

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689034

研究課題名(和文)結核菌臨床分離株における宿主定着・適応因子の究明と遺伝子型別技術の補完

研究課題名(英文)Research on adaptive evolution and its genetic factors of Mycobacterium tuberculosis clinical strains towards development of genotyping methods

研究代表者

和田 崇之(WADA, Takayuki)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：70332450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：わが国における結核菌臨床分離株の遺伝的特異性に着目し、日本固有性が高い2系統(G3群、G4群)の比較ゲノム解析と、系統的代表株(計12株)の全ゲノム配列決定を行った。G3/G4群の比較解析では、全国各地から菌株を収集し、ゲノム全域にわたる固有変異の抽出に成功した。変異情報に基づく分子系統樹では両群ともに分岐点が集中しており、いずれも短期間のうちに拡散し、その後国内固有群として広く定着した経緯が示唆された。また、G4群における既存型別法の問題点が浮き彫りとなった。国内株の全ゲノム配列は標準株と高い相同性を示したが、ゲノム内に点在する相同遺伝子間の比較を目的とした参照配列としての活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To uncover uniqueness of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Japan, we focused on two research targets; genetic diversities of the two unique sublineages, G3 and G4 of the Beijing lineage and complete genome sequences of representative 12 strains isolated in Japan. Various mutations of G3/G4 isolates from geographically broad areas could be determined successfully. Phylogenetic analysis based on the results shows historical dissemination of the sublineages which might cause their endemic situation in Japan. The data also reveals unreliability of genotyping methods to discriminate clinical isolates for G4 sublineage. The complete genome sequences of clinical strains showed high similarity to referential strain, H37Rv, but they can provide appropriate references to approach genetic diversity among paralogous genes.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：感染症 ゲノム 公衆衛生 分子疫学 結核

1. 研究開始当初の背景

結核は、慢性経過を辿ることや入院治療を要することが多く、患者に著しい社会的負担を及ぼす点で公衆衛生上重要な感染症である。わが国の結核罹患率は年間人口 10 万に対して約 20 となっており、世界的には中蔓延国として位置付けられる。原因菌であるヒト結核菌は遺伝的に同一性が高く、その病原性や伝播力は一様であると考えられていた。しかしながら近年、遺伝子型別分析やゲノム比較が精力的に進められ、結核菌の臨床分離株には遺伝的に様々な多様性があり、諸地域での分布に違いがあることがわかってきた。現在では、結核菌は各地域において蔓延と定着を繰り返し、それぞれの地域特異性・宿主（民族）特異性を獲得していると考えられるようになっている。

これまで、研究代表者は日本国内で分離された臨床分離株について遺伝多型を多数解析し、その構成が近隣諸国と大きく異なっていることを見出した。国内分離株は約 8 割が東アジア系統（北京型結核菌）によって構成されているが、中でも「祖先型」に分類される菌株が全体の約 70%を占めている。北京型結核菌は主に東アジア地域の優先系統として知られていたが、ユーラシア大陸をはじめ世界各地で伝播、拡散を繰り返しているのは「新興型」であり、祖先型が優先して分離される地域は日本がほぼ唯一である。このような傾向の理由は現時点では不明であるが、上述したような地域特異性と宿主特異性が日本国内において成立している可能性がある。

一方で、結核菌の遺伝的多様性は結核患者間の伝播経路を推定する手法として応用できる。具体的には、患者由来の臨床分離株から DNA を抽出し、その遺伝型を調べることで菌株間の異同判定を行い、患者間の関連を探る。結核菌では反復配列多型 (VNTR) が遺伝型判別に有用とされ、結核対策の一環として全国的に普及が進みつつあるが、北京型結核菌は世界標準法による型別分解能が低く、偶発的な型別一致株の出現が誤った伝播経路の推定を生み出すケースが散見されている。

2. 研究の目的

本課題では、祖先型北京株のうち、わが国に特異的に定着している系統群 (G3, G4 群) に着目した。G3 群は高齢患者からの分離頻度が有意に高い上、菌株間の遺伝的多様性が著しく、我が国に長く定着してきたことが推定される。対照的に、G4 群では遺伝的に近似した菌株が散見される。遺伝子型別による菌株の異同判定が困難な事例が頻出するため、我が国における結核分子疫学の重大な障壁となっている。また、いずれも日本固有性が高く、近隣諸国の分離頻度も低い。

G3/G4 群はそれぞれ系統的に分岐した後、国内で伝播・拡散したことが示唆される。各株は分岐から現代に至るまで、さらなる細分

岐を繰り返しながら固有の変異を蓄積してきたと考えられ、実際に代表株 (各 1 株のみ) を選んで行ったゲノム比較では、それぞれ固有の点変異や遺伝子欠損が確認されていた (Wada et al., 2012)。

本課題では、G3/G4 群に属する結核菌臨床分離株を国内諸地域から収集してゲノム比較を行い、以下の 3 テーマを中心としてその遺伝的特異性と多様性を精査することを目的とした。

(1) 各菌株の固有変異情報を、各系統群をさらに細分化するために活用する。変異遺伝子の機能から、特定の菌株個性を推察すると同時に、各群の内部的な多様性を把握することにより、流行の時期、現代における拡散状況などを推定する。

(2) 結核菌株の高度多変領域におけるゲノム挙動、分子進化を分析する。結核菌では、特定の遺伝子ファミリーが重複を繰り返し、抗原多様性などに寄与している可能性が示唆されている。本課題では、このような遺伝子を近接株間で比較することを目的として、各系統の完全長ゲノム配列の獲得とそれを対照配列とした比較研究を行う。

(3) VNTR 型別に伴う誤判定を補完しうる遺伝多型データを集積し、結核公衆衛生にゲノム科学を導入する糸口とする。

3. 研究の方法

(1) 菌株の収集。国内各地 (山形、東京、大阪、神戸、福岡、沖縄) で分離された結核菌臨床分離株から、G3/G4 群の遺伝系統マーカーを確認して解析対象を決定した。先行研究によるデータ (各群から 4 株、計 8 株) を合わせ、計 59 株を解析対象とした。各株は主に結核患者喀痰から小川培地上で分離培養して得られたものを用い、ゲノム DNA を精製して解析試料を得た。

(2) マッピング解析による菌株固有変異検出。Illumina 社の次世代シーケンサー (HiSeq, MiSeq など) により、各株からペアエンド配列情報を取得した。各データは H37Rv ゲノム (GenBank AL123456.2) を参照配列としてマッピングを行い、変異箇所を抽出した。マッピングには CLC genomics workbench を利用した。比較が難しい重複遺伝子や反復構造、大規模欠損領域などを除いて変異箇所を抽出し、他系統株の配列データと合わせて Neighbor-Joining 分子系統樹の構築を行った。

(3) ゲノムデータに基づく G3/G4 内部系統マーカーの抽出と VNTR 型別の異同判定評価。比較ゲノム解析株を選択した各地域由来の結核菌について VNTR 型別を確認し、同時に系統内の内部分岐を規定しうる遺伝マ-

カーの分析を行った。遺伝マーカーは上述のマッピング解析によって検出された点突然変異から選び、TaqMan プローブを設計・合成してリアルタイム PCR による変異の有無を確認できるようにした。

(4) 完全長ゲノム配列の決定。マッピング解析では相同性が高いゲノム構造を比較することができないため、より近接の完全長ゲノムを獲得することが求められる。国内分離株の遺伝的多様性を網羅するために、計 12 株（うち G3/G4 群は各 3 株）を選択して PacBio RS によるロングリードデータを獲得し、完全長ゲノムの決定を行った。遺伝子アノテーションには MiGAP を用い、BLAST によって H37Rv の遺伝子情報を対応させた。

なお、本課題では NGS データの取得に当たり、2013-14 年度において文科省科研費新学術領域「ゲノム支援」による支援を受けた。

4. 研究成果

(1) 複数地域由来の臨床分離株における変異解析および系統解析から、G3/G4 群はともに分離地域に関係なく分岐点が集中しており、いずれも短期間のうちに拡散し、その後国内固有群として広く定着した経緯が示唆された。地域ごとに系統的な偏りは認められず、国内の結核菌株は集団構造に均質であることが示された。こうした状況が形成された経緯は不明だが、過去の分離株を分析対象に加えてコアレセント解析を実施することにより、拡散年代を推定できると期待される。

(2) G3/G4 各系統は、それぞれ樹形上で 3 群、4 群に内部分類可能であった。VNTR 型別に基づく異同判定では、G4 群においてこうした内部系統群の違いと一致しない結果が示され、同群における VNTR 型別が菌株の異同を正しく反映しにくい可能性が示唆された。一方、G3 群ではそうした不一致は見いだされず、VNTR 型別による異同判定の信頼性は高いと考えられた。

(3) 国内の系統上代表的な菌株の完全長ゲノム配列について、解析対象とした全 12 株について約 4.4Mb のコンティグが各 1 本得られており、現在解析エラーのチェックおよび詳細な配列解析を進めている。ゲノム構造上は実験室標準株 H37Rv ときわめて相同であり、組み換えによる大規模ゲノム変異は低頻度であることが確認された。今後、これらの配列情報を参照配列とした近接ゲノム解析を実施し、相同性が高い遺伝子領域の精査を行う予定である。

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 10 件)

Wada Takayuki, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, Yamamoto T. Clonality and micro-diversity of a nationwide spreading genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. PLoS ONE. 2015; 10: e0118495. doi: 10.1371/journal.pone.0118495. 査読有.

Teramoto K, Suga M, Sato T, Wada Takayuki, Yamamoto A, Fujiwara N. Characterization of mycolic acids in total fatty acid methyl ester fractions from *Mycobacterium* species by high resolution MALDI-TOFMS. Mass Spectrometry. 2015; 4: A0035. doi: 10.5702/massspectrometry.A0035. 査読有.

De Beer JL, Ködmön C, Van Ingen J, Supply P, Van Soolingen D, Jamieson FB, Bidovec-Stojkovic U, Brown T, Cirillo, DM, Cruz L, Miranda A, Dou HY, Fauville-Dufaux M, Fitzgibbon MM, García De Viedma D, Groenheit R, Haanperä-Heikkinen M, Indra A, Kam KM, Kramer R, Jiang GL, Niemann S, Obrovac M, Rasmussen EM, Refrégier G, Realpe T, Samper S, Sharma MK, Sougakoff W, Stakenas P, Stavrum R, Trenkler J, Wada Takayuki, Siame KK, Tafaj S, Cowan L, Sng LH, Seagar AL, Basu I, Rastogi N, Ferro BE, De Matos, F, Kipnis A, Van Soolingen D, Supply P. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. The international journal of tuberculosis and lung disease. 2014; 18: 594-600. doi: 10.5588/ijtld.13.0531. 査読有.

Nakanishi N, Wada Takayuki, Arikawa K, Millet J, Rastogi N, Iwamoto T. Evolutionary robust SNPs reveal the misclassification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains into sublineages. Infection, genetics and evolution. 2013; 16: 174-177. doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.007. 査読有.

Tateishi Y, Tamaru A, Ogura Y, Niki M, Wada Takayuki, Yamamoto T, Hirata K, Hayashi T, Matsumoto S. Whole-Genome Sequence of the Potentially Hypertransmissible Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strain OM-V02_005. Genome announcements. 2013; 1: e00608-e00613. doi: 10.1128/genomeA.00608-13. 査読有.

Wada Takayuki, Maeda S. Multiplex agarose gel electrophoresis system for variable number of tandem repeats

genotyping: analysis example using *Mycobacterium tuberculosis*. Electrophoresis. 2013; 34: 1171-1174. doi: 10.1002/elps.201200471. 査読有 . 瀬戸順次, 阿彦忠之, 和田崇之, 長谷篤, 山田敬子. 結核低蔓延地域における網羅的な結核菌反復配列多型 (VNTR) 分析の有用性. 結核. 2013; 88: 535-542. 査読有 . 田丸亜貴, 和田崇之, 岩本朋忠, 長谷篤. JATA(12)-VNTR 型別による結核集団発生事例の菌株異同調査. 結核. 2013; 88: 393-398. 査読有 . 和田崇之, 田丸亜貴, 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 小向潤, 松本健二, 長谷篤. 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学の基盤構築 JATA(12)-VNTR 型別に基づくクラスター形成とその傾向 . 結核. 2013; 88: 393-398. 査読有 . Tamaru A, Nakajima C, Wada Takayuki, Wang Y, Inoue M, Kawahara R, Maekura R, Ozeki Y, Ogura H, Kobayashi K, Suzuki Y, Matsumoto S. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific *Mycobacterium tuberculosis* clones in Osaka Prefecture, Japan. PLoS ONE. 2012; 7: e42505. doi: 10.1371/journal.pone.0042505. 査読有 .

〔学会発表〕(計 14 件)

Wada Takayuki, Iwamoto T, Maeda S, Seto J, Tamaru A, Hase A, Murakami K, Takara T, Ahiko T, Yamamoto T. Phylogenetic uniqueness and its historical backgrounds of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. International Symposium on Genome Science 2015 “Expanding Frontiers of Genome Science II”. 2015.1.20-21. Hitotsubashi-Hall. Tokyo (Japan)
和田崇之. 抗酸菌属に潜む分類学と臨床現場の乖離. 日本分類学会連合第 14 回総会. 2015.1.11. 国立科学博物館 (東京).
Wada Takayuki, Yoshida S, Yamamoto T, Yanai T. Opportunistic and pathogenic Mycobacteria: importance of systematic surveillance of mycobacteriosis based on pathological diagnosis. The 7th Asian Society of Zoo and Wildlife Medicine meeting in Vietnam. 2014.10.14. Tam Dao (Vietnam)
大原直也, 趙娜, 和田崇之, 藤原永年, 前田伸司, 瀧井猛将, 前山順一, 山本三郎. BCG Tokyo172-1 に存在するサブポピュレーションの比率変化に関する検討. 第 89 回日本結核病学会総会. 2014.5.9-10. 長良川国際会議場 (岐阜, 岐阜市).
和田崇之, 岩本朋忠, 瀬戸順次, 阿彦忠之, 田丸亜貴, 長谷篤, 前田伸司, 山本太郎. M 株の広域的分離の原因究明 比較ゲノム解析に基づく「結核ゲノム疫学」の導

入. 第 89 回日本結核病学会総会. 2014.5.9-10. 長良川国際会議場 (岐阜, 岐阜市).
藤原永年, 前田伸司, 和田崇之. 超高分解能 MALDI Spiral TOFMS によるミコール酸の簡易迅速分析. 第 89 回日本結核病学会総会. 2014.5.9-10. 長良川国際会議場 (岐阜, 岐阜市).
和田崇之. 結核菌国内臨床株の比較ゲノム解析: 大規模拡散株と国内定着系統群を追跡する. 第 84 回実験結核研究会. 2014.5.8. 長良川国際会議場 (岐阜, 岐阜市).
和田崇之, 岩本朋忠, 瀬戸順次, 田丸亜貴, 前田伸司, 長谷篤, 山本太郎. 結核菌における遺伝型別一致株の比較ゲノム解析. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014.3.28. タワーホール船堀 (東京).
和田崇之. 結核分子疫学研究の現在と未来. 第 19 回国際結核セミナー. 2014.3.6. ヤクルトホール (東京).
和田崇之. 反復配列多型 (VNTR) 分析法による結核菌型別 精度管理と考え方, 使い方. 第 72 回日本公衆衛生学会総会. 2013.10.23. 三重県総合文化センター (三重, 津市).
和田崇之, 山本太郎. わが国における結核分子疫学と伝搬経路推定: 結核中蔓延国としての役割について. 第 54 回日本熱帯医学会大会. 2013.10.5. 長崎ブリックホール (長崎, 長崎市).
Maeda S, Wada Takayuki, Naka T, Shibata M, Fujiwara N. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), especially Beijing genotype MTB, in Japan by using the variable-number of tandem repeats (VNTR) and a next generation sequencer (NGS). The 5th EMBO meeting 2013. 2013.9.22. Amsterdam (Netherlands)
中西典子, 和田崇之, 有川健太郎, 岩本朋忠. 結核菌北京型 1,054 株を用いた遺伝的系統解析法の評価. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013.3.18-20. 幕張メッセ (千葉, 千葉市).
前田伸司, 和田崇之. 反復配列多型法による型別結果比較における問題点とその対策. 第 87 回日本結核病学会総会. 2012.5.10-11. 広島国際会議場 (広島, 広島市).

〔その他〕
特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 崇之 (WADA, Takayuki)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 70332450