

次世代シーケンサを用いた*Listeria monocytogenes*の疫学的基礎研究

著者	京井 大輔
学位名	博士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2015
学位授与番号	12614博甲第387号
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00001275/

[論文題目]

次世代シーケンサを用いた *Listeria monocytogenes* の疫学的基礎研究

[要約]

Listeria monocytogenes は、グラム陽性の感染型食中毒細菌である。本菌による食中毒は、特に免疫弱者において重症化しやすく高い致死率を示すことが特徴である。また、本菌の製品への混入は、食品製造業に対してリコールなどに依る多大な損害を与える。本食中毒を防止し、これらの健康的・経済的被害を軽減することは、世界的に食品衛生上の課題となっている。本菌の食中毒の実態を解明する上では、疫学的な調査が大きな役割を有する。なぜなら、本食中毒は、原因となる食品の特定が困難である事や臨床患者からの原因菌株の分離が稀である故に、患者から原因までを直接的に遡って調査することが難しい為である。そこで、本食中毒の実態解明の為に、多くの疫学調査が行われてきた。特に分子生物学的手法を用いた疫学研究は、*L. monocytogenes* の汚染ルートの解明や系統学的分類において有用な知見を齎した。

近年、登場した次世代シーケンサは、分子生物学的手法を利用した疫学研究において、新たなブレイクスルーを齎すと期待されている。本技術は、飛躍的な DNA 配列解読能の向上を齎し、これまでは困難とされてきた細菌のゲノム全体での解析を容易とした。一方で、本技術を利用した研究は発展途上にあり、次世代シーケンサより得られる膨大なデータを、どのように食品微生物分野に活用するかということに関しては試行段階にある。そこで、本研究では、*L. monocytogenes* の疫学研究の 3 つのテーマに対して次世代シーケンサによる全ゲノム解析を適用し、これまで技術的な限界から未解明とされてきた事柄に対して知見を得た。同時に、次世代シーケンサによる全ゲノム解析が明示できる点を示し、食品微生物分野の研究における同技術の利用方法および研究の立案に関して指針を示した。

第 1 章では、ゲノムタイピング法にて極めて類似した結果を示す F2-382 株と NIHS-28 株に対して全ゲノム比較を行った。ゲノムタイピング法は、*L. monocytogenes* の疫学研究において広く利用される株識別法であるが、本手法によって示される株間の関係性に反映されるのは、解析対象となるゲノム上の一大部分の差異のみである。本章では、ゲノ

ムタイピング法が示す株間の関係性の検証を目的として、上記の 2 株を含めた 20 株に対して全ゲノム配列の比較を行った。その結果、ゲノムタイピング法によって明らかとされる株間の関係性は、全ゲノム配列の関係性と概ね一致することが確認された。更に、全ゲノム配列が近似した 4 株について、全ゲノム配列の詳細な比較を行った。その結果、NIHS-28 株と F2-382 株は、外部からの挿入領域および一塩基多型において差異を有し、そのゲノム配列の相同性は、クローン株には及ばないことが明らかとされた。

第 1 章での研究により、次世代シーケンサを用いた解析は、最小の変異である 1 塩基レベルの配列の差異まで明らかとできることが実証された。そこで、第 2 章では、病原性の低下という特徴的な性状を示す株に対して、病原性関連遺伝子の網羅的な解析を行い、その病原性を総合的に明らかとすることを試みた。*L. monocytogenes* には、病原因子である Interanalin A (InlA) が変異し、細胞侵入性が低下した株 (InlA 変異株) が存在することが知られている。本章では、InlA 変異株の病原性関連遺伝子の塩基配列を次世代シーケンサによって網羅的に明らかとし、臨床野生株との比較を行った。その結果、InlA 変異株は、病原性関連遺伝子を全て有しており、また、その塩基配列は InlA 以外には病原性に影響を及ぼすと考えられる変異は発見されなかった。従って、InlA 変異株は、InlA を介した侵入性以外においては、臨床野生株と同等の病原性を有すると考えられた。また、全ての病原性関連遺伝子を有していたことから、InlA 変異株は、本質的には病原性を有するグループに属する株であると考えられた。

第 2 章では、次世代シーケンサを用いた解析を行うことにより、その病原性および疫学的位置付けを総合的に明らかとできることが示された。この結果は、次世代シーケンサによる全ゲノム解析によって細菌の全ての性状が予測できる可能性を示しているが、現状では知見が不足している。特に、ライフサイクルや生理活性に関連する遺伝子では、遺伝子間の相互関係が複雑であり、機能が解明されている遺伝子は限られている。本章では、*L. monocytogenes* の生活様式の一つであり、食品製造環境中で問題となるバイオフィームに注目し、全ゲノム解析によるバイオフィーム形成関連遺伝子の解明を試みた。まず、栄養条件に対するバイオフィーム形成の応答を試験し、グルコースの濃度条件に対するバイオフィーム形成の応答がカテゴライズできることを示した。次に、その応答が異なる菌株に対して全ゲノム比較を行い、応答との相関を示す遺伝子を明らかとした。これらの知見は、*L. monocytogenes* のバイオフィーム形成メカニズムの解明および形成

能の評価法の開発において基礎的な知見となることが期待される。また、本章での研究は、*L. monocytogenes* のバイオフィルム形成能に関して新規の知見を得ると共に、統計的な手法を組み合わせることで、性状に影響する遺伝因子を全ゲノム解析により明らかとできることを実証したものである。

本研究では、1) ゲノムタイピング法の正確性と識別能の限界点、2) InlA 変異株の総合的な病原性と疫学的な位置付け、3) バイオフィルム形成能と遺伝因子の関係性、以上の3つのテーマに関して次世代シーケンサを用いた解析によって技術的な限界から未解明であった *L. monocytogenes* の性状及び病原性と全ゲノム配列の関係性について疫学的な知見を得た。同時に、次世代シーケンサによって明らかとされるゲノム配列の差異の限界を示し、加えて、本技術を用いた全ゲノム解析によって病原性および性状に関連する遺伝子の特定や意味付けが可能であることを実証した。次世代シーケンサは、今後も研究機関および企業への普及が広がると予想されている。その中で本研究は、食品微生物分野における次世代シーケンサの利用法および有用性を実証したものであり、今後の研究において一つの指針を示したものであると言える。