

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0183

研究課題名（和文）腸管付着阻害剤開発を目指したインドにおける腸管病原体のゲノム調査

研究課題名（英文）Genomic survey of enteric pathogens in India for developing anti-adhesion therapies

研究代表者

飯田 哲也（Iida, Tetsuya）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：90221746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：メタゲノム解析の結果、インドのコルカタ市民の中には不顕性感染として腸内に少数のコレラ菌を保有している人がいることを確認した。不顕性感染を起こすコレラ菌の全ゲノム情報を効率的に取得するため、コレラゲノムを標的とするDNAプローブを作成した。
また、コレラ菌が腸管定着の際に菌体外に分泌する可溶性定着因子の輸送メカニズムを、複合体結晶構造と相互作用解析から明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られたメタゲノム情報は、コレラ菌の不顕性感染者がインドでのコレラの拡散や蔓延に関与していることを示している。本研究で設計開発したDNAプローブによって効率的に収集されるコレラ菌のゲノム情報と、腸管定着に関わる因子の構造情報をあわせることで、コレラ菌に対するワクチンや新規薬剤の開発が可能となり、将来的にはコレラの感染制御に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Metagenomic analysis revealed that some citizens of Kolkata have a small number of *V. cholerae* in their intestines as a subclinical infection. In order to efficiently obtain the whole genome sequences of *V. cholerae* that cause subclinical infection, we made DNA probes targeting the *V. cholerae* genome. In addition, the transport mechanism of soluble colonization factor secreted by *V. cholerae* was elucidated by the crystal structures and interaction analysis.

研究分野：細菌学

キーワード：コレラ メタゲノム解析 IV型線毛

1. 研究開始当初の背景

世界的に公衆衛生の改善による感染症の制御が進められているが、腸管感染症は未だに高齢者や乳幼児の死亡要因の上位にある。特に、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) が産生するコレラ毒素によって引き起こされるコレラは、激しい下痢症状を呈し、現在においても年間約 290 万人の感染と、約 10 万人の死亡が推定される代表的な腸管疾患である。コレラに対するワクチンが複数開発されているが、普及率が低く、死亡率の高い乳幼児には満足のいく効果が得られていない。また、抗生物質耐性株の出現も社会的問題となっている。本研究で対象とするインドは、現在も国内に多数のホットスポットが存在し、1817 年から始まったコレラの世界的アウトブレイクの発端としても知られる。故に、コレラの故郷とも称されるインドにおいて、現在の流行を調査し、分子・ゲノム疫学調査や、治療対策を実施することは急務の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、最大のコレラパンデミック発生地であるインドにおいて、便サンプルのメタゲノム解析を行い、流行もしくは今後流行する恐れのあるコレラ菌株をゲノムレベルで把握することである。最近の研究から、インド国内において不顕性感染が多く存在し、それが患者の封じ込めだけではコレラを制圧できない一因といわれている。そのため、コレラ菌数の少ないと予想される不顕性感染者便や環境サンプルからの効率的なコレラゲノム解析系の構築も重要となる。ゲノム情報レベルでの病原性や不顕性感染、また環境に存在するコレラ菌等のどのような因子が発症や腸管定着に関連するのか明らかにすることでコレラ制圧に向けた基盤情報を得る。

本研究の第二の目的は、流行株を含むコレラ菌の腸管定着機構を理解し、定着阻害剤開発に向けた基盤情報を得ることである。定着阻害剤は病原菌を殺さずに体外に排出することが可能であるため、抗生物質のような選択圧がかからず、耐性菌が出現しにくいと想定されている。本研究で取り組むコレラ菌の性状及び宿主定着機構の理解に基づいた定着阻害剤開発は、耐性菌を生み出さない新規のコレラ対策に繋がる可能性があり、抗生物質やワクチンによる治療が難しい乳幼児や高齢者も対象とした有望な治療法としてコレラ撲滅に大きく寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 下痢症患者便サンプルのメタゲノム解析

インド国内での下痢症患者からの検体採取は、コルカタ市にある、インド医学研究評議会 (Indian Council of Medical Research: ICMR) - 国立コレラ腸管感染症研究所 (National Institute of Cholera and Enteric Diseases: NICED) の Shanta Dutta 博士の協力のもと実施し、市内にある Beliaghata ID Hospital に入院した下痢症患者とコルカタ市内在住の健常者の便検体を収集した。便検体からの DNA および RNA の抽出は、それぞれ DNeasy PowerSoil DNA Kit および QIAamp MinElute Virus Spin Kit を用いて行った。抽出した RNA サンプルは DNaseI 処理後に逆転写することで cDNA を合成した。Nextera XT DNA Library Prep Kit を用いて、DNA サンプルと合成した cDNA サンプルの両方からメタゲノムショットガンライブラリーを構築した。シーケンスは HiSeq2500 を用いておこなった。得られたリードはトリミング後、Burrows-Wheeler Alignment ツールにより、バクテリアゲノムを含むデータベースを用いてマッピングを行った。

(2) コレラ菌が産生する定着因子群の機能・構造解析

本研究では、(1)のメタゲノム解析と並行して、コレラ菌の主要な定着因子の機能・構造解析を実施した。特に、コレラ毒素を産生するコレラ菌 O1 血清型 (*V. cholerae* O1) の主要な定着因子である毒素共発現線毛 (toxin co-regulated pilus: TCP)とマウスを用いた感染実験から近年同定された可溶性定着因子である TcpF について、等温滴定型熱量計や超遠心分析機などを用いた物理化学的手法による相互作用解析や、X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡などの構造生物学的手法を用いた立体構造決定を行い、ワクチンや定着阻害剤開発に資する定着因子の原子レベルでの立体構造情報を取得した。

4. 研究成果

(1) 下痢症患者便サンプルのメタゲノム解析

・下痢便サンプルを用いたメタゲノムショットガン解析

コレラ菌 O1 血清型が培養法で検出されコレラ患者と診断された 23 人の便サンプルのメタゲノム解析をおこなったところ、得られた細菌由来 DNA リードのうち、コレラ菌由来の DNA リードの割合は、便サンプルによって 0.003~38.337%と様々であった(図 1)。コレラ菌由来の DNA リードが非常に少ない検体を得られた患者の腸管内腔でコレラ菌の遺伝子が実際に発現していたか明らかとするために、サンプル中の RNA をメタゲノムシーケンス解析によって確かめた。その結果、DNA リードの解析でコレラ菌由来の遺伝子が少なかったサンプルでは、RNA リード量も少なかった。特に 2 つの便サンプルでは、全細菌 RNA に対するコレラ菌由来 RNA の比率が 0.038%と 0.236%と低かった。この 2 サンプルのメタゲノムデータを精査したところ、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) とサルモネラ菌 (*Salmonella enterica*) がコレラ菌由来のリードよりも多く検出されたことから、2 サンプルの患者は非コレラ菌感染による下痢症であり、コレラ菌が不顕性感染していたことが明らかとなった。次に、コレラ菌が分離されなかった 22 名の下痢症患者の便を同様に分析した結果、コレラ菌の不顕性感染と思われる症例が 3 例見つかった。これらの結果から、コルカタ市民の中には不顕性感染として腸内に少数のコレラ菌を保有している人がいることが予想された [1]。

以上の結果を踏まえ、サンプルの規模をさらに拡大する目的で、コレラ患者と診断された 47 人と健康人 234 人の便サンプルを新たに収集し、メタゲノム解析を実施したところ、同様に、健康人の糞便サンプルから毒素産生性コレラ菌 O1 血清型が検出された。これらの結果から、コルカタ市内では、不顕性感染としてコレラ菌が人々の間で絶えず拡散している可能性が示唆された。このような拡散が、この地域における慢性コレラ患者の発生に関連している可能性がある。

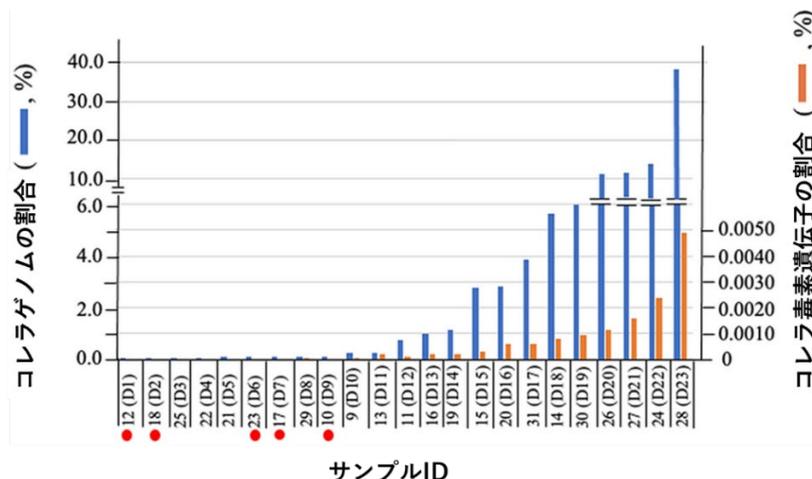


図 1. 全リードに対するコレラゲノム、コレラ毒素遺伝子の割合。文献[1]の図を改変。

・不顕性感染コレラ菌株の全ゲノム解析に向けた DNA プローブの設計と合成

不顕性感染を含むコレラ菌の感染に必要な定着因子を同定するためには、当該菌株の全ゲノム情報が必要である。これまでに、コレラ発症者の便サンプルから単利培養したコレラ菌株を使用し、詳細は現在解析中であるが、O1 血清型、O139 血清型のコレラ菌 20 株の全ゲノム解読に成功した。しかしながら、不顕性感染から採取した便サンプル中のコレラ菌は、菌数が著しく少なく、リード数が極端に少なくなるため、全ゲノム情報を得ることが困難である。この課題を克服するために、流行しているコレラ菌 El Tor 株 (C6706 株) のゲノム配列情報をもとにした、DNA プローブの設計と合成をおこなった。新規に開発したこの DNA プローブは、コレラゲノムを微量しか含まないサンプルから作成した DNA ライブラリに使用することで、特異的にコレラゲノムをハイブリダイゼーションし、今後、コレラ菌由来のリードの回収効率を向上させることが期待される。

(2) コレラ菌が産生する定着因子群の機能・構造解析

コレラ菌は、様々なタンパク質 (定着因子) 群の働きによって腸管に定着したのちにコロニーを形成し、毒素を産生することで腸管疾患を引き起こす。この定着過程が阻害されると、コレラ菌は病原性を発揮することなく、体外に排出される。このため、腸管定着に関わる因子は盛んに研究がされており、有望な創薬標的と考えられている。コレラ菌表面に形成される繊維状タンパク質である TCP は、その一例であり、その大部分を構成するピリンと呼ばれるサブユニットである TcpA、および先端部にのみ存在し、少数のみ発現するサブユニットである TcpB から構成される。近年の研究から、TCP はコレラ菌のコロニー形成に必須であるが、効率的な定着には可溶性定着因子である TcpF も必須因子であることが明らかになっており、それぞれワクチン抗原としても注目されているが [2]、両者の定着における役割は理解が進んでいない。

本研究では、コレラ菌 O1 血清型由来 TCP および TcpF について、物理化学的手法を用いた相互作用解析を実施し、可溶性の定着因子である TcpF が、菌外に伸長した TCP の先端部に存在する TcpB と 3 : 3 の化学量論比で結合することを明らかにした。また、低分解能クライオ EM マップと高分解能で決定した、TcpA、TcpB、そして TcpF の結晶構造を組み合わせることで、TCP 線毛の先端部に 3 分子の TcpF が結合する立体構造モデルを構築することに成功した (図 1)。

本構造から、コレラ菌が腸管定着の際に、TCP を介して TcpF を分泌する機構が明らかになるだけでなく、線毛先端部において特徴的な 3 量体構造を形成することで、TcpF が宿主腸管上皮受容体を認識することが示唆された [3]。得られた構造は、今後、ワクチン開発や腸管定着阻害剤の設計の際の基盤情報としての利用が期待される。

参考文献

- [1] Takahashi et al., *Sci. Rep.* 2022 **12** 19473.
- [2] Sit et al. *Annu. Rev. Microbiol.* 2022 **76** 681.
- [3] Oki et al., *Sci. Adv.* 2022 **8** eabo3013.

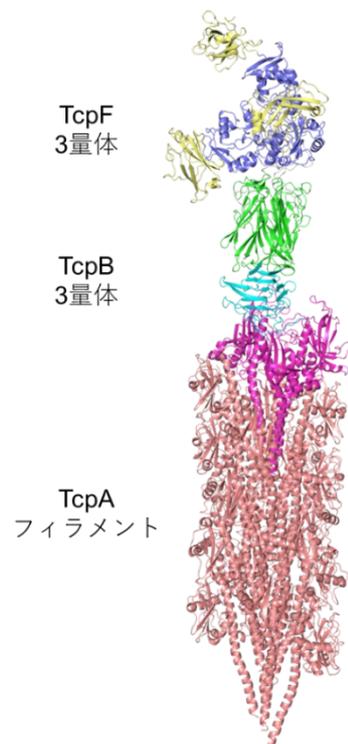


図 2. TcpF-TCP モデル。
文献[3]の図を改変。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Imori Minato, Imoto Yuka, Nishiumi Haruka, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Muroga Yuki, Yoshida Akihiro, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Matsuda Shigeaki, Iida Tetsuya, Nakamura Shota	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis for the toxin-coregulated pilus-dependent secretion of <i>Vibrio cholerae</i> colonization factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abo3013	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 -

1. 著者名 Takahashi Eizo, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Miyoshi Shin-ichi, Chowdhury Goutam, Mukhopadhyay Asish K., Dutta Shanta, Morita Daichi, Iida Tetsuya, Okamoto Keinosuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Metagenomic analysis of diarrheal stools in Kolkata, India, indicates the possibility of subclinical infection of <i>Vibrio cholerae</i> O1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-24167-9	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroya Oki, Kawahara Kazuki, Imori Minato, Nishiumi Haruka, Maruno Takahiro, Uchiyama Susumu, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Matsuda Shigeaki, Iida Tetsuya, Nakamura Shota
2. 発表標題 Structural basis for type IVb pilus-dependent secretion of the colonization factor from <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖 大也、河原 一樹、飯森 南斗、松田 重輝、吉田 卓也、大久保 忠恭、飯田 哲也、中村 昇太
2. 発表標題 コレラ菌が形成するIV型線毛TCPの構造解析
3. 学会等名 第44回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沖 大也, 飯森 南斗, 西海 遥夏, 丸野 孝浩, 内山 進, 松田 重輝, 吉田 卓也, 大久保 忠恭, 飯田 哲也, 河原 一樹, 中村 昇太
2. 発表標題 コレラ菌が形成するIVb型線毛TCPを介した定着因子の分泌機構
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大嶋恵子、沖大也、飯森南斗、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、中村昇太、河原一樹
2. 発表標題 腸内細菌がIVb型線毛システム依存的に分泌するタンパク質の特徴
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯森 南斗, 沖 大也, 今井 友也, 松田 重輝, 吉田 卓也, 大久保 忠恭, 飯田 哲也, 中村 昇太, 河原 一樹
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌が分泌する可溶性定着因子の脂質膜認識機構
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沖大也, 飯森南斗, 西海遥夏, 丸野孝浩, 内山進, 松田重輝, 飯田哲也, 河原一樹, 中村昇太
2. 発表標題 腸管系病原菌が形成するIVb 型線毛を介した定着因子の分泌機構
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Iimori Minato, Oki Hiroya, Imai Tomoya, Matsuda Shigeaki, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Iida Tetsuya, Nakamura Shota, Kawahara Kazuki.
2. 発表標題 Membrane recognition by secreted colonization factors of enterotoxigenic Escherichia coli.
3. 学会等名 ASM Microbe 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroya Oki, Kazuki Kawahara, Minato Iimori, Haruka Nishiumi, Takahiro Maruno, Susumu Uchiyama, Shigeaki Matsuda, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, Tetsuya Iida, and Shota Nakamura.
2. 発表標題 Secretion mechanism of the colonization factor via Type IVb pilus TCP from Vibrio cholerae.
3. 学会等名 ASM Microbe 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯森南斗、沖大也、今井友也、松田重輝、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太、河原一樹
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌が分泌する可溶性定着因子の脂質膜認識機構の解明
3. 学会等名 第20回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沖大也、河原一樹、飯森南斗、西海遥夏、丸野孝浩、内山進、松田重輝、吉田卓也、大久保忠恭、飯田哲也、中村昇太
2. 発表標題 コレラ菌が形成するIVb型線毛TCPIによる定着因子TcpFの認識機構
3. 学会等名 第55回ピブリオシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市岡慎也、飯森南斗、沖大也、今井友也、松田重輝、飯田哲也、吉田卓也、大久保忠恭、中村昇太、河原一樹
2. 発表標題 腸管毒素原性大腸菌が分泌する可溶性定着因子とリボソームの相互作用解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岡本 敬の介, 北原 圭, 高橋 栄造, 三好 伸一, 元岡 大祐, 中村 昇太, 飯田 哲也
2. 発表標題 メタゲノム解析によるインド・コルカタ地域住民の便中のコレラ 菌の検査
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本 敬の介, 高橋 栄造, 三好 伸一, 元岡 大祐, 中村 昇太, 飯田哲也
2. 発表標題 インド・コルカタ地域でのコレラ菌の不顕性感染に関する研究
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	沖 大也 (Oki Hiroya) (30845285)	大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤) (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	河原 一樹 (Kawahara Kazuki) (60585058)	大阪大学・薬学研究科・助教 (14401)	

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