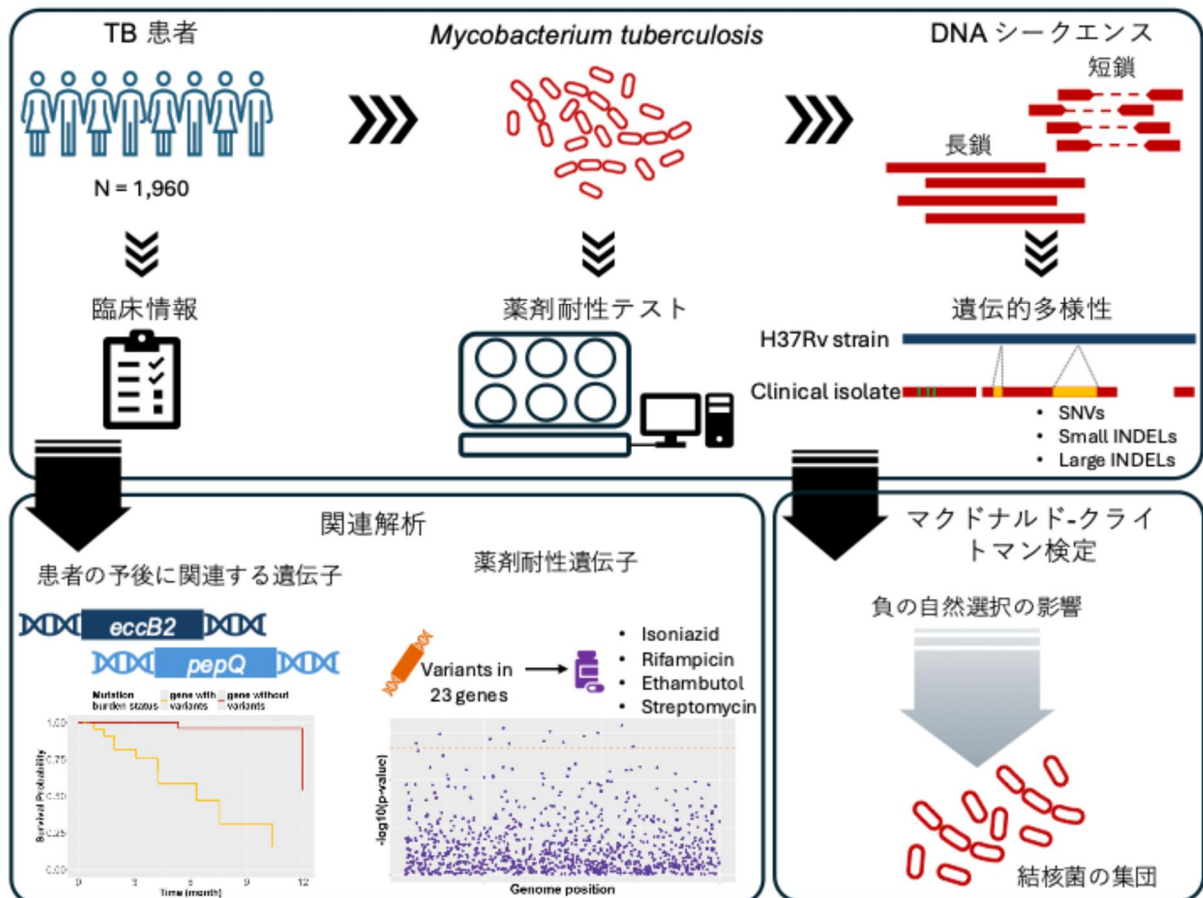


国立大学法人 東京大学
 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター

結核菌ゲノムの遺伝的多様性の包括的解析と病原性との関連

発表のポイント

- ◆結核菌のゲノム配列を解析し、様々な種類の遺伝的多様性を検出しました。また、遺伝的多様性と結核菌の病原性（患者の予後）や薬剤耐性との関連を解析しました。
- ◆病原菌ゲノムにおいて遺伝的多様性の包括的な解析はほとんど行われていませんでした。本研究によって病原性や薬剤耐性に関連する新たな遺伝子が検出されました。
- ◆結核菌の病原性、薬剤耐性のメカニズムの理解が深まり新たな治療標的分子の発見につながると考えられます。また、病原性の高い株や薬剤耐性株を検出する検査のマーカーになる可能性が考えられます。



結核菌のゲノム解析

概要

東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻人類遺伝学分野の Wittawin Worakitchanon 博士課程学生（当時）、藤本明洋教授らは、結核予防会複十字病院の野内英樹博士、国立感染症研究所の宮原麗子博士、国立国際医療研究センターの徳永勝士プロジェクト長、マヒドン大学の Prasit Palittapongarnpim 教授、タイ保健省の Surakameth Mahasirimongkol 博士らと共同で、結核菌 1,960 株の全ゲノムシーケンスデータ（注 1）を解析し、挿入・欠失および一塩基多様体 (SNV) の包括的解析を行い、病原性や薬剤耐性に関連する新たな遺伝子を検出しました。

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) によって引き起こされる世界的に重要な感染症です。しかし、結核菌の遺伝的多様性（注 2）の包括的解析は行われていませんでした。この研究では、結核菌 1,960 株の全ゲノムシーケンスデータを解析し、挿入・欠失および一塩基多様体 (SNV) の包括的解析を行いました。その結果、機能喪失変異は細菌の生存に必須な遺伝子に有意に少ないことが分かりました。また、集団遺伝学的な解析により、結核菌のゲノムには弱有害変異が多いことが示唆されました。さらに、病原性に関連する多型を探索したところ、*eccB2* 遺伝子の欠失が患者の予後と有意に関連していました。薬剤耐性に関連する 23 個の新規遺伝子も検出されました。これらの結果、機能変化が結核菌の病原性に関係する遺伝子についての知見が得られました。結核菌の病原性、薬剤耐性のメカニズムの理解が深まり新たな治療標的分子の発見につながると考えられます。

発表内容

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) によって引き起こされる感染症であり世界的に大きな問題となっています。世界保健機関 (WHO) によると、2020 年には約 990 万人が感染し、130 万人の患者が結核で死亡しています。また、抗生物質に対する耐性を獲得した薬剤耐性菌は、疾病対策や治療にとって重要な問題のひとつです。したがって、結核菌の病原性に関連する要因や薬剤耐性の研究は、新たな結核治療法の開発につながる重要な知見をもたらすと考えられます。

これまで、薬剤耐性のメカニズムの解明を目指してゲノム解析が行われてきました。しかし、先行研究では、主に SNV や短い挿入・欠失が解析されており、検出が難しい長い挿入・欠失 (50 塩基以上の挿入・欠失) の解析は行われていませんでした。本研究では、結核菌の遺伝的多様性を包括的に解析し、それらの進化的意義および病原性や薬剤耐性との関連を解析しました。

まず、遺伝的多様性を検出するための方法を開発しました。先行研究において、結核菌 1,960 株が次世代シーケンサー（注 3）を用いて全ゲノムシーケンスが行われており、本研究ではこのデータを解析しました。その中で 18 株が長鎖シーケンサー（注 4）でも全ゲノムシーケンスが行われていました。そこで、両方のシーケンサーで解析された 4 サンプルを用いて長い挿入・欠失を検出する方法を開発しました。複数のソフトウェアを用いて長い挿入・欠失を検出し、新たに開発したプログラムを用いて見逃されている長い挿入・欠失を同定しました。開発した手法は、さらに長鎖シーケンサーのデータと比較することで、十分な精度であることを確認しました。

1,960 株のシーケンスデータから、長い挿入・欠失、SNV と短い挿入・欠失を検出し解析しました。その結果、SNV が 98,922 個、短い挿入・欠失検出が 6,814 個、長い挿入・欠失検出が 1,181 個検出されました。遺伝子領域の遺伝的多様性の頻度を比較したところ、結核菌の生存に必須の遺伝子は挿入・欠失の頻度が低く、挿入・欠失は結核菌の生存に有害な影響を与えることが示唆されました（図 1）。一方で、宿主との相互作用や免疫系からの逃避に関与している

PE/PPE 遺伝子群では、挿入・欠失の頻度が高く、機能的多様性が大きいことが示唆されました (図 1)。

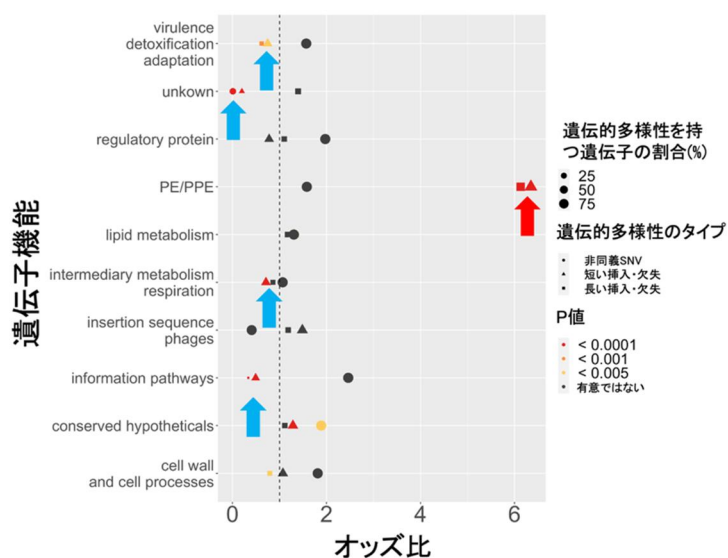


図 1 遺伝的多様性を有する遺伝子の機能比較

一塩基多様体 (SNV)、短い挿入・欠失、長い挿入欠失が存在する遺伝子の割合を比較した。結核菌の生存に重要な遺伝子には挿入・欠失が少なかった (オッズ比 < 1 青矢印)。一方、宿主との相互作用や免疫系からの逃避に関与している PE/PPE 遺伝子群は、挿入・欠失の頻度が高かった (オッズ比 > 1 赤矢印)。

次に各遺伝子への自然選択の影響を推定するために、近縁種のデータも使用して、非同義 SNV と種間の非同義変異の数を比較しました (注 5)。その結果、非同義 SNV が種間の非同義変異よりも多いことが分かりました。この結果は、結核菌の集団においては多くの弱有害多型が存在していると解釈することができます。

最後に、各遺伝子の多型と病原性および薬剤耐性との関連を解析しました (図 2)。その結果、*eccB2* 遺伝子の欠失が患者の予後と有意に関連し、*eccB2* 遺伝子の機能の喪失によって結核菌の病原性が強化されることが示唆されました (図 3)。*eccB2* 遺伝子の詳細な機能は明らかではありませんが、この遺伝子は結核菌の増殖、病原性、免疫系からの逃避に関係している ESX 系の遺伝子であり、結核菌の病原性に重要な機能を持っていると考えられます。次に、4 種類の薬剤 (イソニアジド、リファンピシン、エタンブトール、ストレプトマイシン) への耐性との関連を解析しました。その結果、23 個の新規遺伝子を含む 39 遺伝子が薬剤耐性に関連していました。

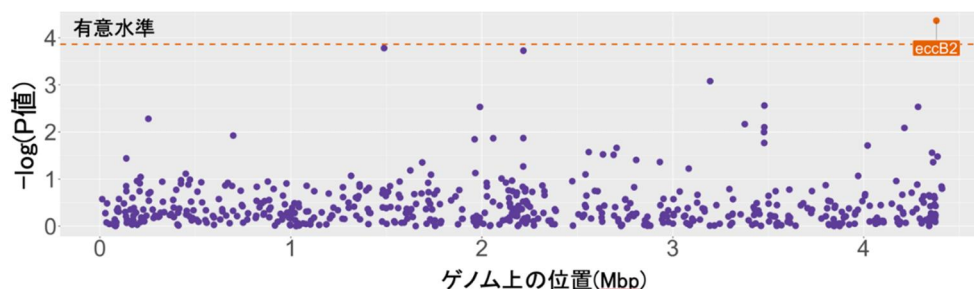


図 2 結核菌の病原性と多型の関連

遺伝子ごとに機能喪失多型を有するサンプルとそれ以外のサンプルの比較を行った。多重検定補正後の有意水準を点線で示した。

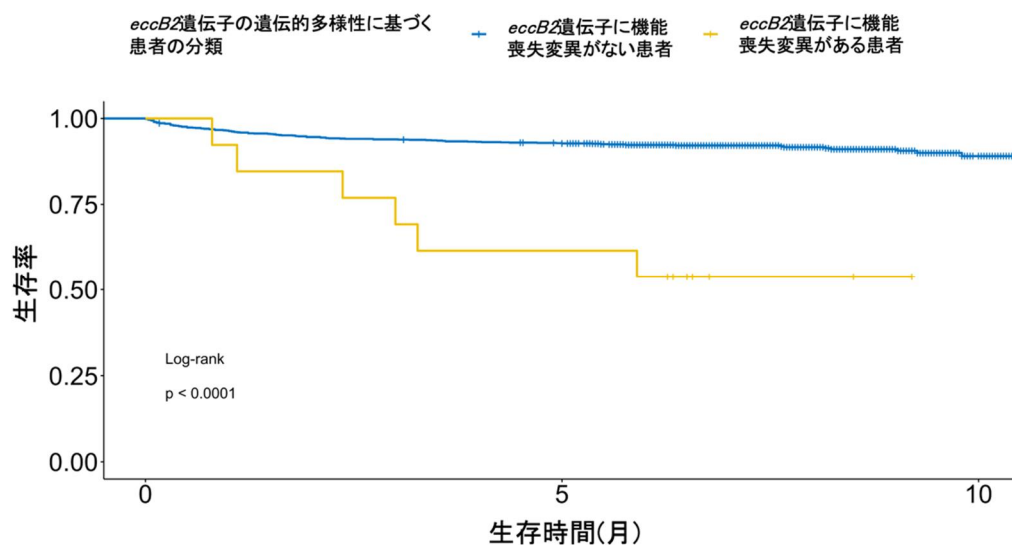


図3 *eccB2* 遺伝子に機能喪失変異がある患者とそれ以外の患者の生存時間の比較

この研究により、結核菌の病原性、薬剤耐性のメカニズムの理解が深まり新たな治療標的分子の発見につながると考えられます。また、病原性の高い株や薬剤耐性株を検出する検査のマーカーになる可能性が考えられます。

発表者・研究者等情報

東京大学大学院医学系研究科 国際保健学専攻 人類遺伝学分野

Wittawin Worakitchanon (ウィットウィン・ウォラキッチャノン) 研究当時：博士課程

現：Thailand MoPH-U.S.CDC Collaboration(TUC) 研究員

藤本 明洋 教授

結核予防会複十字病院

野内 英樹 博士

国立国際医療研究センター 研究所 ゲノム医科学プロジェクト

徳永 勝士 プロジェクト長

論文情報

雑誌名：Cell Host & Microbe

題名：Comprehensive analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals important variations in bacterial virulence

著者名：Wittawin Worakitchanon, Hideki Yanai, Pundharika Piboonsiri, Reiko Miyahara, Supalert Nedsuwan, Worarat Imsanguan, Boonchai Chaiyasirinroje, Waritta Sawaengdee, Sukanya Wattanapokayakit, Nuanjan Wichukchinda, Yosuke Omae, Prasit Palittapongarnpim, Katsushi Tokunaga, Surakameth Mahasirimongkol* & Akihiro Fujimoto*

DOI：10.1016/j.chom.2024.10.004

URL：[https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(24\)00362-7](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(24)00362-7)

研究助成

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）JP21km0908001、2020年度武田報彰医学研究助成金、NCGM 国際医療研究開発費 19A2001、e-ASIA 共同研究プログラム JRA1120C0-2564-13620-TH、22jm0210075 の支援により実施されました。

用語解説

注1 解析したサンプル：野内英樹博士（複十字病院）、Surakameth Mahasirimongkol 博士（タイ保健省）らが中心となり、約30年前からタイ国チェンライ県において結核菌ゲノムや結核患者のゲノム、臨床情報の収集と研究開発が行われている。また、2014年より2019年まで徳永勝士プロジェクト長（国立国際医療研究センター；当時は東京大学大学院医学系研究科教授）が代表として実施した国際共同研究（SATREPS）によって結核菌の全ゲノム解析が開始された。本研究では、このシーケンズデータに長鎖シーケンズデータも加え、新たな解析方法を開発して詳細に解析した。

注2 遺伝的多様性：同一種内の個体間のゲノム配列の違いのこと。遺伝的多様性には、一塩基多様体（SNV）、挿入・欠失などの幾つかのタイプに分類される。SNVは一塩基の違いであり、タンパク質のアミノ酸の違いを生じるSNVを非同義SNVとよぶ。挿入・欠失は塩基配列の長さの違いであり様々な長さの挿入・欠失が存在している。このうち、長めの（50塩基対以上）の挿入・欠失の検出は難しく正確な検出法は確立していない。本研究では、SNV、短い挿入・欠失、長い挿入・欠失を検出し包括的解析を行なった。なお、遺伝的多様性のうち、集団内の頻度が1%以上のものを多型とよぶ。

注3 次世代シーケンサー：DNA分子を断片化し大量の塩基配列を同時に解読する装置。配列決定の精度は高いが、読み取り長は短く、長い挿入・欠失などの構造異常の検出、繰り返し領域の配列決定に問題があるとされる。

注4 長鎖シーケンサー：DNA分子を短く断片化することなく配列決定を解読する装置。次世代シーケンサーが苦手とする構造異常の検出、繰り返し領域の配列決定が可能であるとされる。

注5 多型と種間変異の比較：この研究では、自然選択の影響を推定するため、マクドナルド・クライトマンテスト（McDonald-Kreitman test）を用いた。この方法では、各遺伝子の種内SNVと種間変異を非同義（アミノ酸を変える塩基置換）と同義（アミノ酸を変えない塩基置換）に分類し、2x2の表を作成し、独立性を検定する。中立変異と非常に有害な変異のみしか存在しない場合は、種内と種間の非同義数と同義数の比は一致するが、適応進化したアミノ酸変異が多数存在する場合や、弱有害多型が多数存在する場合にはこの比が異なる。本研究では、種内の非同義多型と同義多型の比が有意に大きく、結核菌集団には弱有害多型が多く存在することが示唆された。

問合せ先

〈研究に関する問合せ〉

東京大学大学院医学系研究科

教授 藤本 明洋 (ふじもと あきひろ)

Tel : 03-5841-3692 E-mail : afujimoto@m.u-tokyo.ac.jp

国立国際医療研究センター 研究所

ゲノム医科学プロジェクト長 徳永 勝士 (とくなが かつし)

E-mail : katokunaga@ri.ncgm.go.jp

〈報道に関する問合せ〉

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム

Tel : 03-5841-3304 E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

国立国際医療研究センター 企画戦略局 広報企画室

Tel : 03-3202-7181 E-mail : press@hosp.ncgm.go.jp