

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告書

コレラ菌のゲノム情報に基づいた検査系の開発

担当責任者 森田昌知 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨

現在アジア地域におけるコレラ流行株として、El Tor 型 *V. cholerae* O1 の変異体である El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 が分離されている。それらの変異体は一塩基多型（SNPs）により型別されており、新たな流行株の出現に備えコレラ菌の基盤的なゲノム情報を整備し、SNP による系統解析を行う必要がある。インド国立コレラ及び腸管感染症研究所よりゲノム DNA の提供を受け、解析を進めるために、共通のゲノム調整プロコールの作成し、精製ゲノム DNA の品質査定をおこなった。

A. 研究目的

Vibrio cholerae は 200 以上の血清群に分類され、自然環境中では淡水、海水、汽水域と広く分布している。それらの中でコレラの流行を引き起こす原因菌は、血清群 O1 及び O139 の *V. cholerae* に限定されており、コレラの典型的な症状を引き起こす主要な病原因子はコレラ毒素であることが知られている。また *V. cholerae* O1 には生化学的性状の違いから classical 型と El Tor 型の生物型が存在するが、現在のコレラの世界流行は 1961 年にインドネシア、スラウェシ島を発端とする El Tor 型 *V. cholerae* O1 による流行である。しかしながら 1990 年代以降、コレラ毒素 B サブユニット遺伝子の一塩基多型（SNPs）により、El Tor 型 *V. cholerae* O1 の変異体の出現が確認され、現在アジア地域においては El Tor 型 *V. cholerae* O1 は分離されずに、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 の両者が分離されている。

このように世界流行の最中において *V. cholerae* O1 は変異を繰り返しているが、変異体は SNPs により型別されている。つまり、今後の

出現が予想される新規コレラ流行株の検出には全ゲノム情報を整備し、基盤情報を整理しておく必要がある。そこで本研究ではコレラ菌の全ゲノム配列の決定と基本的な配列解析を行い、ゲノム情報に基づいた新規コレラ流行株の検出系を構築することを目的とする。コレラの世界流行の中心はベンガル湾であることを鑑みると、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所（National Institute of Cholera and Enteric Diseases、NICED）との連携及び情報の共有化は重要な役割を担っている。次世代シーケンサーの導入によりゲノム配列の速度やコストは大幅に改善されているものの、アジア各国では普及していない。そこで次世代シーケンサー用の DNA ライブラリーを NICED にて調整できるようにするため、本年度はその端緒としてゲノム調整法の標準化を行った。

B. 研究方法

コレラ菌の培養方法、及びゲノム調整方法を最適化するため使用培地、ゲノム精製キット等の各種条件を検討した。DNA 濃度及び品質は吸光度に

よる定量値と蛍光色素を用いた定量値を比較することで評価した。またゲノム精製試薬に含まれるカオトロピック塩及びコレラ菌由来のタンパク質の混入をそれぞれ波長 230nm における吸光度と波長 260nm における吸光度の比 (A_{260}/A_{230}) 及び波長 280nm における吸光度と波長 260nm における吸光度の比 (A_{260}/A_{280}) により評価した。

(倫理面への配慮)

人を対象とする研究ではなく、また動物実験も行っていないので、該当しない。

C. 研究結果

精製法として磁性ビーズ法とシリカメンブレン法を、製造社として MACHEREY-NAGEL 社と QIAGEN 社を比較した。次年度以降インド NICED で実施することをふまえ、ゲノム調整キットの購入及び作業工程などを考慮し、QIAGEN 社の DNeasy Blood & Tissue Kits を使用することとした。コレラ菌の LB 培地一昼夜培養液からゲノム DNA を QIAGEN 社のプロトコール通りに精製したところ、 A_{260}/A_{230} 、 A_{260}/A_{280} とともに 1.6 より大きい値となり、カオトロピック塩及びタンパク質の混入は低濃度であった。しかしながら、DNA 濃度は吸光度による定量値が蛍光色素を用いた定量値の 3 倍以上となっており大きな乖離がみられた。これは RNA の混入により A_{260} が高く測定されたためであると考えられた。そこで定法に Proteinase K 失活処理と RNase A による RNA 分解処理を加えた。これにより吸光度による定量値が蛍光色素を用いた定量値の乖離は小さくなったものの、サンプルによっては依然として 3 倍以上の大きな乖離がみられた。これを改善するためには、ゲノム精製に至る前段階である培養時の最適化が必要であると考え、食品や環境中のコレラ菌はアルカリペプトン水により増菌した後、分離されることから、使用培地を LB 培地からアルカリペプトン水に変更し、ゲノムを精製した。その

結果、多くのサンプルで吸光度による定量値が蛍光色素を用いた定量値の乖離が 3 より小さくなり、RNA の混入が改善された。また、今後のライブラリー調整への EDTA の影響を避けるため、予溶出液は 10 倍に希釈した TE buffer とし、標準プロトコールとした (図)。

D. 考察

インドで分離された *V. cholerae* O1 のゲノム DNA をインド NICED より提供してもらい、ゲノム情報の基盤整備を行うためには、一定した品質のゲノム DNA を継続的に精製しなくてはならない。そのために共通のゲノム精製プロトコールが必要となる。そこで本年度は標準プロトコールの作成を行い、その評価を行った。次年度以降、インド NICED で精製されたゲノム DNA を用いて次世代シーケンサー用のライブラリー調整を行う予定である。またこの標準プロトコールは、インドのみならずアジア各国で適用でき、今後、研究ネットワークが広がった際には、すみやかにサンプルの提供を受けることができるであろう。

さらには本研究課題では国際的な共同研究を通じて、NICED と中長期的な連携体制を築くことを目指している。今後 NICED を訪問し、次世代シーケンサー用の DNA ライブラリー調整法の指導及び技術移転を行うなど、コレラ流行株の基盤情報の取得及びその共有化のために綿密なコミュニケーションを図りたい。

E. 結論

RNA 除去作業を含めた DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて、アルカリペプトン水で培養したコレラ菌からゲノム DNA を精製する方法を標準プロトコールとした。

F. 健康危機情報

特に無し。

G. 研究発表

特に無し。

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

Single colony grown on LB plates

Inoculate in alkaline peptone 2 mL, 30 shaking culture

The bacterial cells are collected by centrifugation from 1 ml of cultivation medium, and then suspend in 20 μ L saline (vortex)

Add 180 μ L ATL solution (DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen) and mixing

Add 20 μ L Proteinase K solution (Kit attached) and mixing

Incubate at 56 , 1hr

Incubate 95 for 5 minutes to inactivate the proteinase K by 5min

Add 2 μ L RNase A solution

Incubate at 37 , 30min

Add 200 μ L AL solution (Kit attached)

Add 200 μ L EtOH (99%)

Transfer the whole solution to the column (Kit attached) and centrifuge

Add 500 μ L AW1 solution (Kit attached) and centrifuge

Add 500 μ L AW2 solution (Kit attached) and centrifuge

Centrifuging the empty column to dry up

Add a 10-fold diluted TE (100 μ L) at 55

Incubate at Room temperature, 1min

Centrifuge it (14800rpm, 1min) to elute the genomic DNA

☒ ゲノム調整プロトコール