

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14980

研究課題名（和文）豚由来 7群サルモネラの遺伝学的全容の解明と薬剤耐性・病原性を規定する因子の同定

研究課題名（英文）Phylogenetic analysis for 07 group of Salmonella and identification of the factors for antimicrobial resistance and virulence

研究代表者

新井 暢夫（Arai, Nobuo）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・研究員

研究者番号：20885008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：全ゲノム系統解析により、Salmonella Choleraesuis（SC、抗原構造；7:c:1,5）および7:c:-には、大きく5つのクレードが存在することが明らかとなった。クレード1と2は生物型Choleraesuis、クレード3-5は生物型Kunzendorf（SCK）で構成され、国内株はクレード2、3、5に集約された。国内分離7:c:-は全てクレード5に集約され、我が国に分布する7:c:-はSCKの単相変異株であることが示唆された。さらに、薬剤感受性試験、培養細胞への侵入試験を通して、多剤耐性傾向が顕著であり、高い細胞侵入性を示すクレード2を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国においてサルモネラ血清型Choleraesuis（SC）は豚のサルモネラ症の主要な原因菌であるが、その遺伝学的全体像および7:c:-との関連は不明であった。本研究は、SCにおける国内外の主要系統を明らかにし、国内に分布する7:c:-がSCの単相変異株であること、薬剤耐性および病原性の観点から注視すべき系統（クレード2）を特定した。本成果は、7:c:-がSCと本質的に同等であることを支持するデータであり、本菌の畜産行政上の取り扱いを検討する際の重要な知見になり得る。

研究成果の概要（英文）：Phylogenetic analysis based on whole genome sequence revealed that there were five distinctive clades in Salmonella Choleraesuis (SC, antigenic formula; 7:c:1,5) and 7:c:-. Biovar Choleraesuis and Kunzendorf (SCK) were summarized in clade1 and 2, and clade 3 to 5, respectively. All 7:c:- strains, which were isolated from Japan, belong to clade 5. Thus, it was indicated that the domestic 7:c:- was the monophasic variant of SCK. Through the antibiotic susceptibility testing and the invasion assay for INT407, we identified the high-risk clade that showed multidrug resistance and high invasiveness.

研究分野：獣医細菌学

キーワード：Salmonella Choleraesuis Salmonella 7:c:- 全ゲノム解析 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルモネラ属菌は菌体(O)抗原と鞭毛(H)抗原の組み合わせによって、2,600以上の血清型が報告されている。特に、血清型 Typhimurium(ST、抗原構造; 4:i:1,2)と血清型 Choleraesuis(SC、抗原構造; 7:c:1,5)が、豚のサルモネラ症の主要な原因血清型であり、これらの血清型によるサルモネラ症は家畜伝染病予防法によって届出伝染病に指定されている。一方で、野外では4:i:-や7:c:-という抗原構造のサルモネラ属菌がしばしば分離される。これらはSTやSCの単相変異株と予想されるが、抗原構造が一致していないため、行政上は異なる菌として取り扱われてきた。4:i:-については、国内における浸潤状況やSTとの遺伝学的関係が明らかになったことを受け、2018年4月から行政上STと同等に扱うことが決定された。しかし、7:c:-はSCとの遺伝学的関係や病原性が不明であり、本菌によるサルモネラ症には届出義務がない。STやSCを代表とするサルモネラ属菌による被害を最小限に抑えるためには、適切で迅速な治療を行い、豚群にサルモネラ汚染を拡大させないことが重要である。そのために、国内にどのような特徴(病原性・薬剤耐性)を持つ遺伝学的系統が存在するのかが明らかにすることが望まれる。

一方で、豚のサルモネラ症の主要血清型であるSCに関して、我が国に分布する本血清型の遺伝学的な全体像は不明である。野外では、SCの感染によって重症化する個体と不顕性で耐過する個体が存在する。これは宿主側の要因もあるが、菌の病原性の違いも要因の1つと考えられる。また、STは主に腸炎を原因とする消化器症状を引き起こすが、SCによるサルモネラ症は消化器症状を示すとは限らず、肝炎、肺炎、敗血症といった多様な病態を呈する。サルモネラの病原性に関する先行研究では主にSTがモデルとして使用され、その成果が他の血清型に外挿されてきた。しかし、SCはSTとは異なる病態を引き起こし、STがほぼ分離されることのない呼吸器からも分離されるなど、病態発生に寄与する遺伝子群が異なることが予想される。サルモネラ感染豚に対しては、主として抗菌薬による治療が行われるが、SCの最新の薬剤耐性状況に関する情報は非常に乏しい。

以上のように、SCは豚のサルモネラ症の主要な原因血清型でありながら、我が国に分布するSCの遺伝学的な全容および7:c:-との関係が明らかでない、最新の薬剤耐性状況が把握できていない、SC独自の病原性に関する解析が不十分であるなど、SCによる被害低減に向けて解決しなければならない課題が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、SCによる被害の低減に向けて次の3課題を解決することを目的とした。

- 課題1 我が国に分布しているSCおよび7:c:-の遺伝学的全体像の解明
- 課題2 豚由来SCにおける最新の薬剤耐性状況の把握と耐性獲得機構の
- 課題3 SCの病原性へ寄与する因子の同定

3. 研究の方法

(1) 我が国に分布しているSCおよび7:c:-の遺伝学的全体像の解明

26道県の合計265株(豚:259、イノシシ:6、SC:241、7:c:-:24)について、Illumina社HiSeq X TenあるいはNovaSeq6000による全ゲノムシーケンスを行った。海外データベース由来208株の全ゲノム塩基配列データを収集した。全473株のコアゲノム内一塩基多型をBactSNP(1)により抽出した。なお、参照株であるSC-B67株(アクセッション番号:AE017220.1)のプロファーシ領域をPHASTER(2)により推定し、当該領域をマスクし、BactSNPを実行した。続いて、Gubbins(3)により組み換え領域を除去し、系統解析に使用するSNPsとした。時系列系統解析にはBEAST2(4)を使用した。なお、本ツールの実行に先立ち、jModeltest2(5)でSite Model、BEAUTiおよびPathSamplerでClock ModelとPriorsについて、最適なパラメーターの組み合わせを検討した。rhierBAPS(6)により、階層型クラスター解析を実施した。

また、SPAdes(7)によるアセンブルを行い、全株のドラフトゲノムを作製した。ドラフトゲノムを用いて、*fljB*(2相鞭毛抗原遺伝子)、*phsA*(チオ硫酸還元酵素遺伝子)の保有状況を調べた。

(2) 豚由来SCにおける最新の薬剤耐性状況の把握と耐性獲得機構の解明

全473株のドラフトゲノムを用いて、ResFinder(8)、PointFinder(9)、PlasmidFinder(10)によって、それぞれ薬剤耐性遺伝子、キノロン耐性決定領域の点変異、レプリコンタイプを検出した。国内分離株について、22薬剤に対する薬剤感受性試験をディスク拡散法あるいは寒天平板希釈法により実施した。なお、使用した薬剤は以下の通り:アンピシリン(AMP)、アンピシリン/スルバクタム(SAM)、イミペネム、アモキシシリン/クラバン酸(AMC)、カナマイシン(KAN)、クロラムフェニコール(CHL)、ゲンタマイシン(GEN)、シプロフロキサシン、ストレプトマイシン(STR)、セファゾリン(CFZ)、セフェピム、セフォキシチン、セフォタキシム、テトラサイクリン(TET)、ナリジクス酸(NAL)、ホスホマイシン、メロペネム、レボフロキサシン、ST合剤(SXT)、スルファメトキサゾール(SUL)、コリスチン(CST)、アジスロマ

イシン (AZM)。

多剤耐性化の進行した代表株について、Oxford Nanopore Technologies 社 MinION によるロングリードシーケンシングを行った。ロングリード、ショートリードを用いて、Unicycler (11) によるアセンブル、Pilon (12) によるエラー修正を実行し、完全長ゲノムを決定した。

(3) SC の病原性へ寄与する因子の同定

国内の主要系統であるクレード 2 と 5 の代表株について、Gentamicin protection assay により INT 407 細胞 (ヒト小腸上皮細胞) への細胞侵入性を比較した。さらに両クレードについて、Raw264.7 細胞 (マウスマクロファージ様細胞) に対する細胞傷害性を LDH アッセイにより評価した。また、対数増殖期の菌体よりトータル RNA を回収後、RNA-seq を実施し、クレード 2 と 5 における遺伝子発現状況を比較した。クレード 2 において顕著に高い発現状況にあった遺伝子 A について、リアルタイム PCR によって発現状況を評価した。さらに、遺伝子 A の下流に存在する遺伝子 B の欠失変異株を作成し、マクロファージ傷害性を親株と比較した。

4. 研究成果

(1) 我が国に分布している SC および 7:c- の遺伝学的全体像の解明

全 473 株のコアゲノム内から 9,523 か所の SNPs が検出された。hierBAPS に結果、473 株は 5 つのクレードに区分され、国内株はクレード 2、3、5 に集約された (図 1)。硫化水素 (H₂S) 非産生性の生物型 Choleraesuis (SCC) と H₂S 産生性の生物型 Kunzendorf (SCK) は、約 1000 年前に共通祖先から分岐した異なる遺伝系統であることが明らかとなった。国内で分離された 7:c- はクレード 5 に集約されたことから、SCK から派生した単相変異株であることが明らかになった。さらに SC と 7:c- の *fljB* とその周辺領域を比較したところ、7:c- では *fljB* に IS4 family transposase が挿入され、偽遺伝子化していることが分かった。

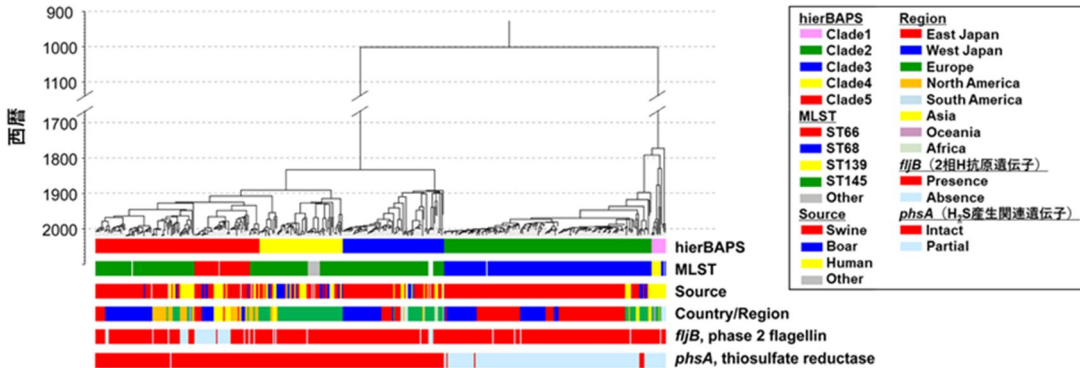


図 1. 国内外で分離された SC 473 株の全ゲノムより作成した系統樹

(2) 豚由来 SC における最新の薬剤耐性状況の把握と耐性獲得機構の解明

国内に分布するクレード 2、3、5 に共通してアミノグリコシド、テトラサイクリン、サルファ剤耐性を規定する遺伝子の保有率が高く、特にクレード 2 は 1 株当たりの平均薬剤耐性遺伝子数が最も多かった (6.4 遺伝子) (図 2)。また、最多で 11 個の薬剤耐性遺伝子が搭載されたプラスミドがクレード 2 から検出された。

薬剤感受性試験の結果、クレード 2、3、5 に共通してストレプトマイシン、サルファ剤に 80% を超える高い耐性率を示した。クレード 2 では、8 薬剤以上に耐性を示した菌株の 88% を占めるなど多剤耐性化が顕著であった (図 3)。

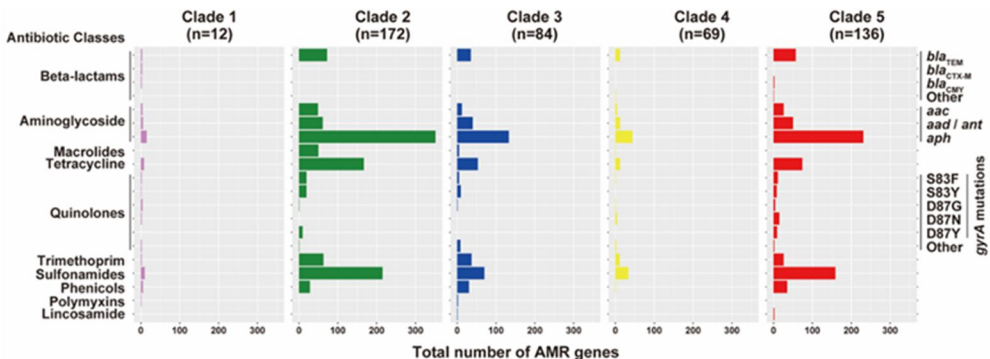


図 2. クレード別の薬剤耐性遺伝子数

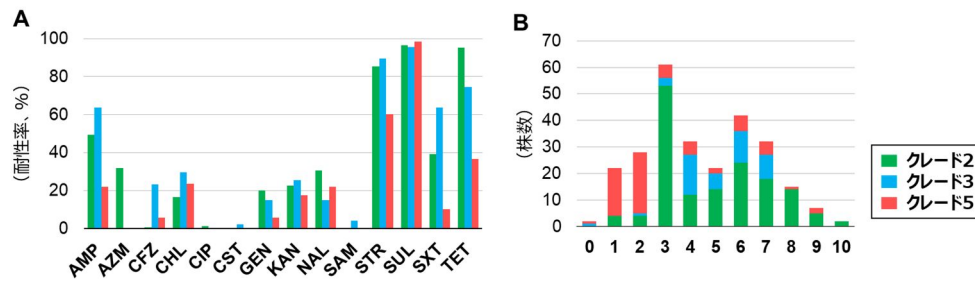


図3. クレード別各薬剤に対する耐性率 (A) と1株当たりの耐性薬剤数 (B)

(3) SCの病原性へ寄与する因子の同定

クレード5と比較して、クレード2はINT 407細胞に対する高い侵入性およびマクロファージ傷害性を示すことが明らかになった。RNA-seqによって、クレード2で顕著に高い発現状況にある一連の遺伝子群を見出した。当該遺伝子群のレギュレーターと考えられる遺伝子Aの発現状況をリアルタイムPCRで評価したところ、クレード5と比較して、クレード2では高い発現状態にあることが明らかになった。遺伝子Bの欠失変異株では、親株と比較してマクロファージ傷害性が著しく低下しており、RNA-seqで見出した遺伝子群がクレード2のマクロファージ高傷害性に寄与することが示唆された。

まとめ

以上の検討により、SCおよび7:c-には大きく5つの系統があり、生物型ごとに遺伝系統が分かれること、国内で分離される7:c-はSCKの単相変異株であること、国内の豚群には多剤耐性化が顕著なクレード2が存在し、薬剤耐性の獲得にはプラスミドが関与していること、主要系統であるクレード2と5の比較において、クレード2は高い細胞侵入性とマクロファージ傷害性を示すことが明らかになった。これらの成果は、SCによる豚のサルモネラ症を制御する上で、適切な抗菌薬の選択や主要系統の監視技術の開発に資することが期待される。

<引用文献>

1. Yoshimura D., Kajitani R., Gotoh Y., Katahira K., Okuno M., Ogura Y., Hayashi T., Itoh T., Evaluation of SNP calling methods for closely related bacterial isolates and a novel high-accuracy pipeline: BactSNP., *Microb Genom.* 5(5):e000261, 2019.
2. Arndt D., Grant JR., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart DS., PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool., *Nucleic Acids Res.* 44(Web Server issue): W16–W21, 2016.
3. Croucher NJ., Page AJ., Connor TR., Delaney AJ., Keane JA., Bentley SD., Parkhill J., Harris SR., Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins., *Nucleic Acids Res.* 43(3), e15, 2015.
4. Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., et al., PLoS Comput Biol., 15(4):e1006650, 2019.
5. Darriba D., Taboada GL., Doallo R., Posada D., jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing., *Nature Methods*, 9, 772, 2012.
6. Tonkin-Hill G., Lees JA., Bentley SD., Frost SDW., RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS., *Wellcome Open Res.*, 3:93, 2018.
7. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A., et al., Using SPAdes De Novo Assembler, *Curr Protoc Bioinformatics.*, 70(1):e102, 2020.
8. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V., et al., ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes., 75(12):3491-3500, 2020.
9. Zankari E., Allesøe R., Joensen KG., Cavaco LM., Lund O., Aarestrup FM., PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens., *J Antimicrob Chemother.*, 72(10):2764-2768, 2017.
10. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H., In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing., *Antimicrob Agents Chemother.*, 58(7):3895-903, 2014.
11. Wick RR., Judd LM., Gorrie CL., Holt KE., Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads., *PLoS Comput Biol.*, 13(6):e1005595, 2017.
12. Walker BJ., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., et al., Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新井暢夫、玉村雪乃、渡部綾子、岩田剛敏、桃木杏奈、楠本正博
2. 発表標題 国内外の豚から分離されたSalmonella Choleraesuisの遺伝学的系統とその性状
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井暢夫
2. 発表標題 我が国の家畜に分布するSalmonella Typhimurium及びその非定型株の遺伝学的背景の解明と流行系統の特徴
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 新井暢夫、玉村雪乃、渡部綾子、岩田剛敏、楠本正博
2. 発表標題 Salmonella Typhimuriumの簡易SNP型別法の開発
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------