

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460686

研究課題名(和文)全ゲノム解析と質量分析による抗酸菌の新たな分類同定法の確立

研究課題名(英文)Development of novel classification of mycobacteria by whole genome analysis and mass spectrometry

研究代表者

松島 早月(Matsushima, Satsuki)

杏林大学・医学部・実験助手

研究者番号：80231596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*M. kyorinense*およびその近縁種について、全ゲノム解析および質量分析装置による解析を行い、非結核性抗酸菌の分類への応用について試みた。これらの菌種では、*rpoB*、*inhA*、*katG*、*ahpC*、*embB*などの薬剤耐性遺伝子を中心として相同性および結核菌との差異が明らかとなったが、系統分類に十分な全ゲノムの解析結果が得られなかった。また、質量分析では、16S rRNA蛋白の相同性により非結核性抗酸菌種間での分類は困難であった。

研究成果の概要(英文)：We performed whole genome analysis and mass spectrometry of *Mycobacterium kyorinense* and its related mycobacterium species. *M. kyorinense* and its related species demonstrated common features in several drug-resistance related genes including *rpoB*, *inhA*, *katG*, *ahpC*, and *embB*, but full genome data were not available in these mycobacteria due to technical issues. We successfully performed mass spectrometry for these species, but they were difficult to distinguish by mass spectrometry, probably due to their high similarity of 16S rRNA between species.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：非結核性抗酸菌 全ゲノム解析 質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌は、近年特に我が国においてこれを原因とする感染症が急速に増加し、医学的にも重大な課題と認識されており、その新規診断法や治療法の開発が急務となっている。しかしながら、非結核性抗酸菌、特に近年報告の増えている希少抗酸菌による感染症は、簡便な診断法が無く、治療にも難渋するケースが多い。その背景要因の一つとして、抗酸菌の分類に関する問題がある。抗酸菌属(genus *Mycobacterium*)は、生物学的に別種とされる菌種間での遺伝子相同性がきわめて高い。そのため、従来の生化学的検査法や、16S rRNA 単独あるいはその他の限られた遺伝子の解析のみでは、その正確な分類が困難であることが知られている。

我々は、2009年に非結核性抗酸菌の新種である *Mycobacterium kyorinense* を発見し報告した<sup>1),2)</sup>。その後、近縁菌等の遺伝子解析を進める過程で、最も近縁の菌である *Mycobacterium celatum* は 型から 型までに細分類されるが、詳細な遺伝子解析により、その 型が実は *M. celatum* ではなく *M. kyorinense* に分類されるべきものであることが明らかとなった。このような非結核性抗酸菌の分類の見直しは、近年の遺伝子解析技術の急速な進歩と細菌ゲノム解析への応用の促進によりさまざまな菌で生じており、非結核性抗酸菌の現在の分類は不完全なもので遺伝子解析の適用による修正が必要であることが判明しつつある。

近年、遺伝子解析技術の大幅な進歩に伴い、ヒトをはじめとする生物の全ゲノムの塩基配列を短時間に決定する手法が開発され、広く応用されている。細菌のゲノムは、サイズがヒトの約 1000 分の 1 と小さく、比較的スベックの小さな次世代シーケンサーでも十分解析可能であるため、結核菌などの代表的な抗酸菌についてはすでに全ゲノムが同定され、データバンクに登録されている。し

かしながら、150 種以上にのぼる非結核性抗酸菌の大部分はいまだそのような全ゲノムの情報は得られていないのが実状である。この一因として、抗酸菌では良質の DNA を得るのが他の菌に比べ困難で、純度の高い DNA を必要とする次世代シーケンサーでの解析が難しい点が挙げられる。

一方、近年微生物の分類同定の有力なツールとして注目されているのが、質量分析装置による蛋白プロファイルの解析である。TOF-MAS に代表される質量分析装置は、抗酸菌を含む様々な菌種の正確かつ迅速な同定にきわめて有用であり、すでに質量分析を臨床検体からの菌種同定の補助として活用している施設も少なくない。しかしながら、抗酸菌の蛋白プロファイルのデータは、他の菌種と比較してまだ不十分であり、今後さらなる充実が望まれている。

## 2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本課題では非結核性抗酸菌の全ゲノム解析および蛋白プロファイル解析により、抗酸菌のより正確な分類法を提示することを目的として研究を行った。なお、次世代シーケンサーには純度の高い DNA サンプルが必要とされるため、非結核性抗酸菌からの良質の DNA 抽出を行うための方法の開発も併せて行った。一方、質量分析においては、未だ抗酸菌の蛋白プロファイルのデータは不十分であり、質量分析を用いた非結核性抗酸菌の同定における最大の阻害要因となっているため、本研究では非結核性抗酸菌の質量分析を行うことで蛋白プロファイルのデータを充実させることを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗酸菌株の収集

国内外の施設から抗酸菌株、特に *M. kyorinense* 関連株について収集した。

### (2) 抗酸菌 DNA の抽出法の検討

全ゲノム解析を行うための次世代シーケンサーに使用する DNA は、通常の PCR 等に使用する DNA に比べ高純度でかつ損傷の少ないものが要求される。抗酸菌は、ミコール酸などの特有の膜構造をもつため、薬剤に対する抵抗性が高く、他の菌に比べ純粋な DNA の抽出が困難であることが知られている。今回の研究では、細胞膜融解薬や、ビーズ等による物理的細胞膜の破壊を行い、各種の DNA 抽出キットも補助的に使用し、DNA の純度および品質を吸光度計や泳動により解析した。各種方法で得られた DNA を対象として次世代シーケンサーにより全ゲノムの塩基配列を決定し、解析に最適な抽出法を見出した。

### (3) 抗酸菌の全ゲノム解析

前項の研究により見出した最適な方法により抽出した高純度の DNA を用いてライブラリー調整を行った。One Touch Duo を用いてビーズ調整を行い。次世代シーケンサー (Ion PGM™) により全ゲノムの塩基配列を決定した。

### (4) 質量分析による蛋白プロファイルの解析

非結核性抗酸菌について、抗酸菌用細胞膜破碎装置 (ヒートビーズシステム HBWK-1) を用いて、蛋白液を抽出した。抽出した蛋白液を用いて、質量分析装置 (MALDI Biotyper) により、蛋白プロファイルの解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 抗酸菌 DNA の抽出法の検討

当初は、通常のダイレクトシーケンスに用いた DNA を使用したが、次世代シーケンサーでの塩基配列決定は困難であった。そこで、過去の共同研究者からの助言をもとにして、Qiagen Genomic-tip 100/G を用い、以下の点を改良することで、次世代シーケンサーに使用し得る純度の DNA を得ることができた。

菌量をできる限り多く使用する。粉末の proteinase K を用いる。エタノール洗浄を十分行う。

### (2) 各種抗酸菌の全ゲノム解析

上記の方法により、*Mycobacterium kyorinense* および *Mycobacterium celatum* type 1 の基準株から高純度の DNA を抽出し、次世代シーケンサー Ion PGM を用いて、2 菌種の全ゲノム配列の決定を行い、特に薬剤耐性関連遺伝子に注目して解析を行った。その結果、この 2 菌種では、結核菌におけるリファンピシン耐性に関与するとされる *rpoB* 遺伝子の Ser531Asp 置換が認められた一方、エタンブトール耐性に関与する *embB* 遺伝子、およびイソニアジド耐性に関与する *inhA*, *katG*, *ahpC* 遺伝子では、結核菌で高頻度に報告されている塩基置換は認められなかった。

### (3) *Mycobacterium kyorinense* の菌株間および近縁種との遺伝学的差異の検討

DNA の質が十分でなく、得られた結果で *M. kyorinense* では 453, *M. celatum* では 1217 の contig に分かれた。そのため、一部の薬剤耐性遺伝子については解析できたものの、系統解析を行うに十分な全ゲノムの完全なデータは得られなかった。特に、*M. celatum* の解析結果については、Genome Announcements 誌に投稿したものの、contig が多いため不完全なデータとされて掲載に至らなかった。その後、*M. celatum* については、さらに純度の高い DNA を得るために、別のキットを使用するなどを試みたが、十分な純度の DNA が得られなかった。また、この DNA の全ゲノム解析を外部委託したが、やはり解析困難という結果であった。

### (4) 質量分析による蛋白プロファイルの解析

*M. kyorinense* について、抗酸菌用細胞膜破碎装置 (ヒートビーズシステム HBWK-1) を用いて、蛋白液を抽出した。抽出した蛋白液を用いて、質量分析装置 (MALDI Biotyper) により、蛋白プロファイルの解析を行ったところ、ピークが表出されず、解析困難であった。これは、菌増殖の後期フェーズでは、16S rRNA

蛋白に変化が生じ、16S rRNA をもとにした質量分析装置による解析では同定が困難になることが考えられた。そこで、なるべき増殖早期フェーズの菌を十分量得ることを試み、そこから蛋白を抽出して質量分析を行ったところ、ピークが得られるようになった。しかしながら、解析結果では抗酸菌属の中での同定がやはり困難であった。その理由として、抗酸菌間においては前述のように 16S rRNA 分子の相同性が高いため、16S rRNA 蛋白の微妙な差異から菌種を正確に同定することが困難であるものと考えられた。

#### <引用文献>

1. Okazaki M, Ohkusu K, Hata H, Ohnishi H\*, Watanabe T, et al: *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel slowly growing *Mycobacterium* sp. related to *Mycobacterium celatum* isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 59:1336-1341, 2009
  2. Ohnishi H, Yonetani S, Matsushima S, Wada H, Takeshita K, Kuramochi D, Caldas PC, Campos CE, da Costa BP, Ramos JP, Mikura S, Narisawa E, Fujita A, Funayama Y, Kobashi Y, Sakakibara Y, Ishiyama Y, Takakura S, Goto H, Watanabe T: *Mycobacterium kyorinense* infection: clinical features and antimicrobial susceptibility. **Emerging Infectious Diseases** 19:508-510, 2013
- 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 3 件)
1. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T: Direct identification of microorganisms from

positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis* 52:37-42, 2016. 査読有。

2. Ohnishi H, Tortoli E, Ramos JP, Kazumi Y, Yonetani S, Matsushima S, Ohtsuka K, Watanabe T: Proposal of reclassification of *Mycobacterium celatum* type 2 as *Mycobacterium kyorinense*. **Annals of Microbiology** 64:1879-1882, 2014. 査読有。
3. Ohtsuka K, Ohnishi H, Nozaki E, Pais Ramos J, Tortoli E, Yonetani S, Matsushima S, Tateishi Y, Matsumoto S, Watanabe T: Whole-genome sequence of *Mycobacterium kyorinense*. **Genome Announcements** 2: e01062, 2014. 査読あり。

#### 〔学会発表〕(計 4 件)

1. Ohnishi H, Ohtsuka K, Kazumi Y, Takii T, Mitarai S, Matsushima S, Yonetani S, Otani S, Yoshiyama T, Kato Y, Hayashi Y, Machiya J, Kida K, Sugihara J, Yamasaki S, Kishino T, Goto H, Watanabe T: *Mycobacterium kyorinense* infection : Clinical, biological and genetic features. The 29<sup>th</sup> World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine, November 15th-18th, 2017, Kyoto International Convention Center (Kyoto, Kyoto).
2. Ohnishi H, Ohtsuka K, Matsushima S, Nozaki E, Yonetani S, Yamasaki S, Kishino T, Watanabe T : Genetic mechanism underlying drug resistance in *Mycobacterium kyorinense* and *Mycobacterium celatum* . The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science , September , 1th-4th , 2016 Kobe International Convention Center (Kobe, Hyogo) .
3. 大西 宏明, 米谷 正太, 大塚 弘毅, 荒木 光二, 松本 壮吉, 立石 善隆, 河合 伸 , 渡邊 卓 : *Mycobacterium*

*kyorinense* および近縁種 *Mycobacterium celatum* の薬剤耐性関連遺伝子の解析 .

第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 , 平成 28 年 10 月 26 日 - 28 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市) .

4. 大西宏明, 大塚弘毅, 松島早月, 野崎江里子, 米山正太, 荒木光二, 高城靖志, 岸野智則, 渡邊卓 : *Mycobacterium kyorinense* の全ゲノム解析 . 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 , 平成 27 年 11 月 19 日 - 22 日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

松島早月 (MATSUSHIMA, Satsuki)

杏林大学医学部・実験助手

研究者番号 : 80231596

### (2) 研究分担者

大塚弘毅 (OHTSUKA, Kouki)

杏林大学医学部・学内講師

研究者番号 : 70439165

大西宏明 (OHNISHI, Hiroaki)

杏林大学医学部・教授

研究者番号 : 80291326

渡邊 卓 (WATANABE, Takashi)

杏林大学医学部・教授

研究者番号 : 00191768

### (3) 連携研究者

なし