

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08465

研究課題名(和文) CRISPRの解析を通じたV. cholerae病原株出現と拡散機構の解明

研究課題名(英文) Understanding of the process of pandemic Vibrio cholerae arising through the analysis CRISPR/Cas sequence

研究代表者

竹村 太地郎 (TAKEMURA, Taichiro)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：60572899

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)：ベトナム北部地域において、環境水検体の収集とV. choleraeの分離培養を実施し、O1抗原を有するV. cholerae 4株、非O1/O139株24株のゲノム配列を取得した。O1株の詳細な比較ゲノム解析を実施し、3株がコレラ世界流行をもたらした病原株グループと近縁であることが示された。この3株はtcpA遺伝子を保有していたが、病原株の保有するtcpA遺伝子型4、8、9、とは異なっており、環境中に生息するV. choleraeが多様性に富んだtcpA遺伝子を保有することを示し、系統関係の解析にこの領域が有用である可能性を示唆すると考えている。非O1/O139株24株の解析を現在進行中である。

研究成果の概要(英文)：Cholera epidemics have been recorded periodically in Vietnam. Since cholera is a water-borne disease, systematic monitoring of environmental waters for Vibrio cholerae presence is important for predicting and preventing cholera epidemics. We conducted monitoring, isolation, and genetic characterization of V. cholerae strains in Northern Vietnam from Jul 2013 to Feb 2015. Four V. cholerae O1 strains were isolated from 110 analyzed water samples, however, none of them carried the cholera toxin gene, ctx. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis revealed that the four O1 isolates were separated into two independent clusters, and one of them diverged from a common ancestor with pandemic strains. The three strains carried tcpA gene with a distinct sequence demonstrating a separate clonal lineage. These results suggest that the aquatic environment can harbor highly divergent V. cholera strains and serve as a reservoir for multiple V. cholerae virulence-associated genes.

研究分野：微生物学

キーワード：Vibrio cholerae コレラ菌 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

世界的なコレラ流行は *Vibrio cholerae* のうち O1 または O139 抗原を持ち、さらにコレラ毒素 (CT) 産生能を持つ菌によって引き起こされる。CT 遺伝子を始めとする病原性に関わる遺伝子群は、CTX ϕ をはじめとする細菌に感染するファージにより *V. cholerae* にもたらされると考えられている。しかし、何故特定の O 抗原型をもつ *V. cholerae* のみが CT 遺伝子を獲得し大規模なコレラ流行をもたらすのか? という疑問が生じる。菌株表面のバクテリオファージが利用するレセプターや細菌の定着因子の解析等からは説明がつかず、未だ答えが出ていない。*V. cholerae* は水環境中に広く存在する常在菌であるが、直近のコレラ流行では、病原株の起源はインドネシア周辺にあり、病原株の感染拡大はインド亜大陸東部地域で生じたことが示唆され、病原株出現と流行拡大には時空間的隔たりが存在する。この隔たりを埋めるために、微生物の自然環境における生態を理解する事が必要となる。

近年、多くの原核生物が CRISPR (Clustered Regularly Inter-spaced Short Palindromic Repeats) / Cas (CRISPR associated genes) と呼ばれるバクテリオファージやプラスミド等の外来遺伝子に対する獲得免疫を持つことが明らかにされた。バクテリオファージ感染のような水平遺伝子伝達と CRISPR/Cas という相反する二者によってもたらされる形質転換の制御は、実験室レベルでは複数報告されているが、実際のヒト-環境循環の中では未明な点が多い。バクテリオファージは環境中で菌数制御に寄与すると考えられているが、この点についても CRISPR/Cas の寄与は未明である。研究代表者の常駐するベトナムは、直近の第 7 次コレラ流行において、3 回に渡り地域外からの病原株侵入が起こったことがヒト臨床株のゲノム解析から示唆されている。このような地域は世界でも数少なく、環境株においても多様な分離株が得られることが期待される。本研究の目的とする水平遺伝子伝達による多様性獲得と拡散の機構を解析するのに適した研究フィールドを設定することが可能であり、さらにコレラ流行予測の側面から現地の公衆衛生管理にも貢献することが可能と考えた。

2. 研究の目的

細菌感染症の根本的な解決には各ニッチに生息する微生物の生態を明らかにすることが必要である。現在まで病原微生物の解析は臨床分離株の解析が主であり、それ以外の環境中での情報は十分に収集されているとは言い難い。本研究では、*V. cholerae* を解析対象として、環境中のファージ感染等の水平遺伝子伝達による多様性獲得と形質変化、ならびに菌数制御機構への CRISPR/Cas の寄与を明らかにする。本研究の成果は、病原微生物の出現と拡散の生態学的機構を明らかにするこ

とにつながり、他の多くの病原微生物にも共通する分子基盤の解明へとつながる。

3. 研究の方法

ベトナム北部ナムディン省にて、2ヶ月ごとに生活用水を収集する(10地点、500ml ずつ)。採集した水検体を用いて、*V. cholerae* ならびに *Vibrio* 属細菌の分離を行う。Alkaline Pepton Water を用いた一次増菌、TCBS 培地を用いた選択培養、分離コロニーの NaCl 感受性による再スクリーニング、細菌同定検査キットと PCR 法を用いた分離菌株の菌種同定、ゲノム DNA の抽出を行い、MiSeq を用いた全ゲノム解析プラットフォームに供する。得られた配列データを用いて、他地域より分離された株の塩基配列データとの比較解析 (SNPs 解析) を行い、ベトナム分離株における特徴とその経時変化を見出すとともに、*V. cholerae* のゲノム動態の解明を試みる。さらに同種間、異種間における水平伝達遺伝子の同定を行い、CRISPR 領域の遺伝子配列解析より、それぞれの菌株のもつ免疫機構と水平遺伝子伝達の相関の定性的解析、各ニッチにおける個体数制御に関与すると考えられるバクテリオファージ感染、溶菌因子・抵抗因子の同定とその地域変動の解析を行う。

4. 研究成果

ベトナム北部地域において、環境水検体の収集と *V. cholerae* の選択培養による分離を実施し、分離された *V. cholerae* から O1 抗原を有する 4 株、非 O1/O139 株 24 株のゲノム配列を取得した。いずれも主要病原因子である CTX 遺伝子は有していなかった。O1 株 4 株の詳細な比較ゲノム解析を実施し、3 株がコレラ世界流行をもたらした pandemic cluster と非常に近縁であることが示された (図 1)。

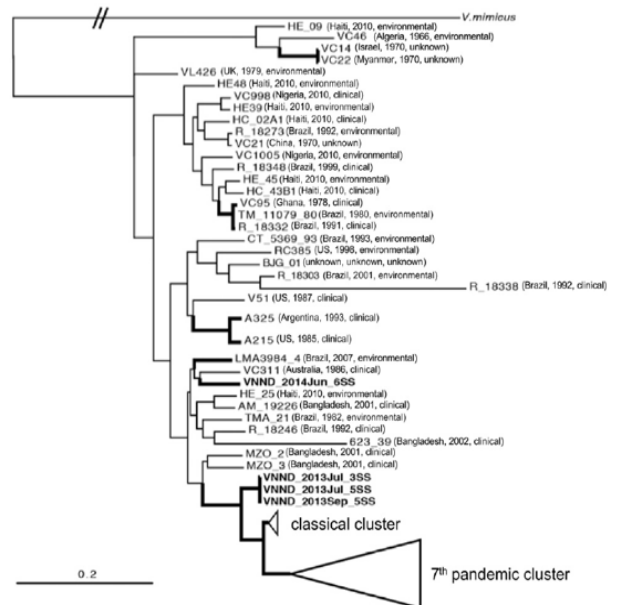


図 1 環境分離 O1 株 4 株の系統解析

1株 (VNND_2014Jun_6SS) の同領域にファージ様の配列の挿入を見出した。挿入領域全長をカバーするファージは Genbank、PHAST 等のデータベースからは見だせず、新規のファージがこの領域に挿入されていることが示唆された。このファージ様領域は 11 の ORF を持つと見られるが、部分的に既報の KSF-1 ファージ (KSF-1 ファージの ORF_X、_IX、_VIII、_VII、_VI、_IV、_III) ならびに VCY ファージ (VCY ファージの ORF11、10、9、8、7) に高い相同性が見られた (図 2)。

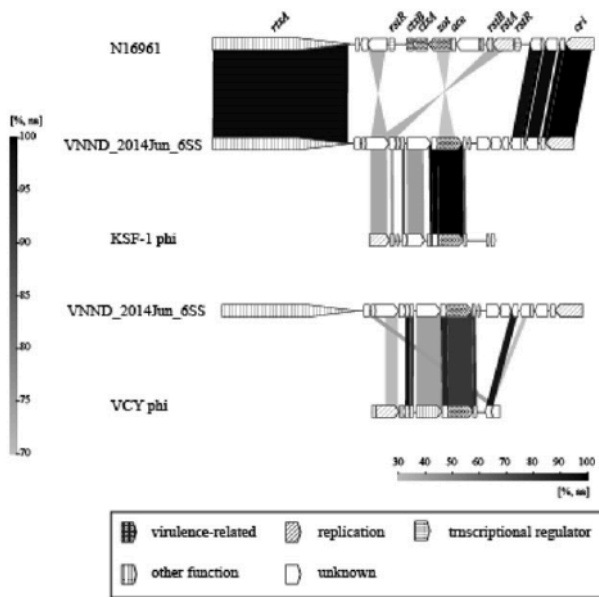


図 2 VNND_2014Jun_6SS の ctx 相当領域に認められたファージ様配列の比較解析

VPI-1 領域にはもう 1 つの主要病原因子である *tcpA* 遺伝子がコードされ、同遺伝子は *V. cholerae* の colonization に寄与すると共に CTX ファージの感染時にレセプターとして働くことが示されている。今回解析した 4 株中 3 株 (VNND_2013Sep_4SS、VNND_2013Jul_3SS、VNND_2013Jul_5SS) が *tcpA* 遺伝子を保有していた。*tcpA* の遺伝子型はこれまで 10 に分類されていた。本研究で同定した *tcpA* 領域の塩基配列は病原 01 株の保有する遺伝子型 4、8、9 とは異なっており、ZJ59 (中国分離株)、Mex-2058 (メキシコ分離株) と近縁であった (図 3)。以上の結果は環境中に生息する *V. cholerae* が多様性に富んだ *tcpA* 遺伝子を保有することを示し、*V. cholerae* の系統関係の詳細な解析にこの領域が有用である可能性を示唆すると考えている。非 01/0139 株 24 株の解析を現在進行中である。

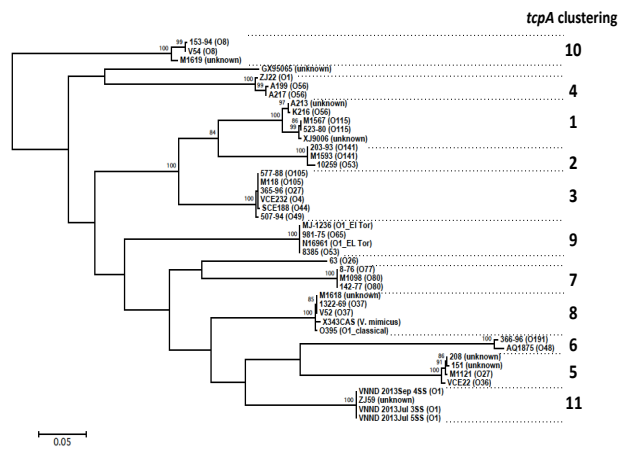


図 3 *tcpA* 遺伝子領域による系統解析

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 4 件)

① Okada K, Wongboot W, Chantaroj S, Natakuthung W, Roobthaisong A, Kamjumhol W, Maruyama F, Takemura T, Nakagawa I, Ohnishi M, Hamada S. *Vibrio cholerae* embraces two major evolutionary traits as revealed by targeted gene sequencing. *Sci Rep*、査読有、2018、26:8(1):1631.

doi: 10.1038/s41598-018-19995-7.

② Nguyen TH, Pham TD, Higa N, Iwashita H, Takemura T, Ohnishi M, Morita K, Yamashiro T. Analysis of *Vibrio* seventh pandemic island II and novel genomic islands in relation to attachment sequences among a wide variety of *Vibrio cholerae* strains. *Microbiol Immunol*、査読有、2018、62(3):150-157.

doi: 10.1111/1348-0421.12570.

③ Takemura T, Murase K, Maruyama F, Tran TL, Ota A, Nakagawa I, Nguyen DT, Ngo TC, Nguyen TH, Tokizawa A, Morita M, Ohnishi M, Nguyen BM, Yamashiro T. Genetic diversity of environmental *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Northern Vietnam. *Infect Genet Evol*、査読有、2017、54:146-151.

doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.017.

④ Imamura D, Morita M, Sekizuka T, Mizuno T, Takemura T, Yamashiro T, Chowdhury G, Pazhani GP, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Miyoshi SI, Kuroda M, Shinoda S, Ohnishi M. Comparative genome analysis of VSP-II and SNPs reveals heterogenic variation in contemporary strains of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Kolkata, India. *PLoS Negl Trop Dis*、2017、査読有、

11(2):e0005386.

doi: 10.1371/journal.pntd.0005386.

〔学会発表〕(計 2件)

① 竹村太地郎, 丸山史人, 大田篤, 村瀬一典,
森田昌, 滝沢木綿, 大西真, 山城哲
Whole genome analysis of *Vibrio cholerae*
isolated between 2007 and 2010 in Vietnam.
第91回日本細菌学会総会 (2018)

② 竹村太地郎, 丸山史人, 大田篤, 村瀬一
典, Nguyen Dong Tu, Cuong Ngo Tuan, Binh
Minh Nguyem, 森田昌知, 滝沢木綿, 大西真, 山
城哲
2007-2010年コレラ流行時におけるベトナム
分離コレラ菌株の全ゲノム解析
第51回ビブリオシンポジウム (2017)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹村 太地郎 (TAKEMURA, Taichiro)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 60572899

(2) 連携研究者

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 30423122