

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15137

研究課題名(和文)梅毒トレポネーマのゲノム情報基盤の構築と分子型別法の開発

研究課題名(英文) Genome analysis of *Treponema pallidum* and development of molecular typing method

研究代表者

大西 真 (Ohnishi, Makoto)

国立感染症研究所・細菌第一部・部長

研究者番号：10233214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：176例の梅毒疑い患者の皮膚潰瘍病変等を解析しT. pallidum DNA陽性82検体を得た。そのうち53検体はT. pallidum型別可能であった。14d/fで(30/53, 56.6%)が高頻度型であった。GenomiPhiおよびSureSelectカスタムキャプチャライブラリを用いてT. pallidum DNA増幅・濃縮を行った。GenomiPhiによるエラー導入は無視できることが確認した。梅毒DNA陽性検体を用いて、T. pallidum DNA増幅・濃縮後MiSeqでT. pallidumゲノム塩基配列の取得を試みた結果、11検体のうち9検体はな比較解析が可能であった。

研究成果の概要(英文)：In this study 82 *T. pallidum* DNA-positive samples were obtained. Among them, 53 specimens could be typed, resulting 14 d/f (30/53, 56.6%) was shown to be the most frequent. Using GenomiPhi genomic DNA amplification reagent and SureSelect custom capture library for *T. pallidum* DNA enrichment system. SureSelect was constructed by synthesizing RNA every 150 bp (75 bp overlapping) from the genome sequence information of *T. pallidum* Nichols strain. The error introduction by GenomiPhi was not found in this study. Thus, GenomiPhi amplification/SureSelect enrichment DNA were submitted to MiSeq. The coverage of the syphilis genome sequence from the 11 trial samples ranged from 0 to 1090. There were 4 specimens with coverage of 100 or less, 0, 16, 86, 97. Others showed coverage 211 ~ 1090, indicating that enough genomic information using GenomiPhi amplification and SureSelect enrichment.

研究分野：細菌学

キーワード：梅毒 *Treponema pallidum* Molecular typing genome analysis

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*) は *in vitro* 培養不能菌であるため、病原性、基本的生態等のすべての解析が、他の病原菌に比べて立ち遅れている。また、菌株分離が困難であり、ニコルス株をはじめ利用可能な *T. pallidum* 株は限られている。

Marra ら (J Infect Dis 2010 202: 1380-1388) により潰瘍部検から直接 *T. pallidum* の複数の多型遺伝子を PCR で増幅して解析する型別法が提案された。この型別法はニコルス株(1912年分離)など数十年以上に前に確立された菌株の情報を基盤に設計されている。

国内における梅毒患者報告数は増加傾向にあり、特に男性患者数の増加が示されている(感染症発生動向調査)。我々は感染症研究所内予算を利用して、潰瘍部検体中の *T. pallidum* の分子タイピングを実施し、国内株の実態把握を目指した。その結果、*T. pallidum* DNA を検出した 46 検体のうち 30 検体は分子型別が可能であった。そのうち 20 株は世界で最頻型とされる 14d/f と判定され、その他に 5 つの異なる型が検出された。ニコルス株は 14a/a と型別されるが、同一型に分類される検体は一つも存在しなかった。また、分子タイピングの解像度を示す多様性指数(1に近い値ほど解像度が高いことを示す)は 0.52 と通常要求される 0.95 には足りないことが示された。

2. 研究の目的

T. pallidum の分離培養を経ないゲノム解読スキームを確立する

現時点の流行型のゲノム情報を得ること
新規分子タイピング法を開発し、国内検体を再解析することでより詳細な菌株情報をえることを目的とする。

最終的には *T. pallidum* ゲノム情報基盤を構築することで、培養困難な病原細菌に対する新規アプローチとする。新規の分子タイピング法を確立し、より正確に梅毒の感染伝播の実態を把握することにつながる。

3. 研究の方法

(1) Marra らの分子タイピング法

皮膚潰瘍病変のswabを採取し TE 溶液に懸濁後、その一部を用いて *T. pallidum* 特異的遺伝子 *poIA* および *TpN47* を PCR 法で増幅した。*T. pallidum* 陽性検体は、*T. pallidum* の多型遺伝子 *arp*, *tpr*, *Tp0548* を PCR 増幅し、各遺伝子において考案されている型別を実施した。具体的には、それぞれ PCR 断片長、制限酵素切断パターン、塩基配列決定を実施した。

(2) *T. pallidum* ゲノムコピー数定量法:

tpp47 遺伝子をターゲットとする primer probe セットと ABI7500 analyzer を使用し、RT-PCR によって行った。サイクル等は

ABI7500 analyzer 標準サイクルに従った。検量線作成用に 10^8 Tp copy genome/ μ l - 10^2 Tp copy genome/ μ l の 10 倍濃度希釈系列物を同時に解析にかけて最近似直線を検量線とし、Ct 値を Tp copy number と対応させた。

(3) SureSelect(Agilent)カスタムキャプチャライブラリ

T. pallidum ニコルス株ゲノム配列情報から 150 bp 毎 (75 bp 重複) を作成した。

DNA 濃度 25 ng/ μ l に調整したサンプル 2 μ l (50ng) を出発材料として、SureSelect Target enrichment system (Agilent) のプロトコルに従い、断片化、ハイブリダイゼーションでの Tp ゲノムの選択濃縮、キャプチャー後インデックス付加 PCR を行なった。

最終サンプルを各サンプル最終濃度 4nM ずつとなるように希釈混合した混合サンプルをイルミナシーケンサーで解析した。

(4) genomiPhi による増幅

genomiPhi プロトコルに記された混合、サイクラーによる酵素反応法に従った。ただし、実験に供する DNA が漿液の綿棒吸物の PBS 懸濁サンプルであり、要求される出発 DNA 濃度、10ng/ μ l に到達しない場合が殆どであるため、濃度については制限を与えず解析に供与した。

(5) ゲノム解析

4. 研究成果

(1) 梅毒疑い皮膚病変検体の解析

176例の梅毒疑い患者の皮膚潰瘍病変等のswabを採取し、TE溶液に懸濁後、*T. pallidum* 特異的遺伝子 *poIA* および *TpN47* 遺伝子を PCR で増幅することで、*T. pallidum* DNA 陽性である 82 検体を得た。そのうち、*T. pallidum* の多型遺伝子 *arp*, *tpr*, *Tp0548* を標的とした型別方を実施し、53 検体は型別可能であった。もっとも高頻度であることが示されたのは 14d/f で (30/53, 56.6%) であった。

(2) 検体中の *T. pallidum* ゲノムコピー数

5 検体の *T. pallidum* 陽性検体を用いて検体中の *T. pallidum* ゲノムコピー数を求めた。各検体中の *T. pallidum* ゲノムコピー数は以下の通りとなった

	Copy number of <i>T. pallidum</i> genome
Specimen 1	643
Specimen 2	1,380
Specimen 3	4,870
Specimen 4	26,000
Specimen 5	155,000

(3) 非特異増幅と濃縮後のゲノムコピー数

検体中の *T. pallidum* ゲノムコピーからは直接検体から DNA を抽出して次世代シーケン

サーにて解析しても、十分なデータが得られないことが示唆された。そのため、まず Specimen 1 (1.55x10⁵ copy number/μl) を用いてパイロット実験を実施した。サンプル (DNA濃度 7.21ng/μl) 1 μl をgenomiPhiによる増幅に供し、増幅後 (20倍容量となる) サンプルのDNA定量と上記RT-PCRによるTp genome copy数評価を行った。増幅後濃度 121 ng/μl、増幅後genome copy数3.9x10⁷ *T. pallidum* copy number/μl の結果を得た。DNA総量として増幅率は16.8倍、*T. pallidum* ゲノムコピーベースでの増幅率は251倍となった。*T. pallidum* ゲノムコピー当たり増幅率が全体増幅率を上回り、増幅プロセスとしてgenomiPhiが有望であることがわかった。20倍容量増加を加味したNet増幅率はこの場合、ヒトを主とした*T. pallidum*以外由来DNA総量335.6倍、*T. pallidum*ゲノムコピーベースで5019倍と計算される。

(4) ゲノム解析

本研究では genomiPhiでの増幅エラー有無検証用に加えた*T. pallidum* ニコルス株ゲノムとそのgenomiPhi増幅サンプルのMiSeqショートリードを解析した。感染研で保管している*T. pallidum* ニコルス株からゲノムDNAを抽出し、genomiPhi増幅前後のDNAをSureSelect カスタムキャプチャライブラリに供した。その後MiSeq解析によってそれぞれ13,097,963および16,950,262のリードを回収した。ニコルス株ゲノム配列にマッピングしSNPを抽出した。ともにニコルス株ゲノム配列とはX箇所のSNPが認められたが、genomePhi増幅の有無によって異なるSNPは存在しなかった。このことはgenomePhiによって人工的なSNPが付加される可能性が低いことを示唆した。そこで、臨床検体11例のgenomiPhi増幅後、SureSelect カスタムキャプチャライブラリで濃縮して、MiSeqで解析しMiSeqショートリードを取得した。得られた*T. pallidum*ゲノム配列由来のリードは最小で962本、最高で5,403,574本であった。SNP解析が可能と考えられるCoverage 80以上を示したサンプルは9サンプル存在した。そのうち、7サンプルではCoverage 200を超えるリード数が得られた。本研究によって確立した手法で、約80% (9/11) の検体で検体から直接*T. pallidum*ゲノム比較解析が可能であることが示された。ニコルス株ゲノム配列解析結果を下記に示した。

Specimen	# of reads	Coverage
A	5,403,674	1090
B	2,651,421	519
C	2,523,441	503
D	2,045,695	401

E	1,289,662	272
F	1,329,362	265
G	1,049,457	211
H	520,402	97
I	257,528	86
J	83,427	16
K	942	0

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)

Ishikane M, Arima Y, Itoda I, Takahashi T, Yamagishi T, Matsui T, Sunagawa T, Oishi K, Ohnishi M. Responding to the syphilis outbreak in Japan: piloting a questionnaire to evaluate potential risk factors for incident syphilis infection among men who have sex with men in Tokyo, Japan, 2015. *Western Pac Surveill Response J.* 7, 36-39, 2016.

[学会発表](計 3件)

Itoda I, Hata J, Hayakawa K, Kutsuna SI, Kato Y, Nakayama SI, Morita-Ishihara T, Shimuta K, Ohnishi M. Clinical features of syphilis patients detected by polymerase chain reaction and molecular typing of *Treponema pallidum* at an urban community-based STI clinic in Japan. 19th IUSTI, Asia-Pacific. December 2016, Okayama, Japan

大西真 性感染症の最近の話題～急増する梅毒を中心に疫学、臨床、病理、予防、治療を学ぶ～ 福島県性感染症対策研修会、2017年3月 郡山市。

大西真 注目の性感染症-梅毒と淋菌感染症-平成 28 年度富山県臨床衛生検査研修会、2017年3月 富山市。

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等
特記なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 真 (Makoto Ohnishi)

国立感染症研究所 細菌第一部 部長

研究者番号：10233214