

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

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

2022 年度

大阪大学大学院 薬学研究科
創成薬学専攻 高分子化学分野

上田賢吾

目次

略語表	2
緒論	3
本論	11
第一章 <i>bec</i> 保有ウェルシュ菌株のゲノム解析	11
第二章 <i>bec</i> 保有プラスミドの水平伝播機構の解明	26
結論	43
謝辞	44
実験の部	45
引用文献	51
主論文	56

略語表

ADP	Adenosine diphosphate
<i>alv</i>	Alveolysin
ANI	Average nucleotide identity
BEC (<i>bec</i>)	Binary enterotoxin of <i>Clostridium perfringens</i>
BLASTn	Basic local alignment search tool nucleotide
bp	base pair
CDS	Coding sequences
<i>cloSI</i>	alpha-clostripain
<i>colA</i>	Collagenase
CPB (<i>cpb</i>)	<i>Clostridium perfringens</i> beta toxin
CPE (<i>cpe</i>)	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat
CW	<i>Clostridium Welchii</i>
dDDH	digital DNA-DNA Hybridization
DNA	Deoxyribonucleic acid
ETX (<i>etx</i>)	epsilon toxin
ITX (<i>itx</i>)	iota toxin
<i>nag</i>	N-acetylglucosamine
Net (<i>net</i>)	necrotic enteritis toxin
PB	Phosphate buffer
Pcp (<i>pcp</i>)	pCP13 <i>Clostridium perfringens</i>
PCR	Polymerase chain reaction
<i>pfoA</i>	perfringolysin O
PLC (<i>plc</i>)	phospholipase C
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SNP	Single nucleotide polymorphism
<i>tcp</i>	transfer of clostridial plasmids
<i>topA</i>	Topoisomerase I
TpeL (<i>tpeL</i>)	Toxin perfringens large
tRNA	transfer ribonucleic acid

緒論

病原性を持つウェルシュ菌

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 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[1-6]。各ウェルシュ菌株は複数の毒素を産生し、産生する毒素のうち α -毒素 (phospholipase C; PLC; *plc*), β -毒素 (CPB; *cpb*), ϵ -毒素 (ETX; *etx*), ι -毒素 (ITX; *iap/ibp*) の4種類の毒素の組み合わせによって A-E 型の5つの毒素型に分類されてきた。しかし近年、分類の判別に用いられる毒素に *C. perfringens* enterotoxin (CPE; *cpe*) と necrotic enteritis toxin B (NetB; *netB*) の2つが加わり、6種類の毒素の組み合わせで A-G 型の7つの毒素型に分類するようになった(表1)[7-10]。

表1 毒素の組み合わせによる毒素型の分類

毒素型	α -毒素	β -毒素	ϵ -毒素	ι -毒素	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

毒素型分類に用いられる6種類の毒素をコードする遺伝子のうち *plc* と *cpe* の2種類は、染色体上に存在する。*plc* は全てのウェルシュ菌株が保有する毒素遺伝子であり、全て染色体上に存在する。一方で、*cpe* に関しては染色体上とプラスミド上のものがある。それ以外の *cpb*、*etx*、*iap/ibp*、*netB* は全てプラスミド上に存在する[11-13]。これらのプラスミド上の毒素遺伝子に加え、近年胃腸炎の原因となるウェルシュ菌から新規毒素をコードした遺伝子をもつプラスミドも同定されており、例として2007年に *tpeL*、2008年に *netB*、さらに2015年に *netE*、*netF*、*netG* の3種類が報告されている[14-17]。また、我々の研究グループは、2009年の大阪府と2010年の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から、プラスミド上の遺伝子にコードされている新規毒素 BEC (binary enterotoxin of *C. perfringens*) を同定してきた[18, 19]。

胃腸炎を引き起こす新規二成分毒素 BEC

これまで、ウェルシュ菌による食中毒は腸管毒素 CPE が主要な病原因子であると考えられていた。しかし 2009 年の大阪府と 2010 年の栃木県で発生した集団食中毒事例では疫学的情報やゲノム DNA のパルスフィールド電気泳動の結果から、原因菌としてウェルシュ菌が強く疑われたにも関わらず、これらの事例の分離ウェルシュ菌から CPE は検出されなかった。そこで、我々は液体貯留活性を示す単一の毒素を精製・特定し、次世代シーケンサーによる解析などから、新規毒素 BEC を同定した[18]。

BEC は ADP リボシル化二成分毒素ファミリーに属する毒素であり、酵素活性成分 (BECa) と細胞結合成分(BECb)の 2つの成分で構成される。BECa は NAD^+ を基質として細胞内の G-アクチンを ADP リボシル化して重合阻害することで細胞骨格の破壊を促す。BECb は、細胞表面の受容体に結合して膜孔を形成し、BECa を細胞内へと輸送する働きを持つと考えられている(図 1)。細胞実験では BECa と BECb をそれぞれ単独で Vero 細胞に添加した際には細胞毒性は見られないが、両成分を添加した際には細胞の円形化や細胞死が引き起こされることが報告されており(図 2)、両成分が協働することで毒性を発現することが明らかになっている[18]。

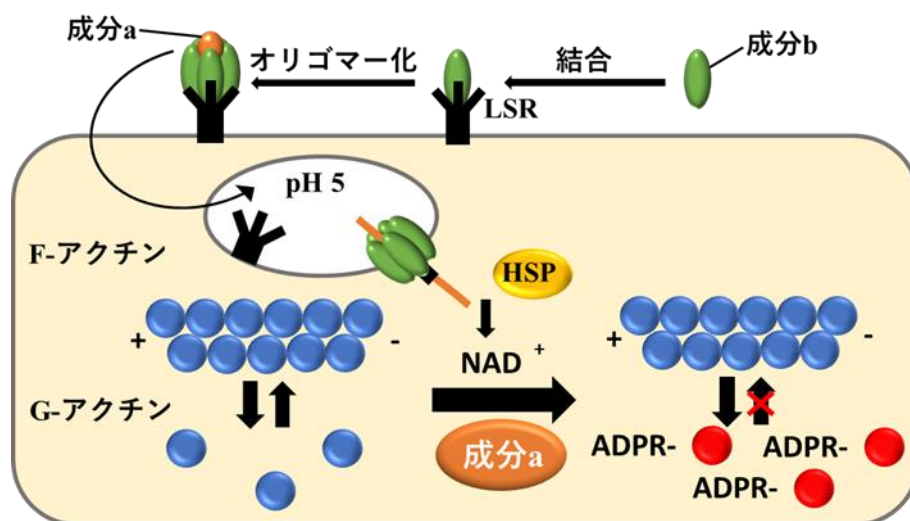


図 1 新規毒素 BEC の作用機序の模式図。 ウェルシュ菌から分泌された BEC を構成する 2 成分のうち BECb (成分 b) は、宿主細胞上受容体に結合し、多量体化したのち BECa (成分 a) と結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入する。その後エンドソーム内が酸性(約 pH 5.0)になると膜孔を形成し BECa を細胞質に送り込む。BECa は、細胞質内で G-アクチンを NAD^+ を基質として ADP リボシル(ADPR)化することによって、細胞毒性を示す。BECb の受容体は未だ明らかでないが、他の類似毒素との類推から Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)が候補として推定されている。

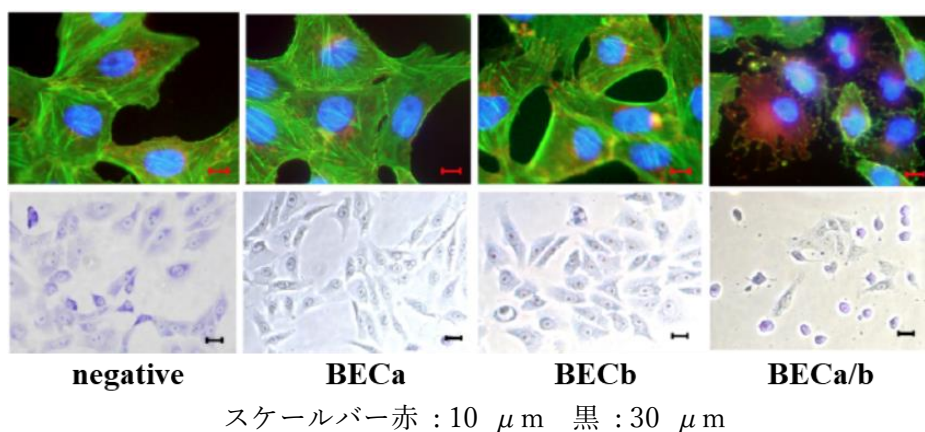


図 2 BEC による細胞毒性の発現 [18]. Vero 細胞に毒素を添加し、37°Cで 3h インキュベート後の顕微鏡写真。上の写真はアクチンが緑、細胞膜が赤、核が青で染色されている。

さらに、我々は X 線結晶構造解析で BECa 単体および BECa-NADH の立体構造を決定することで(PDB ID ; 5H03)[20]、当該毒素が ADP リボシル化二成分毒素ファミリーに典型的な $\alpha\beta$ 型の折り畳み構造を採ることを明らかにし、BECa の基質認識機構の詳細を原子レベルで明らかにした。また、BECa-NAD-アクチンの三者複合体モデルを構築し (図 3)、分子動力学シミュレーションにより、G-アクチンの ADP リボシル化機構を提案し、BECa の毒性発現機構を考察した[2021 年度修士論文、木本成美]。

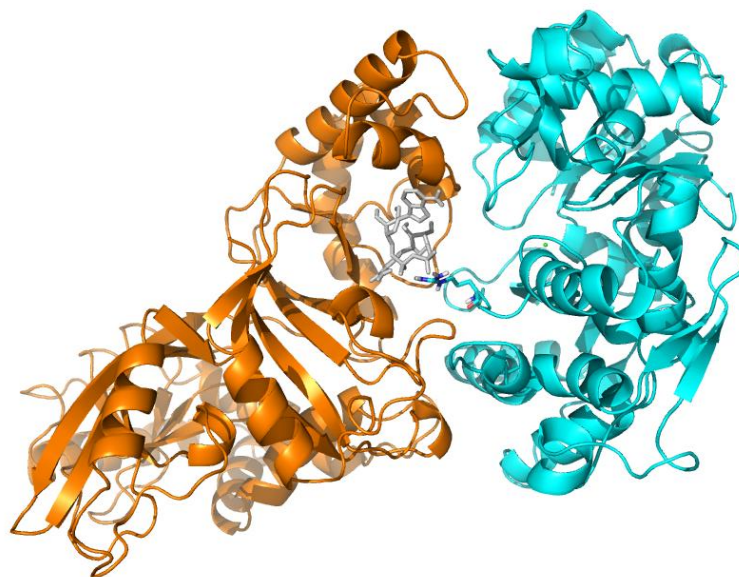


図 3 . BECa-NAD⁺-アクチン三者複合体モデル. 複合体モデルは、既報のイオタ毒素 Ia-NAD⁺-アクチン三者複合体構造 (PDB code:4H03) を鋳型とし、BECa の結晶構造 (PDB code:5H03) を重ね合わせることで構築した。複合体中で、NAD⁺と被修飾残基である G-アクチンの Arg177 をスティックモデルで示した。

bec 保有ウェルシュ菌の分離状況

我々が初めて BEC を報告して以降[18]、国内を中心に *bec* 保有株が分離されており、本研究を開始した 2019 年 8 月時点では前述の 2009 年大阪府と 2010 年栃木県以外に、1997 年と 2003 年に東京都(いずれも 2015 年報告)[19, 21]、2019 年に北海道[22]とイギリス[23]で合計 4 株の分離が報告されていた。さらに我々は 2013 年に大阪府(大阪健康安全基盤研究所)、2018 年と 2019 年に愛知県(愛知県衛生研究所)において新たに 3 株の *bec* 保有株を分離しており、2019 年 8 月時点で合計 9 株が分離されていた。しかしながら、これらの分離株のうち、ゲノム情報が報告されていたのはイギリスの 1 株のドラフトゲノムのみであり[23]、*bec* 保有株の遺伝学的な特徴はほとんど明らかになっていなかった。従って、地理的条件や分離時期が異なる *bec* 保有株が複数報告されているにも関わらず、*bec* がどのような機構に基づき各ウェルシュ菌株へ拡散されてきたのかを議論することが困難であった。そのため、各分離株を収集し、それらのゲノム情報を得る必要性があった。

本研究の開始以降、2021 年にアメリカで 2 株の *bec* 保有株の分離例が報告され、いずれもドラフトゲノムではあるが、全ゲノム配列が報告された。これは、イギリスに続いて 2 か国目の国外での報告例であり、*bec* はさらなる広がりを見せていると言える(図 4, 5 および表 2)。本研究では、既に全ゲノム情報が報告されているイギリスおよびアメリカで分離された 3 株に加えて、我々が分離した 2009 年および 2013 年大阪府と 2010 年栃木県、2018 年および 2019 年愛知県の 5 株の全ゲノム情報を収集し、合計 8 株の全ゲノム情報を用いたゲノム疫学解析及び比較ゲノム解析を行うことで、*bec* の拡散機構について考察することとした。

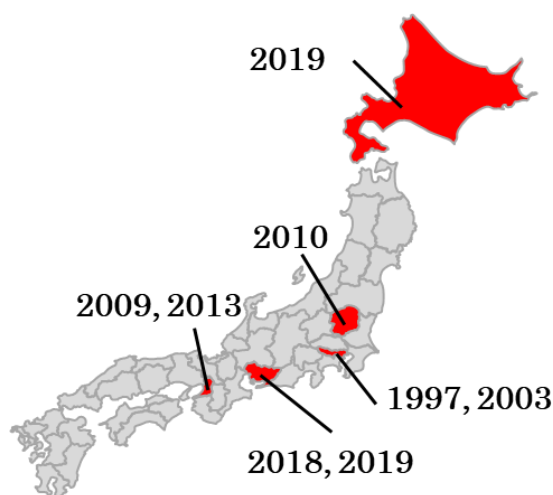


図 4 日本国内での *bec* 保有株の分離状況。国内では大阪府、愛知県、東京都、栃木県、北海道で 1997~2019 年に渡って *bec* 保有株が 8 株分離されている。いずれも全ゲノム情報は報告されていない。



図5 国外での *bec* 保有株の分離状況. 国外では 2019 年にイギリスで 1 株、2021 年にアメリカで 2 株の合計 3 株の *bec* 保有株が分離されており、いずれもドラフトゲノムで全ゲノム情報が報告されている。

表2 *bec* 保有株の分離状況

菌株名	分離年	発生場所	分離元	参考文献	Accession
W5052	1997	東京都	食中毒患者	18, 21	-
-	2003	東京都	食中毒患者	18, 21	-
OS1	2009	大阪府	食中毒患者	本研究	
TS1	2010	栃木県	食中毒患者	本研究	
O13-19	2013	大阪府	食中毒患者	本研究	
A18-256	2018	愛知県	食中毒患者	本研究	
A19-1	2019	愛知県	牡蠣	本研究	
Q135.2	2019	イギリス	健常 2 歳児	23	GCA_902459425.1
CP653	2019	北海道	食中毒患者	22	-
ASM1837293v1	2021	アメリカ	不明	-	GCA_018372935.1
PDT001006423.1	2021	アメリカ	不明	-	GCA_018011955.1

細菌の水平伝播機構

細菌の遺伝子獲得は母細胞から娘細胞への遺伝以外に、外部から DNA を取り込む水平伝播によっても行われる。水平伝播は細菌の進化において極めて重要な現象で、細菌は外部から DNA を取り込むことで生存に有利な遺伝子を取り込み、環境に適応してきた。水平伝播は数百 bp の小さな DNA 断片を転移するものや多くの遺伝子を転移するものなど様々な機構によって起こり、代表的な機構として、形質転換、形質導入、接合伝達の 3 種類が挙げら

れる(図 6)[24, 25]。形質転換は環境中から能動的に DNA を取り込む現象で、形質導入や接合伝達とは異なりレシピエント細胞の働きによって始まる。形質導入はファージを介した DNA の転移で、細菌に感染したファージが宿主細菌の遺伝子を取り込んで次に感染する細菌内へと導入する。ファージは溶菌性と溶原性の 2 種類が存在し、溶菌性ファージは感染後すぐにウイルスが複製されて細菌は破壊される。一方で溶原性ファージは感染後に宿主の DNA に統合されてプロファージとなる。細菌の DNA 複製に伴ってプロファージも複製されて子孫の細菌へと遺伝していく。接合伝達は IV 型分泌システムを介した DNA の転移で、ほとんどの場合でプラスミドを転移させる。

2021 年 9 月時点でデータベース上に 596 株のウェルシュ菌のゲノム情報が登録されているが、その多くがドラフトゲノムであり、特定の毒素遺伝子が染色体上に存在するのか、プラスミド上に存在するのかを議論することが困難であった。また多くのウェルシュ菌は最大で 3 種類程度の異なるプラスミドを保有することが知られており、各々が複数種類の毒素をコードすることもあることから、病原性因子が上述のどのような機構によって拡散されてきたのか議論することが困難であった。

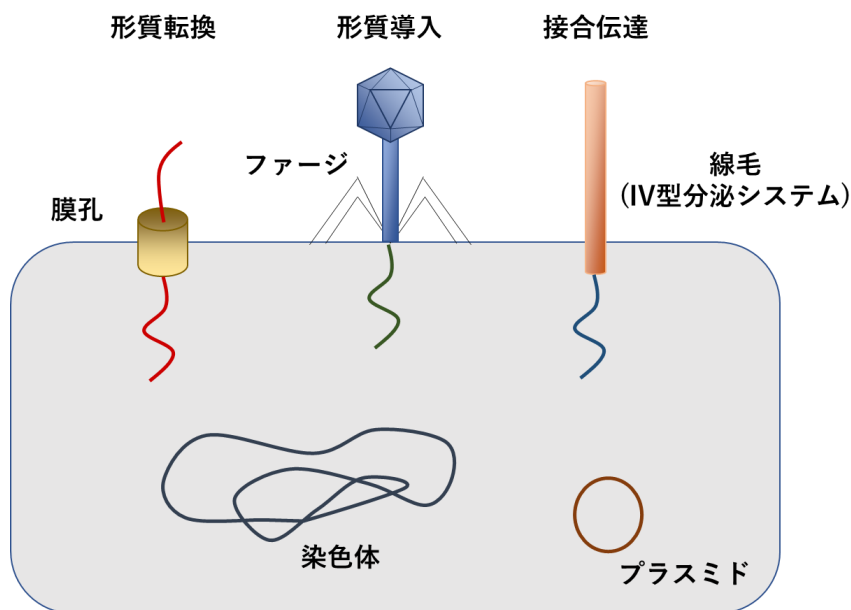


図 6 細菌の水平伝播機構. 細菌の水平伝播は主に形質転換、形質導入、接合伝達の 3 種類がある。形質転換は細胞外にある遊離 DNA など膜孔を通して取り込む。形質導入ではファージが取り込んだ DNA が取り込まれる。接合伝達では IV 型分泌システムを介して他の細菌から直接 DNA を取り込む。

DNA シーケンスの手法

2010 年代以降、細菌のゲノム DNA シーケンスには第 2 世代のシーケンサー（ショートリード）や第 3 世代のシーケンサー（ロングリード）が用いられることが一般的となった。ショートリードのシーケンサーには MiSeq (Illumina) などがあり、シーケンスのクオリティが高いが（エラー率はおよそ $<2\%$ ）[26]、各リードは数百 bp と短いためリード長よりも長い反復配列などを含むゲノム配列を決定することは困難である。そのためショートリードのシーケンサーで決定したゲノム配列は断片的な配列情報のコンティグやギャップを含んでいるスキファールドを集めたドラフトゲノムとして決定されることが多い[27-29]。一方、ロングリードのシーケンサーには MinION (Oxford Nanopore Technologies) や PacBio (Pacific Biosciences) などがあり、シーケンスのクオリティはショートリードの場合と比較して低い（エラー率はおよそ $<15\%$ ）[30]。そのためリードのエラー補正を正確に行わなければ、遺伝子の予測に重大な影響を及ぼす可能性がある[27-29]。しかし各リードは数 kbp 以上と長いため、数百 bp 以上の反復配列などを含むゲノム配列のアセンブリを行うのに適している。そこで近年では両シーケンサーの長所を活かし、ロングリードの配列でアセンブリした配列を高くクオリティのショートリードの配列で補正する“ハイブリッドシーケンス”と呼ばれる手法が開発され、染色体や各プラスミドを環状配列としてアセンブリした完全長ゲノム配列を正確に決定することが可能となった[30-33]。完全長ゲノム配列を決定することにより、各遺伝子が染色体とプラスミドのどちらに存在するのか、あるいは複数のプラスミドのうちどのプラスミドに存在するのかといったことが以前よりも容易に分かるようになり、遺伝子の拡散機構について知見を得やすくなった。

しかしながら、ハイブリッドシーケンスはコストや手間もかかるため、細菌のゲノム配列を決定する上で一般的な手法としては普及しておらず、ウェルシュ菌についてアメリカ国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information : NCBI）のデータベースにゲノム情報が登録されている 596 菌株のうち、完全長ゲノム配列として登録されている菌株は 48 菌株（8.05%）のみである。

本研究の目的

本研究では *bec* 保有株の完全長ゲノム配列を決定し、ゲノム疫学解析および比較ゲノム解析を通して *bec* の拡散機構を明らかにすることを目的とした。

第一章では、我々が分離した 2009 年および 2013 年大阪府、2010 年栃木県、2018 年および 2019 年愛知県の 5 株 (OS1、O13-19、TS1、A18-256、A19-1 株) に関してハイブリッドシーケンスを行い、*bec* 保有株としては初めての完全長ゲノム配列情報を得た。得られた結果から、*bec* はいずれも類似のプラスミド上にコードされており、全て同配列であることが明らかになった。また、得られた 5 株の情報とデータベース上に登録されている 596 株のウェルシュ菌の全ゲノム情報を用いた系統樹解析を行うことで、*bec* 保有株の系統関係を明らかにした。以上に加えて、完全長ゲノム配列の決定により、染色体とプラスミドの配列を分けて解析することが可能となったため、本研究では染色体とプラスミドの SNP の割合を比較することで、プラスミドが同一祖先から垂直方向に遺伝したのか、あるいは水平伝播によって獲得したのかを判別する新たな手法を開発し、*bec* 保有プラスミドが水平伝播によって拡散されてきたことを提唱した。

第二章では、*bec* 保有プラスミドについてアノテーションを行い、当該プラスミドが IV 型分泌システムをコードする遺伝子群をもち、接合伝達によって水平伝播してきたことを示した。さらに、ウェルシュ菌の異なる系統間での接合伝達性プラスミドの広がりについての知見を得、ウェルシュ菌の病原性及び薬剤耐性遺伝子の獲得に関して、IV 型分泌システムが重要な役割を担うことを明らかにした。

本論

第一章 *bec* 保有ウェルシュ菌株のゲノム解析

第一節 序論

本章では国内で分離された *bec* 保有株 5 株のゲノム DNA シーケンスを行い、完全長ゲノム配列を決定した(表 3)。OS1 と TS1 はそれぞれ 2009 年と 2010 年に大阪府と栃木県で発生した集団食中毒事例で分離された菌株で、これらの菌株から初めて胃腸炎の発症に関わる毒素 BEC の存在が明らかになった。O13-19 と A18-256 はそれぞれ 2013 年と 2018 年に大阪府と愛知県で食中毒患者から分離された菌株である。A19-1 は愛知県の市場で売られていた牡蠣から分離された菌株で、産地は不明である。

表 3 本研究で用いた *bec* 保有株

菌株名	分離年	発生場所	分離元
OS1	2009	大阪府	食中毒患者
TS1	2010	栃木県	食中毒患者
O13-19	2013	大阪府	食中毒患者
A18-256	2018	愛知県	食中毒患者
A19-1	2019	愛知県	牡蠣

第二節 *bec* 保有ウェルシュ菌株のゲノム DNA シーケンス

国内で分離された *bec* 保有株 5 株を本研究に用いた。各菌株のゲノム DNA を抽出し、ショートリード (MiSeq) とロングリード (PacBio または MinION) の 2 種類のシーケンスプラットフォームを用いてゲノム DNA シーケンスを行った。

OS1、TS1 の 2 株は PacBio でロングリードのシーケンスを行った。リード数はそれぞれ約 11.7 万本、22.7 万本、総塩基長は約 476 Mbp、612 Mbp、平均リード長は 4,061 bp、2,694 bp であった(表 4)。

表 4 PacBio リードの統計値

	OS1	TS1
リード数	117,190	227,285
総塩基長 (bp)	475,879,292	612,387,193
平均リード長 (bp)	4,061	2,694
最短リード長 (bp)	35	35
最長リード長 (bp)	47,848	62,049
N50* (bp)	5,215	3,211

* リード長の加重平均。リードを配列長が長いものから順に足していき、総塩基長の半分になった時のリードの長さ。

O13-19、A18-256、A19-1 の 3 株は MinION でロングリードのシーケンスを行った。リード数はそれぞれ約 80.4 万本、115 万本、65.9 万本、総塩基長は約 2.73 Gbp、3.85 Gbp、2.71 Gbp、平均リード長は 3,395 bp、3,350 bp、4,111 bp であった(表 5 および図 7)。

表 5 MinION リードの統計値

	O13-19	A18-256	A19-1
リード数	804,218	1,149,881	658,924
総塩基長 (bp)	2,730,537,575	3,853,040,818	2,709,196,587
平均リード長 (bp)	3,395	3,350	4,111
最短リード長 (bp)	42	46	43
最長リード長 (bp)	33,570	32,103	34,515
N50 (bp)	5,989	6,009	7,083

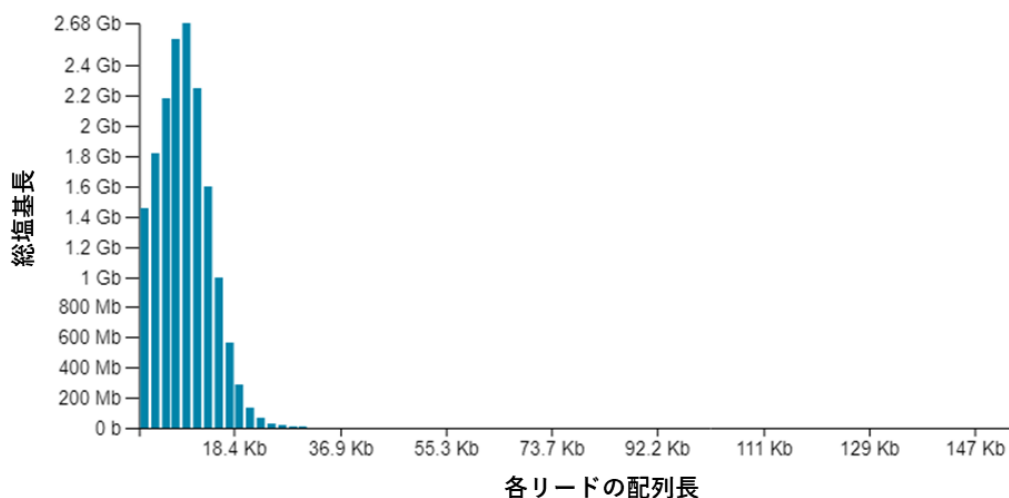


図7 MinION リードの配列長および各配列長の総塩基長. MinION でシーケンスを行った際の各リードの配列長と、配列長毎にリードを加算した総塩基長。約 10 kbp のリードのデータ量が最も多く、ロングリードシーケンスとして十分なクオリティだと予想できる。

ショートリードのシーケンスはいずれも MiSeq で行った。OS1、TS1 の 2 株は 251 bp×2 で、O13-19、A18-256、A19-1 の 3 株は 151 bp×2 でペアエンドシーケンスを行った。

OS1 と TS1 のリード数はそれぞれ約 61.7 万本、69.4 万本、総塩基長は約 155 Mbp、174 Mbp であった。またシーケンスのクオリティ評価の基準として一般的に用いられる $\geq Q30$ (エラーの割合が 10^{-3} 以下と予想されるリード) のリードの割合は 84.9%であった(図 8 および表 6)。

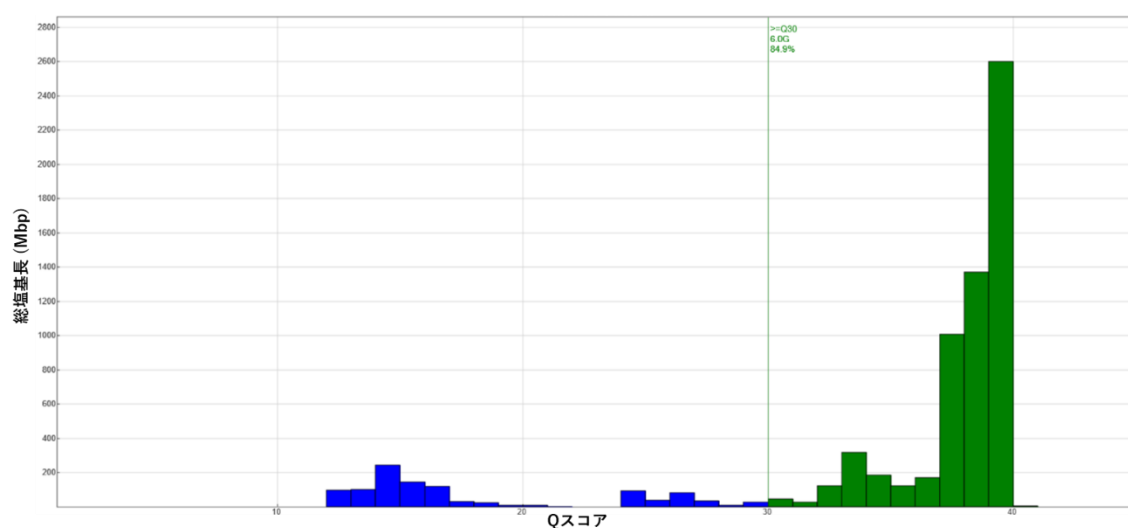


図8 OS1、TS1 の MiSeq リードのクオリティグラフ. $\geq Q30$ を緑で示した。OS1 と TS1 の全リードのうち 84.9%が $\geq Q30$ であり、高クオリティのシーケンスであった。

表6 MiSeq リードの統計値 (OS1、TS1)

	OS1	TS1
リード数	616,838	693,640
総塩基長 (bp)	154,826,338	174,103,640

O13-19、A18-256、A19-1 のリード数はそれぞれ約 239 万本、255 万本、308 万本、総塩基長は約 361 Mbp、385 Mbp、465 Mbp であった。また $\geq Q30$ のリードの割合は 92.8% であった(図9 および表7)。

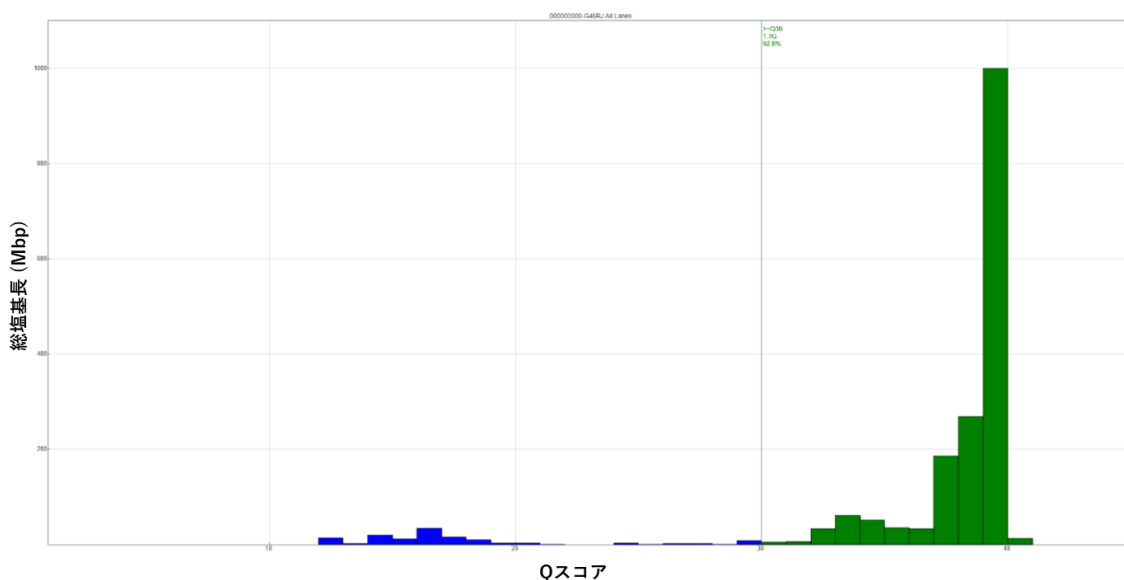


図9 O13-19、A18-256、A19-1 の MiSeq リードのクオリティグラフ。 $\geq Q30$ を緑で示した。O13-19 と A18-256、A19-1 の全リードのうち 92.8%が $\geq Q30$ であり、高クオリティのシーケンスであった。

表7 MiSeq リードの統計値 (O13-19、A18-256、A19-1)

	O13-19	A18-256	A19-1
リード数	2,390,872	2,547,966	3,079,410
総塩基長 (bp)	361,021,672	384,742,866	464,990,910

ウェルシュ菌の平均的な全ゲノム配列長の約 3.3 Mbp を基準とすると、いずれの菌株もショートリードのカバレッジは $\times 45$ 以上、ロングリードのカバレッジは $\times 140$ 以上あり、完全長ゲノム配列を正確に決定するのに十分なデータ量を得られた。

第三節 ゲノム配列のアセンブリ

ゲノム配列のアセンブリは、まず得られたロングリードのデータのみを用いて配列の環状化から行った。各菌株で約 3.3 Mbp の配列 1 つと約 1.5~5.5 kbp の配列が 1~3 つ環状配列として決定された。環状化された配列はショートリードの配列で補正を行い、5 菌株全てで完全長ゲノム配列を決定することに成功した。

アセンブリしたゲノムはウェルシュ菌の代表的な菌株 ATCC13124 をリファレンスゲノムとして、ANI (Average Nucleotide Identity) と dDDH (digital DNA-DNA Hybridization) を算出した。それぞれの値が $\geq 95\%$ と $\geq 70\%$ であれば同一種のゲノムとされ、今回は $\geq 97.1\%$ と $\geq 74.1\%$ であったため、各配列がウェルシュ菌のゲノム DNA であることを確認した。またアノテーションツール Prokka [34] を用いて全ゲノム配列のアノテーションを行い、ゲノムの GC 含量は 28.30~28.43% であり、平均して 3023 個の CDS、96 個の tRNA、31 個の rRNA の遺伝子を保有していることが明らかになった(表 8)。

ウェルシュ菌は GC 含量が約 30% と他の細菌と比較して低く、本研究で決定したゲノム配列も $\leq 28.43\%$ であった。ウェルシュ菌は他の細菌と比較して遺伝子の多様性が高いことから、GC 含量が低いことによって DNA の組み換え等が起こりやすく、様々な遺伝子を取り込みやすい性質を持っていると考えられる [35]。

表 8 5 菌株の統計値

	OS1	TS1	O13-19	A18-256	A19-1
プラットフォーム	PacBio MiSeq	PacBio MiSeq	MinION MiSeq	MinION MiSeq	MinION MiSeq
配列数	4	3	3	3	2
ゲノム長 (bp)	3,367,796	3,508,738	3,459,661	3,520,477	3,405,579
GC (%)	28.43	28.32	28.30	28.32	28.36
CDS	2,956	3,077	3,013	3,075	2,997
tRNAs	96	97	95	96	94
rRNAs	33	30	30	30	30
ANI (%)	98.2	97.1	97.1	97.1	97.1
dDDH (%)	85.0	74.4	74.1	74.6	75.4

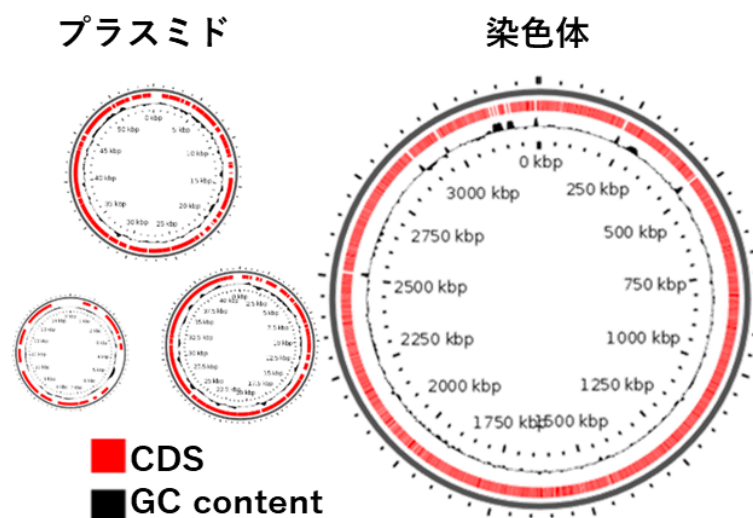


図10 完全長ゲノム配列の決定により明らかになった *bec* 保有株のゲノム配列。例として OS1 が保有する染色体と 3 種類のプラスミドの環状化の結果を示した。環の外側に赤で CDS を、内側に GC content を示した。GC content は環状の折れ線グラフで描かれており、平均よりも高い部分が円の上側に、低い部分が下側に出ている。

完全長ゲノム配列の決定により、各菌株は平均して 3.36 Mbp の染色体を 1 つと様々な配列長(14,826~54,530 bp)のプラスミドを 1~3 つ保有していることが明らかになった(図 10 および表 9)。各プラスミドの名称は、*bec* 保有プラスミドは OS1 と TS1 に関しては pCP-OS1 と pCP-TS1、それ以外の 3 株は pCP-(菌株名)-1 とした。その他のプラスミドは、各菌株の配列が長いものから順に pCP-(菌株名)-(2 or 3)とした。

表 9 5 菌株の染色体とプラスミドの配列長

菌株	染色体		プラスミド		
	配列長 (bp)	プラスミド名 (<i>bec</i> 保有)	配列長 (bp)	プラスミド名 (その他)	配列長 (bp)
OS1	3,256,834	pCP-OS1	54,536	pCP-OS1-2	41,600
				pCP-OS1-3	14,826
TS1	3,418,761	pCP-TS1	54,478	pCP-TS1-2	35,499
O13-19	3,357,727	pCP-O13-19-1	54,536	pCP-O13-19-2	47,265
A18-256	3,418,734	pCP-A18-256-1	54,478	pCP-A18-256-2	47,265
A19-1	3,350,958	pCP-A19-1-1	54,536	-	-

いずれの菌株も *becA/becB* は約 54 kbp のプラスミド上 (pCP-OS1、pCP-TS1、pCP-O13-19-1、pCP-A18-256-1、pCP-A19-1-1) にコードされており、*becA/becB* の配列は完全に同配列であった。

第四節 病原性因子および薬剤耐性因子の遺伝子のアノテーション

さらにクロストリジウム属の毒素と薬剤耐性因子の遺伝子配列をクエリとした配列検索によりアノテーションを行った。*bec* 以外の毒素遺伝子は、*plc* (Phospholipase C)、*colA* (collagenase)、*pfoA* (perfringolysin O)、*cloSI* (alpha-clostripain)、*nagH*、*nagI*、*nagJ*、*nagK*、*nagL* (5 つとも加水分解酵素)、*nanH*、*nanI*、*nanJ* (3 つとも sialidase) が各菌株の染色体上に存在し、さらに OS1 の染色体上に *alv* (alveolysin) が存在していた。

一方で、各菌株のプラスミド上には *bec* 以外の既知の毒素遺伝子は見つからなかった。本研究で用いた 5 菌株はいずれも染色体上にテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetM*)を保有しており、OS1 はテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetA(P)*)とクロラムフェニコール耐性遺伝子(*crp*)も保有していた。O13-19 と A18-256 の 2 株は約 47 kbp のプラスミド上(pCP-O13-19-2、pCP-A18-256-2)に、テトラサイクリン耐性遺伝子(*tetA(P)*、*tetB(P)*)を保有していた(表 10)。

表 10 5 菌株の各配列の分類と保有遺伝子

菌株名	配列	病原性遺伝子	薬剤耐性遺伝子
OS1	染色体	<i>colA</i> , <i>pfoA</i> , <i>plc</i> , <i>cloSI</i> , <i>nagH-L</i> , <i>nanH-J</i>	<i>tetA(P)</i> , <i>tetM</i>
	pCP-OS1	<i>becA</i> , <i>becB</i>	-
	pCP-OS1-2	ND	<i>crp</i>
	pCP-OS1-3	ND	-
TS1	染色体	<i>alv</i> , <i>colA</i> , <i>pfoA</i> , <i>plc</i> , <i>cloSI</i> , <i>nagH-L</i> , <i>nanH-J</i>	<i>tetM</i>
	pCP-TS1	<i>becA</i> , <i>becB</i>	-
	pCP-TS1-2	ND	-
O13-19	染色体	<i>alv</i> , <i>colA</i> , <i>pfoA</i> , <i>plc</i> , <i>cloSI</i> , <i>nagH-L</i> , <i>nanH-J</i>	<i>tetM</i>
	pCP-O13-19-1	<i>becA</i> , <i>becB</i>	-
	pCP-O13-19-2	ND	<i>tetA(P)</i> , <i>tetB(P)</i>
A18-256	染色体	<i>alv</i> , <i>colA</i> , <i>pfoA</i> , <i>plc</i> , <i>cloSI</i> , <i>nagH-L</i> , <i>nanH-J</i>	<i>tetM</i>
	pCP-A18-256-1	<i>becA</i> , <i>becB</i>	-
	pCP-A18-256-2	ND	<i>tetA(P)</i> , <i>tetB(P)</i>
A19-1	染色体	<i>alv</i> , <i>colA</i> , <i>pfoA</i> , <i>plc</i> , <i>cloSI</i> , <i>nagH-L</i> , <i>nanH-J</i>	<i>tetM</i>
	pCP-A19-1-1	<i>becA</i> , <i>becB</i>	-

ND : not detected

第五節 ウェルシュ菌の系統解析

bec 保有株がウェルシュ菌においてどのような系統に属するのかを明らかにするために系統解析を行った。系統樹の作成は既報の *bec* 保有株 3 株(Q135.2、ASM1837293v1 および PDT001006423.1)を含む、2021 年 9 月時点で GenBank のデータベースに登録されていたウェルシュ菌 596 株分の全ゲノム情報に、今回決定した 5 株を加えた 601 株を用いてコアゲノムを抽出し、その SNP の位置から最尤法で行った。さらに各菌株のゲノム配列から主要な毒素遺伝子の配列を検索し、各菌株が保有する毒素遺伝子を明らかにして毒素型の分類も示した(図 11 および表 11)。

表 11 ウェルシュ菌の主要毒素

毒素	遺伝子
BECa	<i>becA</i>
BECb	<i>becB</i>
Phospholipase C (α -毒素)	<i>plc</i>
CPE	<i>cpe</i>
Collagenase	<i>colA</i>
β -毒素	<i>cpb</i>
β -2 毒素	<i>cpb2</i> variant 1
β -2 毒素	<i>cpb2</i> variant 2
Perfringolysin O	<i>pfoA</i>
ϵ -毒素	<i>etx</i>
ι -毒素 component Ia	<i>iap</i>
ι -毒素 component Ib	<i>ibp</i>
NetB	<i>netB</i>
Peptidase	<i>tpeL</i>
NetF	<i>netF</i>
λ -毒素	<i>lam</i>
Alveolysin	<i>alv</i>

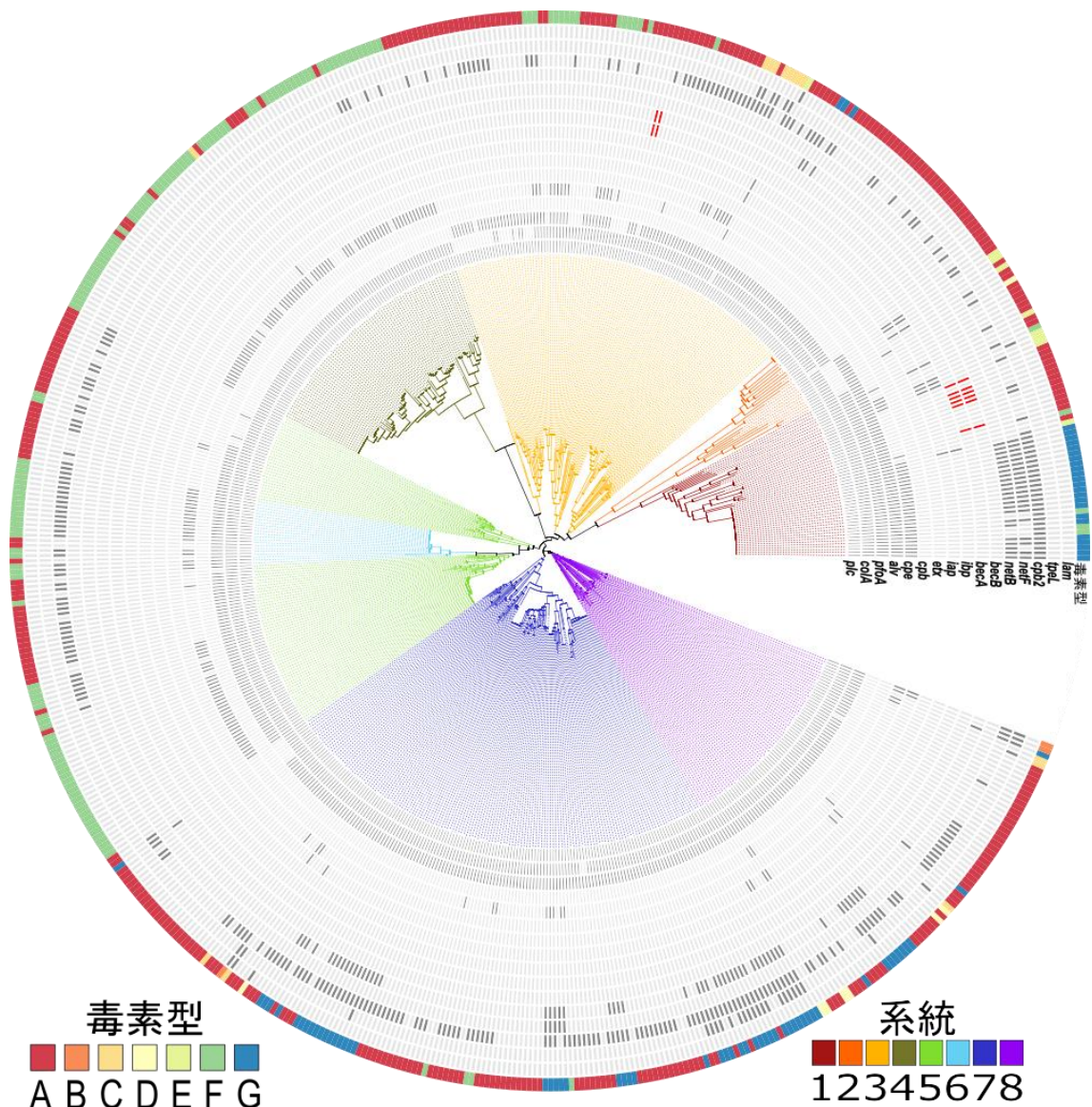


図 11 ウェルシュ菌の系統樹。系統樹は系統 1~8 に色分けして示した。また系統樹の周囲には各菌株が保有する毒素遺伝子を黒で、*bec* は赤でプロットした。最外周には各菌株の毒素型 A~G を色分けして示した。

2020 年 9 月の Feng らの報告では 173 株のウェルシュ菌のゲノム情報を用いて系統樹を作成し、5 系統にウェルシュ菌を分類していたが[35]、本研究では 601 株の系統樹を作成し遺伝的距離や分岐の仕方から、新たに 8 系統の分類とした。*bec* 保有株の 8 株のうち、OS1 と PDT001006423.1 は系統 3 に属し、その他 6 株は系統 1 に属していた。ゲノム情報が既報の 3 株 (Q135.2、PDT001006423.1、ASM1837293v1) に関して *bec* を保有している配列を調べると、本研究で配列を決定した 5 つの *bec* 保有プラスミドと同様に約 54 kbp の配列上に *bec* が存在していた。これらの配列を本研究で決定した *bec* 保有プラスミドと合わせて、計 8 配列で配列を比較すると配列相同性は $\geq 99.81\%$ と非常に高かった(第二章で詳述)。

8つの *bec* 保有プラスミドは非常に配列相同性が高いにもかかわらず、*bec* 保有株は2つの系統に分かれたことから、2つの系統間で水平伝播によって *bec* 保有プラスミドが拡散されていることを示唆する結果となった。

bec 保有株のうち TS1、O13-19、A18-256、A19-1、Q135.2、ASM1837293v1 の6株が属する系統1にはプラスミド上に *cpe* や *netB* を保有しており毒素型がF型やG型に分類される菌株が多く含まれる。また類似毒素である ι -毒素の遺伝子 *iap/ibp* を保有しているE型の9株のうち5株がこの系統に属していた。*bec* 保有株はA型に分類されるため、系統1はA、E、F、G型と4種類の毒素型の菌株が属していた。

多くの *bec* 保有株が系統1に属している一方で、OS1とPDT001006423.1が属する系統3の菌株は多くがA型に分類され、一部 *cpe* や *cpb*、*netB*、*iap/ibp*などを保有している菌株が存在し、A、C、D、E、G型の5種類の毒素型の菌株が属していた。

その他の系統でもA型はほとんどの系統で多く見られるが、それ以外に系統2では *etx* や *iap/ibp* を保有するD、E型が、系統4~6では *cpe* を保有するF型が、系統7では *netB* を保有するG型が、系統8では *cpb* や *etx*、*cpe*、*netB* を保有するB、C、D、G型の菌株が属していた。

第六節 染色体と *bec* 保有プラスミドの SNP の比較

系統樹解析の結果から、*bec* 保有株が属する 2 つの系統間ではプラスミドの水平伝播があった可能性が高いと言える。さらに *bec* 保有プラスミドの配列相同性が極めて高いことから、同系統内の菌株でも水平伝播があった可能性が考えられる。

そこで各系統内でも *bec* 保有プラスミドが水平伝播によって獲得されてきたのかを詳細に明らかにするため、染色体と *bec* 保有プラスミドでそれぞれ SNP の割合を算出し比較した。DNA の変異は複製時に一定の確率で入るため、プラスミドが細胞分裂の繰り返しによって垂直方向に遺伝していた場合、染色体とプラスミドの変異の割合はほぼ同じとなる。一方で水平伝播によって外部からプラスミドを獲得していた場合、染色体とプラスミドの変異の割合は異なると考えられる。そこで本研究では DNA の変異が反映されやすい SNP を数え上げ、染色体とプラスミドでその割合を比較した。SNP の割合は染色体とプラスミドそれぞれの共通する配列の配列長(2,682,400 bp と 54,459 bp)から算出した(表 12, 13)。

SNP の割合は全体的に染色体の方が高い結果となった。系統 3 に属していた OS1 と PDT001006423.1 の染色体の配列を系統 1 に属していた 6 株の染色体の配列と比較すると、SNP の数は染色体の共通配列 2,682,400 bp 中 63,093~65,157 bp (2.35~2.43%)と各系統内で比較した場合よりも多くの SNP が存在した。しかしプラスミドの配列を 2 つの系統間で比較すると、全ての組み合わせでプラスミドの共通配列 54,459 bp 中 1~17 bp (0.00184~0.0312%)と染色体よりも極めて低い割合となり、異系統間での水平伝播を支持する結果となった。

また各系統内でプラスミドの水平伝播があったのか推察するために、各系統内でも同様に染色体とプラスミドの SNP の割合を比較した。系統 3 に属する TS1 と O13-19、A18-256、A19-1、Q135.2、ASM1837293v1 間では染色体の SNP は 2,682,400 bp 中 63~32,713 bp (0.00235~1.22%)となった。一方でプラスミドは 54,459 bp 中 0~15 bp (0~0.0275%)となり、染色体と比較して SNP の割合が低いものが多かった。しかし TS1 と A18-256、ASM1837293v1 の 3 株間の染色体の SNP は 2,682,400 bp 中 63~472 bp (0.00235~0.0176%)と他の組み合わせに比べて非常に低く、プラスミドの SNP の割合 (0.00184~0.0275%)と近い結果となった(表 12、13 中に四角で囲った)。このことから、これら 3 株は細胞分裂による垂直方向の遺伝によってプラスミドを獲得した可能性が示唆された。また OS1 と PDT001006423.1 を比較すると染色体では 2,682,400 bp 中 5,344 bp (0.199%)、プラスミドでは 54,459 bp 中 15 bp (0.0275%)となり、ややプラスミドの方が SNP の割合が低かった。

表 12 染色体の共通配列(約 2.6 Mbp)中の SNP (%)

菌株名	場所 (年)	OS1	TS1	O13-19	A18-256	A19-1	Q135.2	ASM183 7293v1
OS1	大阪 (2009)							
TS1	栃木 (2010)	2.40						
O13-19	大阪 (2013)	2.43	1.15					
A18-256	愛知 (2018)	2.40	0.00235	1.16				
A19-1	愛知 (2019)	2.36	1.15	1.07	1.15			
Q135.2	イギリス (2019)	2.36	1.21	1.06	1.21	1.14		
ASM183 7293v1	アメリカ (2021)	2.39	0.0173	1.16	0.0176	1.15	1.22	
PDT0010 06423.1	アメリカ (2021)	0.199	2.40	2.43	2.40	2.36	2.35	2.39



表 13 プラスミドの共通配列(約 5.4 kbp)中の SNP (%)

菌株名	場所 (年)	OS1	TS1	O13-19	A18-256	A19-1	Q135.2	ASM183 7293v1
OS1	大阪 (2009)							
TS1	栃木 (2010)	0.0312						
O13-19	大阪 (2013)	0.00551	0.0257					
A18-256	愛知 (2018)	0.0294	0.00184	0.0239				
A19-1	愛知 (2019)	0.00551	0.0257	0	0.0239			
Q135.2	イギリス (2019)	0.00734	0.0275	0.00184	0.0257	0.00184		
ASM183 7293v1	アメリカ (2021)	0.00734	0.0275	0.00184	0.0257	0.00184	0.00367	
PDT0010 06423.1	アメリカ (2021)	0.0275	0.00367	0.0220	0.00184	0.0220	0.0239	0.0239

これらの SNP の割合を基に二項分布を用いた検定を行い、染色体とプラスミドの SNP は同じ確率に従って入っているのかを統計学的観点から検証した(表 14)。

表 14 二項分布を用いた z-score

菌株名	場所 (年)	OS1	TS1	O13-19	A18-256	A19-1	Q135.2	ASM1837 293v1
OS1	大阪 (2009)							
TS1	栃木 (2010)	-36.09						
O13-19	大阪 (2013)	-36.74	-24.66					
A18-256	愛知 (2018)	-36.13	-0.2467	-24.71				
A19-1	愛知 (2019)	-36.23	-24.58	-24.28	-24.63			
Q135.2	イギリス (2019)	-36.14	-25.27	-24.16	-25.32	-24.98		
ASM1837 293v1	アメリカ (2021)	-36.41	1.810	-25.27	1.427	-25.17	-25.85	
PDT0010 06423.1	アメリカ (2021)	-8.985	-36.52	-36.48	-36.56	-35.98	-35.85	-36.17

二項分布を用いた統計値は下記の通りに計算を行った。統計数値表から $Z_{0.025}$ は 1.96 であり、 z の絶対値が >1.96 のものは帰無仮説が棄却され、「プラスミドの SNP は染色体と同じ確率に従って入っている」とは言えないと結論付けられる。よって表 14 中の黒の数字で示した箇所に関しては「プラスミドの SNP は染色体と異なる確率に従って入っている」、言い換えると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いる。

$$Z = \frac{X - np}{\sqrt{np(1-p)}}$$

X =プラスミドの SNP 数、 n =染色体の SNP の割合、 p =プラスミドの共通配列長 (54,459)

また *bec* 保有プラスミドの配列を、遺伝子 *parA* を始点としてアライメントして SNP の位置を示した(表 15)。SNP の位置から 8 つのプラスミドをグループ A (TS1、A18-256、PDT001006423.1)とグループ B (A19-1、Q135.2、OS1、ASM1837293v1)の 2 つのグループに分類した。グループ A では 22,191、45,011 の位置に、グループ B では 9,397、12,297、28,267、46,299、50,683 の位置にグループ内でも塩基の違いが見られた一方で、O13-19 と A19-1 のプラスミドは完全に同配列であった。グループ A と B は系統樹での系統分けとは異なる分かれ方となったことから水平伝播を示唆する結果となった。

表 15 *bec* 保有プラスミドの SNP

位置	グループ A			グループ B				
	TS1	A18- 256	PDT001 006423.1	A19-1	O13- 19	Q135. 2	OS1	ASM18 37293v1
582	A	A	A	G	G	G	G	G
6,503	A	A	A	G	G	G	G	G
9,397	G	G	G	G	G	G	G	T
11,473	T	T	T	C	C	C	C	C
12,297	C	C	C	C	C	C	T	C
22,191	T	T	G	G	G	G	G	G
25,350	A	A	A	C	C	C	C	C
25,785	A	A	A	G	G	G	G	G
28,267	A	A	A	A	A	G	A	A
37,420	A	A	A	G	G	G	G	G
40,721	A	A	A	G	G	G	G	G
45,011	A	C	C	C	C	C	C	C
46,299	C	C	C	C	C	C	T	C
46,477	T	T	T	C	C	C	C	C
48,030	T	T	T	C	C	C	C	C
48,848	A	A	A	G	G	G	G	G
50,023	G	G	G	T	T	T	T	T
50,683	C	C	C	C	C	C	A	C
50,954	T	T	T	C	C	C	C	C

第七節 小括

本章では国内で分離された複数のプラスミドを保有する 5 株の *bec* 保有ウェルシュ菌に関してロングリードとショートリードで DNA シーケンスを行い、*bec* 保有株としては初めて完全長ゲノム配列を決定することに成功した。その結果、*bec* はいずれも類似配列の約 54 kbp のプラスミド上に存在していた。また既報 3 株の *bec* 保有株についても同様に類似配列のプラスミド上に *bec* が存在しており、各 *bec* 保有プラスミドの配列相同性は $\geq 99.81\%$ と非常に高かった。

系統樹解析の結果から、*bec* 保有株は OS1、PDT001006423. 1 の 2 株と TS1、O13-19、A18-256、A19-1、Q135.2、ASM1837293v1 の 6 株で 2 つの系統に分かれた。これらのことから 2 つの系統間で *bec* 保有プラスミドの水平伝播があったことが示唆された。さらに各菌株の染色体と *bec* 保有プラスミドの SNP の割合の比較から、異系統・同系統に関わらずほとんどの *bec* 保有株が水平伝播によって *bec* 保有プラスミドを獲得していることが示唆された。本研究で解析を行った *bec* 保有株 8 株は 2009 年から 2021 年に渡って日本やイギリス、アメリカと異なる年代や地域で分離されたにも関わらず類似のプラスミドを保有していた。このことは単に菌株が拡散されたのみでなく水平伝播を行って他の系統の菌株へと遺伝子を拡散することが示唆された。

これまでにウェルシュ菌の病原性に関わる主要な毒素遺伝子として *plc*、*colA*、*pfoA*、*alv*、*cpe*、*cpb*、*etx*、*iap*、*ibp*、*becA*、*becB*、*netB*、*netF*、*cpb2*、*tpeL*、*lam* の 17 種類が報告されている。本研究で行った 601 株のウェルシュ菌の系統樹解析の結果、染色体上にコードされることが知られている *plc*、*colA*、*pfoA* の 3 種類の毒素遺伝子は、系統 4 に属する菌株が *pfoA* を保有しない例を除いて、系統の違いに関わらずほぼ全てのウェルシュ菌が保有していた。このことから、これらの遺伝子はウェルシュ菌の生存や環境適応に必須であり、垂直方向に遺伝し保存されてきたと考えられる。一方で *alv*、*cpe*、*cpb*、*etx*、*iap*、*ibp*、*becA*、*becB*、*netB*、*netF*、*cpb2*、*tpeL*、*lam* の 14 種類の毒素遺伝子は、異なる系統に分散しており、系統 1 の全てが保有している *alv* を除いて、各系統において全ての菌株が保有しているわけではないことから、水平伝播によって拡散されたことが示唆された。これらの結果から、水平伝播はウェルシュ菌間の毒素遺伝子の拡散機構として一般的であると考えられた。

第二章 *bec* 保有プラスミドの水平伝播機構の解明

第一節 序論

前章では *bec* 保有プラスミドが主に水平伝播によって拡散されてきたことを示した。しかし形質転換や形質導入、接合伝達と言った種々の水平伝播機構のうち、いずれの機構で水平伝播したのかは明らかになっていない。

ウェルシュ菌においては、テトラサイクリン耐性を持つ代表的なプラスミド pCW3 が接合伝達によって水平伝播を行うことが知られている。pCW3 は、薬剤耐性を保有しない菌株がテトラサイクリン耐性と同時にこのプラスミドを獲得していたことから水平伝播によって拡散されていることが明らかになった[36, 37]。さらにゲノム解析によって pCW3 は接合伝達を行う IV 型分泌システムをコードする *tcp* 遺伝子座を保有することが明らかになっており[38]、この遺伝子座を保有するプラスミドは pCW3 ファミリープラスミドと呼ばれる。

同じクロストリジウム属の *Clostridium sordellii* が保有する接合伝達性プラスミド pCS1-1 は約 10^{-7} ~ 10^{-6} (レシピエント/ドナー)の効率で接合伝達を行うのに対し[39]、pCW3 は約 10^{-1} (レシピエント/ドナー)と高い効率で接合伝達を行う[38]。pCW3 ファミリープラスミドは動物で胃腸炎の原因となる毒素 NetB や CPB の遺伝子や、テトラサイクリン耐性など薬剤耐性因子の遺伝子を保有することが知られており[36, 40]、多くの病原性因子や薬剤耐性因子の遺伝子を接合伝達によって拡散してきたと考えられている[41]。

IV 型分泌システムは DNA の接合伝達を行うことが知られており、主にグラム陰性菌でその構造や機能が明らかになってきている。接合伝達はドナー側の細胞が出す線毛を介して細胞内の DNA を切断した一本鎖 DNA をレシピエント側の細胞へと輸送し、その後両細胞で一本鎖 DNA の相補鎖を合成することで水平伝播を行う(図 12)[42-46]。

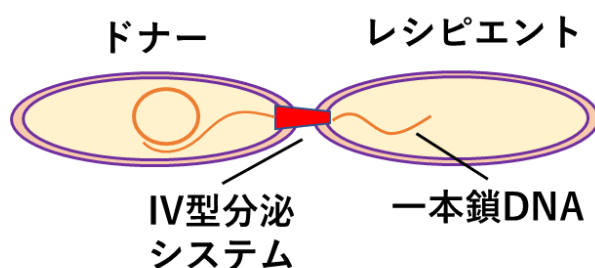


図 12 接合伝達の模式図。ドナー細胞は IV 型分泌システムを形成してレシピエント細胞に結合し、一本鎖 DNA を送り込む。

第二節 *bec* 保有株のゲノム DNA のアノテーション

bec 保有プラスミドに関して、アノテーションツール Prokka を用いたアノテーションを実施したが、どのような機構で水平伝播してきたのかは明らかにできていない。そこで *bec* 保有プラスミドの配列を用いて BLASTn で類似の配列を検索し、既存のプラスミドの遺伝子情報から、マニュアルでより詳細なアノテーションを行うこととした。pCP-OS1 の全長配列を用いて BLASTn 検索を行ったところ、ウェルシュ菌の代表的な菌株 13 (以降 strain 13 と表記) が保有するプラスミド pCP13 と約 38 kbp の領域で >92% の高い配列相同性が見られた[47]。

近年、pCP13 の一部の遺伝子は既知の IV 型分泌システムをコードする遺伝子と低い相同性を持つことが明らかになっており、新規の IV 型分泌システムを保有することが示唆されている[48]。同研究において、pCP13 は *in vitro* で 10^{-1} (レシピエント/ドナー) という高い効率で水平伝播することが実験的に明らかにされ[48]、IV 型分泌システムをコードしていると考えられる 25 個の遺伝子を含む約 27 kbp の領域は Pcp (pCP13 *Clostridium perfringens*) 遺伝子座と命名された。Pcp 遺伝子座は strain 13 をはじめとする多くのウェルシュ菌のプラスミドが保有していることから、この領域を持つプラスミドは一般的に pCP13 ファミリープラスミドとして分類されている。

各 *bec* 保有プラスミドは Pcp 遺伝子座を保有しており、pCP13 ファミリープラスミドに分類された(図 13)。このことから *bec* 保有プラスミドは接合伝達によって拡散されてきた可能性が示唆された。

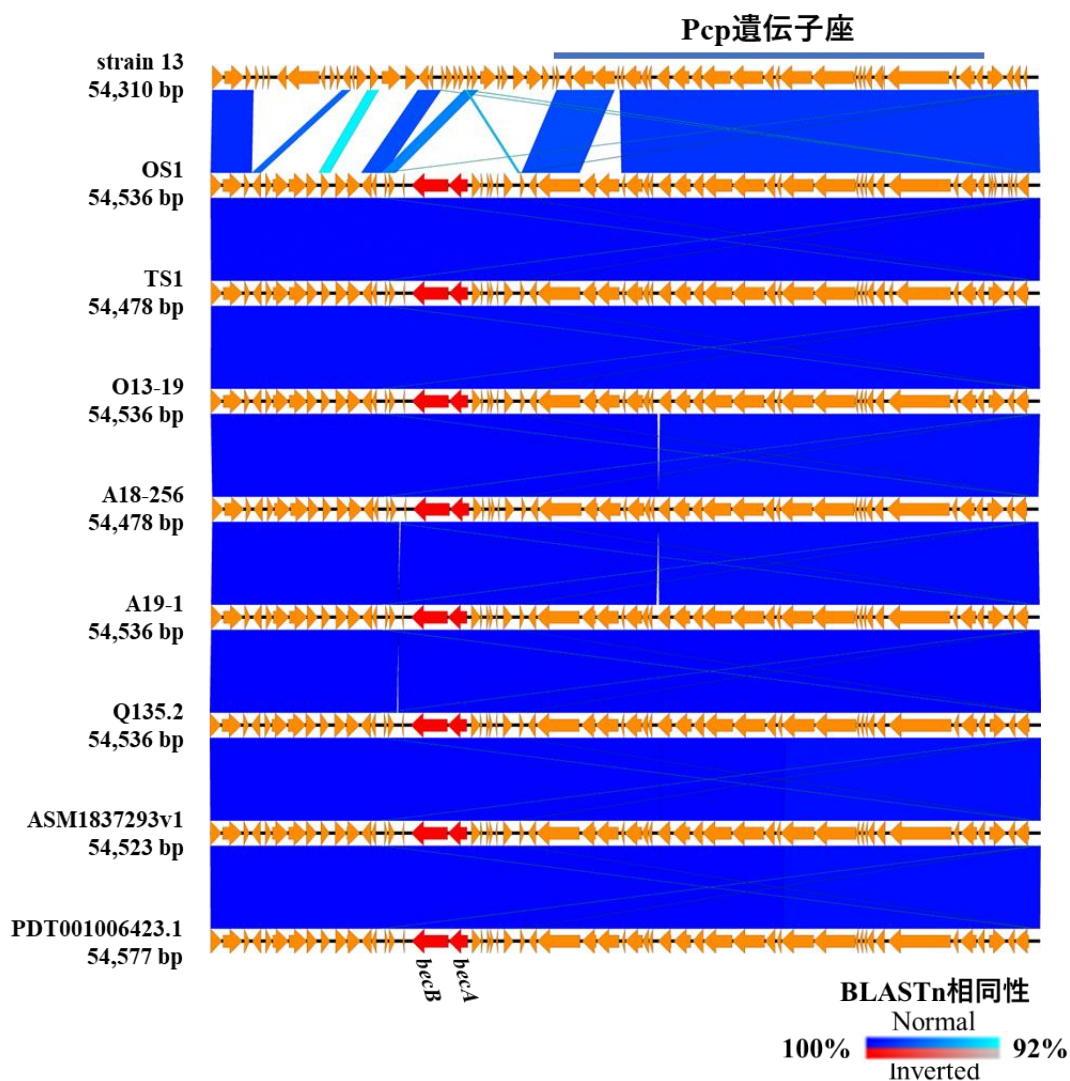


図 13 *bec* 保有プラスミドの配列比較. strain 13 のプラスミド(pCP13)と *bec* 保有プラスミドの配列を比較した。矢印は CDS を示し、*bec* は赤、その他はオレンジで示した。また配列間の相同性を色分けして示した(図中右下参照)。

配列相同性が見られた pCP13 のアノテーション情報を参考に pCP-OS1 に関して各遺伝子の詳細なアノテーションを行った(表 16)。pCP-OS1 の Pcp 遺伝子座は pCP13 とほぼ同じ遺伝子を保有していた。pCP-OS1 の Pcp 遺伝子座にはカップリングプロテイン (*pcpD4*) や ATPase (*pcpB4*)、膜結合タンパク質 (*pcpB6*)、ペプチドグリカン加水分解酵素 (*pcpB1*)、リラクサーゼ (*pcpD2*)、トポイソメラーゼ (*topA*)、リボン-ヘリックス-ヘリックスタンパク質 (*pcpO*)、コラーゲン結合タンパク質 (*cnaB*)等、IV 型分泌システムを構成すると予想されるタンパク質の遺伝子を多く保有していた。*cnaB* や *pcpB1* は *tcp* 遺伝子座の対応する遺伝子とそれぞれ 69%、48%の相同性が見られたが、それ以外では一部の遺伝子で低い相同性(16~21%)が見られた。

表 16 *bec* 保有プラスミド (pCP-OS1) が保有する遺伝子の情報

CDS	位置 (向き)	配列長 (bp)	遺伝子名	機能
1	1-753(+)	753	<i>parA</i>	Type I partitioning system ATPase
2	812-2092(+)	1281	<i>parB</i>	Type I partitioning system centromere binding protein
3	2208-2570(+)	363	-	Hypothetical
4	2730-3308(-)	579	-	Hypothetical with SMC_N superfamily domain
5	3620-4033(+)	414	-	Hypothetical
6	4091-5125(+)	1035	-	ABC transporter permease
7	5151-6326(+)	1176	-	ABC transporter permease (<i>FtsX</i>)
8	6323-7006(+)	684	-	ABC transporter ATP-binding protein
9	7270-7842(+)	573	<i>resP</i>	Serine recombinase/resolvase (ResP)
10	8213-8971(+)	759	-	Hypothetical
11	8986-9861(+)	876	-	Hypothetical
12	9926-10570(-)	645	-	Hypothetical
13	10582-10896(-)	315	-	PadR family transcriptional regulator
14	11456-11659(+)	204	-	Hypothetical
15	11733-12122(+)	390	-	Hypothetical
16	12618-12737(-)	120	-	Hypothetical
17	13223-15622(-)	2400	<i>becB</i>	Binary enterotoxin component b
18	15641-16900(-)	1260	<i>becA</i>	Binary enterotoxin component a
19	17193-17786(+)	594	-	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor
20	17779-17913(+)	135	-	Hypothetical
21	18188-18376(+)	189	-	Hypothetical
22	18381-18599(+)	219	-	Hypothetical
23	18777-18884(-)	108	-	Hypothetical
24	19292-19894(+)	603	-	Recombinase family protein
25	20361-20663(+)	303	-	Hypothetical
26	20920-21417(-)	498	<i>pcpT</i>	Hypothetical
27	21473-24283(-)	2811	<i>pcpS/R</i>	PcpS: Hypothetical, PcpR: ImmA/IrrE family metallo-endopeptidase
28	24416-25345(-)	930	-	Restriction enzyme

29	25365–26855(-)	1491	-	Eco571 restriction-modification methylase domain-containing protein
30	27021–27239(-)	219	<i>pcpP</i>	Hypothetical
31	27257–28390(-)	1134	<i>pcpD2</i>	Putative relaxase
32	28393–28800(-)	408	<i>pcpO</i>	N-terminal CopG-like Ribbon-Helix-Helix protein (35% coverage of aa sequence)
33	28804–29073(-)	270	<i>pcpN</i>	Hypothetical
34	29402–30265(-)	864	<i>pcpL</i>	Hypothetical
35	30443–31558(-)	1116	<i>pcpB1</i>	Putative peptidoglycan hydrolase
36	31691–32383(-)	693	<i>pcpK</i>	Hypothetical C-terminal Ntf-like transpeptidase domain protein (6% coverage of aa sequence)
37	32388–34286(-)	1899	<i>pcpB4</i>	VirB4-like ATPase
38	34304–36415(-)	2112	<i>topA</i>	Topoisomerase III
39	36460–37104(-)	645	<i>pcpJ</i>	Hypothetical
40	37220–37501(-)	282	<i>pcpI</i>	Hypothetical
41	37504–39633(-)	2130	<i>pcpB6</i>	VirB6-like
42	39630–42371(-)	2742	<i>pcpD4</i>	VirD4-like coupling protein
43	42358–42570(-)	213	<i>pcpH</i>	Hypothetical
44	42637–42873(-)	237	<i>pcpG</i>	Hypothetical
45	42937–43131(-)	195	<i>pcpF</i>	Hypothetical
46	43124–43576(-)	453	<i>pcpE</i>	Spo0A-homologue
47	43695–44291(-)	597	<i>pcpD</i>	Sortase
48	44535–48641(-)	4107	<i>cnaB</i>	Collagen adhesion protein
49	48786–49136(-)	351	<i>pcpC</i>	PemK toxin (type II toxin-antitoxin system)
50	49260–50327(-)	1068	<i>pcpB</i>	Hypothetical
51	50373–50858(-)	486	<i>pcpA</i>	Helix-turn-helix containing DNA-binding regulatory protein
52	51171–52274(+)	1104	<i>regC</i>	LexA-like transcriptional regulator, similar to RegC from pCW3
53	52388–52834(-)	447	-	Hypothetical
54	52863–53780(-)	918	<i>rep</i>	replication protein

pCP-O13-19-2 と pCP-A18-256-2 の配列相同性は 99.64% と非常に高く、*tcp* 遺伝子座を保有する pCW3 と $\geq 99\%$ の配列相同性が見られた(図 14)。配列相同性から pCP-O13-19-2 と pCP-A18-256-2 は pCW3 ファミリープラスミドに分類することができ、接合伝達によって各菌株が外部から獲得した可能性が示唆された。

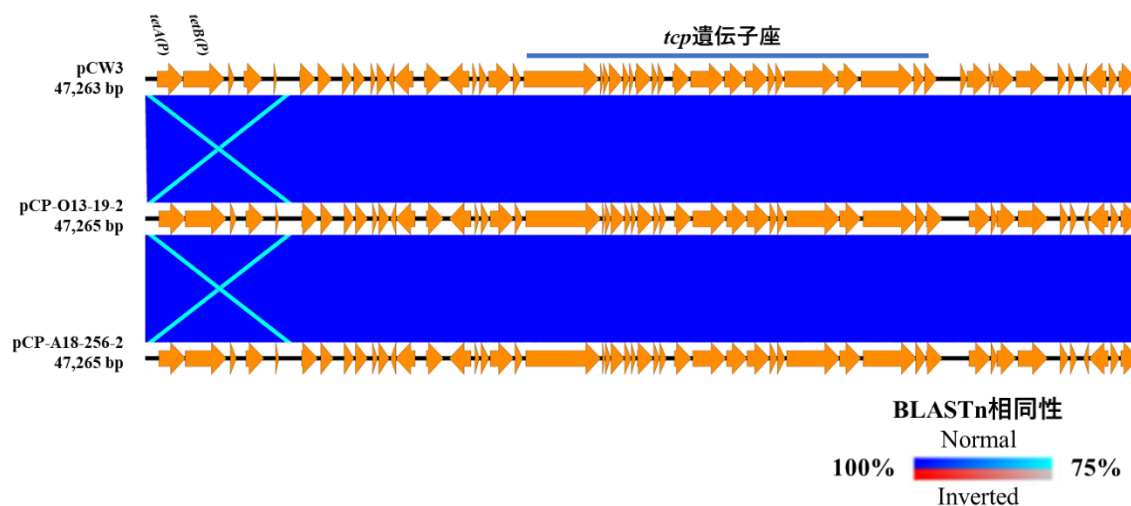


図 14 pCW3 ファミリープラスミドの配列比較. pCW3 と pCP-O13-19-2、pCP-A18-256-2 の配列を比較した。CDS はオレンジの矢印で示した。また配列間の相同性を色分けして示した(図中右下参照)。

また *bec* 保有株の全ゲノム配列から、DNA の水平伝播に関わるプロファージの配列を探索した(表 17)。染色体や *bec* を保有しないプラスミドにはプロファージの配列が見つかったが、*bec* 保有プラスミド上には配列は見つからず、*bec* 保有プラスミドは IV 型分泌システムによる接合伝達によって水平伝播した可能性をさらに支持する結果となった。

OS1 は染色体のプロファージ領域内にテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetA(P)*)とクロラムフェニコール耐性遺伝子(*crp*)がコードされており、ファージによって *crp* を獲得した可能性が示唆された。

表 17 5 菌株の各配列が保有するプロファージ

菌株名	配列	プラスミド ファミリー	プロファージ
	染色体		2 (1 questionable, 1 incomplete)
OS1	pCP-OS1	pCP13	0
	pCP-OS1-2	NT	1 (incomplete)
	pCP-OS1-3	NT	0
	染色体		3 (1 intact, 1 questionable, 1 incomplete)
TS1	pCP-TS1	pCP13	0
	pCP-TS1-2	NT	1 (intact)
	染色体		2 (incomplete)
O13-19	pCP-O13-19-1	pCP13	0
	pCP-O13-19-2	pCW3	1 (incomplete)
	染色体		3 (1 intact, 1 questionable, 1 incomplete)
A18-256	pCP-A18-256-1	pCP13	0
	pCP-A18-256-2	pCW3	1 (incomplete)
	染色体		2 (1 intact, 1 incomplete)
A19-1	pCP-A19-1-1	pCP13	0

※intact (score >90)、questionable (score 70~90)、incomplete (score <70)

NT : not typable

第三節 接合伝達性プラスミドの広がり

ウェルシュ菌の接合伝達性のプラスミドとしてこれまでは *tcp* 遺伝子座を保有する pCW3 ファミリープラスミドが知られており、その広がりなどについて研究が進められてきた[49]。しかし pCP13 ファミリープラスミドについては、Pcp 遺伝子座が比較的最近になって発見されたこともあり、研究が進んでおらず、保有する菌株の数や特徴は、詳細には分かっていない。そこでウェルシュ菌 601 株から pCP13 ファミリープラスミドを保有する菌株を特定し、系統樹解析などの結果と照らし合わせることで、どの程度の数や系統に pCP13 ファミリープラスミドが広まっているのかを明らかにすることとした。

Pcp 遺伝子座のうち、ATPase や T4CP(第五節で詳述)といった特に重要な役割を持つとされるタンパク質をコードする *pcpB4* と *pcpD4* の配列をクエリに、ウェルシュ菌 601 株のゲノム情報をデータベースとして BLASTn で検索したところ 192 株 (31.9%)が pCP13 ファミリープラスミドを保有していることが明らかになった。これらの pCP13 ファミリープラスミド保有株は様々な系統に広く存在しており、様々な菌株が水平伝播によって pCP13 ファミリーのプラスミドを獲得してきたことが示唆された(図 15)。

また最近にゲノム情報が登録されたウェルシュ菌株に関しても情報をアップデートするため、Pcp 遺伝子座と同様に *tcp* 遺伝子座中の *tcpA* と *tcpF* の配列を用いて BLASTn 検索を行ったところ、313 株 (52.1%)が pCW3 ファミリープラスミドを保有していた(図 15)。

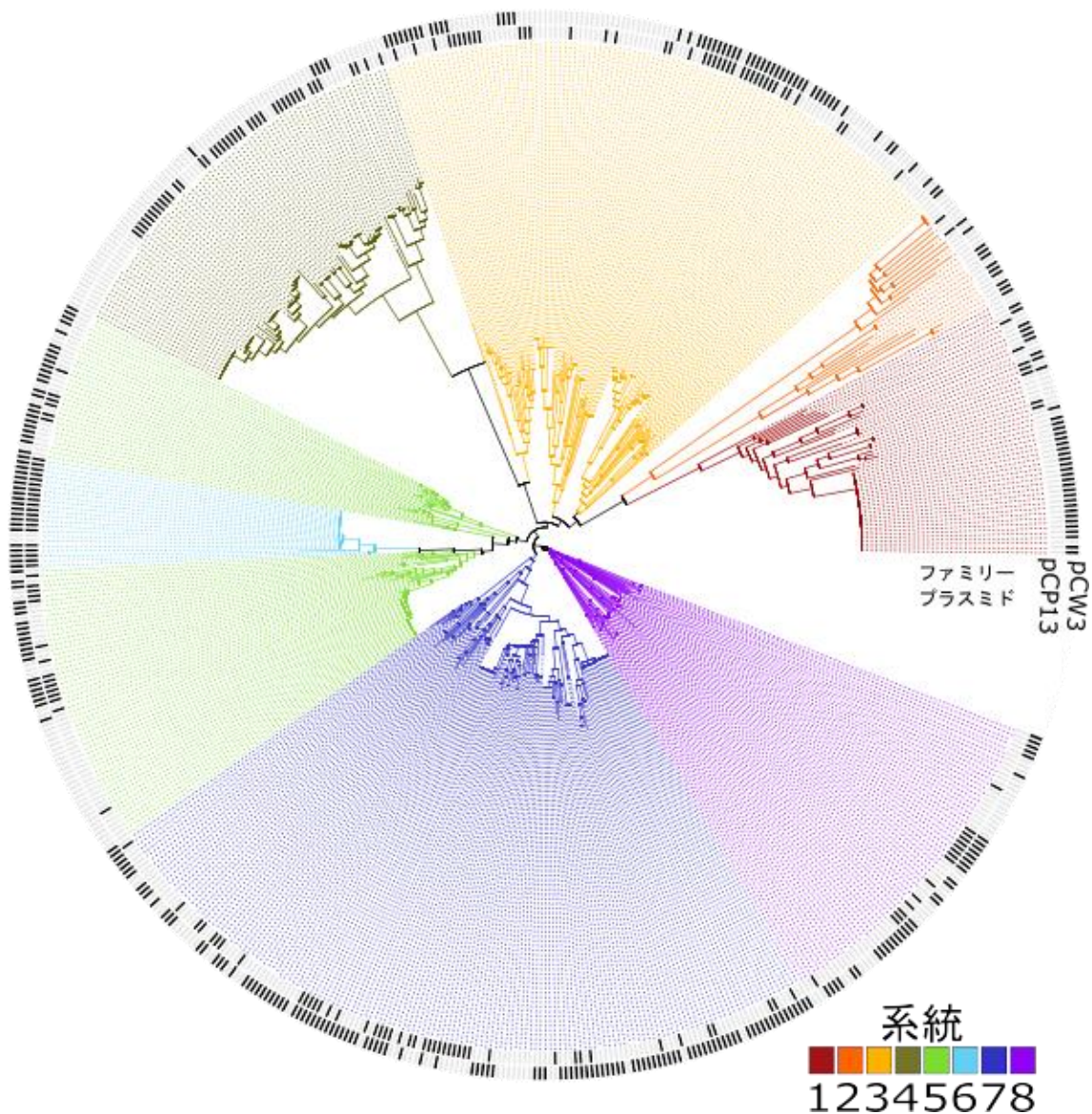


図 15 pCP13 および pCW3 ファミリープラスミドを保有するウェルシュ菌. 各ファミリープラスミドを保有する菌株を系統樹の周囲にプロットで示した。ウェルシュ菌のうち 31.9%が pCP13 ファミリープラスミドを、52.1%が pCW3 ファミリープラスミドを保有していた。

ウェルシュ菌のうち 31.9% (192/601 株)が pCP13 ファミリープラスミドを、52.1% (313/601 株)が pCW3 ファミリープラスミドを保有しており、67.7%の菌株がいずれかのプラスミドを保有していた。

pCW3 ファミリープラスミドは *cpb* や *cpe*、*etx*、*iap/ibp*、*tpeL*、*netF*、*netB*、*cpb2* など様々な毒素遺伝子を保有することが知られており[40]、プラスミドの接合伝達によってこれらの毒素遺伝子を様々なウェルシュ菌に拡散してきた。pCP13 ファミリープラスミドが保有する毒素遺伝子はこれまでに *cpb2* と *bec* しか特定されていないが[40]、pCW3 ファミリー

ープラスミドと同様に様々な系統の多くのウェルシュ菌が保有するプラスミドであり、広く拡散されていく可能性があるため今後注視していく必要がある。

第四節 pCP13 ファミリープラスミドの比較解析

pCP13 ファミリープラスミドは *Pcp* 遺伝子座以外の多様性が見られる領域(アクセサリー領域)にどのような遺伝子を保有しているのかを明らかにするとともに、プラスミド全体の遺伝子構造を比較するため、様々な系統から 11 個の pCP13 ファミリープラスミドを選んで配列比較を行った(図 16)。

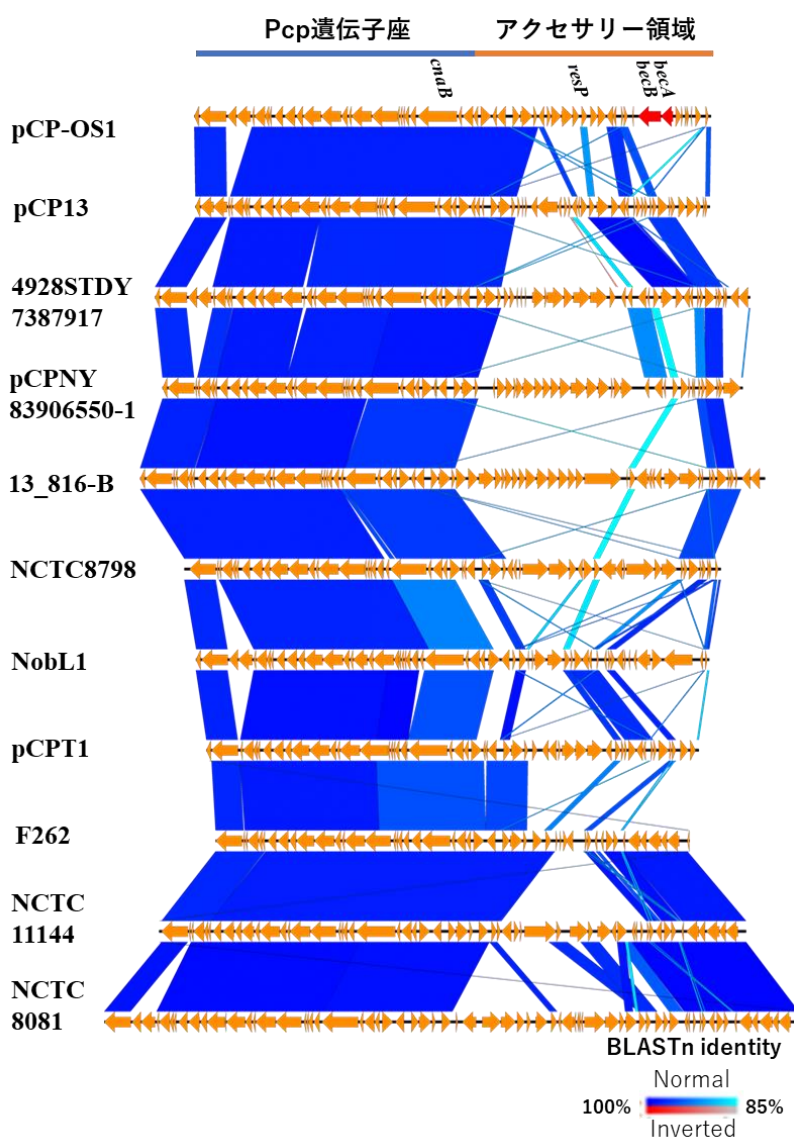


図 16 pCP13 ファミリープラスミドの配列比較. 11 個の pCP13 ファミリープラスミドの配列を比較した。矢印は CDS を示し、*bec* は赤、その他はオレンジで示した。また配列間の相同性を色分けして示した(図中右下参照)。Pcp 遺伝子座は高い配列相同性を示したのに対してアクセサリー領域は多様な遺伝子を保有していた。

11 個のプラスミドのリコンビナーゼの遺伝子をコードしているアクセサリ領域はプラスミドによって長さやコードされている遺伝子が異なり、*bec* や *cpb2* を含む様々な遺伝子を獲得できることを示している。しかしながら、この領域にコードされている遺伝子の多くはいまだに機能が分かっていないため、機能の解析を進めると同時にこれらの遺伝子がどのように広まっているのかを監視していく必要がある。

第五節 IV 型分泌システムの構造生物学的研究

ウェルシュ菌において 67.7% (407/601 株)の菌株が接合伝達性のプラスミドを保有していることから、接合伝達によるプラスミドの水平伝播は遺伝子の拡散において重要な位置を占めることが示唆された。そのため接合伝達を担う IV 型分泌システムは病原因子等の拡散を防ぐための有望な創薬ターゲットであり、効果的な薬剤設計のために構造生物学的な研究を進めていく必要がある。

細菌の IV 型分泌システムの機能や構造に関しては、グラム陽性菌と比較してグラム陰性菌で研究が進んでおり、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) が保有する VirB/D4 システムやレジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) が保有する Dot/Icm システムなどで、クライオ電子顕微鏡などを用いた構造解析によってシステム全体や各タンパク質の構造が決定され、その機能が明らかになってきている(図 17)[42、43]。グラム陽性菌の IV 型分泌システムの構造についても類似する部分はあると考えられているが、ウェルシュ菌を含むグラム陽性菌は細胞膜の構造が異なるため、IV 型分泌システムの詳細な構造は異なる。

グラム陰性菌の IV 型分泌システムは 10 種類以上のタンパク質で構成される複合体で、働きや部位によって外膜コア複合体(Outer membrane core complex : OMCC)や内膜複合体 (Inner membrane complex : IMC) といったサブ複合体に分かれている(図 17、表 18)。

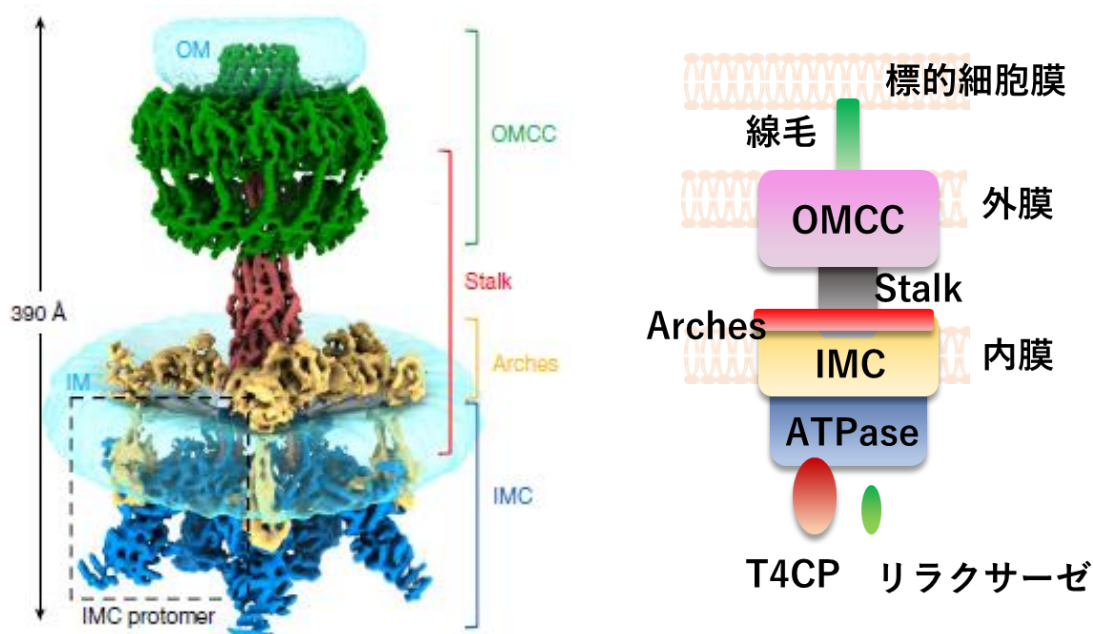


図 17 VirB/D4 システムの構造および模式図[50]。左：VirB/D4 システムの全体構造、右：グラム陰性菌の IV 型分泌システムの模式図。グラム陰性菌では OMCC や IMC といった構成要素に分かれる。

表 18 IV 型分泌システムを構成する要素

サブ複合体	働き
リラクサーゼ	システム内に取り込む DNA の <i>oriT</i> と呼ばれる配列を認識して DNA を切断し一本鎖 DNA にした後、5'末端に結合する。
T4CP (Type IV coupling protein)	DNA と結合したリラクサーゼを認識して分泌システム内に取り込む。
ATPase	細胞質から内膜にかけて存在し、DNA の輸送や線毛形成のためのエネルギーを産生する。
IMC (Inner membrane complex)	内膜で DNA が通過するチャンネルを形成する。
Stalk	IV 型分泌システムの中心部に位置し、IMC から OMCC をつなぐ。
Arches	IMC の上部に位置し、内膜を貫通して Stalk と IMC に結合する。
OMCC (Outer membrane core complex)	外膜で DNA が通過するチャンネルを形成する。
線毛	細胞外へと伸びる細長い管状構造で、先端部で標的細胞膜を認識すると考えられる。
アドヘシン	ペプチドグリカン層から細胞外へと伸び、標的細胞膜を認識して結合する。

グラム陰性菌では全体構造やサブ複合体、各タンパク質の構造が明らかになってきているが、グラム陽性菌の IV 型分泌システムの構造生物学的研究はほとんど進んでいない。そのため詳細な構造や各タンパク質の機能は明らかになっていない。しかし、グラム陰性菌の IV 型分泌システムの遺伝子との配列相同性などから、構成するサブ複合体は表 19 のように異なると予想されている。

表 19 グラム陽性菌とグラム陰性菌の IV 型分泌システムを構成するサブ複合体

サブ複合体	グラム陽性	グラム陰性
リラクサーゼ	○	○
T4CP	○	○
ATPase	○	○
IMC	○	○
Stalk	?	○
Arches	?	○
OMCC	×	○
線毛	×	○
アドヘシン	○	×

※構成要素として含むサブ複合体を○、含まないものを×、不明なものを?で示した。

グラム陽性菌は外膜を持たないため、その IV 型分泌システムは OMCC を持たず、IMC が内膜からペプチドグリカン層を貫通すると考えられている。また線毛は持たず、アドヘシンや輸送チャンネル自体が標的細胞膜の認識に関わると考えられている。そのため全体構造は以下のようにになると予想されている(図 18)[51]。

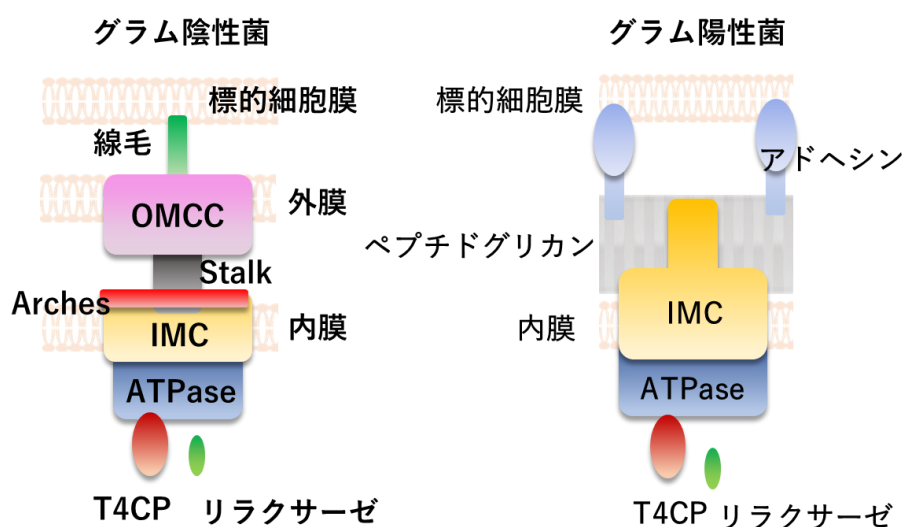


図 18 グラム陰性菌とグラム陽性菌の IV 型分泌システムの模式図

またグラム陰性菌の IV 型分泌システムの VirB/D4 システムでは、構造情報を活用した創薬も進められており、ATPase の加水分解を阻害したり、OMC の構成タンパク質の二量体化を阻害したりするような接合伝達阻害剤が開発されている [52]。本研究では、グラム陽性菌のウェルシュ菌が、接合伝達で病原性因子や薬剤耐性因子の遺伝子を拡散していることを示した。そこでグラム陽性菌でもグラム陰性菌と同様に IV 型分泌システムをターゲットとした創薬が病原菌の拡散への対策になり得ると考える。

第六節 小括

本章では、*bec* 保有プラスミドがウェルシュ菌の代表的なプラスミド pCP13 と広い領域で高い相同性を持ち、IV 型分泌システムをコードする Pcp 遺伝子座を保有していることを明らかにした。このことにより *bec* 保有プラスミドは接合伝達によって水平伝播してきた可能性が高いことを示した。

ウェルシュ菌の接合伝達性プラスミドである pCP13 ファミリープラスミドと pCW3 ファミリープラスミドは既に様々な系統のウェルシュ菌に広がっており、様々な遺伝子を拡散していることを明らかにした。これらのプラスミドが病原性因子や薬剤耐性因子の遺伝子を獲得した場合、接合伝達によって急速に多くの菌株に拡散される可能性があり、引き続き接合伝達性プラスミドの遺伝子の獲得や拡散について注視していく必要がある。

これまでにグラム陰性菌については IV 型分泌システムの構造解析や機能解析が進んでいる。しかし細胞膜の構造が異なるために IV 型分泌システムの構造も異なるグラム陽性菌については理解がほとんど進んでいない状況である。本章ではウェルシュ菌において IV 型分泌システムによる接合伝達が病原性因子や薬剤耐性因子の拡散に大きく寄与していることから、グラム陽性菌においても IV 型分泌システムが有望な創薬ターゲットになり得ると位置づけた。

結論

本研究は食中毒の発生に関わるウェルシュ菌の新規毒素 BEC を産生する菌株の拡散に関して遺伝学的観点から解明することを目指した。本研究の開始段階では *bec* 保有株は 1 株しか全ゲノム情報がなく、*bec* の拡散に関する研究は困難であったため、ゲノム疫学的な情報を取得するために、2009 年から 2019 年の間に国内で分離された *bec* 保有株 5 株の完全長ゲノム配列を決定した。ゲノム解析の結果、*bec* はウェルシュ菌の代表的なプラスミドファミリーである pCP13 ファミリープラスミド上にコードされており、プラスミドの接合伝達によって拡散されてきたことが明らかになった。既報で pCP13 は *in vitro* で高い水平伝播効率を示していたが、本研究の比較ゲノム解析とデータマイニングによって、pCP13 ファミリープラスミドが実際に自然環境中で多くのウェルシュ菌に拡散されていることを示した。現在、pCP13 ファミリープラスミドが保有する毒素遺伝子は *cpb2* と *bec* しか見つかっておらず、毒素遺伝子を持った pCP13 ファミリープラスミドを保有する菌株数も限られているが、今後これらの毒素遺伝子や新たに獲得した病原性因子の遺伝子が接合伝達によって様々なウェルシュ菌に急速に拡散されていく可能性がある。

接合伝達を行う IV 型分泌システムはグラム陰性菌で研究が進んでおり、構造生物学的研究から構成タンパク質の各機能も明らかになってきている。しかしグラム陽性菌は IV 型分泌システムが存在する細胞膜の構造が異なるため、その構造はグラム陰性菌と異なっており、研究はほとんど進んでいない。本研究ではグラム陽性菌のウェルシュ菌に関して接合伝達が遺伝子の拡散に大きく寄与していることを示した。

今後はウェルシュ菌の IV 型分泌システムを創薬ターゲットとして構造解析を行い、グラム陽性菌の IV 型分泌システムの構造から、その機能を明らかにしていくことで新規阻害剤の開発など創薬へと発展することが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始に渡り御指導賜りました大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野 大久保忠恭教授、吉田卓也准教授、河原一樹助教、並びに大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課 余野木伸哉主任研究員に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言並びに御激励を賜りました大阪大学微生物病研究所感染症メタゲノム研究分野 中村昇太特任准教授、並びに大阪大学微生物病研究所細菌感染分野 飯田哲也教授、松田重輝准教授に深く感謝いたします。

本論文の審査をしていただきました大阪大学大学院薬学研究科量子生命情報薬学分野 福澤薫教授、並びに大阪大学大学院薬学研究科細胞生物学分野 西野邦彦教授に深く感謝いたします。

ゲノム解析を中心に研究全般に渡り広く御指導いただきました大阪大学微生物病研究所感染症メタゲノム研究分野 元岡大祐助教、松本悠希特任助教、並びに沖大也特任研究員に深く感謝いたします。またウェルシュ菌株を分与していただき、御助言並びに御指導を賜りました愛知県衛生研究所生物学部細菌研究室 山田和弘主任研究員、並びに大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課 川津健太郎課長に深く感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、終始支えてくださいました家族と友人、大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野の皆様にご深く感謝いたします。

実験材料と方法

bec 保有ウェルシュ菌株の分離

国内で分離された *bec* 保有株 5 株(表 20)を本研究に用いた。

表 20 実験に用いた菌株の情報

菌株名	分離年	発生場所	分離元	備考
OS1	2009	大阪府	食中毒患者	
TS1	2010	栃木県	食中毒患者	
O13-19	2013	大阪府	下痢症患者	ノロウイルス等も検出
A18-256	2018	愛知県	食中毒患者	
A19-1	2019	愛知県	牡蠣	産地は不明

各菌株は以下の方法で分離された。

➤OS1、TS1、O13-19

カナマイシン含卵黄加 CW 寒天培地（ウェルシュ菌選択培地）に糞便を塗抹し、42°C、嫌気条件下で一晩培養後、卵黄反応を示したコロニーを釣菌した。

➤A18-256

糞便を 80°C で 10 分間加熱処理後、カナマイシン含卵黄加 CW 寒天培地に塗抹し、37°C、嫌気条件下で 48 時間培養後、卵黄反応を示したコロニーを釣菌した。

➤A19-1

牡蠣約 10g をストマッカー袋に入れて PB 20mL を加え、ストマッカーで 2 分均一化して試料液を作製した。試料液 1 白金耳量をカナマイシン含卵黄加 CW 寒天培地に塗抹し、37°C、嫌気条件下で 48 時間培養後、卵黄反応を示したコロニーを釣菌した。

分離した各菌株は蒸留水で懸濁後 10 分間煮沸して加熱処理し、15,000 g で 5 分間遠心し、上清をテンプレートとして表 21 に示したプライマーを用いてマルチプレックス PCR を実施し、菌株の *bec* の有無を確認した[53]。

表 21 プライマーの配列

遺伝子	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')
<i>cpe</i>	CPE F	ggagatggttgatattagg
	CPE R	ggaccagcagttgtagata
<i>becA</i>	<i>becA</i> F	caatggggcgaagaaaatta
	<i>becA</i> R	aaccatgatcaattaaacctca
<i>becB</i>	<i>becB</i> F	tgcaaatgacccttactga
	<i>becB</i> R	agattggagcagagccagaa
<i>plc</i>	CPA F	gctaagtgtactgccgttga
	CPA R	cctctgatacatcgtgtaag

2× Multiplex PCR Master Mix 12.5 μL、*plc* と *cpe* のプライマー 0.4 μM、*becAB* のプライマー 0.2 μM、テンプレート DNA 1 μL (>10pg DNA/ 25 μL) 混合した反応液 25 μL を用いて、表 22 に示した条件でマルチプレックス PCR を行った[53]。

表 22 PCR 条件

95°C	5 分	} ×30 サイクル
95°C	30 秒	
60°C	90 秒	
72°C	30 秒	
68°C	10 分	

PCR 産物は 2.5~3.0% のアガロースゲルで泳動し、499 bp の *becA* と 416 bp の *becB* が検出された菌株に関して DNeasy Power Soil Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。

ゲノムシーケンス

抽出した各ゲノム DNA は、以下の方法でショートリード (MiSeq) とロングリード (PacBio または MinION) の 2 種類のシーケンスプラットフォームを用いてゲノムシーケンスを行い、完全長ゲノムを決定した。

➤MiSeq (ショートリード)

抽出した各ゲノム DNA 100ng に 130 μL になるように TE 溶液を加え、covarisS 220 (Covaris) を用いて超音波で DNA を約 600bp になるように断片化した後、LabChip GX Touch (PerkinElmer) を使用し、キットは DNA HiSens を用いてフラグメントサイズを確

認した。断片化を行った DNA は KAPA Hyper Prep (KAPA Biosystems) を用いてライブラリを調製し、MiSeq (Illumina) でペアエンドシーケンス (150×2 or 250×2 cycles)を行った。

➤PacBio (ロングリード)

抽出した各ゲノム DNA 10 μg を SMRTbell Template Prep Kit 1.0 (PacBio) を用いてライブラリを調製し、PacBio (PacBio) でシーケンスを行った。

➤MinION (ロングリード)

抽出した各ゲノム DNA 2.0 μg を 1D genomic ligation (SQK-LSK109) library preparation kit (ONT) を用いてライブラリを調製し、フローセルは FLO-MIN106 を用いて MinION (ONT) でシーケンスを行った。

アセンブリ

MinION で得られたデータのアセンブリは Flye v2.5 を用いて行った[54]。その際、データ量が過剰であったため、ウェルシュ菌の平均的な全ゲノム配列長の 3.3 Mbp の 50 倍となるように無作為にデータを抽出してからアセンブリを行った。その後、Minimap2 v2.17 を用いて MinION で得られた全ての配列で補正した[55]。PacBio で得られたデータのアセンブリは HGAP v3 を用いて行った[56]。ロングリードでアセンブリした配列は pilon を用いて MiSeq で得られたデータで補正した[57]。

bec 保有プラスミドの配列補正

アセンブリした *bec* 保有プラスミドを MAFFT v7.475 でアライメントし、配列の違いからシーケンスやアセンブリのエラーと予想される部分の配列を、サンガー法で再度シーケンスし、配列を確認した。また Q135.2 のシーケンスデータを European Nucleotide Archive (ENA) (project PRJEB33762) から取得し、TrimGalore v0.6.4 でアダプター配列を取り除き、Unicycler v0.4.8 で *de novo* アセンブリを行った[58]。

ゲノム DNA のアノテーション

アセンブリした配列は Prokka v1.14.5 でアノテーションを行った[34]。さらに pCP-OS1 に関しては pCP13 のアノテーション情報を参考にさらにマニュアルでアノテーション情報を追加した。

ANI と dDDH の算出

アセンブリしたゲノムはウェルシュ菌の代表的な菌株 ATCC13124 をリファレンスゲノムとして、ANI と dDDH を算出した。ANI は fastANI v1.3[59]を、dDDH は GGDC v2.1[60]

を用いて算出し、それぞれ $\geq 97.1\%$ と $\geq 74.1\%$ で、各配列がウェルシュ菌のゲノム DNA であることを確認した。

コアゲノムを用いた系統樹解析

596 株のウェルシュ菌株のゲノム配列を GenBank のデータベースからダウンロードし、本研究で決定した 5 株のゲノム配列と合わせて 601 株で Parsnp v1.2 を用いて最尤法で系統樹を作成した。リファレンスには strain 13 を用い、-x のオプションを使用して最近起こった再構成と考えられる配列を取り除いた[61]。遺伝的距離を決定するため、Gingr で VCF ファイルを作成した。作成した系統樹は R パッケージの phylogram、ggtree[62]、ape、RColorBrewer を用いて毒素遺伝子の有無や毒素型と合わせて作図した。

系統分けは RhierBAPS を用いて hierarchical Bayesian clustering に基づいて行った後、複雑さを除くために一部の系統をまとめた[63]。

病原性因子や薬剤耐性因子、CRISPR 領域、プロファージの探索

ウェルシュ菌 601 株のゲノム配列から Abricate v1.0.1 を用いて、独自の毒素遺伝子データベースを基に毒素遺伝子を探索した(表 23)[64]。同様に、本研究で決定した 5 株のゲノム配列から、独自の薬剤耐性遺伝子データベースと NCBI AMRFinderPlus、CARD、Resfinder、ARG-ANNOT、MEGARES、EcOH、PlasmidFinder、VFDB、Ecoli_VF のデータベースを基に薬剤耐性遺伝子を探索した(表 24)。また本研究で決定した 5 株のゲノム配列から、MinCED v0.4.2 と PHAge Search Tool Enhanced Release (PHASTER)を用いて CRISPR 領域とプロファージを探索した[65, 66]。

表 23 薬剤耐性因子の情報

薬剤耐性産物	遺伝子	Accession No.
TetM	<i>tetM</i>	CYYX01000001.1
BcrA	<i>bcrA</i>	GU810181.1
BcrB	<i>bcrB</i>	GU810180.1
BcrD	<i>bcrD</i>	GU810179.2
BcrR	<i>bcrR</i>	GU810182.1
chloramphenicol resistance protein	<i>crp</i>	NZ_CABPRN010000011.1

表 24 病原性因子の情報

毒素	遺伝子	Accession No.
BECa	<i>becA</i>	NC_023918.1
BECb	<i>becB</i>	NC_023918.1
Phospholipase C (α -毒素)	<i>plc</i>	D63911.1
CPE	<i>cpe</i>	M98037.1
Collagenase	<i>colA</i>	D13791.1
β -毒素	<i>cpb</i>	KP064410.1
β -2 毒素	<i>cpb2</i> variant 1	AP003515.1
β -2 毒素	<i>cpb2</i> variant 2	CP009558.1
Perfringolysin O	<i>pfoA</i>	BA000016.3
ϵ -毒素	<i>etx</i>	M95206.1
ι -毒素 component Ia	<i>iap</i>	NC_015712.1
ι -毒素 component Ib	<i>ibp</i>	NC_015712.1
NetB	<i>netB</i>	FJ189503.1
Peptidase	<i>tpeL</i>	EU848493.1
NetF	<i>netF</i>	KJ606986
λ -毒素	<i>lam</i>	AJ439340
Alveolysin	<i>alv</i>	TGY44713.1

染色体-プラスミド間の SNP の割合の比較

本研究でゲノム配列を決定した 5 株の染色体と Q135.2、PDT001006423.1、ASM1837293v1 の全ゲノム配列(ドラフトゲノム)を Parsnp v1.2 でアライメントした。出力された VCF ファイルを基に、共通する配列の配列長と SNP の数を決定した。8 株の *bec* 保有プラスミドは MAFFT v7.475 でアライメントし、染色体と同様に共通する配列の配列長と SNP の数を決定した。

SNP の割合は染色体とプラスミドそれぞれの共通する配列の配列長(2,682,400 bp と 54,459 bp)から算出した。二項分布を用いた統計値は下記の通りに計算を行った。

$$Z = \frac{X - np}{\sqrt{np(1-p)}}$$

X=プラスミドの SNP 数、n=染色体の SNP の割合、p=プラスミドの共通配列長 (54,459)

pCP13 ファミリープラスミドおよび pCW3 ファミリープラスミドの探索

pCP13 が保有する Pcp 遺伝子座中の *pcpB4* と *pcpD4* の配列を用いて BLASTn で GenBank の 596 株のゲノムから Pcp 遺伝子座を持つ菌株を探索した。これらの遺伝子を持

つ菌株を pCP13 ファミリープラスミド保有株とした。

同様にして pCW3 が保有する *tcpA* と *tcpF* の配列を用いて BLASTn で *tcp* 遺伝子座を持つ菌株を探索した。これらの遺伝子を持つ菌株を pCW3 ファミリープラスミド保有株とした。

pCP13 ファミリープラスミドの比較ゲノム解析

47 個の pCP13 ファミリープラスミドの *pcpT* または *pcpS* を始点として、Pcp 遺伝子座を MAFFT v7.475 でアライメントした。アライメントした配列から RAxML v8.2.12 を用いて最尤法で系統樹を作成した。この結果から 11 個のプラスミドを選んで Prokka v1.14.6 でアノテーションし、Easyfig v2.2.2 を用いて図示した[67]。

引用文献

- [1] Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 1999;7:104–10.
- [2] Matches JR, Liston J, Curran D. *Clostridium perfringens* in the environment. Appl Microbiol. 1974;28:655–60.
- [3] Duncan CL, Strong DH. *Clostridium perfringens* type A food poisoning I. Response of the rabbit ileum as an indication of enteropathogenicity of strains of *Clostridium perfringens* in monkeys. Infect Immun. 1971;3:167–70.
- [4] Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. Future Microbiol. 2014;9:361–77. doi: 10.2217/fmb.13.168.
- [5] Revitt-Mills SA, Rood JI, Adams V. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. Microbiology Aust. 2015;36:114–7.
- [6] Kiu R, Hall LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. Emerg Microbes Infect. 2018;7:141.
- [7] Niilo L. Mechanism of action of the enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. Infect Immun. 1971;3:100–6.
- [8] Bannam TL, Yan XX, Harrison PF. Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. mBio. 2011;2:e00190-11. doi: 10.1128/mBio.00190-11.
- [9] Uzal FA, Senties-Cué CG, Rimoldi G, Shivaprasad HL. Non-*Clostridium perfringens* infectious agents producing necrotic enteritis-like lesions in poultry. Avian Pathol. 2016;45:326–33.
- [10] Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. Anaerobe. 2018;53:5–10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.
- [11] Popoff MR, Bouvet P. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. Toxicon. 2013;75:63–89.
- [12] Verherstraeten S, Goossens E, Valgaeren B, Pardon B, Timbermont L, Haesebrouck F, et al. Perfringolysin O: The underrated *Clostridium perfringens* toxin? Toxins (Basel). 2015;7:1702–21.
- [13] Gibert M, Petit L, Raffestin S, Okabe A, Popoff MR. *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. Infect Immun. 2000 Jul;68(7):3848-53.

- [14] Amimoto K, Noro T, Oishi E, Shimizu M. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology*. 2007;153(Pt 4):1198–206.
- [15] Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*. 2008;4:e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0040026.
- [16] Mehdizadeh Gohari I, Parreira VR, Nowell VJ, Nicholson VM, Oliphant K, Prescott JF. A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2015;10:e0122684. doi: 10.1371/journal.pone.0122684.
- [17] Mehdizadeh Gohari I, A Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A McClane B. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*. 2021;12:723–53.
- [18] Yonogi S, Matsuda S, Kawai T. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect Immun*. 2014;82:2390–9.
- [19] Irikura D, Monma C, Suzuki Y, Nakama A, Kai A, Fukui-Miyazaki A, et al. Identification and characterization of a new enterotoxin produced by *Clostridium perfringens* isolated from food poisoning outbreaks. *PLoS One*. 2015;10:e0138183. doi: 10.1371/journal.pone.0138183.
- [20] Kawahara K, Yonogi S, Munetomo R, Oki H, Yoshida T, Kumeda Y, et al. Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;480:261–7.
- [21] Monma C, Hatakeyama K, Obata H, Yokoyama K, Konishi N, Itoh T, et al. Four foodborne disease outbreaks caused by a new type of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol*. 2015;53:859–67. doi: 10.1128/JCM.02859-14.
- [22] Matsuda A, Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Nakamura M, et al. Prevalence and genetic diversity of toxin genes in clinical isolates of *Clostridium perfringens*: Coexistence of alpha-toxin variant and binary enterotoxin genes (*bec/cpile*). *Toxins (Basel)*. 2019 6;11:326.
- [23] Kiu R, Sim K, Shaw A, Cornwell E, Pickard D, Kroll JS, et al. Genomic analysis of *Clostridium perfringens* BEC/CPILE-positive, toxinotype D and E strains isolated from healthy children. *Toxins (Basel)*. 2019;11:543.
- [24] Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LS. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol*. 2007 Dec;158(10):767-78.
- [25] Arnold BJ, Huang IT, Hanage WP. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2022 Apr;20(4):206-218.
- [26] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008 Oct;26(10):1135-45. doi: 10.1038/nbt1486.

- [27] Watson M. Mind the gaps-ignoring errors in long read assemblies critically affects protein prediction. *Biorxiv*, 2018 Mar; 285049.
- [28] Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 May 17;17(6):333-51.
- [29] Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012 Jul 24;13:341.
- [30] Miclotte G, Heydari M, Demeester P, Rombauts S, Van de Peer Y, Audenaert P, et al. Jabba: hybrid error correction for long sequencing reads. *Algorithms Mol Biol*. 2016 May 3;11:10.
- [31] Au KF, Underwood JG, Lee L, Wong WH. Improving PacBio long read accuracy by short read alignment. *PLoS One*. 2012;7(10):e46679.
- [32] Hackl T, Hedrich R, Schultz J, Förster F. proovread: large-scale high-accuracy PacBio correction through iterative short read consensus. *Bioinformatics*. 2014 Nov 1;30(21):3004-11.
- [33] Koren S, Schatz MC, Walenz BP, Martin J, Howard JT, Ganapathy G, et al. Hybrid error correction and de novo assembly of single-molecule sequencing reads. *Nat Biotechnol*. 2012 Jul 1;30(7):693-700.
- [34] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30:2068–9.
- [35] Feng Y, Fan X, Zhu L, Yang X, Liu Y, Gao S, et al. Phylogenetic and genomic analysis reveals high genomic openness and genetic diversity of *Clostridium perfringens*. *Microb Genom*. 2020 Oct;6(10):mgen000441.
- [36] Rood JI, Scott VN, Duncan CL. Identification of a transferable tetracycline resistance plasmid (pCW3) from *Clostridium perfringens*. *Plasmid*. 1978 Sep;1(4):563-70.
- [37] Abraham LJ, Rood JI. Molecular analysis of transferable tetracycline resistance plasmids from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*. 1985 Feb;161(2):636-40.
- [38] Bannam TL, Teng WL, Bulach D, Lyras D, Rood JI. Functional identification of conjugation and replication regions of the tetracycline resistance plasmid pCW3 from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*. 2006;188:4942–51. doi:10.1128/JB.00298-06.
- [39] Vidor CJ, Watts TD, Adams V, Bulach D, Couchman E, Rood JI, et al. *Clostridium sordellii* Pathogenicity Locus Plasmid pCS1-1 Encodes a Novel Clostridial Conjugation Locus. *mBio*. 2018 Jan 16;9(1):e01761-17.
- [40] Mehdizadeh Gohari I, A Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A McClane B. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):723-753.
- [41] Adams V, Han X, Lyras D, Rood JI. Antibiotic resistance plasmids and mobile genetic elements of *Clostridium perfringens*. *Plasmid*. 2018 Sep;99:32-39.
- [42] Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada A, Braun N, Connery S, Dujeancourt A, et al. Structure of a type IV secretion system. *Nature*. 2014 Apr 24;508(7497):550-553.

- [43] Ghosal D, Chang YW, Jeong KC, Vogel JP, Jensen GJ. *In situ* structure of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system by electron cryotomography. *EMBO Rep.* 2017 May;18(5):726-732.
- [44] Fronzes R, Schäfer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G. Structure of a type IV secretion system core complex. *Science.* 2009 Jan 9;323(5911):266-8.
- [45] Rivera-Calzada A, Fronzes R, Savva CG, Chandran V, Lian PW, Laeremans T, et al. Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J.* 2013 Apr 17;32(8):1195-204.
- [46] Li YG, Hu B, Christie PJ. Biological and Structural Diversity of Type IV Secretion Systems. *Microbiol Spectr.* 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.PSIB-0012-2018.
- [47] Shimizu T, Ohshima S, Ohtani K, Shimizu T, Hayashi H. Genomic map of *Clostridium perfringens* strain 13. *Microbiol Immunol.* 2001;45(2):179-89.
- [48] Watts TD, Vidor CJ, Awad MM, Lyras D, Rood JI, Adams V. pCP13, a representative of a new family of conjugative toxin plasmids in *Clostridium perfringens*. *Plasmid.* 2019;102:37–45.
- [49] Li J, Adams V, Bannam TL, Miyamoto K, Garcia JP, Uzal FA, Rood JI, McClane BA. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013 Jun;77(2):208-33.
- [50] Macé K, Vadakkepat AK, Redzej A, Lukoyanova N, Oomen C, Braun N, et al. Cryo-EM structure of a type IV secretion system. *Nature.* 2022 Jul;607(7917):191-196.
- [51] Bhatti M, Laverde Gomez JA, Christie PJ. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res Microbiol.* 2013 Jul-Aug;164(6):620-39.
- [52] Boudaher E, Shaffer CL. Inhibiting bacterial secretion systems in the fight against antibiotic resistance. *Medchemcomm.* 2019 May 8;10(5):682-692.
- [53] Yonogi S, Kanki M, Ohnishi T, Shiono M, Iida T, Kumeda Y. Development and application of a multiplex PCR assay for detection of the *Clostridium perfringens* enterotoxin-encoding genes *cpe* and *becAB*. *J Microbiol Methods.* 2016 Aug;127:172-175.
- [54] Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol.* 2019;37:540–6.
- [55] Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018;34:3094–100.
- [56] Chin C-S, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods.* 2013;10:563–9.
- [57] Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One.* 2014;9:e112963.
- [58] Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017;13:e1005595.

- [59] Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun.* 2018;9:5114.
- [60] Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics.* 2013;14:60.
- [61] Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol.* 2014;15:524.
- [62] Guangchuan Y. Using ggtree to visualize data on tree-like structures. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2020, 69:e96.
- [63] Tonkin-Hill G, Lees JA, Bentley SD, Frost SDW, Corander J. RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. *Wellcome Open Res.* 2018 Jul 30;3:93.
- [64] Seemann T. Mass Screening of Contigs for Antimicrobial and Virulence Genes. <https://github.com/tseemann/abricate>
- [65] Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W16–21.
- [66] Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Web Server issue):W347–52.
- [67] Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics.* 2011;27:1009–10.

主論文

“Analysis of the complete genome sequences of *Clostridium perfringens* strains harbouring the binary enterotoxin BEC gene and comparative genomics of pCP13-like family plasmids”

Kengo Ueda, Kazuki Kawahara, Narumi Kimoto, Yusuke Yamaguchi, Kazuhiro Yamada, Hiroya Oki, Takuya Yoshida, Shigeaki Matsuda, Yuki Matsumoto, Daisuke Motooka, Kentaro Kawatsu, Tetsuya Iida, Shota Nakamura, Tadayasu Ohkubo, Shinya Yonogi.

BMC Genomics, 23, Article number: 226 (2022)