

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460556

研究課題名(和文)国内で分離されるセレウス菌の網羅的分類とゲノム解析による病原性関連遺伝子の探索

研究課題名(英文)Genetic analysis and virulence gene search of *Bacillus cereus* group bacteria isolated in Japan

研究代表者

奥谷 晶子 (Okutani, Akiko)

国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官

研究者番号：60392320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：日本国内の土壌からは炭疽菌は分離されず、セレウス菌およびチュリンゲンシス菌と同定した菌株50株を7種類の遺伝子によるMLST解析に供した。MLST解析で臨床分離セレウス菌と近縁であった株と新規のシークエンス・タイプを示した土壌由来11株を選択し全ゲノム配列を解読した。網羅的に抽出した一塩基変異(SNP)による分子系統解析と病原性遺伝子のBLAST検索を行い、保有遺伝子の有無を検証した。その結果、土壌由来の一部は臨床分離セレウス菌と近縁なクラスターに分類された。炭疽菌の毒素遺伝子を完全長で保有するセレウス菌は確認されなかったが、溶血毒素遺伝子hblオペロンの欠失が一部の分離株で確認された。

研究成果の概要(英文)：Total of 50 strains identified as *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolated from the soil in Japan were subjected to MLST analysis using seven kinds of genes. No *B. anthracis* was isolated from the collected soil. According to MLST results, 11 soil-derived isolates that were genetically closely related to clinical isolates of *B. cereus* or showing novel MLST sequence type were selected for the whole genome sequencing. Phylogenetic analysis by comprehensive extracted single nucleotide mutation (SNP) and BLAST search for virulence genes were performed. As a result, part of the soil - derived isolates was classified into clusters closely related to clinically isolated *B. cereus* as same as MLST analysis. No isolates carrying the full length of anthrax toxin gene was identified, but one clinical isolate from patient possess capsule operon. Six clinical and one soil isolates deleted the hemolytic toxin genes, hbl operon.

研究分野：人獣共通感染症

キーワード：セレウス菌 フルゲノム 病原性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

Bacillus cereus group は *Bacillus* 属の 6 菌種から成り、グラム陽性の芽胞形成菌で通常は土壤中に芽胞として存在する。そのうち人に病原性がある菌種は *Bacillus anthracis*(以下炭疽菌)と *Bacillus cereus*(セレウス菌)である。炭疽菌は人獣共通感染症である炭疽の起因菌であり、感染症法では特定病原体に分類され厳重な管理が必要である。セレウス菌の中には嘔吐毒や下痢毒による食中毒や院内感染の起因菌となるものがあり、公衆衛生上の監視が必要な細菌である。近年、アメリカにおいて炭疽に類似した臨床症状を示す患者からセレウス菌が分離され、このセレウス菌が炭疽菌の持つ病原性遺伝子(蛋白毒素遺伝子および莢膜遺伝子)の一部を保有し発現していることが明らかとなった(PNAS, 2004, 101(22)p8449-54.)。現状では、臨床由来と環境由来セレウス菌との遺伝学的な違いや、臨床由来セレウス菌がどの程度炭疽菌と類似の病原性遺伝子を保有しているかの全容は明らかになっていない。これまでの遺伝子解析は各菌株の遺伝子情報の一部(特定の遺伝子解析(MLST)や増幅パターン解析(AFLP))であることから、ゲノム全体を反映し新規の病原性遺伝子を探索するにはフルゲノム遺伝子情報を用いた比較解析が必須であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは、臨床由来セレウス菌あるいは炭疽菌と共通の病原性遺伝子を保有するセレウス菌が国内の土壤からどの程度分離されるかをゲノムレベルで検証するため、平成 23 年度より国内土壤からのセレウス菌の分離と食中毒由来セレウス菌の収集を行ってきた。炭疽菌およびセレウス菌は、土壤に芽胞として存在する *Bacillus* 属菌であり遺伝学的に極めて近縁な *Bacillus cereus* group 菌種群に属する。炭疽菌は人獣共通感染症である炭疽の起因菌であり、セレウス菌は食中毒や敗血症の起因菌となる。近年、炭疽の臨床症状に類似した疾病患者からセレウス菌が分離され、炭疽菌の病原性遺伝子の一部を保有するセレウス菌があることが示された。日本国内の土壤より分離されるセレウス菌の全ゲノム配列解読による分子系統解析を行うとともに、炭疽菌およびセレウス菌の病原性遺伝子・新規の病原性遺伝子を保有しているかを検証する。また、国内分離セレウス菌および炭疽菌株ライブラリと全ゲノムデータベースの構築が本研究の目的である。

3. 研究の方法

1. 土壤からのより効率の良い *Bacillus cereus* group 菌種群の分離方法の確立
現在市販されているセレウス菌選択

培地の中から最も効率良く分離できる培地として NGKG 寒天培地(日水)と MYP 寒天培地(BD)の比較を行った。

2. 臨床分離株の収集
食中毒由来セレウス菌株は東京都健康安全研究センター(平成 24 年度 3 株)から分与された。また、平成 25 年度には愛知県より院内感染株の分与を受けた。
3. MLST 解析
土壤分離セレウス菌 16 株、チュリンゲンシス菌 34 株を分離地点から選抜した。臨床分離セレウス菌 4 株と食中毒由来 4 株を加えて、合計 7 種類の遺伝子の塩基配列解読を行い、MLST 解析に供した。各遺伝子の塩基配列を基にアリル・タイプとシークエンス・タイプを決定した。また最尤法による系統樹を作成し、日本国内の分離株がどのような遺伝学的位置に分類されるかを検証した。
4. 全ゲノム配列の解読
MLST 解析により異なる遺伝学的位置に分類された土壤由来 11 株を選抜して、臨床由来 4 株、食中毒由来 4 株と共に、次世代シークエンサーを用いて全ゲノムの解読を行った。また、得られた全ゲノム配列を基に、既知の病原性関連遺伝子の有無について BLAST 検索を行った。
5. 国内分離炭疽菌株ゲノムデータベースの構築
過去に日本国内で分離された炭疽菌(動物衛生研究所所有 3 株)について次世代シークエンサーを用いて全ゲノム配列の解読を行い、国内分離の炭疽菌ゲノムデータベースに追加した。

4. 研究成果

1. 土壤からのコロニー分離において市販のセレウス菌選択寒天培地上のコロニー出現率は殆ど差はなかった。17 都府県の 23 箇所から得られた土壤からセレウス菌選択培地でコロニーを分離し、羊血液寒天培地での溶血性の有無により、セレウス菌 79 株、チュリンゲンシス菌 82 株を同定し、菌株データベースとして - 80 冷凍庫に菌株を保管した。炭疽菌はどの地点からも分離されなかった。
2. 臨床分離株の生化学性状は血液寒天培地による溶血性陽性を確認した。また、食中毒由来株の嘔吐毒素陽性は遺伝子の保有を PCR 反応により再確認した。また、嘔吐毒素陽性菌株で確認されるでんぷん分解性については、ゼラチン添加培地上のコロニーの周囲にみられるでんぷん分解陽性をヨウ素溶液を用いて確認した。

3. MLST 解析は 7 遺伝子の PCR 産物から直接塩基配列を解読して各遺伝子のアリル・タイプを決定した。7 つのアリル・タイプにより決定されるシーケンス・タイプはインターネット上で利用可能な MLST データベース (<https://pubmlst.org/bcereus/>) 上で判定した。新規のアリル・タイプおよびシーケンス・タイプもデータベース管理者に依頼して決定した。その結果、日本国内の土壌由来および臨床分離菌株 58 株中、28 株は新規のシーケンス・タイプとなった。各アリルの塩基配列を基に最尤法により系統樹を作成したところ(図 1)、日本土壌由来の株の中には臨床分離株および食中毒由来株と近縁な遺伝学的位置に分類されるものもあることが明らかとなった。

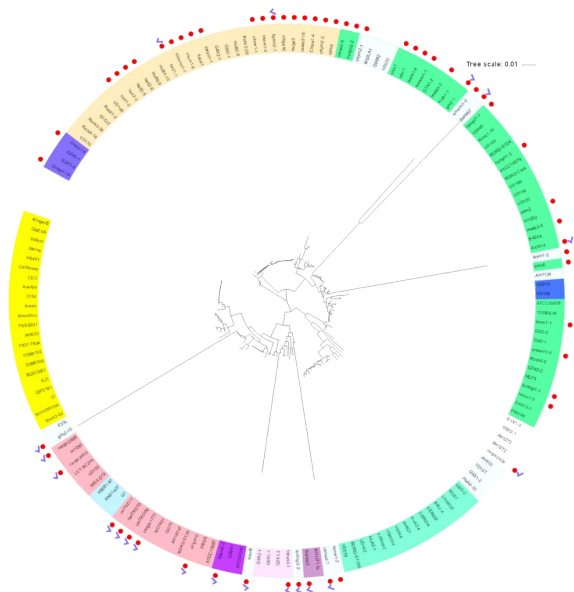


図 1
MLST の 7 遺伝子配列より最尤法で作成した系統樹。
外側の赤い は日本で分離された菌株を、紫色の✓は全ゲノム配列を解読した菌株。色付け部分は各クラスターを表す。

4. 解読した全ゲノム配列データを解析用パイプラインに投入し、865,897 箇所 SNP を得た。これらの SNP を用いて近隣結合法で系統樹を作成したところ(図 2)、日本株は 12 個のクラスターに分類された。これらは、諸外国由来のセレウス菌、炭疽菌とは独立したクラスターであった。

全ゲノム配列から BLAST 検索による病原性遺伝子の有無を検証した結果、表 1 に示すように菌株により保有遺伝子プロファイルに違いがあることが明らかとなった。炭疽菌の病原性遺伝子である毒素遺伝子を完全長で保有する菌株はなかったものの、臨床分離株のうち 1 株では荚膜遺伝子オペロンを保有していることが明らかとなった。臨床分離株 6 株および土壌由来の 1 株でセレウス菌の溶血毒素遺伝子 hbl オペロンを欠失していた。

5. 国内で過去に分離された炭疽菌のうち、動物衛生研究所において長期保管されていた菌株 3 株の全ゲノム配列を解読した。これらは 1928 年、1940 年に分離された株である。上記と同様のパイプラインを用いて網羅的に抽出された SNP による分子系統解析により(図 3)、これら 3 株はエイムズ(Ames)株と近縁であることが明らかとなった。

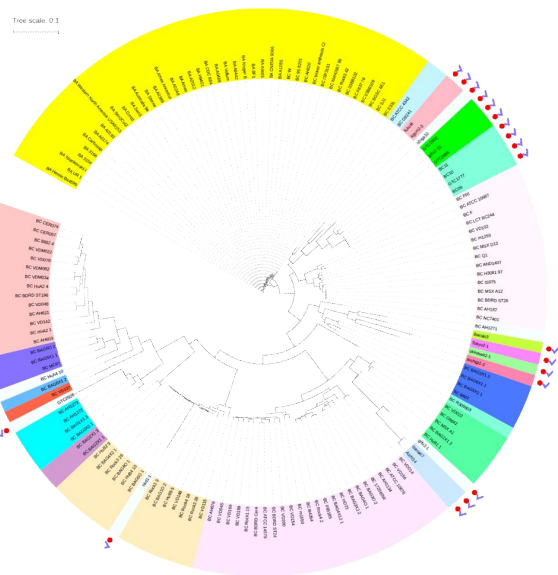


図 2
全ゲノムから抽出された 865,897 箇所 SNP より近隣結合法で作成された系統樹。
全ゲノム配列を解読した日本国内分離株は外側にマークで示した。色付け部分は各クラスターを表す。

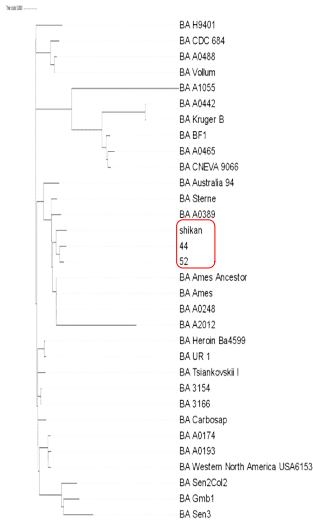


図 3 様々な国から分離された炭疽菌株との比較。

Akiko Okutani, Genetic and biological analysis of *Bacillus cereus* group bacteria isolated from soil in Japan. *BacillusACT*, 2015 年 10 月、インド・デリー

奥谷晶子、「国内土壌から分離されたセレウス菌および過去に分離された炭疽菌の遺伝学的・生物学的解析」第 158 回日本獣医学会、2015 年 9 月、青森県十和田

奥谷晶子、「国内で分離された *Bacillus cereus* group の全ゲノム配列解析」第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 7 日、神奈川県藤沢市

奥谷晶子、「炭疽菌と生物テロ」第 90 回日本細菌学会 シンポジウム、2017 年 3 月 20 日、宮城県仙台市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥谷 晶子 (OKUTANI, Akiko)

国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究者番号：60392320

	pXO1	pXO2	溶血毒素関連遺伝子										エンテロトキシン関連遺伝子				ホスホリパーゼ	嘔吐毒素						
fk18	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	p	+	+	+	+	p	-	-	
kgs2-3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	p	+	+	+	+	p	-	-
shiga10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	p	+	+	+	+	p	-	-
GTC2903	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
gfu2-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
GTC2888	-	+	p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	
BC11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
BC10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
GTC1777	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
BC09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
okmw2-1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	p	+	+	+	+	p	-	-
tcg1-2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	p	+	+	+	+	+	-	-
lbrk3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	p	+	+	+	+	+	-	-
tky2-1	-	-	+	p	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	p	+	+	+	+	+	-	-
gfu2-1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
lbrk7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ach14	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
hkd1-1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
GTC2928	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	p	+	+	+	+	+	-	-

表 1 日本国内分離株 *B. cereus* group 菌種の病原性遺伝子の保有プロファイル

該当遺伝子の 80%以上をカバレッジ (+)、80%未満のカバレッジ(p)、カバレッジが 5 倍以下(-)を表す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Draft genome sequences of *Bacillus anthracis* strains stored for several decades in Japan. Okutani A et al. *Genome announcements*. Jun 18;3(3). (2015).

〔学会発表〕(計 4 件)