

令和元年5月28日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15686

研究課題名(和文) GWASを用いた腸管出血性大腸菌の志賀毒素産生調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of Shiga toxin production by GWAS in EHEC.

研究代表者

佐藤 光彦 (Sato, Mitsuhiro)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：30783013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌(EHEC)の重要な病原因子の一つである志賀毒素2(stx2)はファージにコードされている。EHECである0121のStx2ファージは遺伝的多様性が非常に低いにも関わらず、志賀毒素産生量には系統と独立な多様性が見られる。そこで染色体ゲノムからstx2産生量を制御する変異をゲノムワイド関連解析(GWAS)を用いて探索した。日本およびベルギーの59株に対してGWASを用いた結果、47の変異が候補として得られた。これらはすべて外来性因子に関連しており、0121のstx2産生量の調節には染色体ゲノムではなくその他のファージが関わっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

0157に代表される腸管出血性大腸菌において、その病原因子である志賀毒素の産生量を制御するメカニズムの一端を明らかにした。これは、ファージ内の遺伝的多様性が低くstx2産生量の多様性が高いという特徴をもつ0121と、ゲノム情報を大量に解読できる次世代シーケンサーに加えて、大量のゲノム情報から関連する領域を探索するゲノムワイド関連解析が組み合わさることによって初めて実現可能となった。さらなる詳細な研究やその他の腸管出血性大腸菌との比較によって、強毒化しやすい大腸菌の特徴を事前に検査することが可能となり、その潜在的な危険性の評価が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Shiga toxin2 (Stx2), one of the major virulence factors of Enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC), is encoded by bacteriophage. Although the Stx2-encoding phage of the EHEC 0121 has a very low genetic diversity, the stx2 production level is variable independent on strains. Then, we searched the mutation which regulated the stx2 production level on the chromosome genome using genome-wide association study (GWAS). GWAS analysis in 59 strains from Japan and Belgium identified 47 mutations in the genome. All of these are annotated in mobile element genetic elements. It suggests that other phages, rather than chromosomal genomes, may be involved in regulating stx2 production level of 0121.

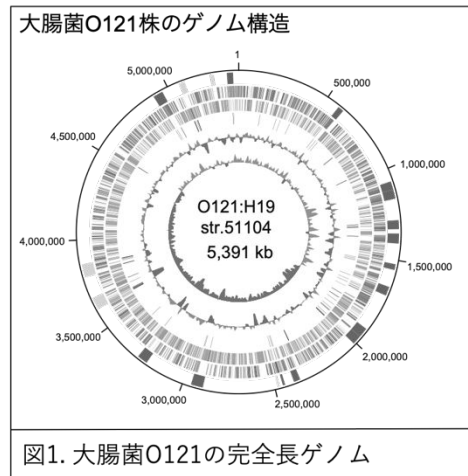
研究分野：進化生態学

キーワード：腸管出血性大腸菌 GWAS 志賀毒素 ゲノム

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

### 1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌(EHEC)は出血性大腸炎に加えて、溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症などの重篤な合併症を引き起こす。EHECの最も重要な病原因子の一つは志賀毒素(Stx)である。StxはStx1とStx2に分類され、それぞれに数種類のバリエーションが存在するが、いずれもファージにコードされている。また、Stx2を産生する菌株の方が重篤なEHEC感染症を惹起するリスクが高いと考えられている。代表的なEHECであるO157はStx1とStx2のいずれかまたは両方を産生し、Stx2に関してはStx2aかStx2cのいずれかを産生する。Stx2cの産生量は非常に低いが、Stx2a産生量は菌株によって大きく異なる。Stx2aファージのサブタイプがStx2a産生量を規定する要素の一つであることが最近示されたが、同時に宿主菌ゲノムにもStx産生量を調節する因子がコードされている可能性が示唆されている。しかしその実体は不明である。一方、O157に次いで感染事例の多いEHECの一つであるO121でも同様にStx2産生量の多様性が見られるが、産生するStxはすべてStx2aタイプであり、各株のStx2aファージのサブタイプもほぼ同一であることが明らかにされている。この知見は、O121のStx2産生量は宿主菌ゲノム上の要因によって調節されていることを示唆する。



近年、次世代シーケンサーを用いて大量のゲノム情報を迅速に得られるようになり、大量の配列情報を解析するバイオインフォマティクスも急速に進歩している。大量のゲノム情報からある形質の原因となる遺伝子を検出する解析手法の一つに、ゲノムワイド関連解析(GWAS)がある。GWASとは表現型と統計的に有意に関連する一塩基多型(SNP)などをゲノムワイドに探索する手法であり、ヒト遺伝性疾患の責任遺伝子の探索など、様々な真核生物の研究で活用されている。しかし、細菌への応用は世界的にもまだ数例であり、その手法も確立しておらず発展途上である。GWASは多様性を示す特定の表現型と関連のある遺伝多型を検出する手法であるため、上記のO121はStx2産生量多様性を規定する遺伝子あるいはその変異を宿主ゲノムから網羅的に探索する上で理想的な対象である。

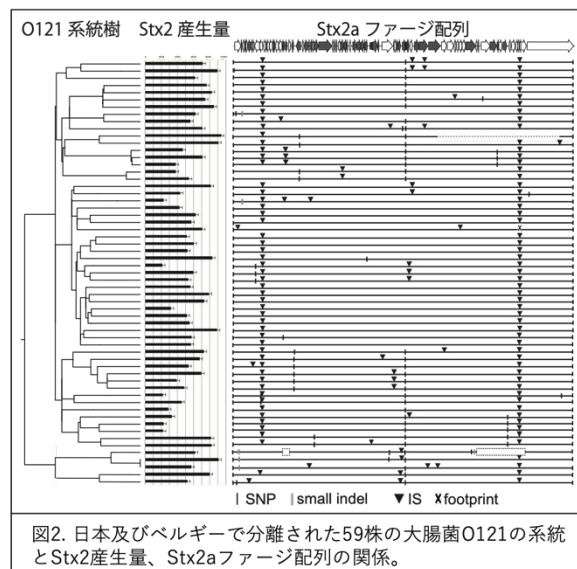
### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、細菌におけるGWAS解析の手法とパイプラインを確立し、これを用いてO121においてStx2産生量を規定する遺伝子を探索することを目的とした。病原因子であるStx2産生量調節機構の解明は、重篤になりうるEHECの評価やその対策に貢献する。

### 3. 研究の方法

#### (1) サンドイッチELISAによるStx2産生量の測定

Stx2産生量はこれまでに計測が完了していたが、そのデータについて株ごとに異なる増殖速度などわずかな条件によってStx2ファージが完全にインダクションされないことが判明したため、マイトマイシンCの濃度や処理時間などの条件を検討し、ファージが完全にインダクションされてStx2産生量が安定する条件で一定にして計測した。Stx2産生量として、マイトマイシンC処理によって細胞外にインダクションされる量をサンドイッチELISA法によって測定した。サンドイッチELISAには、Stx1には結合しないStx2特異的な抗体を用いることで、Stx1を含まない正確なStx2産生量を測定した。



#### (2) バクテリア用GWASパイプラインの構築

GWASによる表現型と有意に関連のある多型の特定は、その手法の登場後、様々な方法が実装されている。しかしながら、これらはヒトを中心とした二倍体でゲノムサイズの大きな生物を対象としており、バクテリアのように一倍体でゲノムサイズの小さな生物は想定していない。これらは組換えのメカニズムや頻度、同じ座位への複数回の変異の導入など、GWASによる多型の特定が困難となる要素であるが、ヒトをはじめとする二倍体生物では想定されない特徴であるため、バクテリアの特徴を考慮した専用のGWASパイプラインが必要となる。次世代シ

ークエンサーからの配列データをインプットとして、表現型と関連のある k-mer を特定し、そのアノテーションを推定するパイプラインを構築した。

### (3) O121 への GWAS の適用

すでに収集及び次世代シーケンサーによるシーケンスが終わっている 59 株の O121 の配列データと(1)で測定した Stx2 産生量を入力として用い、(2)で構築したバクテリア用 GWAS パイプラインによって Stx2 産生量と関連する k-mer 配列を検出した。O121 のゲノム配列とアノテーション情報から k-mer 配列を含む遺伝子を推定することで、宿主ゲノムがファージ内にコードされる Stx2 産生量を制御するメカニズムを推定した。

## 4. 研究成果

### (1) サンドイッチ ELISA による Stx2 産生量の測定

人為的なバリエーションの生じにくい条件を新たに検討するために、系統的に異なるクレードに属する代表 4 株に対して、マイトマイシン C の濃度や処理時間を変えて複数の条件で比較し、Stx2 ファージが完全にインダクションされていると考えられる条件を決定した。この新たな条件で Stx2 産生量を測定したところ、これまでの実験で計測した Stx2 産生量と同程度のバリエーションが見られた。当初の想定通り均一なサブタイプのファージから Stx2 産生量のバリエーションが見られたため、GWAS による宿主の染色体ゲノムからの Stx2 産生量調節領域の推定は可能であると考えられる。

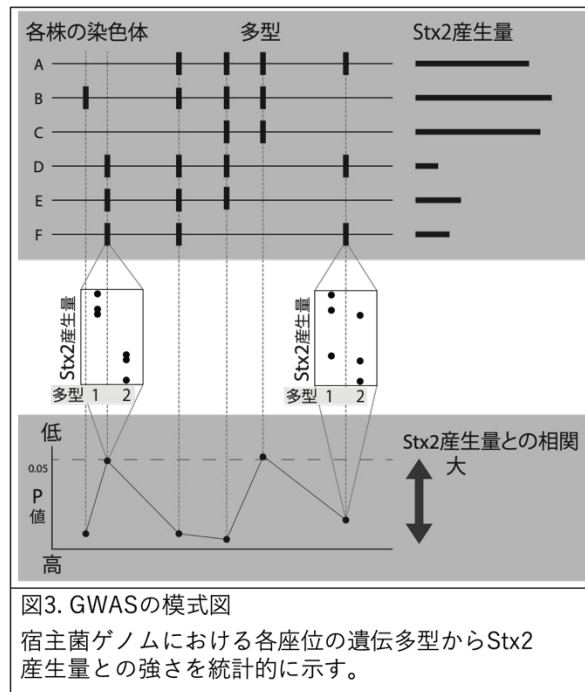
### (2) バクテリア用 GWAS パイプラインの構築

従来の GWAS では遺伝的多型として一塩基置換 (single nucleotide polymorphism; SNP) を用いていたが、本研究では数 bp の塩基配列のパターンである k-mer の有無を採用した。これによって、挿入や欠失、構造の変化などの多型も検出することが可能となった。この方法の特徴として、従来の GWAS ではゲノム中に少数しか存在しない SNP のみを用いるのに対してゲノム中からすべての数 bp の塩基配列のパターンを取得するため必要となる計算量が非常に多くなる。ゲノムサイズの大きな真核生物ではこのアルゴリズムは現実的ではないが、バクテリアほどの小さいゲノムサイズであれば現実的な時間で計算できた。

次世代シーケンサーによる配列データから効率的に GWAS による解析を行い、表現型と関連のある k-mer とその機能を推定するために既存のソフトウェアを交えてパイプラインを構築した。具体的には、アセンブルによるゲノムの再構築、k-mer の抽出とカウント、GWAS、k-mer の位置をゲノム上にマッピング、マッピングした位置およびその周辺の遺伝子を候補として取得、パンゲノム解析による使用した全株の遺伝子リストの作成、候補となる遺伝子の有無の確認、遺伝子内にあった場合は同義/非同義置換やフレームシフトの確認など一連の解析を簡便に実行できた。将来的にはこれらのパイプラインを公開することで、大腸菌に限らずどのようなバクテリアに対しても適用可能となる。

### (3) O121 への GWAS の適用

上述(1)の Stx2 産生量に対して(2)のパイプラインを適用することで、Stx2 産生量と相関のある k-mer を検出した。幅広い遺伝子を探索しつつ偽陽性を排除するために複数の閾値で検討、比較したところ、最も厳しい基準では 47 の k-mer が得られた。検出されたすべての k-mer のゲノム上の位置情報とアノテーションから候補となる遺伝子の機能を取得したところ、これらの k-mer をもつ遺伝子はすべてインテグラーゼや IE (insertion elements) など外来性と考えられる因子に関連する領域であった。次に厳しい基準では Stx2 産生量と相関のあった k-mer は 242 検出された。これらの k-mer がもつ遺伝子の機能を調べたところ、同様にそのほとんどが外来性因子であり、特にファージを構成する遺伝子が多く含まれていた。現在のデータセットとパイプラインでは宿主菌由来の染色体ゲノムからは Stx2 産生量の制御に関わる領域を見つけることはできなかったが、一方で Stx2 産生量に Stx2 ファージ以外のファージやその他の外来性因子が関わっている可能性が示唆された。今後は、サンプル数を増やすことでより精度の高い GWAS を行っていくことに加え、O121 以外の EHEC である O157 などでも同様に、Stx2 ファージの挿入部位やサブタイプが均一であるサンプルセットでの外来性因子の影響を検討していく。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

西田 留梨子、中村 佳司、佐藤 光彦、村瀬 一典、後藤 恭宏、大岡 唯祐、伊豫田 淳、大西 真、小椋 義俊、林 哲也 腸管出血性大腸菌 O121:H19 のゲノム多様性と Stx2 産生量の菌株間バリエーション 第91回日本細菌学会 2018年3月27日~29日 福岡

小野 友行、佐藤 光彦、中村 佳司、後藤 恭宏、西田 梨留子、井口 純、後藤 直正、伊藤 武彦、小椋 義俊、林 哲也 *Serratia marcescens* の多様性:ゲノム配列に基づいた大規模かつ高精度な系統解析 第71回細菌学会九州支部総会 2018年9月7日~8日 福岡

小野 友行、佐藤 光彦、中村 佳司、後藤 恭宏、西田 梨留子、井口 純、後藤 直正、伊藤 武彦、小椋 義俊、林 哲也 *Serratia marcescens* の大規模比較ゲノム解析 第92回細菌学会総会 2019年4月23日~25日 札幌

有水 遥子、勢戸 和子、磯部 順子、桐野 有美、佐藤 光彦、中村 佳司、後藤 恭宏、林 哲也、小椋 義俊 Stx2 を産生する Cryptic *Escherichia* clade I の潜在的病原性の解明 第92回細菌学会総会 2019年4月23日~25日 札幌

〔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

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：林 哲也

ローマ字氏名：Tetsuya Hayashi

研究協力者氏名：小椋 義俊

ローマ字氏名：Yoshitoshi Ogura

研究協力者氏名：後藤恭宏

ローマ字氏名：Yasuhiro Gotoh

研究協力者氏名：中村 佳司

ローマ字氏名：Keiji Nakamura

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。