

京都大学	工学博士（都市環境工学）	氏名	池端建吾
論文題目	ゲノム解析を用いた下水中溶血性細菌の分類に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>病原性細菌が有する溶血性毒素は、様々な疾患の増悪に関係している。例えば大腸菌の溶血毒αヘモリシン遺伝子 (<i>hlyA</i>) の有無と、尿路感染症、結腸がん、潰瘍性大腸炎との関係が示唆されている。しかしながら、今後、溶血細菌と様々な疾患の関係を分子疫学的に解明するためには、溶血毒素遺伝子の有無だけではなく、溶血活性に関わる様々な遺伝マーカーを整備する必要がある。また、ヒトが曝露しうる溶血性細菌の網羅的リストの整備も必要である。都市下水中の細菌を調べることは、ヒト腸内細菌調査のサロゲートとして利用できるだけでなく、河川や湖沼などの水環境への排出源の調査としても重要である。本研究では、改良した高感度な血液寒天培地法を用いて、都市下水中の病原性細菌の検出と同定、さらに遺伝的特徴の解析を行った。</p> <p>滋賀県の都市下水から血液寒天プレートによって明瞭な溶血斑を示す 77 株、不明瞭な溶血斑を示す 55 株、コロニー周辺が変色する 5 株を得た。これら全ての菌株について 16S rRNA 遺伝子解析を行い、一部の菌株については全ゲノム解析も行った。その結果、明瞭な溶血斑やコロニー周辺が変色するコロニーを示す株はいずれもグラム陰性菌のグループに属し、その中でも明瞭な溶血斑を示す株、病原性細菌としても知られる <i>Aeromonas</i> 属と大腸菌であることが分かった。不明瞭な溶血斑を示す株は、グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の両方が含まれた。不明瞭な溶血斑を示した株は、敗血症等の稀な感染症の報告のある <i>Streptococcus parasuis</i>、<i>Streptococcus lutetiensis</i>、<i>Leuconostoc lactis</i>、<i>Enterococcus casseliflavus</i> などが同定された。また、これまで溶血活性の報告がなかった <i>Ligilactobacillus salivarius</i>、<i>Lactococcus taiwanensis</i>、<i>Enterococcus lemanii</i> なども同定された。不明瞭な溶血斑を示した株の多くは、溶血毒遺伝子ヘモリシン A (<i>tlyA</i>) の保有が確認された。</p> <p><i>Aeromonas</i> 属は、大きな溶血斑を示す株と、小さな溶血斑を示す株の 2 種類に大別された。これらの違いは 16S rRNA 遺伝子アレルのパターンにより明確に区別することが可能であった。16S rRNA 遺伝子アレルパターンによる株の分類では、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスから得られた数百～数千のリードから、ユニークな配列に分類し、続いてそれぞれのユニーク配列の検出頻度を計算し、そのパターンによって、株の分類を行った。アレルパターンによる単離株の分類により、従来の 1 の 16S rRNA 遺伝子を用いた分類よりも細かく分類することができた。解析の結果、<i>Aeromonas hydrophila</i> の保有するアレル（アレル 01）を多く保有する多型は、全ゲノム解析の結果 <i>Aeromonas hydrophila</i> と同定され、溶血活性が比較的大きかった。一方、<i>Aeromonas caviae</i> 等の保有するアレル（アレル 00）を多く保有し、アレル 01 を保有しない多型は、全ゲノム解析の結果 <i>Aeromonas caviae</i> と同定され、溶血活性は比較的小さかった。<i>Aeromonas hydrophila</i> のもつ病原性遺伝子を解析したところ、<i>Aeromonas caviae</i> が保有しないエロリジン遺伝子 <i>aerA</i> や細胞外ヘモリシン遺伝子 <i>ahh1</i> を保有しており、これら遺伝子が強い溶血活性と関係していることが明らかとなった。</p> <p>溶血毒αヘモリシン遺伝子 (<i>hlyA</i>) を有する大腸菌についても、菌株により大きな溶血斑を示すものと小さな溶血斑を示すものが存在した。これら菌株の全ゲノムシー</p>			

京都大学	工学博士（都市環境工学）	氏名	池端建吾
<p>ケンスの結果をもとに、MLST 解析、FimH 分類、血清型分類、phyloptype、病原性遺伝子の保有、溶血毒 α ヘモリシンとその産生にかかわる遺伝子およびヘモリシン F、ヘモリシン E 遺伝子の多型を解析した。大きな溶血斑を示した株はいずれも phyloptype B2 群に所属しており、ST95、FimH18、H7 血清型のグループ、ST73、H1 血清型のグループ、ST127、06:H31 血清型のグループ等に分類された。ST95、ST73、ST127 は尿路感染症を引き起こす大腸菌グループであり、これらの株が病原性大腸菌であることが示唆された。保有する病原性遺伝子を確認したところ、多くの株で <i>papA</i>、<i>sfaS</i>、<i>pilC</i>、<i>cnf1</i> 等の、尿路感染症等を引き起こす腸管外病原性大腸菌（ExPEC）に特徴的な病原性遺伝子を保有していることが確認された。溶血性大腸菌の遺伝的特徴が明らかとなった。また、<i>hlyA</i> 遺伝子を保有する大腸菌と大腸がんの関係性についても示唆された。<i>hlyA</i> を保有する株はいずれも <i>usp</i> 遺伝子と <i>c1bB</i> 遺伝子を保有していた。<i>usp</i> 遺伝子は遺伝毒性物質コリシン様 <i>usp</i> の産生、<i>c1bB</i> 遺伝子は遺伝毒性物質コリバクチン産生にそれぞれ関与することが知られている。さらに、α ヘモリシンを保有する大腸菌と女性の大腸がんの関係性も報告されている、発がんには、遺伝毒性物質等によるイニシエーション、炎症等によるプロモーションの 2 ステージによって引き起こされることから、<i>usp</i> や <i>c1bB</i> といった遺伝毒性物質の産生にかかわる遺伝子と <i>hlyA</i> 遺伝子が、大腸発がんにかかわっている可能性があり、今後の解析がのぞまれる。溶血毒 α ヘモリシンとその産生にかかわる遺伝子多型の解析のため、アミノ酸置換を引き起こす重要な変異であるミスセンス変異の位置をグラフ上に表示する遺伝子多型解析ソフトウェア Missense Mutation Viewer (MMViewer) を新たに開発した。MMViewer を用いた解析の結果、<i>hlyA</i> 遺伝子の p.Gly281Cys 変異、<i>rfaH</i> 遺伝子の p.Met32Thr、p.Ala17Gly 変異、<i>tolC</i> 遺伝子の p.Ser18Thr、p.Glu221Asp、p.Thr233Ala、p.Thr269Ala、p.Val474Ala、p.Thr478Ala 変異、<i>waaG</i> の p.Lys83Arg 変異等が、溶血活性に影響を与えている可能性として示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

細菌が生産する溶血性毒素は、尿路感染症、結腸がん、潰瘍性大腸炎、肺炎など、様々な疾患の増悪に関連する。本論文では公衆衛生に関わる溶血性細菌種の実態を解明するため、ヒト腸内細菌が集まる都市下水に着目し、溶血性細菌の単離と全ゲノムシーケンスによる種の同定、溶血活性に寄与する遺伝因子の解析を行なった。

本研究の遂行にあたり、申請者は溶血性細菌をより高感度に検出できるよう、培養法の改良を行い、また、ゲノム上の突然変異を視覚的にマッピングするためのソフトウェアも開発した。

下水中溶血性細菌の同定の結果、主要な溶血細菌は大腸菌と *Aeromonas* 属細菌であった。また、その他の溶血性細菌として、敗血症を引き起こすことが報告されている *Streptococcus parasuis*、*Streptococcus lutetiensis*、*Streptococcus lactis*、*Leuconostoc lactis*、*Enterococcus casseliflavus* などが同定された。また、これまで溶血活性の報告がなかった *Ligilactobacillus salivarius*、*Lactococcus taiwanensis*、*Enterococcus lemanii* なども同定した。

Aeromonas 属細菌については、血液寒天培地で大きな溶血斑を示すものと、比較的小さな溶血斑を示すものに分類された。全ゲノムシーケンスの結果、大きな溶血斑を示す菌は *Aeromonas hydrophila* であり、小さな溶血斑を示すものは *Aeromonas caviae* であることを明らかにした。また、*Aeromonas hydrophila* のもつ病原性遺伝子を解析したところ、*Aeromonas caviae* が保有しないエロリジン遺伝子 *aerA* や細胞外ヘモリシン遺伝子 *ahh1* を保有しており、これら遺伝子が強い溶血活性と関係していることを示した。これらの種の区別は通常の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域の解析では難しかったが、この領域のアンプリコンディープシーケンスを行い、マイナーアレルも含めてパターン解析を行うと明瞭に区別できることがわかった。これらの知見は今後、水環境中の *Aeromonas* 属細菌のリスクを評価する上で有用であると思われる。

一方、大腸菌も単離した株によって大きな溶血斑を示すものと小さな溶血斑を示すものが存在した。全ゲノム解析により、MLST 解析、FimH 分類、血清型分類、phyloptype、*hlyCABD* オペロンの遺伝子多型などの解析を行い、これら大腸菌株は全て、phyloptype B2 群に所属しており、ST95、ST73、および ST127 のシーケンスタイプが優勢であった。さらに溶血活性に影響を与えていると推測される遺伝子多型も同定した。

以上の研究成果は、今後溶血細菌と疾患の関係を明らかにしたり、水環境中の重要な溶血細菌を検出するのに有用なバイオマーカーを開発する上で重要な知見を与える。これにより、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

要旨公開可能日： 2022年 4月 1日以降