定および薬剤耐性遺伝子等、臨床的に重要な意義を持った遺伝子多型の検出を行った。研究室環境での試験の完了後、インドネシアマナド市において、その実用試験を行った。必要となる情報解析パイプラインを簡略化、ノートPCでの実行を可能とすることができた。のべ50症例を用いた試験的運用を行い、得られた結果をRT-PCR法、イルミナシークエンス法あるいはサンガーシークエンス法で確認した。上記のいずれの系においても十分な感度と精度で測定が行われていることが確認されたことから、新手法について従来の手法と比較して十分に将来の実用に性能での実用試験に成功したと考えている(図1)。

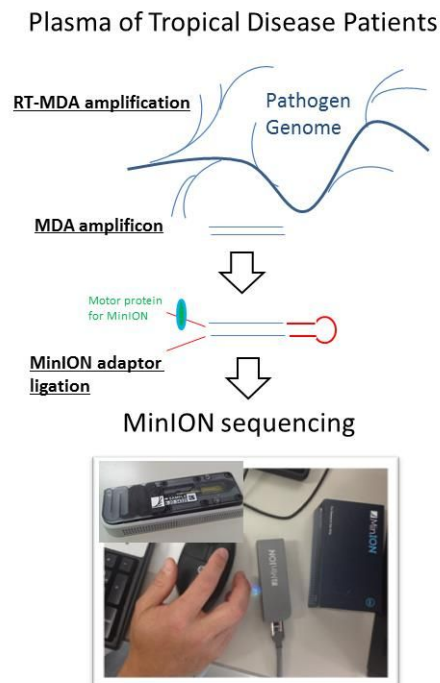


図1: MinIONを用いた簡便な病原性微生物の同定
ゲノムの増幅はrandom primerを用いて逆転写酵素混在化でMDAで行う。反応は等温反応で進行し、精製は矢印で示した2回のみ行う。

ただし、これらのいずれも想定される種ごとに設計したプライマーあるいはそれらのカクテルを用いた増幅によるものであって、ランダムな核酸増幅系を用いた系を確立することはできなかった。反応複製生物の効率的な除去についてより一層の検討が必要であると考えられた。

また得られたゲノム多型データの疫学的

解析も施行した。得られたシークエンスデータは、ゲノム中の SNP を検出するにも有用であることが明らかになった。特に熱帯熱マラリア原虫において、代表的な抗マラリア薬であるアルテメシニン耐性との関連が示唆される PfK13 遺伝子において、インドネシアマナド地区に多くのゲノム多型が検出された(図2)。

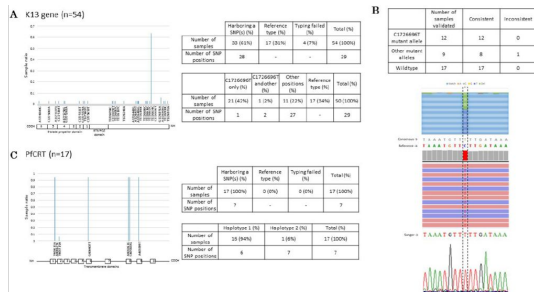
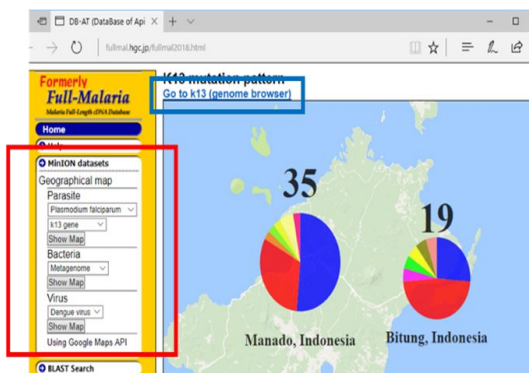


図2:マナド地区で検出された熱帯熱マラリアK13遺伝子 (A)、CRT遺伝子 (C)の多型箇所 (x軸は遺伝子座標) とその頻度 (y軸)を示す。(B)検出されたK13遺伝子多型についてのイルミナあるいはサンガーシークエンス確認結果を示す。

これが同薬剤に対する耐性獲得過程を反映しているとすれば、同様の測定の継続は重要な案件であると考えられた。また抗マラリア薬クロロキニンについても PfCRT 遺伝子における現地での変異カタログの創出に成功した。下図にマナド市および近傍地区から検出された PfK13 遺伝子の変異地図を示す。関連データはデータベース“Full-Malaria” (<http://fullmal.hgc.jp/>)として公開している。現在、同様のマップをさらに広域、最終的には全東南アジア地域に拡大すべく、現在、共同研究の拡大を進めているところである(下図)。



データ収集の観点からは当初の計画は概ね達成できたと考えている。これらの検討については下記の論文としまとめることができた。また、本研究成果をいくつかの国際学会で発表することができた。さらにいくつかの関連論文が現在、査読中である。

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 1件)

Yamagishi Junya, Runtuwene Lucky R., Hayashida Kyoko, Mongan Arthur E., Thi Lan Anh Nguyen, Thuy Linh Nguyen, Nhat Cam Nguyen, Limkittikul Kriengsak, Sirivichayakul Chukiat, Sathirapongsasuti Nuankanya, Frith Martin, Makalowski Wojciech, Eshita Yuki, Sugano Sumio, Suzuki Yutaka, Serotyping dengue virus with isothermal amplification and a portable sequencer, Scientific Reports, 7, Article number: 3510, 2017、査読あり
DOI: 10.1038/s41598-017-03734-5

[学会発表](計 3件)

Yutaka Suzuki, “On Site Sequencing for Genotyping Pathogens of Tropical Diseases”, One Health International Seminar in Zoonoses and Wildlife (招待講演), 2017

Yutaka Suzuki, “Nanopore sequencing for genotyping pathogens of tropical diseases”, Joint International Tropical Medicine Meeting (招待講演), 2016

Yutaka Suzuki, “MinION sequencing of malaria parasites” London Calling, 2016

[図書](計 1件)

鈴木絢子, Lucky Runtuwene, 阿部佳澄, 鈴木穂, 「ナノポアシークエンサーMinION (RNA-Seq 実験ハンドブック)」, 羊土社, 2016、242-249

[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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
教授
研究者番号：40323646

(2)研究分担者

山岸 潤也 (YAMAGISHI, Junya)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン
ター・准教授
研究者番号：80535328