

平成 22 年 3 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19780066
 研究課題名（和文） 院内感染に関与する孢子形成細菌の検出および同定法の確立
 研究課題名（英文） Detection and identification of sporulating bacterium that involved in nosocomial infection

研究代表者
 桑名 利津子 (RITSUKO KUWANA)
 摂南大学 薬学部・助教
 研究者番号：50330361

研究成果の概要（和文）：院内感染が生じる病院内では *Bacillus* 属細菌は孢子の状態であると考えられる。病原性を持つ *B. cereus* グループの細菌およびその近縁種は遺伝的に近いが、RAPD-PCR 法により *B. cereus* グループ細菌種を分類することができた。また病原性に関与する遺伝子を対象とした解析により、病原性の報告がない *B. thuringensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephaensis* において、病原性に関与する遺伝子を保持していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

The *Bacilli* is a sporulating bacterium, and it is thought that it is a cell in the state that is the spore in the hospital that causes nosocomial infection. It became possible to classify the species and strains of the *B. cereus* group according to random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR method. *B. thuringensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, and *B. weihenstephaensis* that belonged to the *B. cereus* group to which it were not reported that there were a pathogenicity. It revealed that the genomes of *B. thuringensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, and *B. weihenstephaensis* possess some genes that involved in the pathogenicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：院内感染，細菌，微生物，遺伝子，孢子

1. 研究開始当初の背景

院内感染が起こるとき、その感染経路は単一ではなく日頃の様々な医療行為およびケ

アを通じて感染は拡大する。院内感染の起因菌として *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E. cloi*, *K.pneumoniseae*, *Enterococcus spp.* に次いで

*Bacillus spp.*が原因となっている。これらの細菌は市中、院内感染の起因菌であり、医療上深刻な問題をもたらしている。特に孢子形成細菌は、熱やアルコールに対して耐性を持つことから、医療スタッフが手を消毒するアルコール容器や、高温で洗濯済みのリネン類から汚染が広がった例が多い。院内感染を防ぐには、手指の消毒を徹底化させたり、保菌者による交差汚染の原因を排除するなど、多発防止のための総合的な対策を考えなければならない。

孢子形成細菌は、栄養源の枯渇などの栄養増殖に適さない環境になると、孢子を形成する。孢子は長期休眠能を持ち、栄養源の欠乏だけでなく、熱・放射線・化学薬品・分解酵素などに対し強い抵抗性を持っている。ふたたび栄養増殖に適した環境条件になると、そのシグナルを受け取り、発芽し、栄養増殖を行う。このように孢子の特性から、孢子は防除が困難であり、食品や医薬品の衛生管理を行う上で重要な存在となっている。

科学技術の向上により、今日では多くの生物ゲノムが解読されている。細菌には孢子形成細菌と非孢子形成細菌がありそれらのゲノムについても解析が進んでいる。孢子形成細菌に保存されている遺伝子群から非孢子形成細菌に保存されている遺伝子群および生育に必須な遺伝子群を引くと孢子形成に必要な遺伝子群が明らかになると考えた。

一方で、病院内は、消毒薬・製剤など様々な薬品が使用されている環境であるため、薬剤耐性菌が出現しやすい、または遺伝子変異がかかりやすいという懸念がある。そのため院内感染の起因菌となった菌種は同じ種・属であったとしても、株レベルでは同じではないかもしれない。そこで、どのような菌種が院内感染の起因菌となるかを知るために、細菌種の多様性についての解析も行って生きたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、孢子形成に関与しているタンパク質をコードしている遺伝子をバイオマーカーとして利用して孢子形成細菌の検出および同定法の確立を目的とする。またどのような菌種が院内感染の起因菌となるかを知るために、細菌種の多様性解析を行う方法の確立も併せて目的とした。

3. 研究の方法

孢子形成細菌を検出するために、孢子形成特異的な遺伝子を探索した。次にそれらの遺伝子を利用することにより、孢子形成細菌を検出できるように試みた。また孢子形成細菌には病原性を持つ細菌種がある、病原性に関与する遺伝子についてゲノム情報より比較検討し、病原性遺伝子の検出をセレウスグル

ープに属する細菌およびその近縁種において解析を行った。病原性を持つセレウス菌の孢子形成条件を検討し、孢子形成および孢子の持つ特徴について解析を行った。

4. 研究成果

孢子形成に関与する遺伝子を対象として、PCR法で特異的に増幅させるために、ゲノム情報が明らかになっている細菌で、孢子形成細菌において、孢子形成に関与する遺伝子群をスクリーニングした。孢子形成に関与する遺伝子群については、以前から解析を行っていた枯草菌の遺伝子群を元にして検索を行った。*Bacillus*属細菌のなかで特に保存性の高い遺伝子についてPCR用のプライマーを構築した。ゲノム情報が公開されている孢子形成細菌を比較すると、高度に保存されている遺伝子の相同性は高いが、部分的にゆらぎがある。ある程度のゆらぎを考慮した上で、PCRプライマーがアニーリング出来るように、プライマーの配列、アニーリング温度、エクステンションの時間、サイクル数などの条件検討を行った。構築したプライマーを用いてPCRを行い、増幅したDNA断片のサイズを確認した。*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. lentus*, *B. simplex*などの20種類の菌株を用いて解析を行った。これらの菌株においては孢子形成に関与する遺伝子については、PCR法により遺伝子の増幅が確認することが出来た。

院内感染が起こる病院内では、多種多様の抗生物質、化学薬品や消毒薬が使用されているので、病院内に存在する細菌も抗生物質・その他の薬剤に対して耐性を獲得していると考えられる。また*Bacillus*属などの細菌は孢子形成を行う孢子形成細菌であり、孢子の状態になると消毒薬などに対して耐性を示すので、衛生面において大きな問題となる。特に、病原性を持つ*B. cereus*グループの細菌およびその近縁種は遺伝的に近く、16S rRNA 遺伝子系統解析だけでは分類するのが困難である。しかしながらrandom amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR法により*B. cereus*グループの細菌を分類することが可能になった。また病原性に関与する、cytotoxin K, enterotoxin, hemolysin, non-hemolytic enterotoxin, phospholipase C, sphingomyeline phosphodiesteraseの遺伝子に対して、保存された配列を用いることにより特異的なプライマーを構築した。そのプライマーによるPCRにより、病原性があることが報告されていなかった*B. cereus*グループに属する*B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*において、病原性に関与する遺伝子を保持していることが明らかとなった。

土壌細菌である *Bacillus* 属細菌は孢子形成細菌であり、院内感染が生じる病院内では、孢子形成を行い、孢子になっている状態の細胞であると考えられる。そのため孢子形成細菌の孢子形成機構及び、耐性獲得機構について解析を行った。孢子形成細菌のうち9種類のセレウス菌株を用いて、孢子形成を行うための培養条件を検討した。孢子形成の有無は、位相差顕微鏡観察を行うことで確認した。セレウス菌株における孢子形成は培地や温度などの培養条件により孢子形成率および細胞形態が異なることが明らかとなった。特に培地内のグルコース濃度や培養温度により、セレウス菌株における孢子の耐熱性獲得に影響することがわかった。熱とエタノールに対する耐性の比率が異なっていることから、熱とエタノールに対する耐性獲得機構は異なっていると考えられる。またリゾチームに対する耐性試験を行ったところ、耐熱性を獲得していないセレウス菌株の孢子でも耐性を獲得していた。これらのことは今まで研究が進んでいた枯草菌とは大きく異なる点であり、同じ *Bacillus* 属細菌であっても、孢子の特徴が大きく異なることがわかった。

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 5 件)

1. Imamura D, Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K. Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *J Bacteriol.* 2010, 192, 518-24.
2. Kuwana R Protein modification system in dormant cells *Yakugaku Zasshi.* 2009, 129, 1221-5. Review.
3. Takamatsu H, Imamura D, Kuwana R, Watabe K. Expression of yeeK during *Bacillus subtilis* sporulation and localization of YeeK to the inner spore coat using fluorescence microscopy. *J Bacteriol.* 2009, 191, 1220-9.
4. Kobayashi K, Kuwana RR, Takamatsu H. kinA mRNA is missing a stop codon in the undomesticated *Bacillus subtilis* strain ATCC 6051. *Microbiology.* 2008, 154, 54-63.
5. Kuwana R, Takamatsu H, Watabe K. Expression, Localization and Modification of YxeE Spore Coat Protein in *Bacillus*

subtilis.

J Biochem. 2007, 142, 681-9.

[学会発表] (計 26 件)

1. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部一仁. セレウス菌株における多様性解析 (2010, 3, 30). 2010年度日本薬学会第130年会・岡山 (2010, 3, 28-30).
2. 田近友美, 宗由加理, 椎葉有樹, 今村大輔, 桑名利津子, 高松宏治, 渡部一仁 健常人ボランティアの鼻腔内及び外耳道における常在フトウ球菌の長期調査 (2010, 3, 30). 2010年度日本薬学会第130年会・岡山 (2010, 3, 28-30).
3. 宗由加理, 田近友美, 椎葉有樹, 今村大輔, 桑名利津子, 高松宏治, 渡部一仁 ブドウ球菌における病原性遺伝子と薬剤耐性遺伝子の保有頻度に関する研究 (2010, 3, 30). 2010年度日本薬学会第130年会・岡山 (2010, 3, 28-30).
4. 椎葉有樹, 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部一仁. 外耳道から得られたブドウ球菌の薬剤耐性と耐性遺伝子のトランスファーに関する研究. 2009年11月14日(土)発表. 第8回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2009. 2009年11月14日(土)~15日(日)名古屋市立大学田辺通キャンパス(愛知県名古屋市瑞穂区)
5. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部一仁. 枯草菌における芽胞外殻タンパク質修飾機構の解析 第59回日本薬学会近畿支部大会、総会 (2009.10.24). 近畿大学薬学部・東大阪市.<招待講演>
6. 椎葉有樹, 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部一仁. ブドウ球菌属における薬剤耐性遺伝子および病原性関連遺伝子の分布と水平伝播に関する研究. 第59回日本薬学会近畿支部大会、総会 (2009.10.24). 近畿大学薬学部・東大阪市.
7. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部一仁. セレウス菌株における多様性解析 (2009.9.14) 日本防菌防黴学会第36回年次大会 (2009.9.14-15). 豊中・千里ライフサイエンスセンター
8. 椎葉有樹, 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部一仁. 外耳道から得られたブドウ球菌の薬剤耐性と耐性遺伝子のトランスファーに関する研究 日本防菌防黴学会第36回

年次大会 (2009.9.14-15). 豊中・千里ライ
フサイエンスセンター

9. Ritsuko Kuwana, Daisuke Imamura, Hiromu Takamatsu, Kazuhito Watabe
Genotype and phenotype diversity in
Bacillus cereus species (2009.6.30)
3rd FEMS Congress of European
Microbiologists, Gothenburg, Sweden, June
28 - July 2, 2009.

10. Ritsuko Kuwana, Hiromu Takamatsu,
Kazuhito Watabe. YabG and Tgl are involved
in the protein modification in the mature
spore of Bacillus subtilis. June 25,
2007-14th Conference on Functional
Genomics of Gram-Positive Microorganisms.
14th International Conference on Bacilli.
June 24-28, 2007. Green Park Resort,
Tirrenia, Pisa, Italy

11. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部
一仁. セレウス菌とその類縁菌の 16S rRNA 遺
伝子の塩基配列と RAPD-PCR 法に基づいた系
統解析および PCR 法による病原性の推定
(2009.9.3). 第 21 回微生物シンポジウム・
福山. (2009.9.3-4).

12. 椎葉有樹, 桑名利津子, 今村大輔, 高松
宏治, 渡部一仁. 健康人より単離されたブド
ウ球菌属細菌における薬剤耐性遺伝子およ
び病原性関連遺伝子の分布と水平伝播に
関する研究 (2009.9.3). 第 21 回微生物シン
ポジウム・福山. (2009.9.3-4).

13. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部
一仁. セレウス菌株における多様性解析
(2009, 3, 27). 2009 年度日本薬学会第 129
年会・京都 (2009, 3, 26-28)

14. 椎葉有樹, 桑名利津子, 今村大輔, 高松
宏治, 渡部一仁. ブドウ球菌の外耳道にお
ける菌そう変化に関する研究 (2009, 3, 27).
2009 年度日本薬学会第 129 年会・京都 (2009,
3, 26-28)

15. 椎葉有樹, 桑名利津子, 今村大輔, 高松
宏治, 渡部一仁. セレウス菌株における多
様性解析 (2009, 3, 12). 第 82 回日本細菌学
会総会・名古屋 (2009, 3, 12-14)

16. 椎葉有樹, 桑名利津子, 今村大輔, 高松
宏治, 渡部一仁. PCR を用いた腸内孢子形
成菌の検出方法の開発研究 (2008, 10, 25).
2008 年度日本薬学会近畿支部大会・神戸

17. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部

一仁. 枯草菌における芽胞外殻タンパク質修
飾機構の解析 (2008, 10, 25). 2008 年度日
本薬学会近畿支部大会・神戸

18. 椎葉有樹, 桑名利津子, 今村大輔, 高松
宏治, 渡部一仁. PCR 法によるセレウス菌株
の検出および分類法の開発研究. (2008, 9,
11). 2008 年度日本防菌防ばい学会第 35 会
年次大会・静岡. 浜松市

19. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部
一仁 (摂南大学・薬) 枯草菌における芽胞外
殻タンパク質修飾機構の解析. (2008.9.5).
2008 年度グラム陽性細菌のゲノム生物学研
究会 (東京)

20. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部
一仁. PCR 法によるセレウス菌株の検出およ
び分類法の開発研究. (2008, 9, 3). 2008 年
度日本薬学会微生物シンポジウム・岐阜

21. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部
一仁 (摂南大学・薬) PCR 法によるセレウス
菌株の検出および分類法の開発研究. (2008
年 5 月 26 日) 日本分子生物学会第 8 回春
期シンポジウム・札幌

22. 高松宏治, 桑名利津子, 今村大輔, 金成
繁太 1, 中西 弘一 1, 渡部 一仁 (2008 年 5
月 26 日) spoIVA 遺伝子を指標にしたヒト糞
便由来メタゲノム DNA サンプル中における
内生孢子形成細菌の検索. 日本分子生物
学会第 8 回春期シンポジウム・札幌

23. 高松宏治, 桑名利津子, 今村大輔, 金成
繁太 1, 中西 弘一 1, 渡部 一仁 (摂南大・
薬, 1 キリンビバレッジ株式会社). 内生孢子
形成細菌に保存されている孢子形成特異
的遺伝子の検索と応用. (2008, 3, 27). 2008
年度日本農芸化学大会・名古屋

24. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部
一仁. PCR 法によるセレウス菌株の検出およ
び分類法の開発研究. (2008, 3, 27). 2008
年度日本薬学会年会・横浜

25. 桑名利津子, 今村大輔, 高松宏治, 渡部
一仁. 枯草菌スポアコートタンパク質 YxeE
は YabG プロテアーゼによりプロセッシング
される (2007, 12, 12). BMB2007 (日本分子
生物学会・日本生化学会合同年会)・横浜

26. 高松宏治, 桑名利津子, 今村大輔, 渡部
一仁. 枯草菌における YeeK タンパク質の
スポアコート局在と分解 (2007, 12, 12).
BMB2007 (日本分子生物学会・日本生化学
会合同年会)・横浜

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：芽胞形成細菌の検出用ポリヌクレオチドおよび芽胞形成細菌の検出法

発明者：高松宏治，桑名利津子，金成繁太.

権利者：キリンビバレッジ株式会社

種類：特許

番号：特願 2008-035044，特開 2009-189320

出願年月日：2008年02月15日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑名 利津子 (RITSUKO KUWANA)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50330361

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

