

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590544

研究課題名(和文)らい菌の比較ゲノム解析

研究課題名(英文)Comparative genome analysis of *M. leprae*

研究代表者

甲斐 雅規 (KAI, MASANORI)

国立感染症研究所・その他部局等・室長

研究者番号：10291147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ハンセン病はらい菌による感染症で、多菌型と少菌型の2病型がある。研究目的は、病型を分ける菌側要因の探索であり、次の研究及び成果を得た。(1)日本の本州で分離された多菌型患者由来らい菌のゲノムシーケンスを決定しデータベースに登録されているインド及びブラジル由来のらい菌と比較解析を行い、日本由来株に特徴的な情報を得た。(2)日本株に特徴的だったSNPsを多数の保存らい菌分離株について調べた結果、日本の本州および韓国で分離されたらい菌には同様のSNPsパターンがあることを発見した。(3)少菌型患者由来菌は極端に少なく、次世代シーケンサーにて一定の結果を得たが、期間内に探索を終了するに至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Leprosy is caused by *Mycobacterium leprae* and classified into multi-bacillary (MB) and pauci-bacillary (PB). Objectives and results of this study were as follows. (1) The genome sequence of *M. leprae* isolated from MB patient in Honshu islands of Japan was determined and compared with two genome sequences (isolated from India and Brazil) registered in database. Some characteristic features were found in the genome of Japanese isolate. (2) The SNPs pattern on the regions in *M. leprae* strains isolated in East Asia or Southeast Asia was investigated. And we found that many of Korean isolates and Honshu isolates showed identical characteristic SNPs pattern. (3) The number of *M. leprae* bacilli in PB patient was extremely small. We acquired some information of genome sequence in *M. leprae* derived from PB patient but not finished completely.

研究分野：微生物学

キーワード：ハンセン病 らい菌 ゲノム 少菌型 多菌型 SNPs genotyping

### 1. 研究開始当初の背景

ハンセン病の原因菌、らい菌は人工培地で培養できないため、菌の発見後 150 年近く経つ現在でも病原性や基本的性状に未だ不明な点が多く、予防・診断・治療の技術開発も十分とは言えない。しかし、近年技術的な進歩に伴い遺伝子レベルでの解析が進んできた。申請者もらい菌の遺伝子解析によりハンセン病の薬剤耐性と遺伝子変異の相関 (Kai et al. FEMS Microbiol Lett 1999)、流行国で薬剤耐性菌の動態解明 (Kai et al. Clin Infect Dis 2011) 等を行ってきた。また流行国では新しい血清診断調査も実施した (Kai et al. Clin Vaccine Immunol 2008)。

らい菌完全ゲノム解析は、インドで分離されたらい菌株の報告 (Cole et al. Nature 2001) とブラジルで分離された株の報告 (Monot et al. Nat Genet 2009) がある。インド株及びブラジル株には時間空間的に大きな隔たりがあるにもかかわらず、両者のゲノムシーケンスにはほとんど差異が認められず、一塩基多型 (SNPs) や variable numbers of tandem repeats (VNTR) の相違が見られるのみであった。申請者の所属する国立感染症研究所ハンセン病研究センターにおいては、らい菌及びらい菌を含む生検材料のサンプル収集および保管を行っており、これまでに 27 種の患者由来らい菌株についてヌードマウスフットパット内での増菌に成功し、株として樹立した菌の維持・管理・供給を行ってきた (Matsuoka, Lepr Rev 2010)。次世代型シーケンサーの普及により多数の菌のゲノム解析が短期間で可能となってきた現在、これらの保存らい菌株のゲノム解析を行なうことで、不明であったらい菌の性状や病原性因子等が明らかとなると考えられ、らい菌ゲノム解析を国立感染症研究所、病原体ゲノム解析研究センターの協力を得て、次世代型シーケンサーにより開始している。

一方、ハンセン病には 2 病型、多菌型と少菌型があるが、上記の調査・研究から、この 2 病型間には様々な面で大きな隔たりがあることが判明し、予防・診断・治療に関して、異なる対処の必要性が改めて認識された。しかし、ハンセン病発症者が多菌型と少菌型に分かれる要因は、感染宿主の免疫の違いであると一般に考えられているものの詳細な解明はされていない。ゲノム解析についてもこれまでの報告では DNA 量の確保できる多菌型患者由来のサンプルしか行われていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、らい菌を原因菌として発症するハンセン病において、発病者が示す多菌型もしくは少菌型と言われる 2 病型を分ける菌側要因を次世代ゲノム解析にて探索・同定することを最終目標とし、

まず、第 1 にハンセン病多菌型患者由来らい菌株のゲノムシーケンスを行ない、少菌型由来らい菌の対照としてリファレンスを構築する。次に少菌型患者試料かららい菌 DNA を抽出し次世代型シーケンサーでゲノムシーケンスを行ない、多菌型由来らい菌ゲノムと比較し相違配列を検出する。最後に 2 病型決定因子候補の抽出とそれぞれの変異株を用いた検証を行なう。

### 3. 研究の方法

1. 多菌型患者由来らい菌株 4 種のゲノムシーケンス及び比較ゲノムにより多菌型らい菌ゲノムデータベースを構築する。(甲斐、黒田、関塚が担当)  
保有する多菌型患者由来のらい菌株 4 株を Shepard らの方法 (J Exp Med, 1960) により、接種し増菌させたヌードマウスのフットパッドから分離し、らい菌ゲノム DNA を調整する。  
次世代型シーケンサー、イルミナ GA-II を用いてらい菌ゲノム DNA の全塩基配列を決定する。必要に応じて、すでにデータベースに登録されているインドあるいはブラジルで分離されたらい菌ゲノム配列 (Cole et al. Nature 2001, Monot et al. Nat Genet 2009) を対照として完成させる。  
4 株のゲノム情報から比較ゲノム解析を行い、多菌型らい菌ゲノムデータベースを作成する。特に一塩基多型 (SNPs) や variable numbers of tandem repeats (VNTR) を含むリピート領域の情報、らい菌に特徴的であることがわかっている偽遺伝子、全 ORFs (Open Reading Frames) を詳細に整理しておく。

2. 少菌型患者由来の試料から DNA を抽出し、必要に応じてゲノム DNA 増幅を行ない、含まれるらい菌ゲノムのシーケンスを行なう。(甲斐、黒田、関塚が担当)  
海外のハンセン病流行地域を持つ研究協力国で収集された少菌型ハンセン病患者のバイオプシーサンプルからトータル DNA を抽出し、一部を保存してあるので、それを用いてシーケンスを行う。

上記 DNA で十分なシーケンス解析ができなかった場合は少菌型患者から得たバイオプシーサンプルの一部が -80 で保存してあるのでこれを利用する。しかし含まれるらい菌数がごく僅かであることが予想されるので、必要に応じて菌分離後に市販のキットを用い、ゲノム DNA 増幅を行う。あるいは菌の分離操作によ

らい菌損失を防ぐため実施せず、サンプルのトータル DNA を抽出しシーケンス解析を行う。

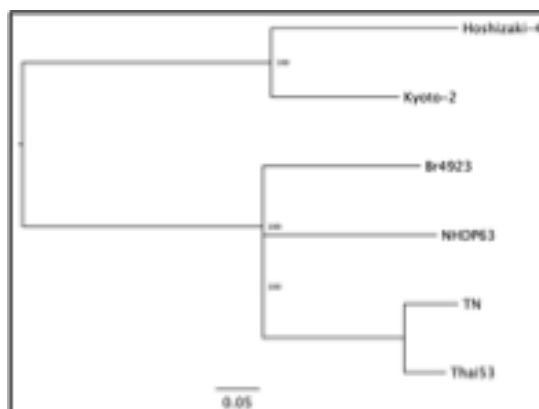
3. 構築してある多菌型らい菌ゲノムデータベースとの照合により、少菌型らい菌ゲノムシーケンスから特徴的な因子を探索、発見する。(甲斐、黒田、関塚が担当)  
ゲノム解析ソフトである、Mapview、Artemis、Genetyx 等を用いて多菌型らい菌ゲノムシーケンスと少菌型ゲノムシーケンスの比較解析を行い、違いを検出する。
4. 多数の多菌型及び少菌型患者由来試料を用い、発見した因子が2病型を分ける因子であるかどうかを検証する。(甲斐が担当)  
保管してある多数の臨床検体由来の DNA について検出された違いの有無を調査し多菌型少菌型を分けることのできる違いを同定する。
5. 特定した因子をクローニングや発現解析さらに変異株の作製等を通じて解析し詳細な病型決定機構を究明する。(甲斐が担当)  
病型決定因子と考えられる候補遺伝子あるいは変異の機能解析を DNA マイクロアレイ技術を用いて解析する。

#### 4. 研究成果

らい菌感染により発症するハンセン病は大きく2病型、多菌型と少菌型がある。本研究の主目的は、その病型を分ける菌側要因を発見することである。比較対照に日本で分離された多菌型患者由来らい菌 Kyoto-2 株のゲノム配列を決定した。データバンクに登録後、すでに登録されているらい菌 TN 株と Br4923 株との比較解析を行い、Kyoto-2 株に特徴的な情報を得た。その中で特に注目した2点に関し検討した結果を以下に示す。1つ目は1つのオープンリーディングフレーム(ORF)に6つ SNPs が存在したことである。このような多数の SNPs を持つ ORF は他にはなかったことからこれら SNPs について他の保存らい菌株を調べた結果、日本の本州と韓国で分離されたらい菌のほとんどが Kyoto-2 株と同じ6カ所の SNPs をもつことが明らかとなった。そこで、この ORF を用いて樹形図を作成したところ図のように本州で分離したらい菌である Kyoto-2 と Hoshizuka-4 は他のらい菌と離れた分岐を示すことがわかった。多数の保存らい菌株を調べた結果、特徴的な SNPs パターンを、Kyoto-2 のみならず日本の本州および韓国で分離されたらい菌の多くが示した。それら株を北東アジアという地理的分布から

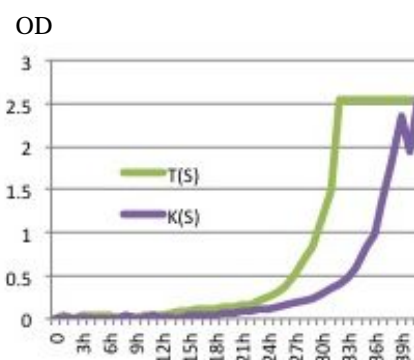
Northeast Asian(NA) strain と命名した。

図1



2つ目は、Kyoto-2 株はタイで分離された保存菌株である Thai-53 株と比較し、増殖速度がやや遅いという特徴がある。そこで、TN 株、Br4923 株及び Thai-53 株と比較し Kyoto-2 に特徴的な SNPs の中から菌の生育に関与する事が疑われたリボソームタンパク遺伝子 *rplS* におけるアミノ酸変異に着目した。遺伝子操作ができ培養可能な抗酸菌である *Mycobacterium smegmatis* のゲノムに Kyoto-2 の *rplS* を導入し、その後 *Mycobacterium smegmatis* の *rplS* を破壊した株を作成し K(S)とした。同様に Thai-53 の *rplS* を導入したものを T(S)として両者の増殖を観察した結果、図のように1カ所のアミノ酸が異なるだけの K(S)の増殖が遅くなることが明らかとなった。

図2



一方、少菌型ハンセン病患者由来らい菌は菌数が極端に少ないことから患者材料を用い直接らい菌 DNA を標的に解析を試みた。サンプルはベトナムで採取し、比較対照として同地域から多菌型サンプルも採取し比較を行った。各 DNA を抽出し、ゲノムライブラリーを作成後イルミナ社の NextSeq500 で大量リードを習得し解析した結果、らい菌由来リードは少菌型では 0.008%、多菌型では 0.012%であった。多菌型はゲノム全体を解読でき、興味深いことに以前報告されたらい菌の 86 カ所の

SNPs を利用したタイピングで先の日本株 Kyoto-2 と同じ 3K タイプであった。しかし、全 SNPs を利用した樹形図では Kyoto-2 が含まれる日本本州及び韓国分離らい菌、NA strain が属す枝 (グループ) には属さないことが示された。少菌型の解読は困難を極め未終了であるが、近く終了が見込まれ少菌型特有の領域の発見が期待されている。本研究において日本の本州分離らい菌がこれまで知られていない遺伝子型を示し、韓国分離株とともに樹形図に新しい枝を形成したことは、らい菌の分子進化あるいは伝播様式の詳細解明への一助として貢献できたと考えられる。また、今後少菌型由来らい菌のゲノム解析から特徴的な領域が発見できればそれはこれまでのハンセン病病型の概念をより正しく理解できると期待される。

#### < 引用文献 >

Kai M, et al. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. FEMS Microbiol Lett 177:231-235,1999.

Kai M, et al. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin Infect Dis 52: e127-e132, 2011.

Kai M, et al. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnam by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein II Clin Vaccine Immunol 15:1755-1759,2008.

Cole ST, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-1011, 2001.

Monot M, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. Nat Genet 41: 1282-1289, 2009.

Matsuoka M. The history and characteristics of isolates maintained at the Leprosy Research Center. Jpn J Lepr 79:247-256, 2010.

Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. J Exp Med 112:445-454,1960.

#### 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4件)

Sekizuka T, Kai M, Nakanaga K, Nakata N, Kazumi Y, Maeda S, Makino M, Hoshino Y, Kuroda M. Comparative

genome analysis of *Mycobacterium massiliense* JCM 15300 among *Mycobacterium abscessus* group reveals the potential pathogenicity related in subcutaneous tissue infection. PLoS one 2014; doi: 10.1371/journal.pone.0114848.

Singh P, Benjak A, Carat S, Kai M, Busso P, Avanzi C, Paniz-Mondolfi A, Peter C, Harshman K, Rougemont J, Matsuoka M, Cole ST. Genome-wide re-sequencing of multi-drug resistant *Mycobacterium leprae* Airaku-3. Clinical Microbiology and Infection. 2014, doi: 10.1111/1469-0691. 12609.

Kai M, Nakata N, Matsuoka M, Sekizuka T, Kuroda M, Makino M. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infect Genet Evol 2013; 19: 200-4.

甲斐雅規. Hp-rPCR 法を用いたらい菌薬剤耐性変異の検出. 日本ハンセン病学会雑誌 2014 年. 第 83 巻 1 号 p.6-13.

#### [学会発表](計9件)

甲斐雅規, 中田 登, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦, 日本で分離されたらい菌 Kyoto-2 の特徴的なゲノタイプ, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月, 岐阜

関塚剛史, 甲斐雅規, 中永和枝, 中田 登, 前田伸司, 牧野正彦, 黒田 誠, 比較ゲノム解析により明らかとなった

*Mycobacterium massiliense* の脂質代謝関連ゲノムアイランド, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月, 岐阜

中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦, 組換え *M. smegmatis* を利用した抗酸菌 rrl 遺伝子とマクロライド耐性の解析, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月, 岐阜

中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦, 培養可能抗酸菌を利用したらい菌 gyrBA 遺伝子とフルオロキノロン耐性の解析, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月, 東京

甲斐雅規, 中田 登, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦, らい菌日本分離株で発見された特徴的な SNPs の解析, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月, 東京

甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦, らい菌 Kyoto-2 株の増殖能への関与が疑われる遺伝子の解析, 第 87 回日本ハンセン病学会, 2014 年 9 月, 埼玉

Kai M, Sekizuka T, Maghanoy AA, Balagon MF, Saunderson P, Makino M, Kuroda M. Comparison of genome sequences between *Mycobacterium leprae* prepared before and after passaging in

nude mice footpad. XVIII International Symposium on Gnotobiology, 2014, 21-24 Sep. Saint-Petersburg.

Kai M, Nakata N, Chae GT, Saunderson P, Maghanoy AA, Balagon MF, Matsuoka M, Sekizuka T, Kuroda M, Makino M.

Characteristic SNPs in *Mycobacterium leprae* isolated in Japan. 18<sup>th</sup>

International Leprosy Congress, 2013, 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> Sep. Brussels.

甲斐雅規、中田 登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦、SNPs 解析により示されたらい菌日本株ゲノムの特徴、第 86 回日本ハンセン病学会、2013 年 5 月、埼玉

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

甲斐 雅規 (KAI, Masanori)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・室長

研究者番号：10291147

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

黒田 誠 (KURODA, Makoto)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長

研究者番号：80317411

関塚 剛史 (SEKIZUKA, Takeshi)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官

研究者番号：40462775

### (4) 研究協力者

中田 登 (NAKATA Noboru)