

## 16S rRNA 遺伝子及び *rpoB* 遺伝子解析による非結核性抗酸菌の同定

向川 純\*, 遠藤 美代子\*, 柳川 義勢\*, 諸角 聖\*\*

### Identification of *Mycobacteria* by Nucleic Acid Sequence Determination of 16S ribosomal RNA (16S rRNA) Gene and RNA Polymerase *B* (*rpoB*) Gene

Jun MUKAIGAWA\*, Miyoko ENDOH\*, Yoshitoki YANAGAWA\* and Satoshi MOROZUMI \*\*

We have identified a novel *Mycobacteria*, which was not previously identified by DNA-DNA hybridization methods (DDH *Mycobacteria*), using nucleic acid sequence determination of the 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene and RNA polymerase *B* (*rpoB*) genes.

**Keywords** : 抗酸菌 *Mycobacteria*, 16S rRNA 遺伝子解析 16S ribosomal RNA gene analysis, *rpoB* 遺伝子解析 RNA polymerase *B* gene analysis, DDH マイコバクテリア法 DDH *Mycobacteria*

#### はじめに

臨床検査における抗酸菌の検出と同定は、従来から培養により生化学的性状を検査する方法<sup>1)</sup>で行われてきたが、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キット<sup>2)</sup>が繁用されている。しかし、市販のキットは、同定可能な菌種が限られており、これらの方法では同定できない非結核性抗酸菌の存在が指摘されている。そこで、今回当研究室において、ヒトから分離された非結核性抗酸菌のうち、市販キットで同定できなかった株について、16S リボゾーム RNA (rRNA) 遺伝子並びに、RNA ポリメラーゼ *B* サブユニット 遺伝子 (*rpoB*) 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

平成 12 年度から 16 年度の 5 年間に、当研究室においてヒト由来検体から分離された非結核性抗酸菌 38 株を用いた。

##### 2. 培養並びに生化学的性状検査

抗酸菌同定のフローチャートを Fig.1 に示した。生化学的性状検査は、新結核菌検査指針 2000 第 5 章「抗酸菌の同定」<sup>1)</sup> に従って、小川培地における集落の性状、光発色性及び発育速度の観察を行ったほか、ナイアシン試験、硝酸塩還元試験、ツイーン 80 水解能試験、ウレアーゼ産生能試験を行った。

##### 3. DDH マイコバクテリア法

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 (以下、DDH 法と略す) 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。実験手技はキットに添付されているマニュアルに従って行った。すなわち、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 を添加した。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。これに DNA 標識試薬を添加、混和して、10 分間照射した。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、マイコバクテリウム属菌同定用プレートの各ウエルに 100  $\mu$ 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  $\mu$ L ずつ分注し、発色後 630 nm での吸光度を測定した。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、該当する菌種に決定した。DDH 法で同定できなかった菌種は、16S rRNA の塩基配列より同定を行い、この方法で同定できなかった菌種は、さらに *rpoB* 遺伝子の塩基配列から同定を行った。

##### 4. DNA シークエンス

菌からの DNA 抽出は、プロテナーゼ K・SDS・フェノール・クロロホルム法で行った<sup>3)</sup>。16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析は、Kirschner<sup>4)</sup> 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 130-210 bp) と B (塩基配列 430-500 bp) を含む領域を、primer 263 (5'-TGC ACA

\* 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

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* 東京都健康安全研究センター微生物部

CAG GCC ACA AGG GA-3') と, 285 (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') を用い, 94°C・1分, 60°C・1分, 72°C・1分の 40 サイクルの PCR 反応を行い, 領域の DNA を増幅した. DNA を, Montage PCR Centrifugal Filter Devices (MILLIPORE 社) を用いて精製した後, primer 263, 285, また r325-305 (5'-CCC CAC TGC TGC CTC CCG TAG-3'), p635-655 (5'-CTG GTG TAG CGG TGG AAT GC-3') をシーケンス用プライマーとして用い, Dye Terminator 法でサイクルシーケンスを行い, ABI PRISM310 (Applied Biosystems 社) を用いて, 塩基配列を決め, この塩基配列と各種抗酸菌の塩基配列との相同性をデータベース上で検索し, 菌種を決定した. 16S rRNA 遺伝子の相同性解析で同定困難な菌株は, *rpoB* 遺伝子の解析により決定した. すなわち, Kim<sup>5)</sup> 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, 94°C・1分, 60°C・1分, 72°C・1分を 30 サイクル行ない, *rpoB* 遺伝子を増幅後, MF あるいは MR をシーケンス用プライマーとして用いて, 16S rRNA 遺伝子と同様の方法で塩基配列を決定した.

#### 5. DNA 塩基配列を用いた菌種の同定

DNA シークエンスで得られた 16S rRNA の塩基配列を, RIDOM (<http://www.ridom.de/>) を用いて相同性を検索し, 99%以上の相同性を示すものをその菌種と決定した. 98%以下のものは, *rpoB* 遺伝子の塩基配列について, DDBJ BLAST Search (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>) を用いて, 相同性を検索した. 相同性の高い菌種が認められた場合, その標準菌株の塩基配列情報を The Entrez Nucleotides database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) から取得し, GENETYX (Software development co.) を用いて被検菌株と比較, 解析した.

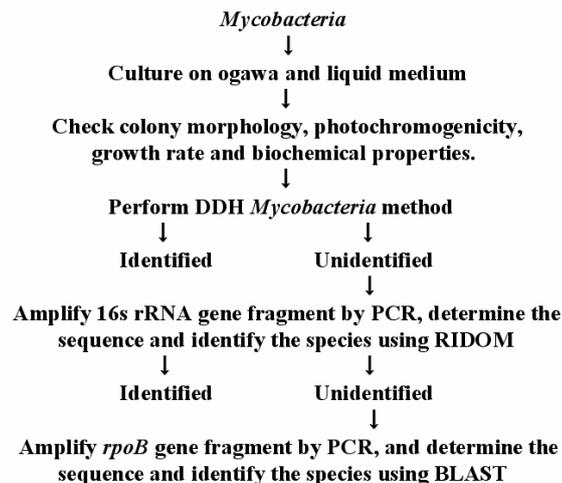


Fig. 1. Flow chart scheme for identification of *Mycobacteria*

#### 結果及び考察

##### 1. 分離株の集落及び生化学的性状並びに DDH マイコバ

#### クテリア法での判定結果

Table 1 に示したとおり, 平成 12 年度から 16 年度の間, 当研究室においてヒトの検体より分離された非結核性抗酸菌 38 株のうち, 小川培地上での集落の性状, 生化学的性状並びに DDH 法で同定できたものは 32 株であった. そのうち最も多いのが, *M. avium* で 16 株, *M. gordonae* 5 株, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum* がそれぞれ 3 株, *M. nonchromogenicum*, *M. xenopi* がそれぞれ 1 株ずつあった. 同定できなかった株は 6 株で, それぞれ患者 1, 患者 2 由来の 3 株ずつであった.

Table 1. Number of Strains of *Mycobacteria* Isolated from 2000 to 2004

Species	Number of strains
<i>M. avium</i>	16
<i>M. gordonae</i>	5
<i>M. kansasii</i>	3
<i>M. chelonae</i>	3
<i>M. scrofulaceum</i>	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	1
<i>M. xenopi</i>	1
Identification is impossible	6

Table 2 に示したように, 患者 1 由来の 3 株 (以下 No. 1 株) は, すべて遅発育の暗発色菌で, 集落は S 型, ナイアシン試験陰性, 硝酸塩還元試験陰性, ツイーン 80 水解陰性, ウレアーゼ陰性であった. 患者 2 由来の 3 株 (以下 No. 2 株) はすべて遅発育の光発色菌で, 集落は S 型, ナイアシン試験陰性, 硝酸塩還元試験陽性, ツイーン 80 水解陽性, ウレアーゼ陽性であった.

Table 2. Colony Morphology and Biochemical Properties of Strain No.1 and No.2

	No. 1	No. 2
Colony morphology	S	S
Photochromogenic	scotochromogenic	photochromogenic
Growth	slow	slow
Niacin	-	-
Nitrate reduction	-	+
Tween hydrolysis	-	+
Urease	-	+

S, smooth

Table 3 に示すとおり, No. 1 株は DDH 法では, *M. triviale* に対してもっとも高い吸光度を示したが, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. nonchromogenicum*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum* の各菌種と 70%以上の相対類似度を示したため, 判定不可であった. No. 2 株は, DDH 法では *M. kansasii* に対してもっとも高い吸光度を示したが, *M. avium*, *M. gastri* の各菌種と 70%以上の相対類似度を示し, この株も判定不可であった. 対照として用いた BCG は *M. bovis* 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。

Table 3. Relativity Resemblance Degree in DDH method (%)

Species	No. 1	No. 2	Control(BCG)
<i>M. bovis</i>	30.1	55.9	100.0
<i>M. kansasii</i>	-	100.0	-
<i>M. marinum</i>	31.3	38.9	-
<i>M. simiae</i>	38.6	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	44.6	-	-
<i>M. gordonae</i>	-	-	-
<i>M. szulgai</i>	66.3	50.9	-
<i>M. avium</i>	73.5	70.8	-
<i>M. intracellulare</i>	95.2	43.9	-
<i>M. gastri</i>	-	93.3	-
<i>M. xenopi</i>	-	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	73.5	-	-
<i>M. terrae</i>	45.8	30.2	-
<i>M. triviale</i>	100.0	35.7	-
<i>M. fortuitum</i>	81.9	-	-
<i>M. chelonae</i>	68.7	31.9	-
<i>M. abscessus</i>	-	-	-
<i>M. peregrinum</i>	74.7	-	-

-: A relativity resemblance degree is under 30%

## 2. 16S rRNA 並びに *rpoB* 遺伝子の相同性

No. 1 株及び No. 2 株の、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、RIDOM で検索した。Table 4 に、相同性の高かった 4 菌種を示した。No. 1 株は、*M. lentiflavum* に 97.7% と最も高い相同性を示したが、99% 以上の相同性は示さず、16S rRNA 遺伝子の解析のみでは同定不可能であった。No. 2 株は *M. kansasii* 並びに *M. gastri* の両菌種に 99.5% と高い相同性を示し、コロニーの性状も本菌と一致したことから、*M. kansasii* と考えられた。

Table 4. Homology of 16S rRNA Sequence (%)

No. 1		No. 2	
<i>M. lentiflavum</i> (DSM44418)	97.7	<i>M. kansasii</i> (DSM44162)	99.5
<i>M. lentiflavum</i> (ATCC51988)	96.5	<i>M. gastri</i> (DSM43305)	99.5
<i>M. simiae</i> (Borste8875/99)	96.5	<i>M. kansasii</i> (Borste10492/98)	99.0
<i>M. interjectum</i> (ATCC51457)	96.4	<i>M. kansasii</i> (Borste539/99)	99.0

そこで、*rpoB* 遺伝子の塩基配列約 330 塩基対を解析し、DDBJ BLAST Search で検索した。Table 5 に No. 1 株及び No. 2 株と相同性の高かった菌種を示した。No. 1 株は、*M. lentiflavum* と 100%、No. 2 株は、*M. kansasii* と 100% の相同性を示した。これらの結果と、集落並びに生化学的性状から、No. 1 株は、*M. lentiflavum*、No. 2 株は、*M. kansasii*

と同定された。

Table 5. Homology of *rpoB* Sequence (%)

No. 1		No. 2	
<i>M. lentiflavum</i> (CIP105465)	100.0	<i>M. kansasii</i> (CIP104589)	100.0
<i>M. triplex</i> (CIP106108)	96.0	<i>M. kansasii</i>	100.0
<i>M. avium</i>	95.0	<i>M. parascrofulaceum</i>	93.0
<i>M. interjectum</i>	94.0	<i>M. haemophilum</i>	92.0

## ま と め

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使われている。一方、本報で報告した *M. lentiflavum* のように、ごくまれに分離される菌種で、このキットでは同定できない抗酸菌の菌種がある。また、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が報告されている<sup>6)</sup>。本報で報告した No. 2 株のように、培養性状並びに、生化学的成績から、*M. kansasii* と考えられるが、DDH 法では、*M. avium*、*M. gastri* と強く反応し、判定不可能となった菌株も存在する。今回、我々は 16S rRNA と *rpoB* 遺伝子の解析により、DDH 法で同定不可能であった *M. lentiflavum* 並びに、*M. kansasii* を同定することができた。今後 DDH 法では判定不可能となるような他の菌株に対して本法による同定を試み、その有用性を評価したうえで、日常の検査に活用していく予定である。

## 文 献

- 1) 新結核菌検査指針 2000 第 5 章 抗酸菌の同定 : 43-77, 2000, 日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会編, 東京.
- 2) 山崎利夫, 高橋 宏, 中村玲子 : 結核, **68**(1), 5-11, 1993.
- 3) 向川 純, 遠藤美代子, 柳川義勢, 他 : 感染症学雑誌, **77**, 1040-1048, 2003.
- 4) Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U *et al* *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2882-2889, 1993.
- 5) Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A. *et al* : *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1714-1720, 1999.
- 6) Kusunoki, S., Ezaki, T., Tamesada, M., *et al* : *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1596-1603 1991.