

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790414

研究課題名(和文) 第3のレプリコンを保有する新奇なコレラ菌O1株のゲノム解析

研究課題名(英文) Genome analysis of a unique strain of *Vibrio cholerae* O1 carrying the third replicon

研究代表者

岡田 和久 (OKADA, KAZUHISA)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：40420434

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)：我々は本研究においてコレラ菌が保有する二つの環状染色体 [Ch1(3.0 Mb)とCh2(1.0 Mb)]に加えて、0.9 Mbのレプリコン(Ch3)を保有するコレラ菌O1を3株見出した。Ch3を保有するTSY216株のゲノムと流行型コレラ菌O1株のものを比較した。両株の染色体は高く保存されていた。一方でCh3は両染色体と共有する領域が存在しなかった。Ch3には1031個のORFと全20種類のアミノ酸に対応するtRNA遺伝子がコードされていたが、Ch3の起源や機能については不明である。本研究で示した大規模遺伝子セットの獲得は、新型のコレラ菌 O1の出現の機会を与えるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found three isolates TSY216, TSY241, and TSY421, of *Vibrio cholerae* O1 carrying a 0.9 Mb replicon (Ch3) in addition to the two circular chromosomes, 1 (Ch1; 3.0 Mb) and 2 (Ch2; 1.0 Mb). The genome of TSY216 carrying the Ch3 was compared with that of epidemic *V. cholerae* O1. The chromosomes 1 and 2 were very similar among TSY216 and other epidemic strains. However, the Ch3 did not share any conserved region with Ch1 and Ch2. Ch3 was found to encode 1,031 ORFs and 66 genes encoding tRNAs for 20 amino acids. The origin and function of Ch3 remain unidentifiable. The acquisition of a large-scale gene set of the third replicon may provide an opportunity to result in a new emerging form of *V. cholerae* O1.

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：Vibrio cholerae コレラ菌 タイ

1. 研究開始当初の背景

申請者は2005年から2010年までの間にタイ国内各地より約500株のコレラ菌O1を分離し、解析してきた。全ての分離株はエルトール型の特徴を有するが、コレラ菌の主要病原因子であるコレラ毒素のBサブユニットの塩基配列が古典型の配列と一致することから、タイ分離株の大多数はエルトール型及び古典型の両特徴を併せ持つエルトール変異型である事を結論付けた。現在アジア・アフリカで猛威を振るっているコレラ菌もこの種のいわゆるエルトール変異型(EI Tor variant)である。さらにパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析により、これらのエルトール変異型株は9つのパルソタイプに分類された。パルソタイプA6型(TSY216)はA4型(TSY240)と比較すると一つのDNAバンドを余分に示した。

そこで、我々は制限酵素処理を施さないゲノムをPFGEに4日間かけた。その結果、パルソタイプA4型を示す標準株は2本のバンドを示す一方で、対象株は3本のバンドを示すことを確認した。

パルソタイプA6型を示す株は計3株分離され、いずれもタイミャンマー国境の一つの難民キャンプの人々から2010年6月から7月にかけて分離されたものであった。また、Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA)の結果は全て16型であり、クローナリティーを示した。そこで第3のレプリコンの保有が示唆されるコレラ菌O1、3株の代表株としてTSY216株の全ゲノム配列決定を行い、ゲノム解析を行った。

2. 研究の目的

通常コレラ菌は2つの環状染色体を保有

するが、筆者はこれまでに報告のない2つの染色体に加えてメガベースペアクラスの第3のレプリコンを保有することが示唆されるコレラ菌O1を見出した。そこで当該株のゲノム解読を行い、第3のレプリコンについての存在について確認すると共に、当該コレラ菌の特徴について理解する。また、コレラ菌の適応進化の理解と今後のコレラ対策に寄与することも目的とする。

3. 研究の方法

ゲノム配列決定

TSY216株のゲノムDNAを調製し、GS FLX Titanium シリーズ・メイトペア法(8kb)により塩基配列読み、クオリティーの低い塩基の除去後に得られた44万リードをNewbler(Ver. 2.6)でアセンブリした結果、3つの大きなスキファールド得た(カバレッジ x 18.3)。次に、その3つのスキファールドに見出された119箇所全てのギャップに対しプライマーを設計し、PCRによってギャップを含む部分を増幅、そのPCR産物を用いてサンガー法(ABI 3130xl Genetic Analyzer)により塩基配列決定をした。次にこの3つのレプリコンに対し、Illumina HiSeqのペアエンド解析(100bp)から得たDNA配列データをマッピングし、GS FLXにおいてエラーが生じやすいホモポリマー部位の修正と全配列の再確認を行った。ゲノム解析

ゲノムのアノテーションはRAST server(ver.4)及びMicrobial Genome Annotation Pipelineを使用した。比較ゲノム解析は、in silico Molecular Cloning Genomics Edition(ver. 5.2.6D)、MAUVE (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>)、

M E G A 6
 (http://www.megasoftware.net/)、The
 S E E D V i e w e r
 (http://rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi)、
 G e n o m e m a t c h e r)
 (http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmPro
 ject/gmhomeJP.html)を主に使用した。

4. 研究成果

コレラ菌O1 TSY216株の全ゲノム
 解読の結果、3つの環状レプリコン(3,0
 53,204 bp, 1,051,284 bp、896,006 bp)を保有するこ
 とが明らかとなった。GC含量は第1、第2染
 色体が47%程度で他のコレラ菌O1のゲ
 ノムと特に違いはなかったが、第3レプリコ
 ンは37%と極めて低かった(図1)。

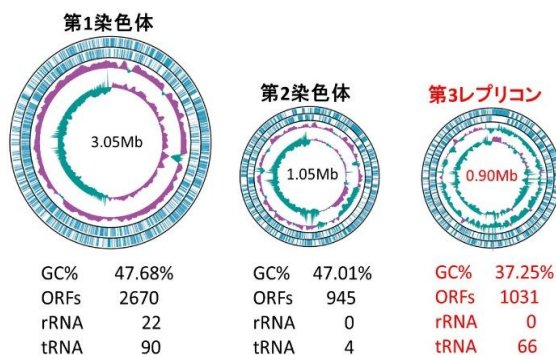


図1 TSY216株は機能未知の第3のレプリコンを保有

TSY216株とハイチで流行を起こした株、2010EL-1786と比較ゲノムを行ったところ、第1染色体上のSXT領域において違いが認められ、薬剤耐性パターンに相違があることが示されたが、その他の第1及び第2染色体の大部分は一致し、TSY216株もまたハイチ流行株と同じ第7次世界流行株であることが示唆された。一方で、第3レプリコンは第1、第2染色体と相同な部分は認められなかった(図2)。

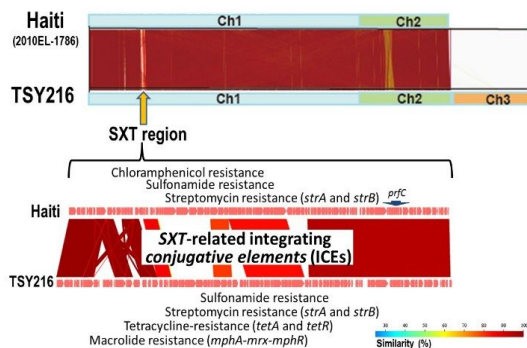


図2 TSY216株とハイチ流行株とのゲノム比較

P F G E A 6型を示した3株(TSY216、TSA241及びTSY421)は全てMLVA 16型を示しているが、同時期、同地域で認められたMLVA 16型・P F G E A 4型のコレラ菌O1を優勢に分離していたことから、この優勢型株が第3のレプリコンを最近獲得し、拡散したことを想定している(図3)。

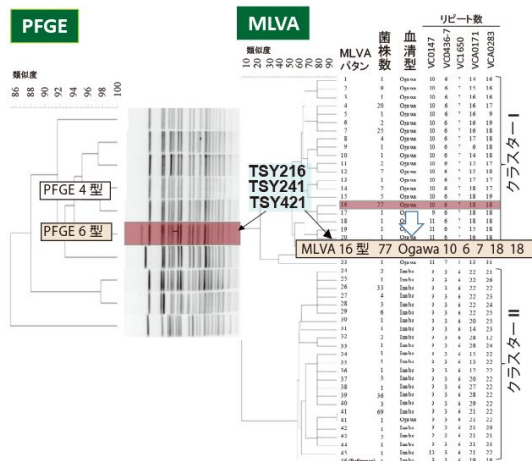


図3 タイ分離株のPFGE及びMLVAによるクラスタ解析の結果と第3レプリコンを持つ株の分布

第3レプリコンの大部分のORFsの機能は未知であり、また、データベース上のものと類似性が低く、由来未知なゲノム配列であった。また、tRNAは66個確認され、20種類のアミノ酸に対応していた。また、Ch3には二つのHNSが見いだされ、一

つは *Vibrio* 属菌種のものと同相性が認められた(図4)。

Anticodon	Ch1	Ch2	Ch3	Amino acid
GGC	1	-	3	Ala
TGC	3	-	3	Ala
ACG	6	-	1	Arg
CGG	1	-	-	Arg
GTT	1	-	3	Asn
GTC	4	-	3	Asp
GCA	1	2	3	Cys
TTG	5	-	2	Gln
TTC	3	-	3	Glu
GCC	6	-	1	Gly
TCC	1	2	2	Gly
GTG	2	-	2	His
GAT	3	-	3	Ile
CAA	1	-	3	Leu
CAG	1	-	3	Leu
GAG	1	-	1	Leu
TAA	1	1	1	Leu
TAG	5	-	1	Leu
TTT	1	-	5	Lys
CAT	9	-	8	Met
GAA	3	-	4	Phe
GGG	1	-	4	Pro
TGG	3	-	2	Pro
GCT	2	-	2	Ser
GGA	1	-	1	Ser
TGA	2	-	1	Ser
GGT	2	-	2	Thr
TGT	4	-	2	Thr
CCA	1	-	1	Tyr
GTA	5	-	3	Tyr
GAC	2	-	3	Val
TAC	1	-	3	Val
Total	90	4	66	Pseudo

大部分のORFsの機能は不明であり、DDBJデータベースにないものであった

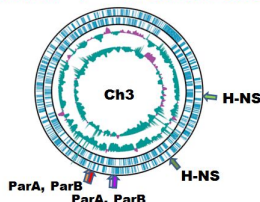


図4 各レプリコンに存在する tRNA の種類と Ch3 の特徴

Shigella flexneri 2a 2457 T株に見出された IncHI1 プラスミド pSf-R27 (165 Kbp、薬剤耐性遺伝子はない) も H-NS 様タンパク質 (Sfh) をコードしており、Doyleら (2007、Science) の論文では、この Sfh が ATリッチな pSf-R27 プラスミドに結合し、プラスミド全体の遺伝子発現を抑制しているために新しい細菌宿主への移行が許容されやすくなると論じている。実際に pSf-27 の Sfh の遺伝子を破壊すると pSf-27 上の遺伝子群の発現が顕著に増加することを彼らは示している。Ch3 もまた pSf-R27 と同じような機構を持つがゆえに、0.9 Mb という巨大なレプリコンをコレラ菌に獲得させることを成立させたのではないかと、またこの H-NS 様タンパク質の遺伝子を破壊することで Ch3 の遺伝子発現の抑制が解除され、顕著な表現型の違いが現れないかと仮説を立てている。そこで Ch3 の当該遺伝子破壊株の作製に現在取り組んでいる。

Ch3 上に染色体やプラスミドの分配に関与する *parA/B* 遺伝子を認めた。TSY216株、TSY241株、TSY421株を30日間、毎日継代培養し、第3レプリコンの消失を調べたが、全てのクローンで維

持されていた。増殖曲線も通常の条件下では第3レプリコンの有無で相違ないことから、安定に保持され分配されていることが示唆された。しかし、42 のストレス条件下で30日間継代培養することで、一部のクローンから第3のレプリコンが消失した (PCR法及び PFGE法で確認)。この第3のレプリコンの保有の有無で、表現型の変化について解析を開始した。一定の条件下ではコレラ毒素産生量に関して、差異は特に認められなかった。

この様にコレラ菌による大規模遺伝子セットの獲得があるとすれば、コレラ菌 O1 のゲノムが劇的に変化し、抗原型や病原性を変え、新型コレラ菌を生み出す可能性が少なくとも理論的には示唆される。

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)

1. Okada K, Roobthaisong A, Swaddiwudhipong W, Hamada S, Chantaroj S (2013) *Vibrio cholerae* O1 Isolate with Novel Genetic Background, Thailand-Myanmar. *Emerg Infect Dis* 19: 1015-1017. (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

1. 岡田和久、タイにおける *Vibrio cholerae* の疫学：分子生物学的-遺伝学的解析第 87 回日本細菌学会総会、東京、日本、2014 年 3 月 28 日。
2. Okada K, Natakathung W, Na-Ubol M, Roobthaisong A, Chantaroj S, Hamada S, Emergence of *Vibrio cholerae* O1 carrying a gigantic replicon in Thailand, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging

infections 2014, Sendai, Japan, 22
Jan (Oral).

〔図書〕(計 1 件)

1. 岡田和久、浜田茂幸 (2013) タイでコレ
ラに挑む. 感染・炎症・免疫 43: 42-54.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 和久 (OKADA KAZUHISA)
大阪大学・微生物病研究所・特任助教
研究者番号 : 40420434