

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07126

研究課題名（和文）コレラ流行株の大規模ゲノム領域重複メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the increased large genomic regions in *Vibrio cholerae* epidemic strains

研究代表者

今村 大輔 (Imamura, Daisuke)

法政大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70454650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：コレラはコレラ菌によって引き起こされる急性の下痢症であり、現在は発展途上国を中心として第7次パンデミックが猛威を奮っている。本研究ではパンデミックを起こしているコレラ菌の一部では、ゲノムの中に著しく増加している領域があることを発見し、そのメカニズムを解析した。その結果、近年のコレラ流行株は、コレラ毒素をコードしている遺伝領域（CTXファージ）の複製能を失っていることや、CTXファージによってゲノム領域の増加が起こっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、コレラは第7次パンデミックが猛威を奮っており、発展途上国を中心として多くの犠牲者を出している。パンデミックが流行を継続している原因の一つとして、コレラ菌が継続的に変化し、常に新たなコレラ菌が流行していることが考えられる。本研究では、近年のコレラ流行株は、コレラ毒素遺伝子を持つCTXファージが複製能を失っていることや、CTXファージによってコレラ菌のゲノム領域の増加が起こっている可能性が示された。これは、パンデミックの伝播様式を変化させ、コレラ菌の性質を大きく変える可能性があり、パンデミックを理解する上で重要な知見となった。

研究成果の概要（英文）：Cholera is an acute diarrheal disease and remains a major threat to health, particularly in developing countries. It is caused by pathogenic strains of *Vibrio cholerae* generated by the lysogenization of filamentous cholera toxin phage CTX. We found that *V. cholerae* epidemic strains possess increased genomic regions. The analysis revealed that recent isolates were defective in replicating the CTX prophage genome but instead it was suggested to be involved in the increased host's genome regions.

研究分野：遺伝学 分子生物学 細菌学

キーワード：コレラ パンデミック ゲノム *Vibrio cholerae*

### 1. 研究開始当初の背景

コレラは現在も世界中の多くの地域で重要な問題であり、年間に130万～400万人のコレラ患者が発生し、およそ10万人がコレラによって亡くなっている (Ali et al. PLoS-NTD 2015 9:e0003832)。歴史上、コレラは7回の世界的流行 (パンデミック) を起こしているが、第1次から第6次パンデミックはベンガル地方から発生した。第7次パンデミックに関しても、主に3回の大きな波となって世界中に広まっているが、その全てがベンガル地方から伝播していることが報告された (Mutreja et al. Nature 2011 477:462-465.)。したがって、ベンガル地方は常にコレラパンデミックの震源地であり、この地域で流行しているコレラ菌の変化を詳細に把握することは、パンデミック全体を理解し、その制圧を目指す上で重要である。

そこで私たちは、2007年から2014年までにベンガル地方のコルカタ市でコレラ患者から分離されたコレラ菌を、毎年10株ずつランダムにピックアップし、計80株の全ゲノム解析を行った。その結果、コレラ臨床分離株の一部はVSP-IIと呼ばれるゲノム領域を欠損していることを発見し、VSP-II欠損と流行株の変遷について報告した (Imamura et al. PLoS-NTD 2017 11:e0005386)。一方、このゲノム解析の過程で、一部の株ではゲノム中の大規模な領域が増加していることが示唆された (図1)。さらに、この増加しているゲノム領域は株によって異なっており、各株に固有の増加領域を有していた。従来、コレラ菌は病原遺伝子の有無や、その遺伝型を指標にモニターされており、このようなゲノム領域の大規模

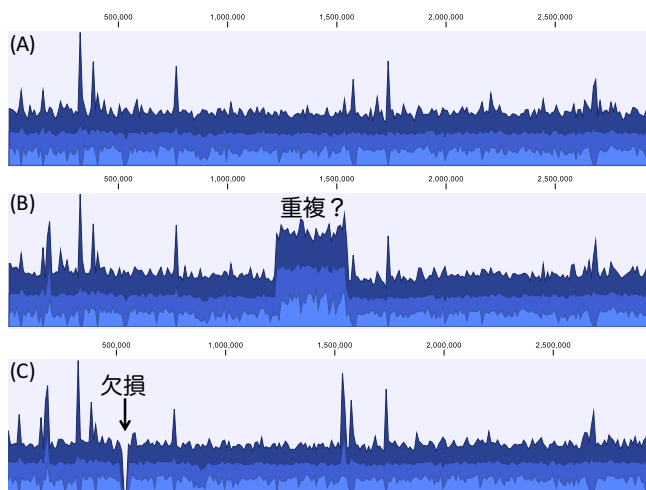


図1 リード配列の参照ゲノムへのマッピング  
縦軸：リード数 (シークエンスされた回数)、横軸：参照株の第一染色体配列2.96Mbp。参照株のゲノム配列と大規模な差がない株では平均的なマッピングになるが(A)、一部の株では重複(B)や欠損(C)が見られた。

な変化が頻繁に起こっていることは知られていない。しかし、ゲノム領域の増加は、病原遺伝子のコピー数や多様性、そして、菌株の性状に大きく影響する。また、このような変化は、コレラ菌だけでなく様々な細菌で発生し、進化や感染症の流行に影響している可能性がある。そのため、このゲノム領域の増加様式やメカニズムを理解することは、コレラパンデミックの全体像を明らかにし、さらに、病原性細菌の進化や感染症の流行メカニズムに関する知見を得る上で重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

近年、全ゲノム配列解析は身近な技術となり、様々な研究に用いられている。感染症研究においても、病原体の地理的な分布や由来の理解に大きな成果を上げている (Hu et al. PNAS 2016 113:E7730-E7739)。しかし、定点における病原体の推移を長期間に渡って調査した例はあまりなく、本研究は、コレラ流行の体系的な理解に貢献する。また、従来、コレラ流行株の推移は、抗原型や病原遺伝子の遺伝型を指標としてモニターされてきた。しかし、本研究で、大規模なゲノム領域の増加様式を解析することにより、これまで知られていないコレラ流行株の推移に関する知見が得られる。そして、これはコレラパンデミックの全体像を理解する上で欠かせない情報であり、将来的なコレラ制圧に貢献できる。また、これまで細菌の大規模ゲノム領域の増加と病原性との関係については、あまり解析がなされていない。しかし、大規模ゲノム領域の増加は、病原遺伝子のコピー数を増やすだけでなく、余分な遺伝子は自由に変化して新たな機能を持つことが可能になるため、進化上、重要な意味がある。したがって、染色体領域の増加が、病原性や流行の傾向に影響を与えている可能性は十分に考えられる。また、このような現象は、コレラ菌のみならず、様々な細菌の環境適応や進化にも関与していると考えられる。そこで本課題では、コレラ流行株におけるゲノム領域の増加メカニズムを解明することにより、感染症の流行や継続に関する有用な知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究で用いる株は、研究の開始前からドラフトゲノム配列が得られている。しかし、MiSeqを用いたショートリードの配列データであるため、各株のゲノム配列は100以上のContigに分断されている。特にゲノム上に複数コピーある配列は、その外にContigが伸長しないため、増加領域のコピー数や染色体上の位置に関する情報は得られていない。そこで、ロングリードのナ

ノボア DNA シークエンシング (Oxford Nanopore Technologies 社) を利用する。この方法は、装置が小型であるため大きな実験スペースを必要としないなどの利点があるが、最大の特徴は、リードの長さであり、イルミナ社の MiSeq が 150 bp 程度であるのに対し、ナノポアは 200 kbp 以上のリード長を得ることができる。そのため、完全な環状染色体と環状プラスミド配列を取得することが可能となる。シークエンサーの頻度は MiSeq よりも高く、SNP 解析などには MiSeq の方が適しているが、本研究で用いる株はすでに MiSeq によるドラフトゲノム配列が得られているため、シークエンサーは校正することができ、完全ゲノム配列を構築することができる。

ゲノム領域が増加した様式としては、いくつかの可能性が考えられ、そのメカニズムも、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、ICE (Integrative Conjugative Element) など、様々な可能性がある (図2)。完全ゲノム配列を構築することにより、染色体の部分的な増加は、プラスミドに乗っているのか、または、染色体上であった場合、第一染色体か第二染色体か、そして、その位置や向きが明らかになる。そこで、この増加領域の内部や周辺の配列から、染色体領域の増加に関与している可能性のある配列を探索する。例えば、ファージやプラスミド由来の領域や、Transposase、Integrase、Recombinase などが候補となる。これらの外来配列から、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、ICE など、どのような機構で染色体の部分増加が起こったのかを推定する。

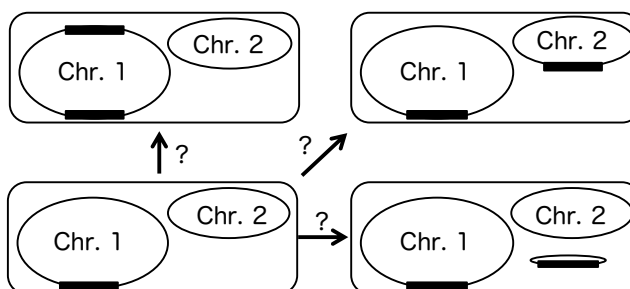


図2 染色体重複様式の可能性

コレラ菌は大小、2つの染色体(Chr. 1とChr. 2)を有している(左下)。重複領域(黒)は同じ染色体上(左上)、別の染色体上(右上)、染色体外(右下)などに重複している可能性がある。

#### 4. 研究成果

本課題では、コレラ流行株特異的に起こっている大規模なゲノム領域の増加について、その原因を明らかにすることを目的として解析を行なった。コレラの流行地域であるインドのコルカタで、コレラ患者から分離したコレラ菌のゲノム解析を行ったところ、一部の株では著しく増加したゲノム領域が見られたが、その増加様式やメカニズムに関する知見は不明であった。そこで、ロングリードのゲノム解析によって完全ゲノム配列を構築したところ、第一染色体に7箇所、第二染色体に4箇所の構造多様性が見つかった(図3)。しかし、増加領域の重複などは起こって

いなかった(Ochi et al. mSphere 2021 6:e0033721)。また、増加の観察された0.4 Mbに渡る領域が環状化していることが明らかになったものの、この領域の切り出しは起こっていなかった。そのため、ゲノム領域の増加は、染色体上の重複ではなく、コレラ菌のコレラ毒素をコードしているCTXΦファージの複製メカニズムであるRolling Circle Replication(RCR)による複製の可能性があると考えた。RCRでは、ファージゲノムの切り出しは起こらずに、ニックの入った部位から複製される。増加ゲノム領域の環状化部位からも、RCRのニック部位のモチーフ配列が見つかった。これらの結果から、コレラ流行株の一部では、RCRによって染色体の大規模な領域が増加していることが示唆された。そこで、さらに5株の完全ゲノム配列を構築したところ、近年の流行株はいずれも、CTXΦ領域の構造が第7次パンデミック初期の流行株とは異なっていることを発見した。さらに、これによりプロファージゲノムを複製することができなくなっていた。これらの結果より、近年のコレラ流行株では、CTXΦプロファージゲノムの複製やファージ粒子の放出ができなくなっており、また、RCRによって頻繁に染色体領域の増加が起こっていることが示唆された。この現象はコレラ流行株の遺伝子組成を大きく変化させ、また、パンデミックの伝播様式を変えるものでもあるため、病原性やパンデミックの継続に対して大きな影響を与えているものと考えられる。

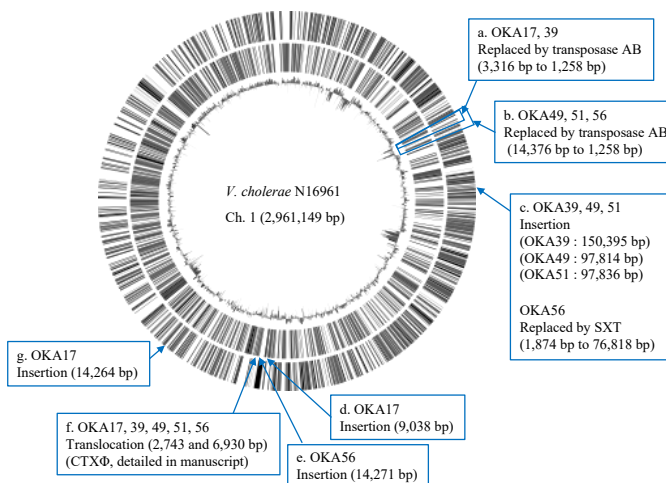


図3 コレラ流行株におけるゲノム構造の多様性

2,000 bp以上のゲノム構造多様性に限っても、第一染色体には7箇所の領域が見つかった(Ochi et al. mSphere 2021)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Samanta Prosenjit, Mandal Rahul Shubhra, Saha Rudra Narayan, Shaw Sreeja, Ghosh Priyanka, Dutta Shanta, Ghosh Amit, Imamura Daisuke, Morita Masatomo, Ohnishi Makoto, Ramamurthy Thandavarayan, Mukhopadhyay Asish Kumar	4. 巻 88
2. 論文標題 A Point Mutation in carR Is Involved in the Emergence of Polymyxin B-Sensitive Vibrio cholerae 01 El Tor Biotype by Influencing Gene Transcription	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00080-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00080-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Shota, Yoshikawa Miki, Imamura Daisuke, Abe Kimihiro, Eichenberger Patrick, Sato Tsutomu	4. 巻 23
2. 論文標題 Compatibility of Site-Specific Recombination Units between Mobile Genetic Elements	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100805 ~ 100805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.100805	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ochi Kaoru, Mizuno Tamaki, Samanta Prosenjit, Mukhopadhyay Asish K., Miyoshi Shin-ichi, Imamura Daisuke	4. 巻 6
2. 論文標題 Recent Vibrio cholerae 01 Epidemic Strains Are Unable To Replicate CTX Prophage Genome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00337-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00337-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Imamura Daisuke	4. 巻 39
2. 論文標題 Changes in Cholera Pandemic Strains Revealed by the Complete Genome Sequences Transmission route of the pandemic	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 19 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5803/jsfm.39.19	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Shota, Osada Sachie, Imamura Daisuke, Sato Tsutomu	4. 巻 in press
2. 論文標題 New Bacillus subtilis vector, pSS , as genetic tool for site-specific integration and excision of cloned DNA, and prophage elimination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2021.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 越智郁、水野環、三好伸一、佐藤勉、今村大輔
2. 発表標題 完全ゲノム配列によって明らかになったコレラ伝播様式の変化
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村大輔、水野環、三好伸一、佐藤勉
2. 発表標題 Rolling Circle Replicationによるコレラ流行株ゲノムの大規模重複
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村大輔、水野環、三好伸一、佐藤勉
2. 発表標題 コレラ流行株における大規模なゲノム領域の増加
3. 学会等名 第60回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村大輔, 水野環, 三好伸一, 佐藤勉
2. 発表標題 Rolling Circle Replicationによるコレラ流行株ゲノムの大規模重複
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越智郁, 水野環, 三好伸一, 佐藤勉, 今村大輔
2. 発表標題 近年のコレラ流行株はCTX プロファージゲノムを複製できない
3. 学会等名 第8回ファージ研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村大輔
2. 発表標題 完全ゲノム配列によるコレラ流行株変遷の新たな理解 -パンデミック伝播ルートの変化-
3. 学会等名 第42回日本食品微生物学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インド	NICED			