

令和 6 年 6 月 1 7 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18927

研究課題名（和文）全ゲノム情報から新興病原細菌-アルジェンテウス菌の病原性ポテンシャルを評価する

研究課題名（英文）Estimation of the virulence potential of an emerging pathogen, *Staphylococcus argenteus* by Pan-genomic analysis

研究代表者

若林 友騎（Wakabayashi, Yuki）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・研究員

研究者番号：70783835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：我々がこれまでに国内で分離・収集した非臨床検体由来アルジェンテウス菌株の全ゲノム配列を新規に解読し、データベースに登録されている国内外で主に臨床検体由来から分離されたアルジェンテウス菌の全ゲノム配列と比較ゲノム解析を実施した。解析に用いた444株は、大きく8つの遺伝系統に分類されたが、各遺伝系統は臨床検体由来株と非臨床検体由来株が混在していた。また、各遺伝系統株が保有する病原因子遺伝子は、すべての遺伝系統で概ね同じであったことから、本質的にすべてのアルジェンテウス菌は病原性ポテンシャルを有していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのアルジェンテウス菌の研究は、臨床検体由来株に基づく成果がほとんどであった。そのため、非臨床検体由来株も含めたアルジェンテウス菌集団全体の病原性ポテンシャルについては不明であった。本研究では、保有する非臨床検体由来株とすでに他の研究者が報告済みの臨床検体由来株のデータを合わせて解析することで、非臨床検体由来株も含めたアルジェンテウス菌集団全体について評価を行った。本研究成果は、アルジェンテウス菌の病原性発現機構等を理解するうえで重要な基礎データになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We sequenced the genomes of *Staphylococcus argenteus* isolates which we had collected from non-clinical samples in Japan. We also downloaded whole genome sequence data from NCBI database and performed comparative analysis with our sequenced genomes. 444 genomes were divided into almost eight lineages, which composed of both clinical and non-clinical isolates. The repertoire of virulence factor genes were almost identical among all eight lineages, implying that all *S. argenteus* isolates have a potential to cause disease to humans.

研究分野：細菌学

キーワード：Staphylococcus argenteus 全ゲノム配列解析

## 1. 研究開始当初の背景

アルジェンテウス菌 (*Staphylococcus argenteus*) は、2015 年に報告された *Staphylococcus* 属の新種で、敗血症や皮膚軟部組織感染症、リンパ節炎などを引き起こす。2015 年の新種登録以降、各国で臨床検体から本菌が分離されている。国内においても化膿性リンパ節炎や敗血症などの症例から分離が報告されている。また、アルジェンテウス菌による食中毒事例が、国内で 4 例報告されている他、国外でも 2 例報告されており、本菌は臨床微生物学上のみならず、食品衛生学上も重要な病原細菌である。

これまでに文献上で報告されているアルジェンテウス菌のほとんどは患者(臨床検体)由来株である。臨床検体由来株としては、遺伝系統 ST2250 が 7 割以上を占めており、ST2250 は世界的な流行株の 1 つとして認識されている。一方で、我々は食品検体や調理器具、人手指等(非臨床検体)におけるアルジェンテウス菌の分布状況調査を進める中で、分離したアルジェンテウス菌には、ST2250 以外にも多様な遺伝系統株が含まれることを明らかにした。しかし、これらの非臨床検体由来アルジェンテウス株は感染症の原因となりうるのか、また、なぜ非臨床検体からは ST2250 以外の遺伝系統株が検出されるにも関わらず、臨床検体からの分離は ST2250 が多いのかについては明らかにされていない。

微生物の病原性に寄与する因子の同定は、ワクチンや治療法開発の上で重要な情報をもたらすが、本菌の病原因子についてはほとんど解明されていない。これまでに、タイ、デンマーク、中国においてアルジェンテウス菌の大規模比較ゲノム解析が実施されているが、解析株のほとんどが臨床由来菌株であり、その比較対象としての非臨床検体由来株の解析例がないことから、本菌の病原性に寄与する遺伝因子の絞り込みには至っていない。また、日本で分離されたアルジェンテウス菌のゲノム情報については、ほとんど解読されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに国内で分離収集した非臨床検体由来株の全ゲノム配列を新規に解読し、データベースに登録されている臨床検体由来株ゲノム情報と比較ゲノム解析を行うことで、次の 2 点を明らかにすることを目的とする。

(1) 非臨床検体由来株と臨床検体由来株で保有する病原遺伝子等に差異は認められるか。

(2) 臨床検体由来株として報告の多い遺伝系統 ST2250 は、他の遺伝系統と比較して保有する病原因子遺伝子等に差異は認められるか。

本研究を通じて、アルジェンテウス菌の集団全体における病原性ポテンシャルを評価するとともに、臨床検体由来株が有意に保有する遺伝子、あるいは ST2250 が有意に保有する遺伝子の探索から、病原性発揮に寄与する遺伝子の推定を試みる。

## 3. 研究の方法

我々がこれまでに分離・収集したアルジェンテウス菌株 95 株を解析に使用した。これらはすべて日本で分離された菌株である。菌株 DNA は DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) で抽出し、QIAseq FX Library kit (QIAGEN) あるいは Nextera DNA Flex Library Prep (Illumina) を使用してライブラリを調製した。次世代シーケンサー MiSeq、iSeq、HiSeq X Ten (Illumina) を使用して、150 bp のペアエンドシーケンスを行い、fastq ファイルを取得した。

また、データベースからアルジェンテウス菌の全ゲノム配列データをダウンロードして解析に加えた。fastp を用いてトリミングしたリードデータについて、SKESA を使用して *de novo* assemble を行い、CheckM を用いて取得したゲノムの completeness および contamination を評価した。CheckM で completeness > 95%、contamination < 5% と判定された菌株のゲノムデータを最終的に解析に使用した。

パンゲノムの決定には、roary を使用した。また、病原因子遺伝子の同定には blastn を、薬剤耐性遺伝子およびプラスミドレプリコン型の決定には、resfinder および plasmidfinder を使用した。病原因子遺伝子の探索には、Virulence Factor Database を基にして、アルジェンテウス菌の配列に最適化した in-house のデータベースを使用した。

コア遺伝子上の Single Nucleotide Variants (SNV) を SNP-sites を使用して抽出した後、fasttree を使用して系統解析を実施した。系統樹へのメタ情報のアノテーションには iTOL を使用した。

## 4. 研究成果

本研究で新規に解読したアルジェンテウス菌 95 株のゲノムデータに、データベースから取得した 349 株のゲノムデータを加えた、計 444 株のゲノムデータを用いてパンゲノム解析を実施した。コア遺伝子上の SNV に基づく系統解析および Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) によるクラスターリングの結果、444 株は大きく 8 つの BAPS クラスターに分類された。7 株から構成される BAPS5 は、食品由来株および環境由来株のみで構成されており、ヒト

由来株は含まれていなかったものの、それ以外の BAPS は、臨床症状の有無の異なる人由来株、食品由来株および環境由来株あるいは由来不明の菌株が混在していた。また、国内分離株は、8 つのうちの 6 つ系統のいずれかに分類された。

Virulence Factor Database から取得した黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の病原因子として知られる遺伝子群について、各遺伝系統株における保有状況を blastn で探索したところ、菌体外分泌酵素や外毒素、免疫逃避、細胞接着、鉄獲得に関与する遺伝子のほとんどすべてが ST2250 を含む BAPS1~8 のすべての遺伝系統間で保存されていた。このことは、アルジェンテウス菌のすべての遺伝系統株は本質的に病原性を有する可能性を示唆している。食中毒発症に関与するエンテロトキシン遺伝子については、*selx* はすべての遺伝系統間で共通に保存されていたものの、*seg*、*sei*、*sem*、*sen*、*seo*、*selu*、*selw*、*sey*、*selz*、*sel26*、*sel27* は各遺伝系統内で良く保存されていた。一方、*seb*、*sec*、*sel*、*sek*、*seq* は、アクセサリー遺伝子として各菌株固有に検出されたが、菌株由来との関連性は認められなかった。*seb*、*sec*、*sel*、*sek*、*seq* は、pathogenicity island 上にコードされていることが知られていることから、pathogenicity island の保有状況が菌株ごとに異なると考えられた。薬剤耐性遺伝子については、遺伝系統との関連性は低かった。各菌株で検出されたプラスミドレプリコン型と薬剤耐性遺伝子を比較すると、*blaZ*、*tet(L)* 等の保有状況とプラスミドレプリコンの検出状況には関連があることが示唆された。また、国内で分離されたアルジェンテウス菌株は、*blaZ* 等の薬剤耐性遺伝子保有率が国外株と比較して低かった。これらの結果から、薬剤耐性遺伝子については、各遺伝系統の祖先株が各国に侵入した後に、プラスミド等の水平伝播によって獲得されたと考えられた。

本研究の結果、臨床検体由来株と非臨床検体由来株で保有する病原因子遺伝子に違いは認められなかった。また、検出された病原因子遺伝子は、ST2250 を含むすべての遺伝系統で概ね保存されていたことから、本質的にすべてのアルジェンテウス菌は感染症の起因菌になりうると考えられた。一方で、これらの病原因子遺伝子の遺伝系統ごとの発現量については不明であるため、本菌の病原性を評価するためには、今後、RNA-seq 等の遺伝子発現レベルでの解析が必要であると考えられた。食中毒発症に関与するエンテロトキシン遺伝子、特に *seb* や *sec* の保有状況は、遺伝系統ごと、あるいは菌株ごとに差が認められたことから、食中毒の発症には特定のアルジェンテウス菌株が関与していると考えられた。

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 0件）

1 . 著者名 Wakabayashi Yuki、Takemoto Kohei、Iwasaki Satomi、Yajima Tomoya、Kido Akiko、Yamauchi Akiko、Kuroiwa Kyoko、Kumai Yuko、Yoshihara Shizue、Tokumoto Hayato、Kawatsu Kentaro、Yasugi Mayo、Miyake Masami	4 . 巻 363
2 . 論文標題 Isolation and characterization of Staphylococcus argenteus strains from retail foods and slaughterhouses in Japan	5 . 発行年 2022年
3 . 雑誌名 International Journal of Food Microbiology	6 . 最初と最後の頁 109503 ~ 109503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 若林友騎
2 . 発表標題 Staphylococcus argenteus国内分離株のパンゲノム解析
3 . 学会等名 第17回細菌学若手コロッセウム
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 若林友騎
2 . 発表標題 日本のStaphylococcus argenteus分離株の性状解析
3 . 学会等名 第16回細菌学若手コロッセウム
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 若林友騎
2 . 発表標題 新興食中毒起因菌Staphylococcus argenteusの分子疫学
3 . 学会等名 第96回日本細菌学会総会（招待講演）
4 . 発表年 2023年

1. 発表者名 若林友騎、山本知佳、岡朋宏、上野純代、小竹幸子、久米田裕子、川津健太郎、三宅眞実
2. 発表標題 食品及び調理環境におけるStaphylococcus argenteusの分布状況と分離菌株の性状
3. 学会等名 第42回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若林友騎、吉原静恵、徳本勇人、川津健太郎、三宅眞実
2. 発表標題 Staphylococcus argenteusの国内の分布実態調査と分離菌株の性状解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------