

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580443

研究課題名(和文) 広宿主域を持つ新たな結核菌群菌の遺伝学的解析

研究課題名(英文) Genetic analysis of a new *Mycobacterium tuberculosis* complex species possessing a wide host range

研究代表者

中島 千絵 (Nakajima, Chie)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授

研究者番号：60435964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：広い宿主域を持つと考えられる新たな結核菌群菌 *Mycobacterium orygis* を、バングラデシュ及びネパールの複数の動物種の肺結核病変から分離した。その遺伝学的解析により、この飛沫感染を起こすと考えられる結核菌群菌が、これらの国々の野生動物の間で保持されている可能性が示唆された。また、ネパールにおいてゾウから分離されたヒト型結核菌の遺伝子解析を行ったところ、トランスポゾン活性化によると考えられるゲノムの小規模な構造変化が観察された。これらの異種動物感染例から得られた菌株の遺伝学的解析により、結核菌群菌の宿主指向性に関与するゲノム上の領域が同定できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A new *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) species named *Mycobacterium orygis*, which seems to possess a wide host range, was isolated from lung TB regions in several animal species in Bangladesh and Nepal. Molecular characterizations of those isolates suggested the wide prevalence of *M. orygis* among wild animals in those areas. In Nepal, several *M. tuberculosis* isolates were obtained from captive elephants and some small structural changes by activated transposons were observed in their genomes. Analyses of those affected regions on the genomes together with comparative genomic analyses of *M. orygis* derived from different host species will provide us insights into the genetic regions associating with host range determination in MTC.

研究分野：人獣共通感染症学

キーワード：結核菌群菌 *Mycobacterium orygis* 人獣共通感染症 バングラデシュ ネパール

1. 研究開始当初の背景

結核菌群菌 (*Mycobacterium tuberculosis* complex) は、ごく短い歴史 (数万年以内) の中で共通の祖先より派生したと考えられる結核菌に近縁の一群の菌種から成り、互いの遺伝子配列は非常に良く一致している。最近の遺伝学的解析により、ヒト型の結核菌の一部が動物への指向性を獲得し、その枝から現在報告されている全ての動物指向性の菌種が順に発生したことが示唆された。全ての菌種において人への感染性が報告されているが、*M. africanum* 以外では各々最初に報告された哺乳類への指向性が最も強いと考えられており、1つの菌種が各宿主に適応しながら分散・進化して行く様子が観察できる興味深い例であると考えられる。

我々は2006年から2010年にかけて、バングラデシュにおいて動物園で飼育されていた2頭のアカゲサルおよび屠場のウシ18頭から結核菌群菌を分離することに成功した。これらの株はいずれも遺伝子型別の結果が既存の結核菌群菌の特徴に一致せず、かつオリックスおよび人から分離され、“*oryx bacillus*”として報告されていた株に近似していることが示された。報告例はいずれも肺結核からの分離であり、ヒト結核同様、菌飛沫の吸入により感染が起こればと考えられる。すなわち、バングラデシュではヒト、ウシ、レイヨウ、サルと広い宿主域を持ち、呼吸器感染を起こす新たな結核菌群菌が、とりわけウシの間で蔓延している可能性があることが示唆された。

この *oryx bacillus* は結核菌群菌の系統樹の上で、ちょうどヒトへの指向性が強い株 (*M. tuberculosis* 及び *M. africanum*) から動物への指向性が強い株が分岐する箇所に位置している。そこで、これらの株の全ゲノムを解読し、既に報告されているヒト型の結核菌 (*M. tuberculosis*)、ウシ型の結核菌 (*M. bovis*) の全ゲノムと比較することにより、この菌の宿主指向性に関与していると考えられる遺伝子を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

当初は上記研究の背景に述べたとおり、*oryx bacillus* は新種としての位置づけも無かったため、全ゲノム配列を決定し、その情報を既に行われている *M. tuberculosis* と *M. bovis* の全ゲノム比較に追加して比較することによって、ヒトへの感染性に重要であると考えられる遺伝子を明らかにすることを目的としていた。ところが、研究開始直後にオランダの研究者らによる *oryx bacillus* の新種 *Mycobacterium orygis* としての提案 (van Ingen J et al., 2012) がなされ、翌年にはイギリスの研究者らによって提案された新種 *M. orygis* のゲノム配列が発表された (APKD00000000)。これと並行して、ネパールの共同研究者よりネパールの野生動物より分離された結核菌群菌のサンプルが分

与され、その解析結果より一部が *M. orygis* であることが判明したため、若干の方向転換を図り、それらの解析も進めることとした。また、ヒト型結核菌のゾウからの分離株も得られたため、宿主指向性の異なる菌種間のみならず、同一の菌種内において他の動物種へ感染した菌株の遺伝子を解析することによってゲノム上にどのような変化が起こっているかを観察し、結核菌群菌の宿主指向性に関与する因子を追及することとした。

<引用文献>

van Ingen J et al., Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis.*, 2012 Apr; 18(4):653-5

3. 研究の方法

(1) サンプル調製

ネパールの捕獲野生動物 (シカ及びレイヨウの一種である blue bull) 及び飼育ゾウ5頭の肺結核病変より分離された結核菌群菌より、煮沸・凍結法によってゲノム DNA を抽出した。(研究協力者: Bhagwan Maharjan, Jeewan Thapa, Sarad Paudel, Toshio Tsubota) また、バングラデシュでアカゲサル及びウシより分離、同定した *M. orygis* 株から同様に抽出した DNA サンプルを用いた。(研究協力者: Zeaur Rahim)

(2) 菌種同定及び型別

菌種の同定は、RD (ゲノム上欠損部位) 解析、SNP (点変異) 解析及びスポリゴタイピング (結核菌群菌で広く使用されている CRISPR 領域による型別法) により行った。また、MIRU-VNTR (反復配列多型) 及び FLiP 法 (トランスポゾン挿入箇所多型) を用いた追加解析も行った。

(3) 全ゲノム解析

バングラデシュのウシから得られた2サンプルを用い、MiSeq (Illumina Inc.) にて300bp ペアエンドシーケンスにより、十分なカバレッジによる全ゲノム配列を得た。また、これらの配列をデータベース上に登録されている人由来 *M. orygis* 株の配列や、他の結核菌群菌株と比較し、解析した。(研究協力者: Arnab Pain, Hazem Sharaf)

4. 研究成果

(1) バングラデシュ動物由来株の型別

首都ダッカ市内の動物園で斃死したアカゲサル2頭および酪農家のウシ18頭の肺結核病変から分離された菌株を用いて MIRU-VNTR による疫学解析を行ったところ、ほとんどの個体が同じ株に感染していたことが示された。2頭のサルを含む計17頭の個体由来株では、解析可能であった VNTR24 カ所のローカス全てが一致しており、1頭の牛では1カ所のみ異なっていた。残る2頭の牛株では4カ所が異なり、この2頭のパターンは一致していた。また、いずれも肺病変から菌

が分離されており、この地域では飛沫感染を起こす新種の結核菌群菌 *M. orygis* が少なくとも 2 株、動物の種の壁を越えて蔓延している可能性が示唆された。

(2) ネパール野生動物由来 *M. orygis* 株の解析

当該飼育施設ではネパール国内の野生のシカやレイヨウを捕獲して長年に亘り飼育していたが、斃死個体にしばしば結核病変が観察されていた。今回、シカ及びレイヨウ (blue bull) 各 1 頭の肺病変から分離された結核様菌の遺伝子解析を行ったところ、欠損領域や点変異、スポリゴタイプの特徴より、いずれも *M. orygis* であることが判明した。MIRU-VNTR 型別結果は van Ingen らの報告 (2012) 中に示されていた複数の国から分離された株から成る最大クラスターの型に一致していた。分離地域も分離年も異なる株間での VNTR 型の一致は、この株がごく短期間で何らかの (恐らくは人為的な) 理由により広域に拡散したことを示唆していると考えられるが、この菌における VNTR 型の安定性の高さを暗示している可能性もある。いずれにせよ、これらのシカやレイヨウが全てネパールの野外から導入されたことを考えると、ネパールの野生動物の間でこの VNTR 型の *M. orygis* が保持されている可能性は高い。

上述のバングラデシュでは同一地域内で 2 種の異なる VNTR 型 (いずれも上記の最大クラスターと異なる) が観察されたため、*M. orygis* の侵入時期はバングラデシュにおいてより古かったと考えられる。以上より、人の感染例も含めた他の報告の多くが北部インドを主とした南アジアであることや、同一地域内における株の多様性、種の壁を越えた伝播例の多さ等を考え併せると、この広い宿主域を示す結核菌群菌 *M. orygis* の主な分布域はこれらの国々を含む南アジアであろう。これらの地域におけるモニタリングの継続が重要であると考えられる。

(3) ネパール飼育ゾウ由来ヒト型結核菌株の解析

ゾウから分離された 5 サンプルは、解析の結果いずれもヒト型の結核菌であった。うち、2 サンプルは異なった 2 系統の結核菌株の混在 (混合感染) であることが判明したため、菌株数としては 7 株となる。このうちの 5 株はスポリゴタイプや点変異解析によりインド・オセアニア系統に属する EAI5 と呼ばれるグループに属していた。更にそのうち 3 株は *gyrA* 遺伝子上に過去に報告の無い特異的な点変異を持っており、我々がこの地域で別に行っている人結核疫学調査データ中の蔓延株の一部に同じ変異が観察されたため、感染源が地元の間人であったこと示された。*M. orygis* においては文献的にもスポリゴタイプが非常に安定しており、異なる地域や動物種から得られた株もほぼ全て同一の型を示していたが、ゾウから得られた 5 株の EAI5 は

スポリゴタイプを決める CRISPR 領域の詳細な解析により、全て異なるパターンを示すことが判明した。取り分け、IS6110 (トランスポゾン) の挿入による構造変異が激しく、相同組み換えによるこの領域の 2 段階に亘る欠損が観察された。

通常、インド・オセアニア系統に属する結核菌はゲノム内 IS6110 の保持数が少なく、FLiP 解析でも同じ EAI5 に属するネパールヒト由来株ではゲノム内 1 カ所の挿入が確認されるのみの株がほとんどであったのに対し、ゾウ由来のスポリゴタイプ領域が激しく構造変異を受けていた株では、複数の IS6110 が確認された。トランスポゾンの挿入によるゲノム構造の変化は、他株との遺伝子のやり取りを行わない結核菌では、進化スピードを加速する大きな原動力となっていることが知られている。今回の例のように、本来の宿主ではない動物種に事後的に感染した場合、トランスポゾンが活性化してゲノムの小規模な構造変化が加速され、進化のスピードが上がることは菌が生存を模索する上で理にかなっている。これらの株のゲノム上で IS6110 その他の因子により改変が起きている箇所を網羅的に比較解析すれば、結核菌群菌の宿主適応性に関与する因子を特定して行くことが可能であると考えられる。

(4) ウシ由来 *M. orygis* 株の全ゲノム解析

バングラデシュのウシ由来分離株を用いて次世代シーケンサー-MiSeq による全ゲノム配列解読を行い、報告されている結核菌の基準株 (H37Rv) と比べたところ、ゲノム構造の一部に小規模な組換えや転移が起きていることが判明した。また、データベース上のヒト結核病変から分離された *M. orygis* のゲノム配列と比較すると、マッピング不能な変異箇所のは半分は菌体表面抗原である PE-PGRS をコードしていた。その他、他の結核菌群菌株の登録配列との比較も行っているが、ソフトウェアの誤判定等の確認が必要であるため、現在作業継続中である。発見された組換えや転移が領域内外の遺伝子の発現に与える影響や、点変異の影響、大きな差が観察された PE-PGRS の意義について引き続き解析を行い、上記のトランスポゾン挿入箇所のデータも合わせて、結核菌群菌ゲノム上の宿主指向性に関与している箇所を特定して行く。これらの解析結果をデータベースとしてまとめて公表することにより、結核菌群菌が種の壁を越えて感染するのに必要な因子を探る材料を提供できると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者に下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Paudel S, Mikota SK, Nakajima C, Gairhe KP, Maharjan B, Thapa J, Poudel A, Shimozuru M, Suzuki Y, Tsubota T. Molecular characterization of

Mycobacterium tuberculosis isolates from elephants of Nepal. Tuberculosis (Edinb). 2014, 94:287-292. (査読有, co-first author) doi: 10.1016/j.tube.2013.12.008.

[学会発表](計7件)

Thapa J, Nakajima C, Maharjan B, Poudel A, Suzuki Y. Molecular characterization of *Mycobacterium orygis* isolates from wild animals of Nepal. FEMS 6th Congress of European Microbiologists, 2015/ 6/ 7-11, Maastricht (オランダ)

Thapa J, Nakajima C, Maharjan B, Poudel A, Suzuki Y. Molecular characterization of *Mycobacterium orygis* isolates from wild animals of Nepal. 7th Asia Meeting of Zoo and Wildlife Medicine/Conservation, 2014/ 10/ 13-19, Hanoi (ベトナム)

Thapa J, Nakajima C, Maharjan B, Poudel A, Suzuki Y. Molecular characterization of *Mycobacterium orygis* isolates from wild animals of Nepal. 第81回日本細菌学会北海道支部学術総会、2014/ 8/ 29-30, 札幌医科大学、札幌

Nakajima C, Suzuki Y. Tuberculosis caused by *Mycobacterium orygis* in dairy cattle and captured monkeys in Bangladesh. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology, 2014/3/25, タワーホール船堀、東京

Thapa J, Nakajima C, Poudel A, Maharjan B, Suzuki Y. Molecular Characterization of *Mycobacterium orygis* from a deer in Nepal. The 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology, 2014/3/25, タワーホール船堀、東京

Nakajima C, Suzuki Y. Tuberculosis caused by *Mycobacterium orygis* in dairy cattle and captured monkeys in Bangladesh. 第87回日本細菌学会総会、2014/ 3/ 26-28, タワーホール船堀、東京

Thapa J, Nakajima C, Poudel A, Maharjan B, Suzuki Y. Molecular Characterization of *Mycobacterium orygis* from a deer in Nepal. 第87回日本細菌学会総会、2014/ 3/ 26-28, タワーホール船堀、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 千絵 (NAKAJIMA, Chie)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授

研究者番号：60435964

(2)研究分担者

鈴木 定彦 (SUZUKI, Yasuhiko)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：90206540