

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 05 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20390124

 研究課題名（和文） 裁定委員会に高度病原体の新分類法を提案するための根拠とする
 遺伝情報の収集

研究課題名（英文） Genome wide SNP collection for reclassification of high risk pathogens

研究代表者

江崎 孝行（EZAKI TAKAYUKI）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90151977

研究成果の概要（和文）：

高度病原体の遺伝子多型情報を全ゲノム配列情報からスクリーニングし、個々の BSL3 の病原体に最も類縁の菌種と比較した。Family レベルで保存されている house keeping gene (HKG) 遺伝子 400 種類のアミノ酸配列から多型の大きい遺伝子配列を 20 個選択し、グラム陽性とグラム陰性の BSL3 病原体の系統分類に有用な遺伝子をそれぞれ 15 種類選択した。

研究成果の概要（英文）：

From genome wide screening of house keeping gene (HKG) of high risk pathogens and the relatives, top 15 HKG were selected to differentiate BSL3 pathogens from the closely related nonpathogens. Diversity of concatenated these 15 HKG of BSL3 and the closely related nonpathogenic species was significantly bigger than the diversity of 16S rRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：細菌、系統分類、ゲノム情報、SNP、多型、種の定義、

1. 研究開始当初の背景

細菌の分類が 16SrRNA の配列を中心に系統的に分類されていた。しかし人病原体では 100 年におけるデータの蓄積から、病原性の

ない類縁菌の存在が知られており、これらの類縁菌の 16SrRNA 配列がほぼ同じであることから、16SrRNA 配列だけでは菌種の分類・同定ができないことも明らかにな

ってきた。

2. 研究の目的

そこで本研究では病原菌を識別する新たな分類指標となる多型遺伝子をゲノムワイドに検索し、種の識別、属の識別に有効な新しい分類指標を作ることを目指した。

これを根拠として高度病原体の分類体系を再構築することを目指した。特にデータが蓄積している腸内細菌科の菌種で *Escherichia*, *Shigella*, 及び *Salmonella* 属の菌種が最もよくデータが蓄積しているため、その中間的位置にくる *Citrobacter* 属の菌種のゲノム解析を通じて、類縁菌種間の SNP を使った種の種類、類縁属間の SNP 情報を使った属の種類に有効な情報の蓄積を目指した。

3. 研究の方法

特定病原体に指定された高度病原体のゲノム配列を決定、及び既存のデータベースから情報を収集し、菌種内の株レベルの多型、菌種間の多型、類縁属との配列の違いを比較した。

4. 研究成果

使用した腸内細菌科の family *Enterobacteriaceae* には 50 属 230 菌種が分類されており、歴史的に最も古くから利用され、最新のゲノム情報も多く蓄積されている *Escherichia* 属、*Salmonella* 属に対して、この両属に近縁である *Citrobacter* 属の菌種に着目し、全ゲノム配列を決定し、種の種類、属の種類に有効な情報を中心にデータを比較した。また、これらの菌種と 16SrRNA による系統が最も遠い *Yersinia* 属を選択し、腸内細菌科としての Family の分類体系の妥当性を検証した。全ゲノム情報から腸内細菌科の菌種が共通に保有している 2000 種類の遺伝子を一次比較の対象に選択し、さらに不安定で株による欠損がある遺伝子、糖類の合成遺伝子等を除外し、最終的に 400 種類の遺伝子を最終比較遺伝子として選択した。これら

の遺伝子にはリボソームタンパク、DNA/RNA の複製・修飾、リボソームでのゲノムの翻訳・タンパク合成に関与する 51 個のリボソームタンパク、及び細胞壁の合成・分裂に関与する遺伝子群から構成されていた。

同じ属内の種の種類 House keeping gene (HKG) から選択した最も多型が大きいトップ 15 種類のタンパク質のアミノ酸配列を比較すると 16SrRNA の腸内細菌科全体での多形は約 6% しかないのに対し、15 種類の HKG を結合した HKG (15HKG) のアミノ酸の多形は約 45% あり、高い識別能力を有していた (図 1)。

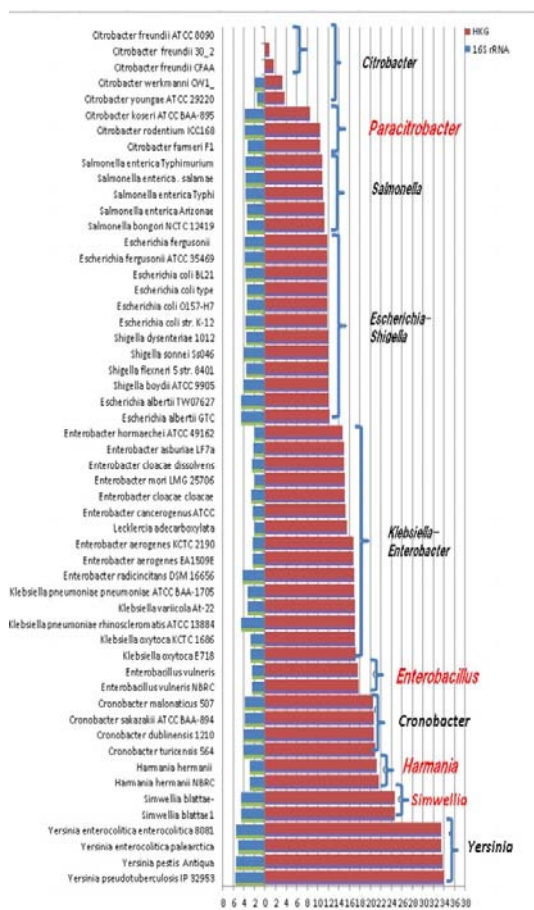


図 1. 16SrRNA 配列と連結下 15 種類の HKG (15HKG) のアミノ酸多型の比較

*C. freundii*と腸内細菌科の他の菌種のSNPの大きさを比較した。左(青)の16SrRNAに多型が最大で6%未満であるのに比べて右(赤)の連結した15HKGのアミノ酸配列の多型の最大値は34%あり、より情報量が多い。

Escherichia, *Citrobacter*, *Salmonella*, 及び *Yersinia* 属の菌種に同様な解析を繰り返した。腸内細菌科の菌種は16S rRNA 配列では1%以内の多型の範囲に類縁菌種が分類されている場合が多いが、15HKG 解析では2%以上の多型があることが判明した。

環境細菌で一般に言われている菌種内の16S rRNA の多型を1.5%として同定する方法では、腸内細菌科の病原性菌種の識別はできないが15HKG で2%以上の多型があれば別種の可能性が高いことが判明した。

これに対し *Escherichia coli* と *Shigella* 属の4菌種では15HKG の多型は0.5%であり *Shigella* は *E. coli* のクローンであるとする従来の知見と一致した。

BSL3 の特定病原体では同様に以下の課題がゲノム解析でも実証された。

1. *Bruceella* 属内のすべての菌種の15HKG 多型0.5%以下で、*Bruceella* 属は一 *B. melitensis* の一つの菌種から構成され Biovar として識別すべきとする提案の妥当性が検証された。

2. *Burkholderia* 属では *B. mallei* と *B. pseudomallei* の16SrRNA は同じで、分類学的には同一種であるが15HKG でも両者の多型は0.2%であった。さらにこれらの種に最も類縁で16SrRNA で区別できない *B. thailandensis* は15HKG で2%以上の多型があり、明確に識別できることが判明した。今後はこれらの知見を根拠として裁定委員会に高度病原体の分類の再構築を提案する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計19件)

- ① Masahiro Hayashi, Sayoko Kubota-Hayashi, Tatsuya Natori, Takuya Mizuno, Machiko Miyata Shigeru Yoshida, Jiwei Zhang, Keiko Kawamoto, Kiyofumi Ohkusu, Souichi Makino, Takayuki Ezaki. 2013. Use of blood-free enrichment broth in the development of a rapid protocol to detect *Campylobacter* in twenty-five grams of chicken meat. *Int. J. Food Microbiol.* 163(1):41-46.
- ② Ezaki T., M. Hayashi, J.Zhang, T. Mizuno, T.Natori, and K. Ohkusu. 2012 Role of Culture Collection in Disasters. *J. Disaster Research.* 7:768-774.
- ③ Masamichi Ogura, Hisako Yano, Mikinori Sato, Atsushi Nakamura, Yukio Wakimoto, Kiyofumi Ohkusu, and Takayuki Ezaki. 2012. Comparative analysis of MRSA strains isolated from cases of mupirocin ointment treatment in which eradication was successful and in which eradication failed. *J Infect Chemother*, DOI 10.1007/s10156-012-0445.
- ④ 江崎孝行. 2012 原核生物の系統分類: 細菌とアーキア(1). *生物の科学遺産*.66:220-226.
- ⑤ Pham Van Hung, Jiwei Zhang, Hayahi M, Yoshida S, Ohkusu K, Ezaki T. 2011. Genetic relatedness and identification of clinical strains of genus *Campylobacter* based on *dnaJ*, 16SrDNA, *groEL*, and *rpoB*

- gene sequences. *Microbiol. Cult. Coll.*;27:1-12.
- ⑥ Kawamura I, Yagi T, Hatakeyama K, Ohkura T, Ohkusu K, Takahashi Y, Kojima S, Hasegawa Y. 2011.Recurrent vascular catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* with different antimicrobial susceptibility profiles. *J. Infect. Chemother.*;17:111-113.
- ⑦ Doi A, Nakajo K, Kamiya T, Ohkusu K. 2011. Splenic abscess caused by *Lactobacillus paracasei*. *J. Infect. Chemother.* 17:122-125.
- ⑧ Nakayama A, Takahashi H, Ohkusu K. Shintani C, Hayakawa S, Ishii J, Watanabe H. 2011 . A case of sepsis and meningitis caused by probable travel-related *Neisseria meningitidis* serogroup B infection: First report of *N. meningitidis* ST-4893 in Japan isolated from a returning traveler from France. *Jpn J. Infect. Dis.*64:61-62.
- ⑨ Nomura M, Shin M, Ohta M, Nukui Y, Ohkusu K. Saito N. 2011. Atypical Osteomyelitis of the Skull Base and Craniovertebral Junction Caused by *Actinomyces* Infection. *Neurol Med Chir.* 51:64-66.
- ⑩ Zhang J, van Hung P, Hayashi M, Yoshida S, Ohkusu K. Ezaki T. 2011. *DnaJ* sequences of *Bacillus cereus* strains isolated from outbreaks of hospital infection are highly similar to *Bacillus anthracis*. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*;70(3):307-315.
- ⑪ Yamada Y, Ohkusu K. Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T. Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe 2011.A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 70(3):395-398.
- ⑫ Saito H, Iwamoto T, Ohkusu K. Otsuka Y, Akiyama Y, Sato S, Taguchi O, Sueyasu Y, Kawabe Y, Fujimoto H, Ezaki T. Butler R. 2011.: *Mycobacterium shinjukuense* sp. nov.; a slowly growing, nonchromogenic species isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:1927-1932
- ⑬ Funato M, Kaneko H, Ohkusu K. Sasai H, Kubota K, Ohnishi H, Kato Z, Hukao T, Kondo N. 2011.Refractory Chronic Pleurisy Caused by *Helicobacter equorum*-like bacterium in a Patient with X-linked Agammaglobulinemia. *J. Clin. Microbiol.*49:3432-3435.
- ⑭ Kaneko T, Murotani M, Ohkusu K. Sugita T, Makimura K. 2011. Genetic and biological features of catheter-associated *Malassezia furfur* from hospitalized adults. *Med. Mycol.* ;50:75-80.
- ⑮ Mochizuki K, Suemori S, Udo K, Komori S, Ohkusu K. Yamada N, Ogura S. 2011. Intraocular Penetration of Micafungin in Patient with *Candida albicans* Endophthalmitis. *J. Ocul. Pharmacol. Thera.* 27:531-533.
- ⑯ Takei Y, Yokoyama K, Katano H, Tsukiji M, Ezaki T. 2010. Molecular epidemiological analysis of methicillin-resistant staphylococci in a neonatal intensive care unit. *Biocontrol Sci.* 15:129-138
- ⑰ 江崎孝行. 2009. 感染症法下での高度病原体の分譲活動と輸送方法の課題,

Microbiol.Cult.Col 26 卷 : 127-129

- ⑮ Ohtsuki,R., K. Kawamoto, Y. Kato, M.M. Sha, T. Ezaki, and S-I. Makino 2008. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. J. Appl. Microbiol. 1-9.
- ⑯ Ohno T, Kishimoto W, Chihara D, Sakamoto T, Miyamoto K, Takeoka T, Tsuji M, Kida K, Ohkusu K, Ezaki T. 2008. First case report of sepsis caused by *Mycobacterium wolinskyi* in chronic myelogenous leukemia. Diag. Microbiol. Infect.Dise , 62(4): 433-436.
- ⑰ Yamamoto Y, Shiohita K, Takazono T, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Tashiro T, Otsuka Y, Ohkusu K, Kohno S:2008. An autopsy case of *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis. Inter Med 47:1437-1440.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Takayuki Ezaki, M.Hayashi, T. Mizuno, S. Yoshida, T. Natori, I. Kanazawa, J. Zhang, and K. Ohkusu.2013. DNA chromatography for rapid screening BSL3 pathogens BioDefense Conference Washington DC, USA, Feb. 26-28.
- ② Takayuki Ezaki. 2012. Reconstruction of taxonomy of family *Enterobacteriaceae* after genomr wid analysis of house keeping genes. 第 35 回、日本分子生物学会年会、博多、12 月 11-14.
- ③ 江崎 孝行、2012. MALDI-TOF-MAS を使った GTC 株の病原性因子保有株の品質保証へ向けた取り組み 第 19 回、日本微生物資源学会総会、かずさ、6 月 27-29.
- ④ Ezaki.T. 2011. Survival strategy of *Salmonella enterica* serovar Typhi during human infection. The first harbin

international symposium on Salmonella and other enteric bacteria :genomes and biology, 1st Harbin international Symposium on Salmonella and enteric pathogens. Harbin, China, May 15th , 2011.

- ⑤ Ezaki.T. 2011. Screening of Environmental Human, Animal and Plant Pathogens in Soil and Water. International Conference on Environmental OMICS Guangzhou, Guangdong Province, China November 8 - 12.
- ⑥ Ezaki.T. T. Mizuno, I. Kanazawa, M. Hayashi, S. Yoshida, J.W. Zhang, and K. Ohkusu. 2011. Shall We Spin out Classical Taxonomy of High Risk Pathogens Even after Complete Genome Era IUMS, Symposium, Sapporo September 6 - 10.
- ⑦ Takuya Mizuno, Masahiro Hayashi, Asami Mori, Shigeru Yoshida Sayoko Hayashi, Machiko Miyata, Kiyofumi Ohkusu and Takayuki Ezaki. 2011 A new blood free enrichment broth *Campylobacter*-*Arcobacter* detection from food and stool. Cholera & Other Bacterial Enteric Infections. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Kolkata, India. December 13-16.
- ⑧ Takayuki Ezaki, Takuya Mizuno, Masahiro Hayashi, Asami Mori, Shigeru Yoshida Izumi Kanazawa, and Kiyofumi Ohkusu 2011. Shuffling Classification of genus *Escherichia* and *Shigella* for better Identification of *E. coli* and *Shigella* spp. after complete Genome Aera. Cholera & Other Bacterial Enteric Infections. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Kolkata, India. December 13-16.

- ⑨ Ezaki.T 2010. Influence of different set of variable gene cluster analysis on the phylogenetic definition of bacterial species. 12th International congress on culture collection . Brazil. September 26-30.
- ⑩ Ezaki.T 2010. Rapid genetic screening of live food pathogens with a single enrichment culture and multiplex cocktail amplification method-Next Generation Diagnostics for infectious Diseases ; Speaker) 3rd International Symposium on Bacterial genomics , China. November 29-December3.
- ⑪ Ezaki.T 2010. Shuffling Classification of high Risk pathogens after complete genome sequencing evolution and pathogenesis (Speaker) 14th U.S. Japan Cooperative medical Science program. Malaysia. October4-6.
- ⑫ 江崎孝行. 2010. 遺伝子検査用増菌培地およびカクテルプライマーを組み合わせた食品中の生菌の構築. 第31回日本食品微生物学会総会. 大津. 11月12.
- ⑬ Takavuki Ezaki. 2010 History and future of taxonomists to unzip chromosomal information to define bacterial species ; Speaker) The 30th anniversary symposium of the Japan Society for Microbial Systematics (Symposium) Tokyo. December 9.
- ⑭ 江崎孝行. 2010. 感染症法下での病原体の系統保存・分譲活動と教育. バイオセーフティー学会, 横浜, 平成22年12月6.

〔図書〕(計4件)

- ① 江崎孝行. 2010. バイオセーフティ指針, 病原微生物のバイオセーフティ分類, 東京: 医歯薬出版: 9-21.
- ② Ezaki.T. 2009. *Gallicola*. In Paul De Vos et al. eds, Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 3. 2nd. Ed. p1132-1133, Springer. New York.
- ③ 大楠清文, 野田万希子, 江崎孝行 2008. : 微生物の事典, 腸管感染症 pp471-480, 朝倉書店.
- ④ 大楠清文, 福永肇, 江崎孝行 2008 : 微生物の事典, レジオネラ感染症, Q熱, pp480-484, 朝倉書店.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

1 . Human Pathogenic Bacterial Collection GTC ; 病原微生物情報、菌株、弱毒株、分類情報を提供

<http://gtc.jpn.com/>

2. National Bioresource Project

“pathogenic microbes; 文部科学省が支援する生物基盤整備事業に参加書病原細菌の収集、保存、分譲を実施

<http://pathogenic.lab.nig.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江崎 孝行 (EZAKI TAKAYUKI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 90151977

(2) 研究分担者

大楠 清文 (OHKUSU KIYOFUMI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 40362173