

非結核性抗酸菌のハウスキーピング遺伝子解析による同定

山本 宣和, 向川 純, 三宅 啓文, 福田 貢, 貞升 健志, 甲斐 明美

Identification of *Mycobacterium* Species by Nucleic Acid Sequencing Determination of House Keeping Genes

Nobukazu YAMAMOTO, Jun MUKAIGAWA, Hirofumi MIYAKE,
Mitsugu FUKUDA, Kenji SADAMASU and Akemi KAI

非結核性抗酸菌のハウスキーピング遺伝子解析による同定

山本 宣和*, 向川 純*, 三宅 啓文*, 福田 貢*, 貞升 健志*, 甲斐 明美**

人から分離された非結核性抗酸菌株について, コロニーの性状や生化学的性状を検査し, さらに市販の遺伝子同定キットで同定を試みたが, 菌種の同定ができなかった. そこでDNAシーケンス法を用いて, ハウスキーピング遺伝子 (16S rRNA, *rpoB*, *recA*, *hsp65*, ITS) の解析による菌種同定を試みた結果, *Mycobacterium gordonae* と同定することができた.

キーワード: 非結核性抗酸菌, DNA-DNA ハイブリダイゼーション法, DNA シークエンス法, ハウスキーピング遺伝子

はじめに

従来より抗酸菌の検出と同定に, 培養による生化学的性状検査が用いられていたが, 同定までに時間がかかることから, 一般の検査室では迅速性の高い核酸を標的とする市販の同定キットが汎用されている. しかし, 市販キットでは同定可能な菌種に限られており, また非結核性抗酸菌の中にはこれらの方法では同定できない菌の存在が指摘されている¹⁾. 我々はこのような非結核性抗酸菌を DNA シークエンス法で同定する報告を行ってきた²⁾.

今回, 当センターで人から分離された非結核性抗酸菌の株で, コロニー, 生化学的性状から *Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*) と推定されるが, 市販の遺伝子同定キットでは, キット内の標準菌株のどれとも反応性がみられなかった株について, DNA シークエンス法を用い, ハウスキーピング遺伝子である 16S rRNA, *rpoB*, *recA*, *hsp65*, 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (以下 ITS) の解析による菌種同定を試みたので, その成績を報告する.

実験方法

1. 材料

2009年8月に当センターにおいてヒト由来検体 (喀痰) より分離された非結核性抗酸菌株を用いた. なお, 対象菌株として *M. tuberculosis* を使用した.

2. 生化学的性状検査

新結核菌検査指針 2007 第五章「抗酸菌の同定」に従い, 小川培地における集落の性状, 光発色性および発育速度の観察, 硝酸塩還元試験, ウレアーゼ産生能試験を行った³⁾.

3. DNA-DNA ハイブリダイゼーション法

遺伝子解析による迅速同定法である DNA-DNA ハイブリダイゼーション法として, 市販されているキット「DDH マイコバクテリア極東 (極東製薬)」を用いて実施した. 検査手技はキットに添付されている説明書に従い, 小川培地

に培養した菌体を 1/2 白金耳量採取し, DNA 抽出用試験管に移し, ミキサーで粉碎後, DNA 抽出試薬 2 mL を添加, ミキサーで 60 秒間混和した後, 3,000 rpm, 5 分遠心し, 上層をスピッツチューブに移した. これにエタノール 1 mL を添加, 混和し, 3,000 rpm 15 分遠心後, 沈殿物をさらにエタノールで洗浄し, DNA を得た. さらに DNA 標識試薬を添加, 混和して 10 分間光照射した. 変性試薬添加及び中和試薬添加後, ハイブリダイゼーション液を 3 mL 添加し, マイコバクテリア属菌同定用プレートの各ウエルに 100 μ L 分注し, 55°C で 2 時間ハイブリダイゼーションを行った. 反応終了後, ウエルの液を捨て, 洗浄試薬で 3 回洗浄し, 発色酵素液を各ウエルに 100 μ L ずつ分注し, 発色後 630nm での吸光度を測定した.

4. DNA シークエンス

1) 遺伝子の抽出

菌からの DNA 抽出は, プロテアーゼ K・SDS・フェノール・クロロホルム法で行った⁴⁾.

2) ハウスキーピング遺伝子の解析

16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析は, Kirschner⁵⁾らの方法により, 16S rRNA 遺伝子の超可変部 A (大腸菌での塩基配列 130-210bp) と B 塩基配列 (430-500bp) を含む領域を, primer 263 (5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3') と, 285 (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') を用い増幅した. *rpoB* 遺伝子は Kim⁶⁾らの方法により, MF (5'-CGA CCA CTT CGG CAA CCG-3'), MR (5'-TCG ATC GGG CAC ATC CGG-3') の両プライマーを用い領域を増幅した. *recA* 遺伝子は Blackwood⁷⁾らの方法により, *recF1* (5'-GGT GTT CGN CTA NTG TGG TG-3'), *recR1* (5'-AGC TGG TTG ATG AAG ATY GC-3') を用い領域を増幅した. *hsp65* 遺伝子は Telenti⁸⁾らの方法により, TB11 (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'), TB12 (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3') を用い増幅した. ITS は Roth⁹⁾らの方法により, Sp1 (5'-ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC-3'), Sp2 (5'-GAT

* 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部

GCT CGC AAC CAC TAT CCA - 3') を用い領域を増幅した。PCR 反応は 94°C・1 分, 60°C・1 分・72°C・1 分の 40 サイクルを行い, 領域の DNA を増幅後, Montage PCR Centrifugal Filter Devices (MILLIPORE 社) を用いて精製した後, 16SrRNA 遺伝子は primer 263, 285, r325 - 305 (5'-CCC CAC TGC TGC CTC CCG TAG -3') または p635 - 655 (5'-CTG GTG TAG CGG TGG AAT GC-3') をシークエンス用プライマーとして, その他の遺伝子は PCR 法に用いたプライマーを用い, Dye Terminator 法でサイクルシークエンスを行い, ABI PRISM3130 (Applied Biosystems 社) を用いて各遺伝子領域の塩基配列を決定した。

5. DNA塩基配列を用いた菌種の調査

DNAシークエンス法で得られた16S rRNA遺伝子や他のハウスキーピング遺伝子 (*rpoB*, *recA*, *hsp65*, ITS) の塩基配列は, DDBJ BLAST Search (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて相同性を調査した。

結 果

1. コロニー及び生化学的性状

本菌は, 小川培地上ではコロニーはS型, 暗所内培養でオレンジ色に着色している遅発育菌で, 硝酸塩還元試験陰性, ウレアーゼは陰性であった。

2. DDHマイコバクテリア法の結果

本菌は *Mycobacterium gordonae* に対してDDH法でもっとも高い吸光度を示したが, TB complex, *M. marinum*, *M. Szulgai*, *M. avium*, *M. gastri* にも70%以上の相対類似度を示した (表1)。添付の説明書によると最も強く発色した菌種の吸光度が対照菌種の1.9倍以上で, かつ2番目に吸光度の高かった菌種との相対類似度が70%以下である場合に, 該当する菌種と決定する。本菌は2番目に吸光度が高かった菌種との相対類似度が70%以上であったため, DDH法では判定不可であった。なお対照として用いた結核菌はTB complexに対してもっとも高い吸光度を示し, 他の菌種との相対類似度はいずれも30%以下であった。

3. DNAシークエンス法の結果

16S rRNA遺伝子超可変部A, Bを含む塩基配列約600塩基対を解析し, DDBJ BLASTで検索した。表2に, 相同性の高かった6菌種を示した。この株は, *M. gordonae* に99.5%と最も高い相同性を示したが, *M. IWGMT*, *M. asiaticum* にも99%と高い相同性を示した。

そこで, さらにハウスキーピング遺伝子の中から, *rpoB*, *recA*, *hsp65*, ITSの遺伝子解析を行った。

*rpoB*遺伝子の相同性を調査したところ, *M. gordonae* に97%と一番高い相同性を示した。*recA*遺伝子, *hsp65*遺伝子, ITS遺伝子の相同性もそれぞれ, 98%, 99%, 100%といずれも *M. gordonae* に一番高い相同性を示し, *hsp65*遺伝子

とITS遺伝子では, 他の菌種との相同性は低かった (表2)。*rpoB*, *recA*, *hsp65*, ITSの遺伝子いずれも *M. gordonae* の遺伝子と一番相同性が高い結果となったため, *M. gordonae* と判定した。

表1. DDHマイコバクテリア法による相対類似度 (%)

菌種	検体	コントロール (結核菌)
TB complex	81.6	100.0
<i>M. kansasii</i>	66.7	-
<i>M. marinum</i>	81.6	-
<i>M. simiae</i>	33.7	-
<i>M. scrofulaceum</i>	40.9	-
<i>M. gordonae</i>	100.0	-
<i>M. szulgai</i>	76.2	-
<i>M. avium</i>	82.9	-
<i>M. intracellulare</i>	65.7	-
<i>M. gastri</i>	74.9	-
<i>M. xenopi</i>	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	61.6	-
<i>M. terrae</i>	46.7	-
<i>M. triviale</i>	32.4	-
<i>M. fortuitum</i>	-	-
<i>M. chelonae</i>	-	-
<i>M. abscessus</i>	37.5	-
<i>M. peregrinum</i>	-	-

-: 相対類似度が30%以下

表2. ハウスキーピング遺伝子の相同性

菌種	16SrRNA	<i>rpoB</i>	<i>recA</i>	<i>hsp65</i>	ITS
<i>M. gordonae</i>	99.5	97	98	99	100
<i>M. IWGMT</i>	99		98		
<i>M. asiaticum</i>	99		97		
<i>M. nebraskense</i>	98			95	
<i>M. avium</i>	98		97		90
<i>M. crocinum</i>		95			
<i>M. intermedium</i>		95			
<i>M. brisbanense</i>		94			
<i>M. parascrofulaceum</i>		94		94	
<i>M. kansasii</i>					92
<i>M. marinum</i>					90
<i>M. ulcerans</i>					90

それぞれの遺伝子ごとに類似度の高いものから3~5菌種について値を示した

考 察

DDH法は操作の簡便性並びに迅速性から, 検査室において非結核性抗酸菌の同定に広く用いられている。しかしこのキットで同定できる菌種は限られており, このキットの対象としている菌種であっても, *M. scrofulaceum* の27%, *M. gordonae* の27%, *M. nonchromogenicum* の48%, *M.*

fortuitum の 7%, *M. chelonae* の 10% の株が, このキットでは同定できないこと¹⁾, また同定できても生化学的性状と一致しない株のあることが報告されている。

遺伝学的に, 種は染色体の 70% 以上の DNA/DNA ハイブリッドを安定に形成する株の集団と定義されている。近年リボゾーム RNA 配列を使った分類法が進化し菌の同定に 16S rRNA 配列が用いられてきているが, 16S rRNA と DNA/DNA ハイブリッドの相関性を調べると, 染色体 DNA/DNA ハイブリッドの値が 70% 以上である場合, 16S rRNA 配列は 98.5% 以上一致することが報告されている¹¹⁾。しかし, 逆に 16S rRNA 遺伝子が 99% 以上一致しても, DNA/DNA ハイブリッドの値が 50% 程度と低い場合もあり, 別の種である事例も報告されている。今回の結果からも 16S rRNA 配列のみで菌種の同定ができないことは明らかである。

近年, 各種細菌の遺伝子配列情報が蓄積されてきており, 16S rRNA 遺伝子以外の遺伝子配列を複数個所選択し比較する論文報告が増加している。そこで今回は以前報告した *rpoB* 遺伝子の他に, *recA*, *hsp65*, ITS といったハウスキーピング遺伝子の DNA シークエンス解析を実施した。

DDBJ BLAST の検索の結果, ITS の遺伝子は 100% の相同性を示したが, 他の遺伝子は 100% を示さなかった。この理由として, *M. gordonae* のサブタイプの違いによる相違の可能性がある。Itoh¹⁰⁾ は *M. gordonae* の分類に *rpoB* 遺伝子を利用し, いくつかのサブグループがあることを報告している。データベースに世界で分離された菌株のすべての遺伝子配列が報告されているわけではなく, 何% 以上の配列の一致があれば同定できるかについても, まだ十分な定義はないが, 調査した 4 種類の遺伝子の解析結果ではすべて *M. gordonae* の遺伝子と一番相同性が高く, 生化学的性状, 菌のコロニーの性状とあわせて *M. gordonae* と同定して差

し支えないと考えられた。

16S rRNA 配列に加えて, 今回調査したような複数のハウスキーピング遺伝子の解析によって, 菌の同定が容易になると考えられる。今後は従来法では同定できない菌種は複数の遺伝子配列の解析による同定を試み, それらの結果と従来法の結果を考慮して日常業務に活用していく予定である。

文 献

- 1) Kusunoki, S., Ezaki, T., Tamesada, M., *et al*: *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1596-1603, 1991.
- 2) 向川 純, 遠藤美代子, 柳川 義勢, 他: 東京健安研 七 年 報, **56**, 31-33, 2005.
- 3) 日本結核病学会 抗酸菌検査法対策委編: 新結核菌検査指針 2007 第 5 章 抗酸菌の同定, 51-80, 2007, 財団法人結核予防会, 東京.
- 4) 向川 純, 柳川 義勢, 山田 澄夫: 東京健安研 七 年 報, **57**, 55-58, 2006.
- 5) Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U *et al*: *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2882-2889, 1993.
- 6) Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A. *et al*: *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1714-1720, 1999.
- 7) Blackwood, K. S., He, C., Gunton, J., Turenne, C. Y *et al*: *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2846-2852, 2000.
- 8) Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M. *et al*: *J. Clin. Microbiol.* **31**, 175-1720, 178, 1993.
- 9) Roth, A., Reischl, U., Streubel, A. *et al*: *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1094-1104, 2000.
- 10) Itoh, S., Kazumi, Y., Abe, C *et al*: *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1656-1663, 2003.
- 11) 江崎孝行: ゲノム医学, **3**, 111 - 118, 2003.

Identification of *Mycobacterium* Species by Nucleic Acid Sequencing Determination of House Keeping Genes

Nobukazu YAMAMOTO*, Jun MUKAIGAWA*, Hirofumi MIYAKE*, Mitsugu FUKUDA*, Kenji SADAMASU* and Akemi KAI*

Mycobacterium species isolated from sputum were suspected to be *Mycobacterium gordonae* based on colony morphology and biochemical properties, but they could not be identified by the DNA-DNA hybridization method (DDH-mycobacteria). Through nucleic acid sequencing housekeeping genes (16S rRNA, *rpoB*, *recA*, *hsp65*, and ITS), the organism was identified as *M.gordonae*. Nucleic acid sequencing determination of housekeeping genes is a good tool for identifying *Mycobacterium* species.

Keywords: *Mycobacterium* species, DNA-DNA hybridization method, DNA sequence method, house keeping gene analysis

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan