

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03472

研究課題名(和文)セラチアのゲノム多様性と高度多剤耐性株出現プロセスの解明と高病原性系統の同定

研究課題名(英文)Elucidation of the *Serratia* genome diversity and emerging process of highly resistant lineage and identification of highly virulent lineages

研究代表者

林 哲也 (Hayashi, Tetsuya)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10173014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な日和見感染菌であり院内感染や高度多剤耐性株の出現が問題となっているセラチアマルセッセンスとその近縁種(Sma complex)のグローバルな大規模ゲノム解析を行い、14系統の同定し、各系統と既知菌種の間を明らかにした。また、各系統のゲノムサイズやGC含量に違いを明らかにし、その違いが外来遺伝子の獲得によることや系統ごとの外来遺伝子の獲得様式の違いを示した。さらに、臨床及び病院環境由来株が大部分を占める2系統を同定し、これら2系統に耐性遺伝子・変異が顕著に集積していることなどから、これらがSma complexの中の院内環境適応系統であると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セラチアマルセッセンスは代表的な日和見感染菌の一つであり、院内感染や高度多剤耐性株の出現が問題となっているが、その多様性や、臨床株と環境株の違い、近縁菌種と関係などは不明であった。本研究によって、セラチアマルセッセンスとその近縁種(Sma complex)の中の各系統と既知菌種の間が明らかとした点が分類学的には重要であり、臨床及び病院環境由来株が大部分を占める2系統(hospital-adapted lineage)を同定した点が臨床的には重要である。

研究成果の概要(英文)：Serratia marcescens (Sma) causes various opportunistic infections, sometimes hospital outbreaks. The emergence of multidrug-resistant strains further poses serious threats to global public health. Sma is also ubiquitously found in natural environments. In this study, by a large-scale genome analysis of Sma and closely related species (Sma complex), we revealed their phylogenetic relationships and complex global population structure, comprising 14 clades. Several clades exhibited distinct genome sizes and GC contents and a negative correlation of these genomic parameters was observed in each clade, which was associated with the acquisition of mobile genetic elements. In addition, we revealed that clades 1 and 2 mostly comprised clinical or hospital environment isolates and accumulated a wide range of antimicrobial resistance genes and mutations, thus clades 1 and 2 represent hospital-adapted lineages in the Sma complex.

研究分野：細菌学

キーワード：セラチア・マルセッセンス セラチア属 ゲノム解析 系統解析 プラスミド 可動性遺伝因子 薬剤耐性 病原性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Serratia marcescens (以下、セラチア)は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌であり、代表的な日和見感染菌の一つである(注:最近になってセラチア属は新設されたエルシニア科に再分類された)。血流感染、尿路感染などを引き起こすが、本菌による院内感染も度々問題となっており、近年ではアミカシンなどのアミノ配糖体、フルオロキノロン、第3世代セフェム、カルバペネム等に耐性を示す高度多剤耐性株が出現し、臨床的に大きな問題となっている。

一方、本菌は土壌などの環境中に広く分布しており、多様な菌株の集団と考えられるが環境株を含めた遺伝的多様性の解析は進んでいない。研究代表者が行った多剤耐性臨床由来株(SM39)と環境株(Db11)の比較ゲノム解析では、2株の配列相同性は95.1%と亜種に近いレベルであり、SM39株の主要な抗菌薬耐性遺伝子(以下、耐性遺伝子)は、プラスミドとその上に存在するインテグロンおよびトランスポゾンに存在した。その後、我々は土壌からの分離株を含む230株のセラチアを収集し、公共データベース(DB)にゲノム情報が登録されている320株を加えて、コア遺伝子を用いた予備的な系統解析を行った結果、少なくとも14の系統が存在することが明らかになってきた。また、耐性遺伝子が高度に集積している系統、臨床株あるいは環境株が集積(エンリッチ)している系統の存在を示唆するデータも得られた。

2. 研究の目的

上記のように、セラチアは代表的な日和見感染菌の一つであり、院内感染や高度多剤耐性株の出現が問題となっている。一方、本菌は環境に広く分布し、多様な菌株の集団と考えられるがその遺伝的多様性の解析は進んでいない。しかし、我々の予備的解析から、少なくとも14の系統が存在することや、耐性遺伝子高度集積系統、臨床株あるいは環境株集積系統の存在が示唆された。そこで、本研究では収集済みの菌株とデータベースから取得する海外株のゲノム情報を活用し、以下の課題解明を目指した。

課題1)存在が示唆される14系統間の遺伝的距離と各系統に特異的に存在する遺伝子群の同定。

課題2)プラスミドの多様性と耐性遺伝子集積の実態、集積メカニズム、各種耐性プラスミドの分布と伝播能の解析による高度多剤耐性株出現におけるプラスミドの役割の解明。

課題3)臨床株集積系統と他の系統間での潜在的病原性の違いの解析による高病原性系統とその責任遺伝子の同定。

3. 研究の方法

1. 菌株とゲノム情報の収集:国内及びフランスの臨床株と土壌由来株(225株)を収集してゲノム情報を取得した。また、公共データベース(DB)からも由来などの情報が明らかな海外株のゲノム情報を収集し(644株)、クオリティーチェックをパスした775株のゲノム情報を最終セットとして研究を行った。

2. 遺伝的多様性の解析:Roaryを用いてコア遺伝子を抽出し、改めて高精度系統解析を行うとともに、総当たりの平均ヌクレオチド一致率(ANI)解析を行い、主なcladeの同定とclade間の系統関係とclade内での遺伝的距離(ANIで規定)を解析した。

3. 可動性遺伝子の解析:PlasmidFinderを用いて各株の保有するプラスミドレプリコンの網羅的検索を行うとともに、パンゲノム解析によって同定したintegrase遺伝子をマーカーとしてプロファージとその他のintegrative element(IE)の網羅的検索を行った。一方、イルミナによ

るゲノム配列決定ではプラスミドは断片化されているため、研究室保有株の中から44株を選抜してNanopore MinIONを用いてロングリード配列を取得し、Unicyclerを用いてイルミナ配列とのhybrid assemblyを行い、完全長配列を決定した。これらの株と公共DBから得られた完全長ゲノム配列を対象に、各株の保有するプラスミド、プロファージ/IE、IS elementの網羅的な検索を行いカタログ化することを試みた。

4. 薬剤耐性(AMR)遺伝子とフルオロキノロン(FQ)耐性変異の検索と薬剤感受性試験：外来性AMR遺伝子の網羅的な検索はSRST2を用いたARG-ANNOT_v3データベースの検索により、またFQ耐性変異の検索はGyrA, GyrB, ParC, ParEタンパク質のアミノ酸配列検索により行った。主な抗菌薬に対する感受性を微量液体希釈法で測定した。

4. 病原性関連遺伝子とclade特異的遺伝子の検索：既知の病原性関連遺伝子の分布はBLAST検索により検索し、特定のclade (clades 1, 2) に分布する遺伝子群は、Roaryを用いたパンゲノム解析の結果を基に検索した。遺伝子群を同定し、特定のclade (clades 1, 2) に分布する遺伝子群を検索した。また、同定した遺伝子群の機能は、文献検索、相同性解析、ドメイン予測、代謝パスウェイ解析により解析した。

4. 研究成果

【課題1関連】セラチア属は環境に広く分布し、多様な菌株集団と考えられたため、予備解析で見出された14系統の解析に先立って、セラチア属の各菌種を代表する株（主に標準株）のゲノム配列を用いてコア遺伝子の配列に基づく系統解析と総当たりANI解析を行った。その結果、*S. marcescens*とその近縁菌種（*S. nematodiphila*, *S. ureilytica*, *S. surfactantfaciens*）は明確に区別できない事が明らかになったため、これらを‘*S. marcescens* complex (SMC)’として大規模比較ゲノム解析を行い、SMC内における14系統に系統関係とSMCのグローバルな集団構造を明らかにすることを試みた。最終的に、775株のゲノム情報（225株は本研究で分離とシーケンスを行った株（国内；171株、フランス；54株）、その他は公共DBから取得）を用いて、コアゲノム・パンゲノム解析、コア遺伝子配列に基づく系統解析、総当たりANI解析、ゲノムサイズとGC含量の比較を行ない、以下の知見を得た。なお、本菌株セットは29カ国に由来する菌株で構成され、分離源も臨床由来が68.8%、病院環境由来が6.5%占めた。残りの21.7%の2/3は土壌由来であるが、そのほとんどは本研究でゲノム配列を取得したものであり、本研究によってSMCの土壌由来株のゲノム情報が大幅に充実したと言える（引用文献）。

(1)775株は14 clade に別れ、各 clade 内での総当たり ANI の値は 97%以上である。また、標準株との関係から、Clades 10, 11, 12, 13 は、それぞれ *S. nematodiphila*, 狭義の *S. marcescens* (*S. marcescens sensu stricto*) , *S. ureilytica*, *S. surfactantfaciens* に対応する。

(2)パンゲノム解析から得られた各株の遺伝子レパートリに基づくクラスタリングの結果は、系統関係とよく一致しており、各cladeにそれぞれ特有の遺伝子群が存在する事が示唆される。また、*S. marcescens*の特徴としてよく知られている赤色色素（prodigiosin）産生量に関わる遺伝子群は、clades 10 (*S. nematodiphila*), 11 (*S. marcescens sensu stricto*), 13 (*S. surfactantfaciens*), 11のみが保有する。なお、未発表データではあるが、各系統・亜系統に分布するCRISPR-Cas系の違いと保存性、CRISPRアレイのレパトリサイズの違いも明らかにしている。

(3)各cladeのゲノムサイズとGC含量の特徴を明らかにした。具体的には、clade 2のゲノムは他に比べて有意に大きくまたGC含量も低いこと、clade 11のゲノムは他に比べて有意に小さく、GC含量も大部分のcladeに比べて高いなどであるが、各clade内においても、ゲノムサイズとGC含量が負の相関を示すことが明らかになった。

(4)上記のゲノムサイズとGC含量の関する知見(負の相関)は、外来性遺伝子の獲得と関連する事が考えられたため、PlasmidFinderによるプラスミドレプリコンの網羅的な検索とインテグラーゼ遺伝子をマーカーとするプロファージ(及び他のIE)の網羅的な検索を行った。その結果、35のプラスミドレプリコンと130とインテグラーゼ遺伝子を同定し、その分布の解析から、clade 2が保有するプラスミドとプロファージ/IEは他に比べて有意に多いこと、すなわち、これらの可動性遺伝子の獲得がclade 2が大きなゲノムを保有することに関連していることを明らかにした。さらに、各cladeの解析からは、それぞれのclade内でのゲノムサイズのバリエーションには異なる可動性遺伝子(プラスミドあるいはプロファージ/IE)の獲得が関与していることを明らかにした。

【課題2 関連】外来性 AMR 遺伝子と DNA gyrase/topoisomerase 遺伝子内の FQ 耐性変異の網羅的な解析を行い以下の知見を得た(引用文献)。

(1) 77 の AMR 遺伝子を同定し、これらが clades 1, 2 に顕著に蓄積している(特に clade 2 での蓄積は顕著で、最多の株では 23 遺伝子を保有)。

(2) FQ 耐性変異も clades 1, 2 に顕著に集積しており、clade 1 の 67.4%、clade 2 の 85.5% に *gyrA* 遺伝子変異が存在し、これらの株の中には *gyrB*, *parC*, *parE* の変異を有するもの存在する。

(3) AMR 遺伝子の中でも臨床的に特に問題となる基質拡張型ラクタマーゼ(ESBL)と carbapenemase 遺伝子については、さらに詳細な解析を行ない、その結果、5 種類の ESBL 遺伝子と 7 種類の carbapenemase 遺伝子と同定し、これらが clades 1, 2 に集積しており、その中には両者を保有する菌株も多数存在すること、しかし、clades 1, 2 では主要な遺伝子の種類や組み合わせが異なる事を明らかにした。

(4) ドRAFTゲノム情報からは AMR 遺伝子の耐性獲得におけるプラスミドの役割とプラスミドへの耐性遺伝子の集積機構の解析が困難であるため、その解明に向けて、ロングリードシーケンスを併用して 41 株の完全長ゲノムを新たに決定し、公共 DB から得られる 36 株の完全長ゲノムを合わせた 77 株について、各株が保有するプラスミドのゲノム情報を取得し、カタログ化した(plasmidome 解析)(未発表データ)。その解析から、PlasmidFinder による検索の精度は高くないこと(約 60%の検出率)であることや各プラスミドの AMR 遺伝子の詳細などが明らかになっているが、接合実験等の実施に向けて、接合伝達関連遺伝子群のより詳細な解析とその結果に基づくグループ化の作業を現在進めている。また、プロファージと他の integrative element、IS 配列についても、完全長ゲノムを対象として同様な解析を行っており、公共 DB から得た 36 株の解析がまだ途中であるが、既に多数の新規 IS 配列を同定できている。

(5) 研究室保有株については、主な抗菌薬に対する耐性を微量液体希釈法で測定した。その結果とゲノム情報から推測される抗菌薬に対する耐性と比較した結果、SMC 株においては、抗菌薬の種類によって予測精度が異なることが明らかになり、予測精度の低いものについては薬剤排泄ポンプの寄与や未知の耐性機構の存在についても考慮する必要があることが示唆された(未発表データ)。

【課題3 関連】各 clade の分離ソースの検討と病原性関連遺伝子レパトリの解析を行い以下の知見を得た(引用文献)。

(1) 分離ソースの検討により、clades 1, 2 の大部分の株が臨床あるいは病院環境由来であり、その頻度は SMC 全体の平均よりも統計的に有意に高いことを明らかにし、これらを SMC の中の

"hospital-adapted lineage"と結論づけた。この2つの clade に AMR 遺伝子と FQ 耐性変異が集積しているという上記の知見も clades 1, 2 が院内環境に適応して長期に存在していることを支持する。

(2) clades 1, 2の潜在的な病原性を調べるために、以前の2株 (clade 1に属するSM39とclade 9に属するDb11) の解析で同定した潜在的な病原性関連遺伝子の分布を解析した結果、ヘモリジンあるいはcontact-dependent inhibition (CDI)に関連するタンパク質とその分泌に関連するタンパク質をコードするオペロンと2つの線毛オペロンがclades 1, 2にある程度偏った分布を示した。さらに、clades 1, 2に共通で他のcladeには稀な遺伝子を検索した結果、287遺伝子を同定した。このセットには、上記に3オペロンの遺伝子のほか、代謝系など様々な遺伝子が含まれた。しかし残念ながら、現時点では、これらがclades 1, 2の病院環境への適応に関与しているのか否かは明らかではない。また、この解析からはclades 1, 2の病原性についての結論萌えあえることはできなかった。これらの点を明らかにするために、今回の研究では実施できなかった病原性への関与が示唆されている形質 (溶血、細胞毒性、プロテアーゼ活性など) の解析と定量化、またモデル感染系を用いた比較感染実験を今後行いたいと考えている。

引用文献

Ono T, Taniguchi I, Nakamura K, Nagano DS, Nishida R, Gotoh Y, Ogura Y, Sato MP, Iguchi A, Murase K, Yoshimura D, Itoh T, Shima A, Dubois D, Oswald E, Shiose A, Gotoh N, Hayashi T. Global population structure of the *Serratia marcescens* complex and identification of hospital-adapted lineages in the complex. *Microb Genom.* 2022 8(3). doi: 10.1099/mgen.0.000793.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ono T, Taniguchi I, Nakamura K, Nagano DS, Nishida R, Gotoh Y, Ogura Y, Sato MP, Iguchi A, Murase K, Yoshimura D, Itoh T, Shima A, Dubois D, Oswald E, Shiose A, Gotoh N, Hayashi T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Global population structure of the <i>Serratia marcescens</i> complex and identification of hospital-adapted lineages in the complex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microb Genom	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mgen.0.000793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 ゲノム解析を基盤とした細菌の遺伝学的多様性に関する研究
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口 愛樹、小野 友行、中村 佳司、Debra Satie Nagano、西田 留梨子、後藤 恭宏、伊藤 武彦、後藤 直正、林 哲也
2. 発表標題 <i>Serratia marcescens</i> とその近縁種のグローバルな集団構造と病院環境に適応した系統の同定
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 次世代シーケンサ（NGS）の活用によって進展する細菌ゲノムの進化・多様性解析
3. 学会等名 第41回阿蘇シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 大規模ゲノム解析から紐解く細菌の多様性
3. 学会等名 2021年度日本生化学会九州支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ナガノデボラサチエ、小野友行、後藤恭宏、中村佳司、谷口愛樹、林哲也
2. 発表標題 Evaluation of genotype-based antimicrobial resistance prediction in <i>Serratia marcescens</i>
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 次世代シーケンサの活用によって広がる細菌のゲノム研究
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ナガノデボラサチエ、小野友行、後藤恭宏、中村佳司、谷口愛樹、林哲也
2. 発表標題 セラチアにおける遺伝子情報（genotype）に基づいた薬剤耐性予測についての検討
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野友行、中村佳司、佐藤光彦、後藤恭宏、西田留梨子、井口純、後藤直正、伊藤武彦、小椋義俊、塩瀬明、林哲也
2. 発表標題 Serratia marcescens complexの大規模かつ高精度なゲノム比較解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野友行、中村佳司、後藤恭宏、井口純、後藤直正、伊藤武彦、小椋義俊、塩瀬明、林哲也
2. 発表標題 大規模ゲノム比較解析によるSerratia marcescens とその近縁種の多様性の解明
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------