



Title	化膿レンサ球菌のゲノム解析による薬剤耐性菌に対する治療
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2025
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101275">https://hdl.handle.net/11094/101275</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	いけもとまゆ 池本真悠	学部 学科	歯学部	学年	4年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	大野誠之	所属	大学院歯学研究科 微生物学講座		
研究課題名	化膿レンサ球菌のゲノム解析による薬剤耐性菌に対する治療				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

## 【研究目的】

近年、抗菌薬に耐性を獲得した薬剤耐性菌が増加しており、今日の重要な問題の一つとなっている。現在、薬剤耐性菌による感染症によって世界で年間 70 万人が死亡している。薬剤耐性菌は、抗菌薬の過度な使用や誤った使用によって、細菌が自然発生的に薬剤への耐性を示す遺伝子変異を獲得して生じる。また、他の耐性菌から薬剤耐性遺伝子を水平遺伝子伝播によって得ることによっても生じる。薬剤耐性菌が引き起こす感染症の治療は困難であり、しばしば重症化し、場合により致命的な経過を引き起こす。このような状況から、薬剤耐性菌に対処する方法として、細菌ゲノムを解析し、細菌に感染するバクテリオファージの情報をを用いて抗菌薬と異なる機序の薬剤の開発につなげることを考えた。本研究により薬剤耐性菌の治療法の選択が広がり、現在薬剤耐性菌により苦しめられている罹患患者の方々、またその治療に携わっておられる方々の手助けになる可能性があると考えられる。

## 【研究計画・方法】

## 1. バイオインフォマティクス解析環境の構築

Windows PC 上で Linux を作動させる WSL2 をインストールし、Linux OS である Ubuntu、データサイエンス環境管理プログラム Anaconda をインストールした。さらに、以下の各解析に用いたプログラムをそれぞれ導入した。

## 2. 公的データベースからの細菌ゲノム配列のシーケンスデータ収集

本研究計画で標的とする化膿レンサ球菌のデータを収集し、シーケンスデータ前処理パイプラインである fastp<sup>1</sup> を用いて低クオリティ配列を除去した。次に細菌用のゲノムアセンブラである skesa<sup>2</sup> によって塩基配列の組み立て (*de novo assembly*) を行った。さらにバクテリオファージの解析プログラムである pharokka<sup>3</sup> を用いて、細菌ゲノムに存在するプロファージのアノテーションを実行した。

### 3. ファージ由来溶菌酵素の配列抽出

pharokka 解析で得られたアノテーション情報をもとに、ファージの溶菌酵素の遺伝子配列を、文字列を操作するシェルスクリプトを作成し実行することで抽出した。

### 4. 溶菌酵素の分子系統解析

下記プログラムを用いて各溶菌酵素について分子系統解析を行った。

- 4-1. MAFFT<sup>4</sup>を用いた多重配列整列
- 4-2. trimAl<sup>5</sup>を用いた配列困難部位の削除
- 4-3. MAFFT を用いた再度の多重配列整列
- 4-4. KAKUSAN4<sup>6</sup>による進化モデルの選択
- 4-5. MrBayes<sup>7</sup>によるベイズ法に基づく分子系統樹の算出

### 5. 各溶菌酵素のドメイン構造の推定

各溶菌酵素のアミノ酸配列について、タンパク質統合データベース InterPro<sup>8</sup>を用いたドメイン検索と局在予測を行った。

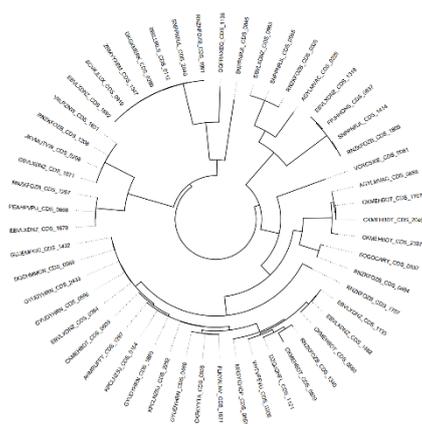
#### 【研究経過・成果】

公的データベースより、化膿レンサ球菌 311 株のペアエンドシーケンスファイルを得た。fastp プログラムにてクオリティ管理、アダプター配列の除去、リードフィルタリングを行った。前処理した fastq ファイルを用いて、細菌ゲノムアセンブリツールである SKESA にてゲノムアセンブルを行った。その結果、311 株のドラフトゲノム配列を得た。次に、ファージ配列のアノテーションプログラムである Pharokka を、Anaconda を用いた local の仮想解析環境にインストールし、解析を実施した。Pharokka による解析では、ドラフトゲノム配列中のすべての遺伝子配列に対してアノテーションが実施された。そこで、分子の機能として溶菌に寄与することが予測された遺伝子群の抽出を行った。

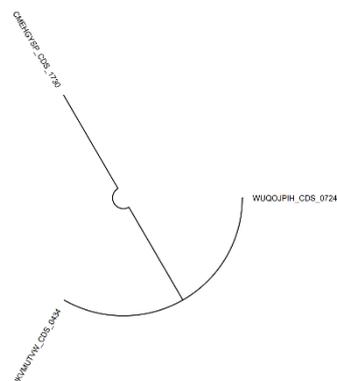
得られた遺伝子群は、endolysin, holin, amidase の 3 種類に大別され、それぞれ 1898 遺伝子、462 遺伝子、115 遺伝子検出された。同一配列を一種類とみなしてさらにまとめると、endolysin は 58 種類、amidase は 3 種類、holin は 33 種類存在することが明らかとなった。次に、MrBayes を用いた分子系統樹の作成を行った。MrBayes は、ベイズ統計に基づく分子系統樹の算出プログラムである。得られた結果から、Figtree を用いて系統樹の描画を行った (図 1)。

InterPro にて endolysin, holin, amidase のタンパク質のモチーフ検索を行った結果(図 2)、signal peptide を持つ endolysin が 14 個あることが分かった。これらの endolysin は菌体外に分泌されることが予測されることから、可溶性が高く組換えタンパク質として作製しやすいと考えられる。今後、これらの endolysin について大腸菌を用いた組換えタンパク質を作製し、化膿レンサ球菌に対する溶菌能を検証したい。

A



B



C



図1. ベイズ法に基づくファージの細菌細胞壁分解酵素の分子系統樹.

系統樹は、各ファージの遺伝子配列に基づいて MrBayes により計算された。Figtree を用いて、ミッドポイント法にて描画した無根系統樹として出力した。

A. endolysin の分子系統樹.

B. amidase の分子系統樹.

C. holin の分子系統樹.

#### 【今後の展望】

選択した遺伝子配列を基にして、組換えタンパク質を作製する。溶菌酵素の遺伝子配列は、大腸菌に最適化した配列を人工合成して作製する。発現ベクターに溶菌酵素の遺伝子配列を導入した後に、大腸菌に形質転換する。発現した組換えタンパク質は、ヒスチジンタグを用いたアフィニティークロマトグラフィーにて精製する。得られた組換え溶菌酵素を化膿レンサ球菌に添加し、溶菌作用を示すかを検証する。

Entry matches to this protein<sup>®</sup> [ ] [-] [+] Options Download

Domains

Conserved Residues

Unintegrated

Other Features

Representative domains

cd16891  
Putative sugar binding site

Unintegrated  
CATHGENE3D: G3DSA:1.10.530.10

PHOBUS: SIGNAL\_PEPTIDE\_C\_REGION  
SIGNALP\_EUK: SignalP-notM

PHOBUS: SIGNAL\_PEPTIDE\_N\_REGION  
PHOBUS: SIGNAL\_PEPTIDE\_H\_REGION  
PHOBUS: SIGNAL\_PEPTIDE  
PHOBUS: NON\_CYTOPLASMIC\_DOMAIN

**InterPro GO terms**  
No GO Terms

**PANTHER GO terms**  
No GO Terms

**図 2. InterPro によるドメイン検索**

**【参考文献】**

- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018 Sep 1;34(17):i884-i890.
- Souvorov A, Agarwala R, Lipman DJ. SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biol*. 2018 Oct 4;19(1):153.
- Bouras G, Nepal R, Houtak G, Psaltis AJ, Wormald PJ, Vreugde S. Pharokka: a fast scalable bacteriophage annotation tool. *Bioinformatics*. 2023 Jan 1;39(1):btac776.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013 Apr;30(4):772-80.
- Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. 2009 Aug 1;25(15):1972-3.
- Tanabe AS. Kakusan4 and Aminosan: two programs for comparing nonpartitioned, proportional and separate models for combined molecular phylogenetic analyses of multilocus sequence data. *Mol Ecol Resour*. 2011 Sep;11(5):914-21.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. 2012 May;61(3):539-42.
- Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S, Grego T, Pinto BL, Salazar GA, Bileschi ML, Bork P, Bridge A, Colwell L, Gough J, Haft DH, Letunić I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jan 6;51(D1):D418-D427.