

Title	ウェルシュ菌が保有する病原因子の水平伝播機構の解明
Author(s)	上田, 賢吾
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92099
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (上 田 賢 吾)	
論文題名	ウェルシュ菌が保有する病原因子の水平伝播機構の解明
論文内容の要旨	
<p>ウェルシュ菌 (<i>Clostridium perfringens</i>) は芽胞を形成するグラム陽性菌であり、ヒトや動物において胃腸炎や下痢症、ガス壊疽などの原因となる。ウェルシュ菌の病原性は主に毒素によるものであり、20種類以上の毒素を産生することが知られている。長年、ウェルシュ菌による食中毒は腸管毒素CPE (<i>C. perfringens</i> enterotoxin) によって引き起こされるとされてきたが、2009年大阪府と2010年栃木県で発生したウェルシュ菌が原因菌となった集団食中毒事例ではCPEは検出されなかった。これらのウェルシュ菌に関して遺伝学的解析等の結果から、新規二成分毒素BEC (binary enterotoxin of <i>C. perfringens</i>) が原因毒素として同定された。BECが報告されて以降、BEC遺伝子 (<i>bec</i>) 保有ウェルシュ菌株は国内を中心に分離されており、申請時点では11株の分離が報告されている。11株のうち8例は国内で分離された株であるが、残りの3例はイギリス (1株) とアメリカ (2株) で分離された株であり、<i>bec</i>保有ウェルシュ菌株は国外へも広がりを見せている。しかしながら全ゲノム情報が報告されているのは、国外で分離された3株のドラフトゲノムのみであり、<i>bec</i>保有ウェルシュ菌株の遺伝学的な特徴はほとんど明らかになっていない。そのためゲノム疫学的情報が乏しく、地理的条件や分離時期が異なる <i>bec</i> 保有株が複数報告されているにも関わらず <i>bec</i> がどのように拡散されてきたのか議論することは困難であった。</p> <p>本学位論文において、申請者は国内で分離された <i>bec</i> 保有ウェルシュ菌株5株のゲノムDNAを抽出し、ショートリードとロングリードの両シーケンスプラットフォームを用いたゲノムDNAシーケンスを行うことで、初めて <i>bec</i> 保有ウェルシュ菌株の完全長ゲノム配列を決定し、<i>bec</i> の拡散機構を明らかにした。各菌株は約3.3 Mbpの染色体を1つと約1.5-5.5 kbpのプラスミドを1-3つ保有していた。また <i>bec</i> はいずれも同配列で、約54 kbpの非常に配列相同性が高い (>99.81%) プラスミド上に存在していた。またデータベースにゲノム情報が登録されている <i>bec</i> 保有ウェルシュ菌株3株と、本学位論文でゲノム配列を決定した <i>bec</i> 保有株5株の計8株を含む601株のウェルシュ菌のゲノム情報を用いて、コアゲノムのSNPの位置から最尤法で系統樹を作成した。系統樹は大きく8つの系統に分類され、そのうち <i>bec</i> 保有ウェルシュ菌株は2つの系統に分かれてそれぞれ6株と2株が属していた。 <i>bec</i> を含むプラスミドは類似していたにも関わらず、 <i>bec</i> 保有ウェルシュ菌株は2つの系統に大別されたことから、2つの系統間ではプラスミドの水平伝播によって <i>bec</i> が転移したことが示唆された。</p> <p>また <i>bec</i> 保有プラスミドの高い配列相同性 (>99.81%) から、同系統内の菌株同士でも水平伝播によって <i>bec</i> が拡散された可能性が考えられたが、異系統間の比較時よりも染色体同士の遺伝的距離が近く、より詳細に染色体とプラスミドの配列比較を行う必要性があった。そこで各系統内も含め8株の <i>bec</i> 保有ウェルシュ菌株全ての染色体と <i>bec</i> 保有プラスミドでそれぞれSNPの割合を算出して比較した。その結果、8株中3株を除いて染色体のSNPの割合 (0.199-2.43%) の方がプラスミドのSNPの割合 (0-0.0312%) よりも高い結果となった。このことは、 <i>bec</i> 保有プラスミドが水平伝播によって獲得された可能性が高いことを示しており、同系統内の菌株同士でも水平伝播していたことを示す結果となった。このSNPの比較解析は、完全長ゲノム配列を決定したことによって可能となったもので、プラスミドが水平伝播によって拡散されたのかを検証する新たな手法として本研究で提案したものである。</p> <p>プラスミドの水平伝播機構には形質転換や形質導入、接合伝達などがあるが、アノテーションツールを用いたゲノム解析ではどのような機構によって水平伝播したのかは明らかにできなかった。そこで既存のプラスミドの遺伝子情報を用いてマニュアルでより詳細なアノテーションを行ったところ、ウェルシュ菌の代表的な菌株strain 13のプラスミドpCP13と約70%の領域で高い相同性が見られた。pCP13は接合伝達を行わないとされてきたが、近年、新規のIV型分泌システムを保有しており、このシステムの働きによって接合伝達を行うことが明らかになった。このIV型分泌システムをコードする遺伝子座はPcp遺伝子座と命名され、各 <i>bec</i> 保有プラスミドのいずれもPcp遺伝子座を保有していることが明らかとなった。このことから、 <i>bec</i> はプラスミドの接合伝達によって拡散されてきたことが示唆された。</p> <p>ウェルシュ菌においてIV型分泌システムをコードする遺伝子座はPcp遺伝子座以外に <i>tcp</i> 遺伝子座が知られており、</p>	

601株のウェルシュ菌のうち67.7%がいずれかの遺伝子座を保有していることを明らかにした。これまでIV型分泌システムについては、グラム陰性菌において創薬研究が盛んに行われてきた。本研究ではグラム陽性菌であるウェルシュ菌においても接合伝達が病原因子等の遺伝子拡散に重要な役割を持つことを示し、有望な創薬ターゲットになり得ることを提案した。

本研究では*bec*保有ウェルシュ菌株の完全長ゲノム配列を決定し、系統樹解析やSNPの割合の比較解析などから*bec*保有株がプラスミドの水平伝播により*bec*を獲得してきたことを示した。またpCP13との類似性から、接合伝達による水平伝播によって*bec*が広まってきたことを明らかにした。さらにウェルシュ菌において67.7%の菌株が接合伝達を行うIV型分泌システムの遺伝子座を保有していることを示し、接合伝達がウェルシュ菌間の遺伝子拡散において一般的に用いられる機構であることを明らかにした。以上の知見は、今後、ウェルシュ菌における遺伝子拡散を制御する薬剤の開発へと資することが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (上田 賢吾)			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	大久保 忠恭
	副 査	教授	福澤 薫
	副 査	教授	西野 邦彦

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は、食中毒を引き起こす毒素BECの遺伝子(*bec*)を保有するウェルシュ菌を国内の食中毒事例などから分離し、5つの菌株について完全長ゲノム配列を決定し、比較解析などから*bec*は主にプラスミドの水平伝播を介して拡散されたことを明らかにした。

BECは2009年に国内で発生した集団食中毒事例から新規に同定された毒素である。最初の報告以降、*bec*保有ウェルシュ菌株は国内を中心に11株が分離されており、近年ではイギリスやアメリカといった国でも計3株分離されるなど、さらなる広がりを見せている。しかしゲノム情報が報告されているのは国外で分離された3株のドラフトゲノムのみであり、*bec*保有ウェルシュ菌株の遺伝学的な特徴は詳細には明らかになっていない。そのためゲノム疫学的な情報も乏しく、地理的条件や分離時期が異なる*bec*保有ウェルシュ菌株が複数分離されているにも関わらず、*bec*がどのように拡散されてきたのか議論することは困難であった。

本研究では、国内で分離された*bec*保有ウェルシュ菌株5株に関してハイブリッドシーケンス法を用いて完全長ゲノム配列を決定し、*bec*はいずれの菌株でも配列相同性が>99.81%と類似した配列を持つプラスミド上に存在することを示した。またウェルシュ菌601株のゲノム情報を用いた系統樹解析を行い、*bec*保有ウェルシュ菌株が2系統に分類されたことから、2つの系統間でのプラスミドの水平伝播があった可能性を示した。一方で同系統内でも*bec*保有ウェルシュ菌株が離れた分岐に存在したことから、さらに染色体とプラスミドに導入された変異の数の割合を比較した解析を行い、同系統に属する菌株間でもプラスミドの水平伝播があった可能性を示し、*bec*は主に水平伝播によって拡散されてきたことを示した。染色体とプラスミドの配列の変異の割合を比較する解析手法は本研究で申請者が提案した手法であり、他の研究においてもプラスミドの水平伝播があった可能性を明らかにする手法として活用することができる。

*bec*保有ウェルシュ菌株に関する詳細な遺伝子解析を行った結果、近年発見されたIV型分泌システムをコードするPcp遺伝子座を保有することを明らかにした。IV型分泌システムはプラスミドの水平伝播機構の一種である接合伝達に用いられることから、*bec*保有ウェルシュ菌株も接合伝達によってプラスミドの水平伝播を行ってきたことを明らかにした。また601株のウェルシュ菌のゲノム情報を用いて、Pcp遺伝子座と既知のIV型分泌システムをコードする*tcp*遺伝子座を保有する菌株を明らかにし、67.7%にのぼるウェルシュ菌がいずれかの遺伝子座を保有しており、接合伝達によってプラスミドを拡散できる可能性を示した。またこの結果から、ウェルシュ菌において接合伝達は遺伝子拡散において重要な役割を担う機構と位置づけた。本研究では、グラム陽性菌であるウェルシュ菌においてIV型分泌システムを介した接合伝達が毒素遺伝子の拡散において重要な位置を占めることを明らかにしており、IV型分泌システムをターゲットとした研究が毒素や薬剤耐性因子の遺伝子拡散の対策となり得ることを示した。

本研究結果は、ウェルシュ菌の新規毒素の遺伝子拡散機構を明らかにし、さらにはIV型分泌システムがグラム陽性菌のウェルシュ菌において遺伝子拡散の重要な位置を占めることを示したものであり、その意義は大きく、ウェルシュ菌の感染拡大防止と症状緩和に関して有用な知見を与えるものであると考えられるため、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。