

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05190

研究課題名(和文) 日本全域を網羅する大腸菌0157の時空間系統ゲノミクスと高リスク系統の探索

研究課題名(英文) Nation-wide spatio-temporal phylogenomics of E. coli 0157 and search for high risk 0157 lineages

研究代表者

林 哲也 (Hayashi, Tetsuya)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10173014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：2005・2010・2015年の各年に国内で分離されたヒト由来0157株をほぼ網羅する2354株と1996年から2017年に19都道府県で分離されたウシ由来株271株のドラフト配列を取得し、0157のコアゲノム領域に存在する全SNPを同定した。これを用いて、高精度系統解析を行った結果、我が国における優勢亜系統の存在とそのターンオーバーを確認した。また、Stx2ファージの新規サブタイピング法を開発し、各亜系統でのサブタイプの違いとサブタイプの変化を明らかにした。現在、臨床情報とゲノム情報の統合等を行い、高リスククローンの同定と動態解明を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者・保菌者から分離された0157菌株を国レベルで系統的に収集できている国は日本のみであるため、極めて貴重な情報が得られた。0157の比較ゲノム解析としても世界的に例を見ない規模である。また、我が国における0157の優勢クローン・亜系統の存在が確認でき、その経年的な変化も確認できたため、現在進行中の解析で、高リスククローン・亜系統が特定できれば、我が国の0157対策に大きく貢献できる。さらに、今回の解析手法は他の病原菌にもフィードバックできることから、「日本全域を網羅する病原菌の時空間系統ゲノミクス」という新たな研究分野を開拓することができ、様々な病原菌・感染症研究に波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We sequenced 2,354 clinical 0157 strains isolated in 2005, 2010, 2015 in Japan, which covered most strains isolated in each year in Japan, and 271 strains that were isolated from bovine between 1996 and 2017 in 19 prefectures in Japan. Using the core SNP information obtained from these draft sequences, we performed high-resolution phylogenetic analysis and identified several sublineages dominating in Japan and the turnovers of the dominant clones or sublineages. By developing a novel Stx2 subtyping method, we identified the difference in dominant subtype between sublineages and subtype change in several sublineages. We are now performing more detailed analyses, including analysis of sublineage specific genes and integrated analyses of clinical and bacterial genome information to identify high-risk 0157 clones or sublineages and their dynamics.

研究分野：細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 ゲノム 疫学 感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な新興・再興感染症の勃興や耐性菌の出現等により、感染症に対する社会的関心は極めて高く、医学・公衆衛生学領域での最重要課題の1つとなっている。代表的な新興感染症である腸管出血性大腸菌（以下、EHEC）感染症は、我が国を含む多くの先進諸国で大きな問題となっている腸管感染症であり、下痢・出血性腸炎のほか、溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症などの生死に関わる合併症を引き起こす。2011年に富山などで発生した集団感染で改めて認識されたように、先進国の医療技術をもってしても死亡患者の発生が避けられない腸管感染症である。2012年に生レバー喫食禁止等の措置が執られた後も、年間2500～3000件の有症事例が発生しており、数多くの散発事例に加えて、集団感染も多数発生している。さらに、多数の都道府県にまたがる集団感染も発生しており、その早期検出も重要となっている。大腸菌0157は我が国でヒトから分離されるEHECの6～7割を占め、その対策が最も急がれる病原体であり、研究代表者らによる0157菌株の全ゲノム解読以降、病原因子の検索や機能解析等、様々な研究が行われてきた。我々の比較ゲノム研究からは、ファージやISなどを介したメカニズムにより、0157のゲノム構造は驚くほどダイナミックに変化し続けており、多様なゲノムを持った0157クローンの存在が明らかになっている。一方、0157の主たる保菌動物はウシ（0157が病原性を示さない）と考えられており、ウシの中で循環している菌株とヒトで問題となる菌株のポピュレーションの違いも提唱されているが、詳細は不明である。菌株系統（クレード）の違いによる重症化率の違いも示唆されているが、精度の高い系統解析は実施されておらず、その詳細は不明である。こういった高リスク系統の同定は極めて挑戦的な研究テーマであるが、その成果はサーベイランス態勢の強化などの施策に反映できるため、0157対策に大きく貢献する。これらの点を明らかにするためには、以下の4課題の解決が必要である。課題1：ヒトで問題となっている優勢クローン（系統）の同定課題2：優勢クローンの時間的・地理的な変化（優勢クローンの時空間的ターンオーバー様式）の解明：どのようなタイムスケールで、どのような遺伝的性状を持った系統が優勢となるのか。課題3：集団感染や重症化しやすい高リスク系統の同定。課題4：ウシの腸管に常在するポピュレーションとヒト分離系統の関連性の解明：ウシ常在株がランダムにヒトに感染するのか、ヒトに感染する菌株はヒト腸管でのフィットネスが向上した特定系統に属する菌株なのか、そのような系統に特徴的な遺伝的変化は何か。これらの課題を解決するためには、ヒト由来株だけでなく、ウシ常在株を含め、さらに地域や年度を超えた大規模ゲノム解析とそこから得られる配列情報を用いた高精度系統解析（時空間系統ゲノミクス）に基づいた解析を行う必要がある。このような研究は、従来の技術では不可能であったが、次世代シーケンサ（NGS）を有効に組み合わせることにより実現可能となってきた。

2. 研究の目的

本研究では、全国でヒトおよびウシから分離される大腸菌0157の大規模ゲノム解析により、上記の課題1～4を解決するとともに、「日本全域を網羅する病原菌の時空間系統ゲノミクス」と呼べる研究分野を新たに開拓することを目指した。具体的には、以下の4項目の達成を目指した。(1) 集団感染事例株とウシ感染実験由来株、及び実験室継代株のゲノム解析により、自然界（ヒト・ウシ腸管内）と実験室内でのゲノム変化と塩基置換速度を決定する（基盤データの取得）。(2) 2000・2008・2016年に全国でヒトから分離された0157全体をほぼカバーする菌株（約800株/年）と国内各地の農場で分離されたウシ由来菌株（600株）のゲノム解析とゲノムワイドな高精度系統解析により、中・長期的な0157クローンの時間的・空間的な拡散様式、優勢クローンの同定、優勢クローンのターンオーバー様式、ウシ常在系統とヒトでの優勢クローンとの遺伝的関係を解明する〔課題1, 2, 4に関連〕。(3) 0157の最も重要な病原因子であるStx2の産生量測定とStx2ファージのサブタイピングにより、Stx産生量の高い（病原性ポテンシャルの高い）系統の同定とStx高産生性を規定する遺伝的要因を解明する〔課題3に関連〕。(4) ゲノム情報・Stx2ファージ情報等と疫学・臨床情報の統合解析により、集団感染や重症化のリスクが高い（高病原性）系統とその遺伝マーカーを同定する〔課題3に関連〕。

3. 研究の方法

当初計画では、(1) 解析パイプライン構築と基盤データ取得〔試験管内・自然界でのゲノム変化速度の決定〕(2) 2000/2008/2016年のヒト分離株とウシ由来株の大規模比較ゲノム解析と高精度系統解析〔中・長期間での時間的・空間的なクローン拡散様式、優勢クローンの同定、クローンのターンオーバー様式、ウシ常在系統とヒトでの優勢クローンとの関連性などの解明〕(3) Stx2産生量測定とStx2ファージタイプと疫学・臨床情報の統合解析〔病原性ポテンシャルの高い系統の同定〕(4) ゲノム情報・Stx2ファージタイプと疫学・臨床情報の統合解析〔集団感染や重症化リスクの高い（高病原性）系統の特定とその遺伝マーカーの同定、4つの項目を実施する予定であった。このうち、(1)の〔試験管内・自然界でのゲノム変化速度の決定〕に関しては、解析の中心となるウシ感染実験由来株の由来やメタ情報が不明確であることが判明したために、その解析を中止した。(2) 2000/08/16年のヒト分離株とウシ由来株の大規模比較ゲノム解析と高精度系統解析に関しては、菌株保存の状況から、ヒト分離株については2005/10/15年の分離株に変更した。ウシ分離株については2005/10/15年の分離株だけでは十分な菌株数が確保できないことから、1996以降に分離された菌株を広く解析することとした。変更した。(4)のStx2ファージタイプに関しては、以下に記載するように、PCRによるタイピングからリードマップ

ングによる方法に変更した。

4. 研究成果

全ゲノム配列からの正確な1塩基多型(SNP)同定プログラムを開発するとともに、多数のゲノム配列解析用のパイプラインを整備した。また、2005・2010・2015年の各年に国内で分離されたヒト由来0157株をほぼ網羅する2354株(各年度;872,652,830株)と1996年から2017年にかけて19都道府県で分離されたウシ由来株270株のドラフト配列をイルミナHiSeqとPlatanusアセンブラーを用いて取得し、上記のSNP同定プログラムにより0157のコアゲノム領域に存在する全SNPを同定した(一部のシーケンシングカバーレージが低い株は解析から除外)。また、海外のデータベースに登録されている800株のゲノム情報を取得し(分離年,分離地,分離ソースが明確な株のみ)同様にコアゲノム領域に存在する全SNPを同定した。これらのSNP情報を用いて、高精度系統解析を行った結果、我が国における優勢亜系統の存在とそのターンオーバーを確認できた。また、HUS由来菌株が優位に多い亜系統を同定した。さらに、PCRに代わるStx2ファージの新規サブタイピング法(リードマッピングによるタイピング)を開発し、各亜系統でのサブタイプの違いとサブタイプの変化を明らかにした。なお、Stx2産生量測定に関しては、これまで使用してきた測定キットが発売中止となったため、独自にStx2濃度測定システムを開発した。現在、海外の株を追加して(分離年,分離地が明らかな約1400株を追加)再度高精度系統解析を行うことにより、グローバルな0157の集団構造に関するさらに正確な情報を取得するとともに、臨床情報とゲノム情報の統合や上記の新規Stx2産生量測定システムを用いた核亜系統の代表菌株のStx2産生量測定を行い、高リスククローン(HUS由来菌株が優位に多い亜系統)の動態解明を進めているところであるが、患者・保菌者から分離された0157菌株を国レベルで系統的に収集できている国は日本のみであるため、本研究により、極めて貴重な情報が得られた。0157の比較ゲノム解析としても世界的に例を見ない規模である。また、我が国における0157の優勢クローン・亜系統の存在が確認でき、その経年的な変化も確認できたため、現在進行中の解析で、高リスククローン・亜系統が特定できれば、我が国の0157対策に貢献できると期待される。さらに、今回の解析手法は他の病原菌にもフィードバックできることから、「日本全域を網羅する病原菌の時空間系統ゲノミクス」という新たな研究分野を開拓することができ、様々な病原菌・感染症研究に波及効果が期待できる。実際に、今回の研究で確立した研究手法の一部は、我々の研究室で行っている0157以外のEHEC(026,0145など)の解析に応用でき、それぞれの血清型のゲノム多様性や集団構造の解明に貢献した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Yoshimura D., Kajitani R., Gotoh Y., Katahira K., Okuno M., Ogura Y., Hayashi T., Itoh T. Evaluation of SNP calling methods for closely related bacterial isolates and a novel high-accuracy pipeline: BactSNP. *Microb Genom.* 2019 17.
2. Ogura Y., Seto K., Morimoto Y., Nakamura K., Sato M.P., Gotoh Y., Itoh T., Toyoda A., Ohnishi M., Hayashi T. Genomic Characterization of β -Glucuronidase-Positive *Escherichia coli* O157:H7 Producing Stx2a. 2018, 24 (12): 2219-2227.
3. Ishijima N, Lee KI, Kuwahara T, Nakayama-Imahiji H, Yoneda S, Iguchi A, Ogura Y., Hayashi T., Ohnishi M., Iyoda S.: Identification of a New Virulent Clade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- Sequence Type 29. *Sci Rep*, 23(7):43136, 2017.
4. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T.: Six Novel O Genotypes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 7:765, 2016.
5. Mondal SI, Islam MR, Sawaguchi A, Asadulghani M, Ooka T, Gotoh Y, Kasahara Y, Ogura Y, Hayashi T.: Genes essential for the morphogenesis of the Shiga toxin 2-transducing phage from *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep*, 6:39036, 2016.
6. Kusumoto M, Hikoda Y, Fujii Y, Murata M, Miyoshi H, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T., Akiba M.: Emergence of a Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing Enterotoxigenic *Escherichia coli* Lineage in Diseased Swine in Japan. *J Clin Microbiol*, 54(4):1074-81, 2016.

〔学会発表〕(計14件)

1. 林哲也(招待講演)「次世代シーケンサーを用いた病原細菌におけるゲノム解析の進展」,日本農芸化学会2019年度大会,2019.3.26,東京都世田谷区(東京農業大学世田谷キャンパス)
2. 林哲也(招待講演)「次世代シーケンサーを用いた病原細菌におけるゲノム解析の進展」,第13回日本ゲノム微生物学会年会,2019.3.8,八王子市(首都大学東京南大沢キャンパス)
3. Nakamura K., Murase K., Toyoda A., Itoh T., Jacques Georges Mainil, Yoshino S., Kimata K., Isobe J., Seto K., Etoh Y., Narimatsu H., Saito S., Yatsuyanagi J., Iyoda S., Ohnishi M., Ooka T., Gotoh Y., Ogura Y., Hayashi T. Genome diversity of EHEC O145:H28 and genome-wide search of high Stx2 producibility-associated genes. *VTEC 2018, Firenze, Italy*,

2018.5.6-9.

- 4.Ogura Y., Gotoh Y., Itoh T., Sato M., Kusumoto M., Akiba M., Tominaga K., Kirino Y., Ooka T., Ishijima N., Lee K., Iyoda S., Mainil J., Hayashi T., The population structure of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11 with recent and repeated *stx2* acquisition in multiple lineages (selected oral presentation). VTEC 2018, Firenze, Italy, 2018.5.6-9.
- 5.林哲也(招待講演)「次世代シーケンサを活用した病原細菌のゲノム研究～当研究室での解析を中心に～」第70回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2017.10.14, 東広島市(広島大学)
- 6.林哲也(招待講演)「ゲノム配列からみた腸管出血性大腸菌」, 第49回小児感染症学会・学術集会, 2017.10.21, 金沢市(ホテル日航金沢)
- 7.林哲也(招待講演)「次世代シーケンサを用いた細菌ゲノム研究と細菌感染症研究」, 第87回日本感染症学会西日本地方会学術集会/第60回日本感染症学会中日本地方会学術集会/第65回日本化学療法学会西日本支部総会, 2017.10.26, 長崎市(長崎ブリックホール)
- 8.後藤恭宏、片平雄之、吉村大、伊藤武彦、小椋義俊、林哲也, 超高精度分子疫学解析で迫る病原菌の動態, 第90回日本細菌学会総会, 2017.3.19-21, 仙台市(仙台国際センター)
- 9.小椋義俊、黒木真理子、吉野修司、木全恵子、磯部順子、勢戸和子、前田詠里子、江藤良樹、楠本正博、秋庭正人、石嶋希、李謙一、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、後藤恭宏、林哲也, 国内外で分離された521株の腸管出血性大腸菌O26の全ゲノム系統解析と病原遺伝子レポーター解析, 第90回日本細菌学会総会, 2017.3.19-21, 仙台市(仙台国際センター)
- 10.中村佳司、村瀬一典、伊藤武彦、Mainil Jacques、吉野修司、黒木真理子、木全恵子、磯部順子、勢戸和子、江藤良樹、前田詠里子、緒方喜久代、成松浩志、齋藤志保子八柳潤、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、後藤恭宏、小椋義俊、林哲也, 比較ゲノムによる腸管出血性大腸菌O145:H28の多様性解析, 第90回日本細菌学会総会, 2017.3.19-21, 仙台市(仙台国際センター)
- 11.中島遥子、桐野有美、宇野浩一、佐藤寿夫、佐藤光彦、西田留梨子、吉野修司、大岡唯祐、後藤恭宏、谷沢靖洋、中村保一、井口純、石原朋子、大西真、林哲也、小椋義俊、大規模比較ゲノム解析による腸管出血性大腸菌の起源と出現プロセスの解明、第11回日本ゲノム微生物学会年会, 2017.3.2-4, 藤沢市(慶応義塾大学湘南藤沢キャンパス)
- 12.佐藤光彦、小椋義俊、中村佳司、西田留梨子、後藤恭宏、久恒順三、菅井基行、伊藤武彦、林哲也、ブドウ球菌属におけるライブラリ調製キットNextera XTによるGC含有量と関連したシーケンスバイアス, 第11回日本ゲノム微生物学会年会, 2017.3.2-4, 藤沢市(慶応義塾大学湘南藤沢キャンパス)
- 13.中島遥子、桐野有美、宇野浩一、佐藤寿夫、佐藤光彦、西田留梨子、吉野修司、大岡唯祐、後藤恭宏、谷沢靖洋、中村保一、井口純、石原朋子、大西真、林哲也、小椋義俊、大規模比較ゲノム解析による腸管出血性大腸菌出現プロセスの解明、第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会(EHEC感染症研究会), 2016.11.10-11, 富山市(富山県民生センターサンフォルテ)
- 14.中村佳司、村瀬一典、西田留梨子、伊藤武、Mainil Jaqyes、吉村修司、磯部順子、勢戸和子、江藤良樹、富永潔、緒方喜久代、齋藤志保子、八柳潤、黒木真理子、木全恵子、前田詠里子、亀山光博、成松浩志、矢端順子、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、後藤恭宏、小椋義俊、林哲也, 腸管出血大腸菌O145:H28の比較ゲノム解析, 第69回日本細菌学会九州支部総会, 2016.9.1-2, 宮崎市(宮崎市民プラザ・オルプライドホール)

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大西 真
ローマ字氏名：OHNISHI Makoto
所属研究機関名：国立感染症研究所
部局名：細菌第一部
職名：部長・副所長
研究者番号（8桁）：10233214

研究分担者氏名：秋庭 正人
ローマ字氏名：AKIBA Masato
所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
部局名：動物衛生研究部門
職名：所長・部門長・部長
研究者番号（8桁）：60355211

研究分担者氏名：伊藤 武彦
ローマ字氏名：ITO takehiko
所属研究機関名：東京工業大学
部局名：大学院生命理工学
職名：教授
研究者番号（8桁）：90501106

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小椋 義俊
ローマ字氏名：Ogura Yoshitoshi

研究協力者氏名：伊豫田 淳
ローマ字氏名：IYODA Sunao

研究協力者氏名：楠本 正博
ローマ字氏名：KUSUMOTO Masahiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。