

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790412

研究課題名(和文) ゲノム比較による細菌病原性の進化の解明

研究課題名(英文) Study of bacterial pathogenicity evolution by whole genome sequence comparison

研究代表者

古田 芳一 (Furuta, Yoshikazu)

東京大学・新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：40613667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、次世代シーケンサーを用いて高精度・高速にピロリ菌の完全長のゲノム配列を解読する手法を確立した。ピロリ菌東アジア株30株について実際に解読に成功し、ゲノム比較解析を行うことで東アジア株にoipA遺伝子の重複やモリブデン代謝遺伝子の欠失、六通りのゲノムの逆位など、地域特異的な遺伝子の有無やゲノムの逆位など過去の少数株比較の結果で得られていたものと同様の特徴を多数株についても見いだした。

研究成果の概要(英文)：We developed a method to sequence a whole genome sequence of *Helicobacter pylori* in a high fidelity and high speed manner by utilizing next generation sequencing technology. We adopted this method to 30 strains of East Asian *H. pylori* strains and confirmed the following East Asian specific characters: (i) duplication of outer membrane protein coding gene oipA, (ii) inactivation of molybdenum related protein coding genes, (iii) 6 positions for genome inversion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：ゲノム比較解析 ピロリ菌 次世代シーケンサー ゲノム再編 de novo assembly Mate-pairライブラリ ゲノム進化

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌は世界人口の半数以上の胃に棲息する細菌（イブシロンプロテオバクテリア）で、胃炎、胃十二指腸潰瘍、胃がん等の疾病を引き起こすことが知られている (Suerbaum & Michetti, N Engl J Med, 2002)。特にわが国では、胃がんは年に5万人を死亡させており、その発症メカニズムを解明することは国民にとって喫緊の課題である。ピロリ菌のゲノムは可塑性・多様性が大きく、地域特異的な型に分化しており、なかでも東アジア株は胃がん発症頻度の高い強毒株である可能性が疑われている。

我々は、過去に東アジア株に属するピロリ菌日本株4株を日本人患者から分離して全ゲノム解読を行い、他地域由来株のゲノムと詳細な全ゲノム比較解析を行った。遺伝子構成を比較した結果、病原性、ホスト相互作用、細胞表面形成に関わる遺伝子が地域特異的に多様化していることがわかった。また、モリブデン代謝系の遺伝子群が東アジア株（日本株+韓国株）において特異的に失われていたことや、日本株においてのみ二つの acetyl-CoA と酢酸の間の径路が共に保持されている、といった特徴を見出した (Kawai et al, BMC Microbiology, 2011)。こうした比較解析から、電子伝達系関連遺伝子等の異常がプロテオーム異常を引き起こし、適応進化が促進された、という進化過程を提唱した。

ゲノム構造についても比較解析を行った結果、遺伝子の重複がゲノムの逆位に伴って起こる、という新しい遺伝子重複メカニズムを発見し、ゲノム進化の歴史の再構築に成功した (Furuta, Kawai et al, PNAS, 2011)。さらに、メチル化酵素遺伝子内でドメインが DNA 組換えを介して移動することにより、タンパク機能の多様化をもたらす現象を発見した (Furuta et al, PLoS ONE, 2011)。

これらの解析は高々ピロリ菌 20 株でのゲノム比較であるにも関わらず、東アジア株の高病原性に関わる可能性のある遺伝子や、新規のゲノム再編メカニズムを検出することに成功した。比較するゲノムの株数が増えれば、新規の特徴やゲノム再編メカニズムが検出できる可能性があるだけでなく、これまで検出した現象の一般性の検証や、病原性進化のプロセスを追跡し、ピロリ菌による病態を理解するための情報の取得につながる、と考えられた。

2. 研究の目的

これまでに行ったピロリ菌全ゲノム比較解析は 10-20 株のゲノム比較解析であり、ゲノムの特徴・ゲノム再編を検出することは出来たが、その一般性や特異性を検証することは難しかった。より多くの株数の全ゲノム比

較解析を行うことで、東アジア株に共通する特徴の一般性や、その病原性獲得に至るプロセスについて検証する。

近年次世代シーケンサーの登場により、より大量のゲノム情報が容易に得られるようになった。しかしながら、一部のシーケンサーを除き、そのリード長は 100bp 程度と非常に短く、それより長い繰り返し配列を持つゲノムを解読した場合、通常のライブラリの解析だけでは1本のゲノム配列にすることは困難であった。これはピロリ菌のように遺伝子重複やゲノム構造を解析するために1本のゲノム配列を必要とする場合には大きな問題となっていた。

本研究では、出力データ量の大きい次世代シーケンサーを用いてピロリ菌の全ゲノムを得る手法を開発すること、より多くの株の全ゲノム配列を取得すること、得られた多数株の全ゲノムについて比較解析を行うことを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを用いたピロリ菌の完全長ゲノム迅速決定プロトコルの開発

迅速かつ大量のデータ出力が可能である次世代シーケンサーの情報のみから、高速・高精度・安価にピロリ菌の完全長ゲノムを取得するプロトコルを開発した。Paired end ライブラリと Mate pair ライブラリを作成してシーケンシングし、得られたデータをアセンブリングすることで、多くの株で1本のゲノム配列 (Scaffold) につなげることができた。

(2) 全ゲノム比較解析によるピロリ菌東アジア株の適応進化・病原性進化の解明

(1)で開発した手法を用いて、患者由来のピロリ菌東アジア株 28 株の全ゲノム配列を取得し、既知のピロリ菌との全ゲノム比較解析を行い、遺伝子レパートリーの特徴、ゲノム構造・ゲノム再編を検出した。過去の解析で検出された東アジア株の特徴の一般性について検証を行った。

4. 研究成果

(1)次世代シーケンサーを用いて、ピロリ菌のほぼ完全なゲノム配列を得る手法を開発した。標準的な Paired End ライブラリのみでは、ゲノム中の多くの領域の配列は得られるものの、ゲノム中の長い繰り返し配列の影響により、部分配列同士の相対的な位置関係を得ることができない。ゲノム比較解析の中で、ゲノム構造の比較解析を行うためには、一本につながったゲノム配列が必須であり、それを得るための手法の開発が必要であった。

我々は Illumina シークエンサーをプラットフォームとして、通常用いられる 300 bp 程度の短い領域の両端を解読するための Paired end ライブラリと、それとは別に 5 kb 程度の長い領域の両端を解読するための Mate pair ライブラリを作成し、シークエンシングを行った。当時の Illumina 社が提供する Mate pair ライブラリ作成手法はうまくいかなかったが、他社製品の同様のライブラリを作成する手法を流用することによってバイパスした。

コントロール実験として、まず我々が過去に解読したピロリ菌日本株 F30 株について、本手法を用いてゲノム解読を行った。Paired end ライブラリの解読データのみでは 60 本の部分配列(contig)としてのデータしか得られなかった。ここに、Mate Pair ライブラリの解読データを加えることで部分配列間の相対位置が判明し、1 本のゲノム配列を得ることに成功した。既知の F30 のゲノム配列と比較した結果、ゲノム構造にも大きな誤りは無く、本手法の正確性を確認した。

次に、本手法を用いて日本人患者由来の株 28 株のゲノム解読を行った。上記と同様に 2 つのライブラリの解読を行い、アセンブリを行った結果、半数以上の株で 1 本のゲノム配列を得ることに成功した。一部の株については、rRNA オペロンが長い内向きの繰り返し配列を形成し、Mate pair ライブラリのデータを用いても相対位置関係を見いだせない状態であった。ピロリ菌はゲノムの逆位を頻繁に起きるため、通常は順向きの rRNA オペロンが内向きの位置関係になるために起こる現象である。これらの株については、rRNA オペロンの部分についてのみ追加で PCR 解析を行い、1 本のゲノム配列を得ることに成功した。プラスミドを持つ株については、1 本につながったプラスミド配列を得ることも成功している。

本手法により、ピロリ菌については、多くの株で 1 本のゲノムが追加解析無し、参照配列無しで得られること、それ以外の株でも決まった数カ所の PCR 解析を追加で行うのみで 1 本のゲノムが得られるようになった。これにより、従来手法に比べてより多くの株数のピロリ菌についてより簡便に全ゲノム配列を得られ、遺伝子レパートリーの解析だけでなく、ゲノム構造の比較解析も容易に行えるようになった。ピロリ菌はゲノム構造多型や遺伝子重複を頻繁に起こすため、より詳細な比較解析を可能とする全ゲノム配列を生産できる手法は重要である。

(2)得られたピロリ菌日本株 28 株の全ゲノム配列と、これまでに解析されたピロリ菌株全ゲノム配列を用いて、遺伝子レパートリー比

較解析と、ゲノム構造比較解析を行った。

遺伝子レパートリーについて比較解析を行った結果、モリブデン代謝系遺伝子の欠損や acetyl-CoA 代謝系の保持など、過去の解析で見られた日本株の特徴は 28 株を加えた本解析においても保持された。

ゲノム構造について比較した結果、日本株内では過去の解析で知られていた逆位に加えて 1 種の新規の逆位が見つかり、6 種の逆位の組み合わせですべての日本株のゲノム構造が説明できることがわかった。また、逆位は両端の逆向きの繰り返し配列によって起こるが、この繰り返し配列の長さによって逆位の頻度が異なることを示唆する結果も得られた。

また、過去の解析において、逆位に伴って遺伝子コピー数が増加、減少するメカニズムが日本株で見つかったが、本解析の 28 株についても同様に検出された。このため、日本株で検出されるこのメカニズムは、ピロリ菌日本株の共通祖先株において 1 回のみ起こったものと考えられた。

以上、本研究の結果、追加でゲノム解読を行ったピロリ菌日本株についても、過去に得られた日本株の特徴をすべて有しており、日本株間での多様性は、地域間の多様性と比較して、それほど大きくないという結論が得られた。追加で解読したピロリ菌株の元の患者の疾患のデータがあるので、今後はこれらのメタデータと遺伝子レパートリーとの詳細な解析を進めていく予定である。

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 1 件)

Koji Yahara, Yoshikazu Furuta, Kenshiro Oshima, Masaru Yoshida, Takeshi Azuma, Masahira Hattori, Ikuo Uchiyama, Ichizo Kobayashi. Chromosome painting in silico in a bacterial species reveals fine population structure. *Mol. Biol. Evol.*, 30(6): 1454-1464 (2013), 査読有
DOI: 10.1093/molbev/mst055

[学会発表](計 4 件)

Koji Yahara, Yoshikazu Furuta, Masahira Hattori, Ichizo Kobayashi: Chromosome painting in silico in a bacterial species reveals fine population structure, 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26 日、タワーホー

ル船堀、東京都

Koji Yahara, Yoshikazu Furuta,
Kenshiro Oshima, Masaru Yoshida,
Takeshi Azuma, Masahira Hattori, Ikuo
Uchiyama, Ichizo Kobayashi: Chromosome
painting in silico in a bacterial
species reveals fine population
structure、第8回日本ゲノム微生物学会
年会、2014年3月7日、東京農業大学、
東京都

矢原耕史、古田芳一、大島健志朗、吉田
優、東健、服部正平、内山郁夫、小林一三：
種内集団構造のインシリコ染色体ペイン
ティングによる解明、日本遺伝学会第85
回大会、2013年9月21日、慶應義塾大学、
神奈川県

矢原耕史、古田芳一、大島健志朗、吉田
優、東健、服部正平、内山郁夫、小林一三：
種内集団構造のインシリコ染色体ペイン
ティングによる解明、日本進化学会第15
回大会、2013年8月29日、茨城大学、茨
城県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田芳一 (FURUTA Yoshikazu)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特
任助教

研究者番号：40613667

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小林一三 (KOBAYASHI Ichizo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教
授

研究者番号：30126057