

平成30年6月11日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08489

研究課題名(和文) 高まん延多剤耐性結核菌株のゲノム解析による高病原因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of genomic characters specific for high-virulence multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

研究代表者

田丸 亜貴 (Tamaru, Aki)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主幹研究員

研究者番号：70270767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大阪での地域分子疫学の結果発見された高病原性多剤耐性結核菌V02群の遺伝的特性の解明を試みた。V02群株は113か所のV02群特異的非同義的変異を持っていた。これらの変異のある遺伝子のうち53個は機能が明らかであり、そのうち4個が病原性に関与する機能を有していた。4個の病原性関与遺伝子のうちpknI遺伝子のみが結核菌の増殖の抑制的制御機能を持っており、V02群株の病原性に寄与していると考えられた。結核菌臨床分離株200株についてpknI遺伝子の有無を調べたが、変異のあった2株は広く感染を起こしていない株であり、pknI遺伝子変異は結核菌全般の感染性の強さには寄与していないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found a peculiar genotype, named V02, accounted for 12% of analyzed MDR-Mtb and consisted of only MDR-Mtb from genotyping analysis of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Since the genotype could be considered spreading MDR-Mtb in widely, we identified single nucleotide variants (SNVs) of 15 Mtb isolates belonging V02 genotype by genome wide mapping using Illumina-based short reads. By comparison between the 15 Mtb isolates and outgroup strains, 113 nonsynonymous SNVs were identified as specific to V02 isolates. Four genes with V02 specific SNPs concerned with the biological process of virulence of Mtb. Of 4 genes concerning with virulence, only pknI, reported to regulate the virulence of Mtb, Therefore, the mutation in pknI gene of Mtb belonging V02 genotype might contribute to the high spread of this genotype.

研究分野：細菌学

キーワード：多剤耐性結核菌 SNPs解析 ゲノム比較

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

1. 研究開始当初の背景

大阪府内の多剤耐性結核菌の地域分子疫学の結果、同一遺伝子型かつ各薬剤耐性遺伝子変異も一致する多剤耐性結核菌株のみで構成される大きな同一遺伝子型結核菌群 V02 群を発見した(1)。V02 群株は初回感染患者からも分離されており、多剤耐性化した後に感染拡大している株である。薬剤耐性化という菌にとってフィットネスコストを増大する変異を持ちながら、感染・発症を起こしている V02 群株は多剤耐性結核菌のなかでも感染性が高い菌株といえる。したがって、V02 群株の遺伝子変異を解析することにより、感染性の差の原因となる遺伝子変異を特定し、結核菌臨床分離株の感染性を診断するツールとして用いることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

高病原性と考えられる多剤耐性結核菌 V02 群株をゲノム解析し、他の複数の結核ゲノム配列と比較することにより特異的遺伝子変異を検出し、その変異を過去の大規模結核集団感染原因株や多発性広域感染株など分子疫学的に感染性が高いと疑われる

菌株と比べることにより、結核菌感染性マーカーとなりうる遺伝子あるいは遺伝子変異を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

V02 群結核菌株のゲノム配列と Table 1 に挙げる菌株について次世代シーケンサーにより全ゲノムリードを取得し、オンライン上の結核菌標準菌株 H37Rv や Beijing 系統株も加えて比較し、V02 群株に共通して、他の株にはみられない遺伝子変異のうち、アミノ酸変異を生じる非同義変異 (V02 群特異的変異) を抽出した。V02 群特異的変異のある遺伝子について、アミノ酸データベース UniProtKB 等を用いて機能を調べ、V02 群株の高病原性に関与しうる変異の候補 (感染性マーカーの候補変異) を特定した。感染性マーカーの候補変異については、大阪府結核菌地域分子疫学データベースから選択した大規模集団感染株、多発性広域発生株、単独株など種々の背景を持つ結核菌株での同変異の有無をダイレクトシーケンスで調査し、感染性マーカーの候補変異の有無と結核感染性との関連を調べた。

Table 1. *M. tuberculosis* isolates analyzed in this study.

VNTR genotype	Number of Mtb isolates*	Number of alleles in the MIRU-VNTR loc																								Cluster size in 4009 Mtb isolates**			
		V424	M10	V955	V2074	Q17b	V2372	M26	V2355	M31	Q33a	Q26	V4156	Q11a	ETR.A	Q412b	M4	M16	M40	V2401	V3690	ETR.C	Q1895	M23	M27		M39	ETR.F	
V02	15	4	1	3	2	7	5	7	4	5	7	8	5	9	4	10	2	3	4	4	3	4	4	4	8	3	2	3	19 (all MDR Mtb)
M02	2	4	3	3	3	1	4	7	4	5	5	7	4	8	2	9	3	3	3	2	3	4	4	5	3	3	3	4 (3: MDR, 1: sensitive)	
OM-V12	2	3	3	3	4	7	4	7	5	5	7	2	5	8	4	9	2	4	3	4	3	4	2	5	3	3	3	15 (3: MDR, 12: sensitive)	
OM-V03	4	2	3	3	3	6	4	7	2	5	10	8	4	>25	4	4	2	3	3	4	2	4	4	5	3	3	3a	8 (5: MDR, 2: INH+SM+PAS R)	
OM-V06	2	4	3	4	3	4	4	7	4	5	7	8	3	5	3	8	2	3	3	4	3	4	4	5	3	3	3	2 (Both MDR)	
OM-V32	1	4	3	4	3	8	4	7	4	5	7	8	3	8	4	9	2	3	3	4	3	4	4	5	3	3	3	33 (3: MDR, 2: INH, SM, EB R, 28: SM R)	

* Number of Mtb isolates analyzed in this study.

** Number of Mtb isolates genotyped by VNTR in OHP

Table 3. The 4 genes concerning with virulence of Mtb Isolates belonging to V02 genotype

NC_000962 (Gene)	Protein	Annotation score	Functions	Disruption phenotype
Rv1410c	Probable triacylglyceride transporter Rv1410c	4 Experimental evidence at protein level	pathogenesis, response to antibiotic, transmembrane transport	Disruption of this gene leads to increased levels of many triacylglyceride alkylforms. Cells grow more slowly on lipid carbon sources, conditions thought to mimic infection, and grow more slowly in infected mice.
Rv0015c	serine/threonine-protein kinase PknA	5 Experimental evidence at protein level	pathogenesis, Virulence, growth	PknA depletion in <i>M.tuberculosis</i> results in cell death and aberrant cell morphology, and leads to complete clearance of the pathogen from the host tissues using the murine infection model.
Rv2914c	Serine/threonine-protein kinase PknI	5 Experimental evidence at protein level	Virulence, pathogenesis, protein autophosphorylation, regulation of growth rate	Mutants show increased growth within macrophages and a hypervirulence phenotype in severe combined immunodeficiency mice.
Rv0981	Response regulator MprA	5 Experimental evidence at protein level	Virulence, Stress response, Transcription regulation, Two-component regulatory system,	Not described (MprA is member of the two-component regulatory system MprB/MprA which contributes to maintaining a balance among several systems involved in stress resistance and is required for establishment and maintenance of persistent infection in the host)

4. 研究成果

02 群株と他遺伝子型群との遺伝子比較：V02 群株は 113 か所の V02 群特異的変異を持っていた。V02 群特異的変異のある遺伝子について、アミノ酸データベース UniProtKB にて機能を調べた結果、53 個について機能が明らかになった (Table 2)。

感染性マーカーの候補遺伝子について：V02 群特異的変異で機能が明らかな 53 個のうち、結核菌の増殖に關与する遺伝子が 16 個あり、そのうち 4 個が病原性に關与する機能を有していた (Table 3)。4 個の病原性關与遺伝子のうち *pknI* 遺伝子のみが結核菌の増殖の抑制制御機能を持っており、*pknI* 遺伝子変異により、酸性状態での結核菌の増殖増加、マクロファージ内での結核菌増殖の増加、免疫低下マウスに対する hypervirulence 化が報告されている。これらの結果から、V02 群特異的変異のうち、*pknI* 遺伝子変異が V02 群株の高い感染性に寄与している可能性あると考えられた。

Table 2. The functions of genes which the V02 specific nonsynonymous SNVs located on.

Main Functions	Number of genes
Growth, virulence or pathogenesis,	16
Metabolism of lipid, protein, carbohydrate or other substance	14
Transcription regulation	7
Transport	7
Drug metabolic process	2
Nucleotide biosynthetic process	2
Others (ATP synthesis, Iron storage et al)	4
Total	52

そこで、*pknI* 遺伝子を増幅するプライマーを作成し (Mtb *pknI* 2 F: 5' - TCGGGGTATCAGGAATCGT, Mtb *pknI* 2 R: 5' - TGAGGAAGCGTATGTCGTCG, Mtb *pknI* 3 F: 5' - GTCGACGACATACGCTTCCT, Mtb *pknI* 3 R: 5' - CGATTTCAACGGGAGACCGA) 2016 年 4~10 月に当所で VNTR 型別を実施した結核菌臨床分離株 200 株について、*pknI* 遺伝子上の変異の有無をダイレクトシーケンス法により調べた。その結果、200 株中 2 株に *pknI* 遺伝子変異がみられ、変異の位置は V02 群株と同じ (NP_217430.1:p.Leu156Met) であった。変異のあった 2 株のうち一株は当所の結核菌 VNTR データベース (4000 株以上の結核菌 VNTR 型を登録している) で同一 VNTR 型のない株であり、もう一株は同一 VNTR 型の株が 1 株あったが、同一患者由来の株であった。すなわち、*pknI* 遺伝子のあった結核菌 2 株は大規模な感染を引き起こしていない株であった。この結果から、*pknI* 遺伝子変異は V02 群株においてはなんらかの役割を持っているかもしれないが、*pknI* 遺伝子変異がすべての結核菌に高病原性をもたらすわけではないと考えられた。V02 群株特異的変異のある遺伝子で機能が判明しているもののうち、*pknI* 遺

伝子遺伝子以外にも発育や結核菌の機能を抑制制御するものが複数あるので、それらの遺伝子の変異について、今後調査していく予定である。

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)

1. A New Screen for Tuberculosis Drug Candidates Utilizing a Luciferase-Expressing Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin. Ozeki Y, Igarashi M, Doe M, Tamaru A, Kinoshita N, Ogura Y, Iwamoto T, Sawa R, Umekita M, Enany S, Nishiuchi Y, Osada-Oka M, Hayashi T, Niki M, Tateishi Y, Hatano M, Matsumoto S. PLoS One. 10(11):e0141658, 2015. (査読あり)
2. Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation. Seto J, Wada T, Iwamoto T. Tamaru A, Maeda S, Yamamoto K, Hase A, Murakami K, Maeda E, Oishi A, Migita Y, Yamamoto T, Ahiko T. Infect Genet Evol. 35:82-8, 2015. (査読あり)
3. Clonality and Micro-Diversity of a Nationwide Spreading Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Seto J, Ahiko T, Yamamoto K, Hase A, Maeda S, Yamamoto T. PLoS One. 2015 Mar 3;10(3):e0118495. (査読あり)
4. 西内由紀子, 田丸亜貴, 戸谷孝洋: 抗酸菌およびそのバイオフィルムに対する次亜塩素酸ナトリウムと二酸化塩素ガス溶

存液の殺菌効果，日本環境感染学会誌，
30巻4号，243-248（2015）。

（計4件）

〔学会発表〕

1. Aki Tamaru, Takayuki Wada, Shiomi Yoshida, Takanori Kooriyama, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki, Toshio Tsubota ; Genetic Feature of *Mycobacterium bovis* Isolated from Japanese Sika Deer (*Cervus nippon centralis*) in Zoological Garden in Osaka. 8th Asian Society of Conservation medicine Meeting, Myanmar (2015)
2. 田丸亜貴：結核分子疫学調査からの院内コンタミネーション発見事例，第74回日本公衆衛生学会総会，長崎（2015）
3. 田丸亜貴、木下優、谷掛千里：大阪府の結核菌分子疫学データベース構築による若年者の結核感染拡大防止への取り組み，第75回日本公衆衛生学会総会，大阪（2016）
4. 和田圭司、田丸亜貴：地域における結核菌の遺伝子型別分析データに基づく結核対策について、第76回日本公衆衛生学会総会、鹿児島（2017）
5. 田丸亜貴：当所における外国人由来結核菌株の分子疫学、第76回日本公衆衛生学会総会、鹿児島（2017）
6. Aki Tamaru, Takayuki Wada, Soukichi Matsumoto, Tomotada Iwamoto : Whole-Genome Sequencing Analysis of Genotype Specific in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Osaka Prefecture,

Japan. The 52nd US-Japan Mycobacteria Panel Meeting 2018 in Niigata, Japan, 新潟（2017）

（計6件）

〔図書〕なし（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況 なし（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（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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田丸亜貴 (TAMARU, Aki)
大阪健康安全基盤研究所 微生物部 細菌課 主幹研究員
研究者番号：70270767

(2)研究分担者

和田崇之 (WADA, Takayuki)
長崎大学熱帯医学研究所 准教授
研究者番号：70332450

松本壮吉 (MATSUMOTO, Soukichi)
新潟大学医学部 細菌学 教授
研究者番号：30244073

金子幸弘 (KANEKO, Yukihiro)
大阪市立大学医学系研究科細菌学 教授
研究者番号：90469958

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()