

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：83201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18923

研究課題名（和文）病原性細菌の新規遺伝子型別法の提唱

研究課題名（英文）Proposal of a novel genotyping method for pathogenic bacteria

研究代表者

安川 和志（Yasukawa, Kazuyuki）

富山県衛生研究所・化学部・主任研究員

研究者番号：00737835

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）：本研究では、ポリプリン/ポリピリミジン配列（PolyR）の三本鎖DNA形成予測式を開発した。そして、それを利用することで微生物の染色体DNA上に存在するPolyR配列から遺伝子型別に利用可能かつ三本鎖DNAの形成が容易な配列を効率良く選択することが可能となった。レジオネラ属菌をモデルに、染色体DNA上の24種類のPolyR配列を用いて遺伝子型別を行い、既存のSequence-based typing（SBT）法とin silicoによる比較を行った結果、本法の多様度指数（ $D = 0.989$ ）がSBT法（ $D = 0.981$ ）より優位である結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した三本鎖DNA形成温度を予測する式は、実験的にも機能することが確認できた。本技術は、選択した配列がどのような条件下で三本鎖DNAを形成するかをPC上で容易に確認できる。このことにより、精度の高い実験計画の立案から迅速な応用研究への展開まで幅広く活用可能であると考えられる。また、レジオネラ属菌をモデルに染色体DNA上の三本鎖DNA形成配列を解析することで、遺伝子型別が可能であることを示した。三本鎖DNAの形成は、熱変性を必要とせず二本鎖DNAの配列特異的に速やかに結合することから、三本鎖DNA形成を利用する新規遺伝子型別法は、迅速な分析法として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a formula for predicting polypurine/polypyrimidine (PolyR) triple-stranded DNA formation. Using this formula, it is possible to efficiently select sequences that can be genotyped and easily formed into triple-stranded DNA from PolyR sequences on the chromosomal DNA of microorganisms. Genotyping was performed using 24 different PolyR sequences on chromosomal DNA of Legionella species as a model, and the results were compared in silico with those of the conventional Sequence-based typing (SBT) method. As a result, the discrimination power ( $D$ ) of this typing method ( $D$  value of 0.989) is higher resolution to that of the SBT method ( $D$  value of 0.981).

研究分野：生物学

キーワード：遺伝子型別 三本鎖DNA レジオネラ菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌感染による食中毒や感染症等の発生時には、「起因菌の同定」と共に「菌株の型別」を実施する必要がある。すなわち、患者由来の菌株と推定感染経路・感染源から分離された菌株の同一性を確認する疫学調査を実施する必要がある。このことは、感染症の拡大防止の他、事後の感染症対策を検討するためにも非常に重要である。しかしながら、現在広く利用されている「パルスフィールド電気泳動法を代表とするフラグメント解析」や「Multi locus sequencing typing 法を代表とする遺伝子配列の解析」による型別法は、煩雑な操作を多く含み、菌株の単離培養後さらに2~4日程度要する。よって、より簡便で迅速な菌株の型別法の開発が、強く望まれている。

また、近年では、次世代シーケンサーの塩基解読速度の向上に伴い、菌株ゲノムの塩基多型を利用した型別法が盛んに研究なされているが、高度なバイオインフォマティクスの知識が必要とされ、学術領域の枠を超えてはいない。

以上の背景から、従来とは異なる原理の遺伝子型別方法論として、微生物の染色体 DNA 上に保存されているポリプリン/ポリピリミジン (PolyR) 配列に着目した。PolyR 配列は、その配列情報に依存して三本鎖となるポリヌクレオチドが結合し、三本鎖 DNA を形成することが知られている。例えば、二本鎖 DNA と DNA プローブによるハイブリダイゼーション法は、熱変性が必用であるのに対して、三本鎖 DNA の形成は二本鎖 DNA の熱変性を必要としないため、特別な機器を必要としない極めて迅速な分析法を開発できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、病原菌や食中毒菌の簡便で迅速な新規遺伝子型別法の提唱として、レジオネラ属菌をモデルに、染色体 DNA に保存されているポリプリン/ポリピリミジン (PolyR) 配列情報をベースとした三本鎖 DNA 形成を利用する菌株の遺伝子型別法の開発を目的とする。

しかし、ゲノム上から三本鎖 DNA の形成が可能な PolyR 配列を効率よく選択し他のゲノム情報と容易に比較検討する技術は存在しなかった。そこで、上記目的を達成するため、in silico による、ゲノム中から PolyR 配列を抽出し比較検討する方法を独自に開発している。この抽出法の最大の特徴は、三本鎖 DNA の形成温度 ( $T_m$  値) を予測して PolyR 配列を選定できることである。一方で、予測した三本鎖 DNA の形成温度が in vitro の実験系で確実に動作していることを評価する必要があった。そこで、予測した三本鎖 DNA の形成温度の妥当性を評価することも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 三本鎖 DNA の形成温度予測法の妥当性評価

##### (1-1) *MboII* 認識配列を含むモデル配列の増幅と精製

制限酵素 *MboII* 阻害実験に利用するモデル配列として *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 由来 Acetyl transferase 遺伝子 (1,983 bp) の部分配列 (1,104 bp) を増幅し利用した。PCR 増幅は、フォワードプライマー: 5'-AGGCGCATTAGTGGCATTGAA-3' およびリバースプライマー: 5'-ACCTCACGTAAGTTATTGGAGC-3' を用いた。目的の PCR 増幅断片は、アガロースゲル電気泳動後、ゲル抽出キット (ISOSPIN Agarose gel, 株式会社ニッポンジーン) の手順に従い精製した。

##### (1-2) 制限酵素 *MboII* 阻害実験

制限酵素阻害実験は、三本鎖 DNA 構造を形成させることで二本鎖 DNA 構造に対する制限酵素の結合を阻害するまたは、制限酵素の切断から回避する手法である。制限酵素 *MboII* 阻害実験は、以下の反応から成る。三本鎖 DNA 形成反応 (20  $\mu$ l) は、100 mM NaCl と 10 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中で 0.3 pmol PCR 増幅断片と対応する 30 pmol 三本鎖 DNA 形成オリゴ核酸 (TFO) を添加し、任意の温度で 1 時間反応後、0.8 U の *MboII* を反応液に直接添加し、20 時間反応させた後 10 x ローディング緩衝液で反応を止めた。その後、3% アガロースゲルを用い 50 V、100 分電気泳動し、*MboII* により生成した約 660 bp の DNA 断片を解析した。

#### (2) レジオネラ属菌由来 PolyR 配列のデータベースの作成と遺伝子型別法への応用

全ゲノム配列が解読されている *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 を参照株として、染色体 DNA に存在する 17 塩基長から成る PolyR 配列 (ポリプリン/ポリピリミジン塩基の任意の箇所に塩基ピリミジン/プリン塩基が含まれるものも含む) を抽出した結果、1,586 カ所 (1,572 配列パターン) が得られた。そして、病原性に関する遺伝子領域およびハウスキーピング遺伝子に含まれる PolyR 配列を選択した。そして、開発した三本鎖 DNA の形成を予測する技術を用いて 30 °C 以上で対象の PolyR 配列が三本鎖 DNA を形成すると予測された 56 配列パターンをレジオネラ属菌の遺伝子型別に利用可能な候補配列とした。SBT 法で遺伝子型が異なるレジオネラ属菌 (109 株) を中心に、その染色体 DNA 情報を Genbank より取得

し、候補とした 56 配列とマッチングさせた。得られた結果から、より少ない配列の種類でレジオネラ属菌の多様度指数が高くなるように最終候補配列を選択した。

(3) 三本鎖 DNA 形成を利用した PolyR 配列検出法の開発

三本鎖 DNA の形成反応 (10  $\mu$ l) は、100 mM NaCl と 10 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で二本鎖 DNA 断片と対応する三本鎖 DNA 形成モレキュラービーコン、そしてパドロックプローブ (PLP) を添加し、20°C で 1 時間反応させた。その後、2  $\mu$ l ライゲーションバッファーと 1  $\mu$ l Salt-T4 DNA Ligase を加え総量 20  $\mu$ l になるよう滅菌水を加え 20°C で 30 分反応させた後、2.25  $\mu$ l Phi29 DNA polymerase バッファー、1  $\mu$ l Phi29 DNA polymerase、3  $\mu$ l dNTP (10 mM each)、0.3  $\mu$ l DTT (100 mM)そしてチオフラビン T を加え総量 30  $\mu$ l になるよう滅菌水を加え 30°C で反応させた。経時的に波長 470nm のトランスイルミネーターで蛍光を観察した。

4. 研究成果

(1) 三本鎖 DNA の形成温度予測法の妥当性評価

モデル配列として PCR 増幅した 1,104 bp の断片は、21 bp の PolyR 配列に一つのミスマッチ塩基 (G-TA) を含む配列である。そこで、表 1 に示すように 15 bp からなる 7 種類の三本鎖 DNA 形成オリゴヌクレオチド (TFO1 ~ TFO7) を作成し、それぞれについて三本鎖 DNA 形成温度を予測し、制限酵素阻害実験を実施した (図 1)。結果として、三本鎖 DNA 形成の反応温度を 35°C から 20°C に段階的に下げていくことで、予測した三本鎖 DNA の形成温度と相関して制限酵素 *Mbo*II に対する阻害が強くなる結果が得られた。以上から、三本鎖 DNA の形成温度予測法は、*in vitro* の系で確実に動作していると考えられた。また、一般的に PolyR 配列に一つのミスマッチ塩基 (G-TA) を含むと三本鎖 DNA の形成効率が大きく低下するため研究の対象とは成り得なかったが、三本鎖 DNA の形成温度予測法を用いることで PolyR 配列に一つのミスマッチ塩基を含む配列についても三本鎖 DNA の形成を予測して活用することができる。

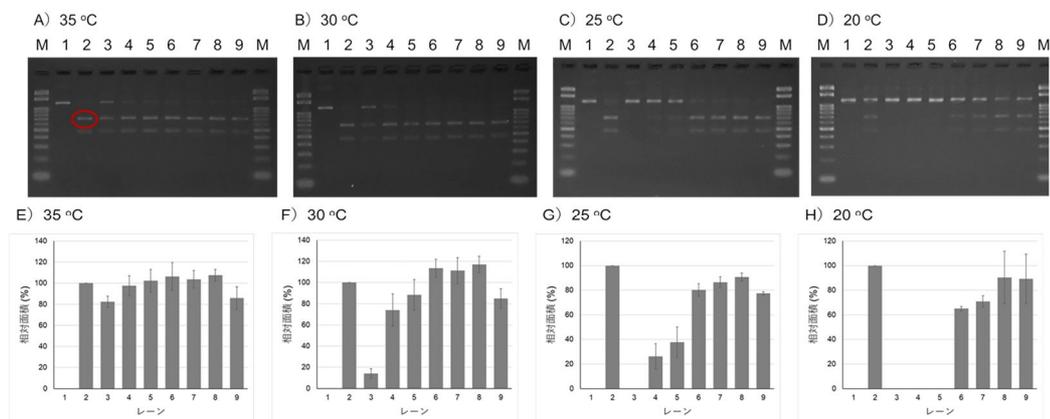


図 1. 制限酵素 *Mbo*II 阻害実験

A), B), C)そして D)の各温度におけるレーン 2 の *Mbo*II 制限酵素処理の生成物である約 660 bp のバンド(O)面積を 100%として各レーンにおける 660 bp のバンドを相対面積で算出した結果を E), F), G)そして H)に示した。

表 1. 三本鎖 DNA 形成オリゴヌクレオチド

レーン	<i>Mbo</i> II	Entry	TFO (5'→3')	予測 $T_{m3\rightarrow2}$
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	TFO1	AAGAGGAAGAATAAA	50.27
4	+	TFO2	AGAGGAAGAATAAAA	48.95
5	+	TFO3	GAGGAAGAATAAAAA	46.43
6	+	TFO4	AGGAAGAATAAAAAA	42.03
7	+	TFO5	GGAAGAATAAAAAAA	40.85
8	+	TFO6	GAAGAATAAAAAAAA	36.42
9	+	TFO7	AAGAATAAAAAAAG	32.86

TFO, 三本鎖DNA形成オリゴヌクレオチド; 下線は*Mbo*II認識サイト

- (2) レジオネラ属菌由来 PolyR 配列のデータベースの作成と遺伝子型別法への応用  
レジオネラ属菌をモデルに、染色体 DNA 上に存在する PolyR 配列を解析し、最終的に 24 種類の 17 塩基長から成る PolyR 配列を遺伝子型別に利用可能なデータセットとした。データセットに含まれる配列があれば“1”，なければ“0”のバイナリーデータとして遺伝子型を評価した。本法の遺伝子型別能力を評価するため、近年、レジオネラ属菌の遺伝子型別に利用されている Sequence-based typing (SBT) 法と *in silico* での比較を行った。事前に SBT 法で遺伝子型を解析し、なるべく遺伝子型が異なる 110 株のレジオネラ属菌を対象に評価した。その結果、本法の多様性指数 ( $D=0.989$ , 95% CI 0.985-0.994) は SBT 法 ( $D=0.981$ , 95% CI 0.968-0.994) より高くなった。また、SBT 法で類似性の高い遺伝子型の菌株は、本法でも近隣に存在することから、SBT 法と本法がある程度相関していることが示された。また、SBT 法で同一遺伝子型の ST36 は 2 種類の型、ST62 は 2 種類の型に細分化された。ST1 においては、4 種類に細分化されたが、細分化されたグループの一つが ST752 と同様の遺伝子型を示し、もう一つのグループは ST630 と ST486 と同じ遺伝子型であった。また、ST30, ST187, ST1999 は、本法では同一の型として評価された。細分化したい遺伝子型に着目しながら PolyR 配列のデータセットを構築することで、より利便性の高い手法になると考える。また、本法と SBT 法等の遺伝子型別の手法間の違いをさらに検討する必要がある。
- (3) 三本鎖 DNA 形成を利用した PolyR 配列検出法の開発  
PolyR 配列検出法として三本鎖 DNA 形成オリゴヌクレオチドのモレキュラービーコン (5'末端に Fam と 3'末端に BHQ1 を修飾) を作成し検出を試みたが、感度が低い問題点があった。そこで、新たに三本鎖 DNA 形成をトリガーとするライナーローリングサークル増幅法 (L-RCA) の開発を行った。本反応は、三本鎖 DNA を形成する反応、パドロックプロープ (PLP) の環化反応、そして Phi29 DNA polymerase による増幅反応の三段階からなる。PLP には、増幅と共にグアニン四重鎖 (G4) 構造を形成する配列がコードしてあるため、形成された G4 構造にインターカレータのチオフラビン T が結合することで蛍光を発する仕組みである。本法を用いることで、目的の PolyR 配列 (0.05 pmol/ $\mu$ l) を約 4 時間程度で検出することが可能であった。一方で、長時間の反応は、S/N 比の増加により感度の低下がみられたことから、改善の余地を残す結果となった。また、実用化を視野に入れると感度をさらに上げる必要がある。
- (4) まとめ  
PolyR 配列は、条件を整えば三本鎖となるオリゴヌクレオチド存在下、速やかに三本鎖 DNA を形成する魅力的な配列である。しかし、配列情報を含めどの様な条件下で三本鎖 DNA を形成するかは、予測が困難であった。今回、*in silico* による三本鎖 DNA の形成温度を予測する方法が *in vitro* の系でも確実に動作していることが確認できた。本技術を用いて染色体 DNA 上に存在する PolyR 配列から三本鎖 DNA を形成できる配列を容易にスクリーニングする方法を開発し、レジオネラ属菌をモデルに遺伝子型別法の開発に応用した。*in silico* において、本遺伝子型別法は SBT 法より高い菌株識別能力を示した。本研究では、PolyR 配列を実用化レベルの感度で検出する方法は、達成できなかったが、今後、高感度で PolyR 配列を検出できる系が開発されれば、本研究で提案する PolyR 配列を利用した遺伝子型別法は、簡便で迅速な方法になると考えている。また、二本鎖 DNA の融解温度を正確に予測することが可能となったことで、PCR や DNA プローブを用いたハイブリダイゼーション法が非常に容易に扱えるようになり広く発展してきたことから、三本鎖 DNA の形成温度が予測できることで、今後の基礎から応用研究の発展に広く貢献できる技術であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安川和志
2. 発表標題 微生物染色体DNA中のポリプリン/ポリピリミジン配列の解析と遺伝子型別への応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 安川和志、金谷潤一、綿引正則
2. 発表標題 三本鎖DNA形成条件の予測と応用研究
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 安川和志
2. 発表標題 ポリプリン-ポリピリミジン配列情報をベースとした新規遺伝子型別法
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------