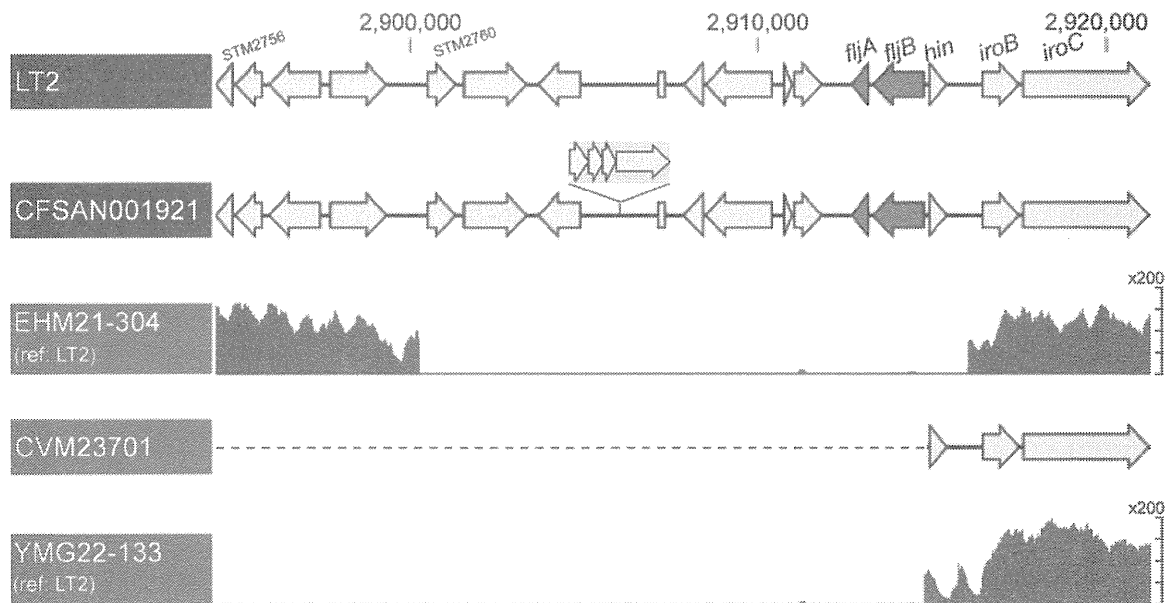


図1 次世代シーケンサーによって示された愛媛株(EHM21-304)山口株(YMG22-133)の第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域の欠失



愛媛株(EHM21-304)山口株(YMG22-133)から次世代シーケンサーによって得られた塩基配列のショートリードを、*S. Typhimurium* LT-2 ゲノムの塩基配列を基に配列した。*S. Typhimurium* CFSAN001921は、登録されている中で最もEHM21-304と近縁のゲノム配列をもつ株である。

第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域を示す。S. 4,[5],12:l:- のうち、本研究以前に唯一ゲノム解析がされていたCVM23701株では、*fljA/B*を含む76個の遺伝子の広範な欠失が認められるが、*hin*は存在していた。YMG22-133株はCVM23701株と似た欠失パターンを示した。

一方、EHM21-304株は、*fljA/B*、*hin*を含む11個の遺伝子が欠失することが明らかにされた。

```

1  GCTACCAATTGCCGCCTTTTCCATGAGAT STM2759 ATATGTCATTCCCTTTGCTGCATCACTGGA 70
71  TGGAAATTTGCGACTGAGAAGTCATTTAC AATACGCTGGGATGGCCGGATTTGAGCCA 140
141  ACTTTGGCTCGAATAATGCTACGCCCCGAAAAGCTCGCTAAAGGGCCTTTAAAGGCCTTTAAGGGTAAGG 210
211  GAGATAAGTGCGCCATTGTGGCTGTCAATTCGTTTTGTTTAGCTCTTCCTGATTTTTCTTCTTGCCCTGGGA 280
281  GAACTGGC LT2とI塩基違い TGGATCCAGAGGAGCTGCGTCCGGCATCAGAGTAACATTCCGCATGG 350
351  TGGGTTAGATCATTCTGCATACCCAATTCTGTTCGTTTAAAGTATTTTAGGTACGGCTGAGATAGCGTGGT 420
421  TTGAACCATCAGAACAATTTAAAATCTACACCCGCAAAGGCTCGCTTTAGCGAGCCTTTGCGGGCGGCATT 490
491  TCTGGATAAATTATCCATGAAAGCCTCACCAGAGATGTAAAAGAATCCTTCCTGCCGCGGCATTCTCTGGA 560
561  CAATATTTTCCCAATCTTCTGATGCTCATGAAACCCGATACTGCATCATGATAATAAAGTTATTTATTAT 630
631  CAATGAATTATGCGGATTAATCAGCTTGACCATCGCATCAACAATGCTATTTTTACGGTAACTGCCGCA 700
701  GTCCTGGGACTGCACCCGAGACAGCCACGACCTTAGAGGACTGTGCCTGGCTGCTATGTCAGGTTGGTCA 770
771  AGCCCTTAACCCGCAAGCCGGACAATACGGCGGGGGCGTCTCTGACGCAGTCCGGTCTGTTGCTGCT 840
841  ATAACCTGTGCCAGTAAGAGGCAGGTTGGTACCGCCTCTTTAGACGGAGCGTATCTCTGCGCCAGTAAAC 910
911  AGGTTGCCTGAAACGGCGGCGCTCACTTTGGAGGCGAAGCAAAACAAGTGACGCCGACGCACACCGCT 980
981  GCGCCAGCCGCCGTCTTATCAGGCTTATCGTTGTATTAACCCTCTGACGCCATCATTTCTGCGTCAAAAA 1050
1051  GATAACAAGGAGGAATGAACAGTACCGGAGGCGGACCACGACGATCCGGGGGCATCCCTGCTGAGGCAGG 1120
1121  CGGCCTGCACACCGTGCAGTACCGTACCCACCAGGCACTGTTGCAAAGTTAGCGATGAGGCAGCCTTTT 1190
1191  GTCTTATTCAAAGGCCTTACATTTCAAAAACCTCTGCTTACCAGGCGCATTTTCGCCAGGGGATCACCATA 1260
1261  ATAAAATGCTGAGGCCTGGCCTTTGCGTAGTGCACGCATCACCTCAATACCTTTGATGGTGGCGTAAGCC 1330
1331  GTCTTCATGGATTTAAATCCCAGCGTGGCGCCGATTATCCGTTTCAGTTTGCCATGATCGCATTCATCA 1400
1401  CGTTGTTCCGGTACTTAATCTGTCCGTGTTCAACGTCAGACGGGCACCGGCCTTCGCGTTTGAGCAGAGC 1470
1471  AAGCGCGGACCATAGGCGGGCGCTTTA IS26 (820 bp) TCGCGGGATCTGCCACTTCTTCACGTTG 1540
1541  TTGAGGATTTTACCCAGAAACCGGTATC CGACGGGAGGAGAGATAAAAAATCGACAG 1610
1611  TGCGGCCCCCGCTGTGACGCCCCGTACAGATACGCCAGCGGCCATTGACCTTCACGTAGGTTTCATC 1680
1681  CATGTGCCACGGCAAAGATCGGAAGGGTTACGCCAGTACCAGCGCAGCCGTTTTTCCATTTGAGGCGCA 1750
1751  TAACGCTGAACCCAGCGGTAATCGTGGAGTGATCGACATTCACTCCGCGTTCAGCCAGCATCTCCTGCA 1820
1821  GCTCACGGTAACTGATGCCGATTTGTCAGTACCAGCGTACGGCCACAGAATGATGTCACGCTGAAAATG 1890
1891  CCGGCCTTTGAATGGGTTTATGTGCAGCTCCATCAGCAAAAGGGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTA 1960
1961  TTTGCAACAGTGCCATCAATACTACTCCCTACGTTTCCCGTTACCTTGCTGTCCGTACGTTTACCTCATT 2030
2031  GTCTGAAAGGTTATTTGCGAAGTTATCATTATAATAATCCACGGGCGTCTGGTATGCGAATCCAGTTCCCA 2100
2101  ATCCTGGCGCTTTGCCTGTGCGACCATACGCGCGTAAATAAGCCTGAAACCAAACCTCACCAGCTTAACGC 2170
2171  TCTCATCTTCCCGATTTTTACGCAAAAAATCATCACATGATCAAGTGTATATTAGTTATTGCATTTTA 2240
2241  CAAATGATATTGGTAATTATTATCATTCTCATTAACTGTTTCGATTTATGACGTGGAGAGAGAGGAT 2310
2311  TTCTCATGCGTATTCTGTTTGTCCG SCTATACCCTGTGCTGTCTCTGGCGCA 2380
2381  AGCGTTTCGTGTTAATGGCCATGAA iroB (STM2773) GGCAAATTTGCACAGAAAGCAGCCG 2448

```

図2 EHM21-304 ΔfljAB sequence (2,448 bp)

forward primer を STM2759 上に, reverse primer を *iroB* 上に設計し、得られた増幅産物 2,448 bp* の塩基配列を決定した (primer は下線)。その結果、*Salmonella* Typhimurium LT2 (AE006468) の 2,900,321 ~ 2,916,035 (15,715 bp)、STM2760 ~ *hin* (STM2772) までが欠失し、代わりに IS26 (820 bp) が挿入されていることがわかった。

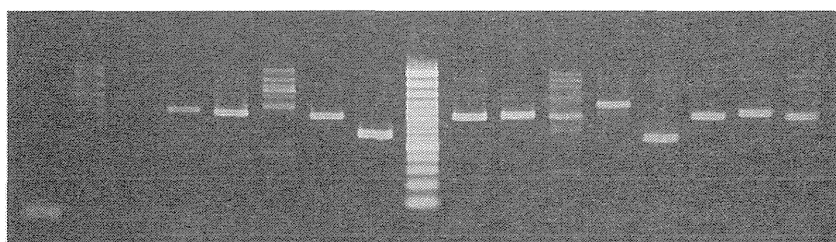
表1 多剤耐性プラスミドpSO4-21-304のgap fillingのためのプライマー

No.	Product	F primer	R primer	size
1	1-8	s1_168360F	s8_187R	ND
2	1-8RC	s1_168360F	s8_6235F	2,217
3	8-1	s8_6235F	s1_324R	ND
4	8RC-1	s8_187R	s1_227R	989
5	1-7099	s1_6897F	s1_7532R	941
6	1-42099	s1_41779F	s1_42600R	(822)
7	1-43056	s1_42875F	s1_43517R	(643)
8	1-91975	s1_91746F	s1_92227R	(482)
9	1-97405	s1_97226F	s1_97880R	(655)
10	1-105707	s1_105408F	s1_106067R	(588)
11	1-134128	s1_133986F	s1_134667R	(682)
12	1-139302	s1_139097F	s1_139937R	(841)
13	1-141498	s1_141346F	s1_141780R	(435)
14	1-141915	s1_141762F	s1_142353R	(592)
15	8-1011	s8_802F	s8_1526R	(725)
16	8-3183	s8_3027F	s8_3682R	(656)

図3 表1のプライマーを用いたPCRアンプリコン

A

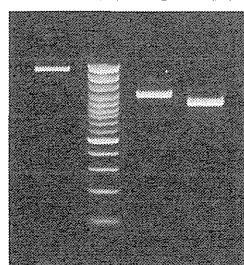
1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16



PrimeSTAR MAX
polymerase (TKR)

98°C、10s
55°C、5s 30cycles
72°C、10s

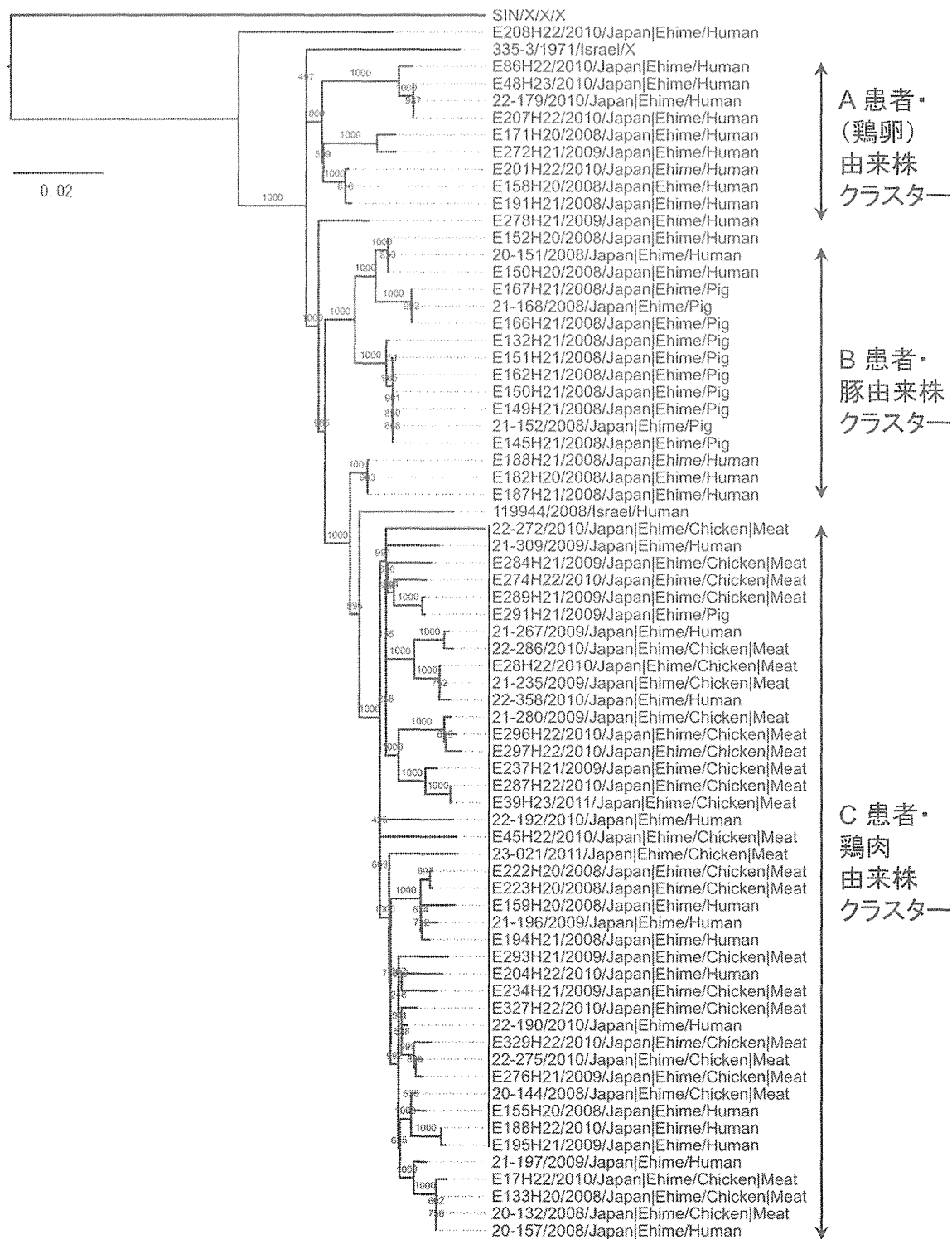
B 2 M 6 11



PrimeSTAR MAX
polymerase (TKR)

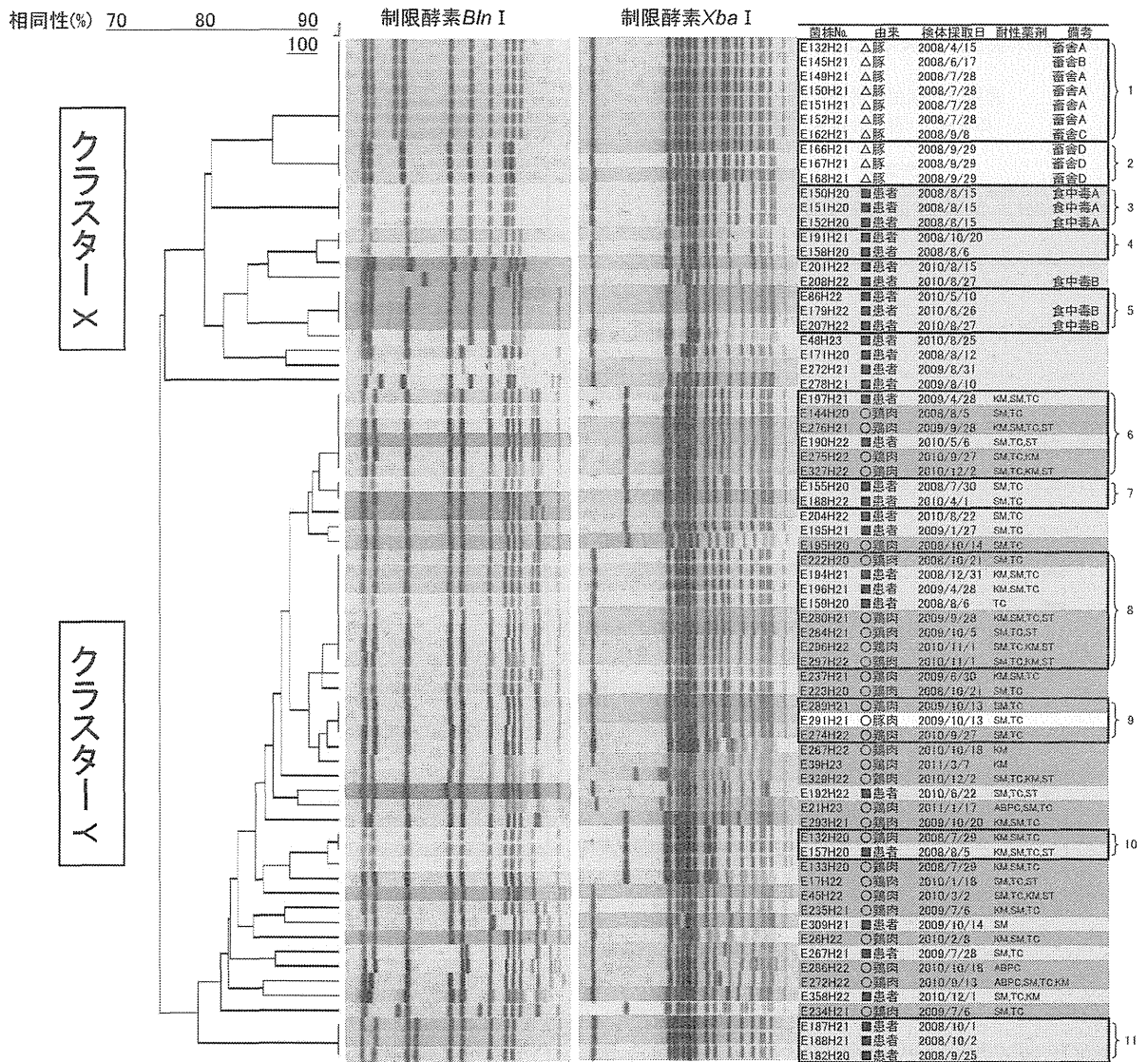
98°C、10s 30cycles
70°C、30s

図5 愛媛県内で患者、食材、家畜から分離された*S. Infantis*の次世代シーケンサーを用いたゲノム解析に基づく系統解析



(参考資料) 図6 S. InfantisのPFGE 解析(Bln I, Xba I複合解析)

(同一パターンを示したグループを太線1~11で表記)



材料と方法

菌株: *Salmonella* serovar 4,5,12:i:- 株は愛媛県と山口県でそれぞれ分離され、Kauffmann-Whiteの様式で分類された。

薬剤感受性試験: 抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づいて実施した。

DNA塩基配列決定: 愛媛株と山口株のゲノム、および多剤耐性を示した愛媛株のプラスミドを抽出し、ライブラリを作成後、Illumina MiSeqでシーケンスし、得られたリードの *de novo* アセンブリを実施した。プラスミド塩基配列のギャップは、特異的プライマーペアを用いたPCR後、通常のシーケンサーで決定した。

系統解析: NGSゲノム解析により得られたSNPsを用いて、RAxML (最尤法, bootstrap 1000回)により実施した。

O4型別不能株(EHM21-304)の性状

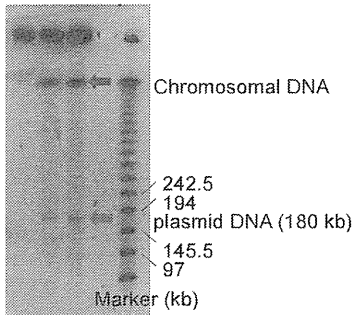
1. O抗原がO4、H抗原の1相が*i*、2相が決定不能の、*Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- (以下、S. 4,5,12:i:-)である。
2. ABPC, CP, SM, GM, SUL, TC, NA, CTX, CAZ の9剤に対して耐性であるESBL (基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ)産生菌である。



NGS解析で、より詳しい性状を明らかにする

S1 nuclease:

0 5 20 (U/plug)



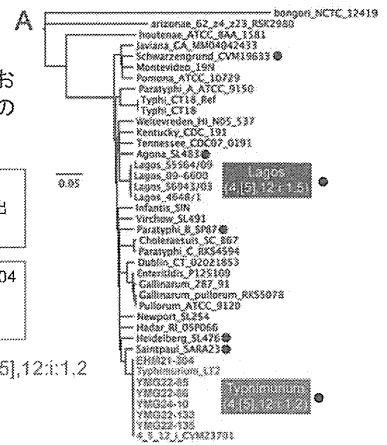
Isolation of chromosomal and plasmid DNA from the *S. enterica* serovar 4,5,12:i:- EHM21-304 strain via PFGE.

Salmonella 4,5,12:i:- 愛媛株および山口株ゲノムの系統解析 (A)

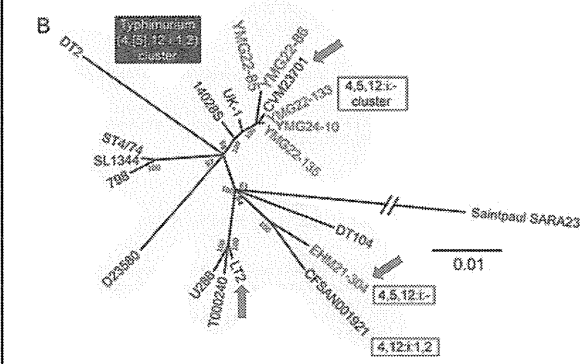
SNPs系統解析
•468,998 SNPs抽出
•RAxML (最尤法)

愛媛株 = EHM21-304
山口株 = YMG
● = O4 group

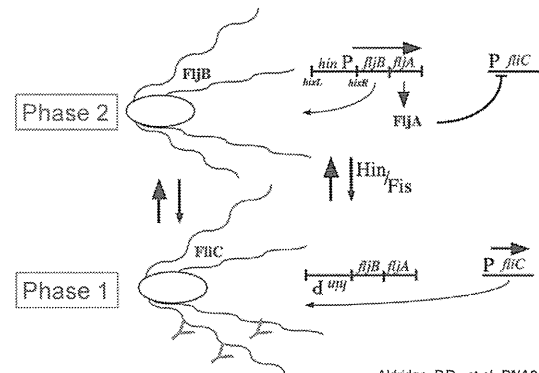
S. Typhimurium 4,[5],12:i:1.2 からの変異



Salmonella 4,5,12:i:- 愛媛株および山口株ゲノムの系統解析(B) ~ S. Typhimurium との比較 ~

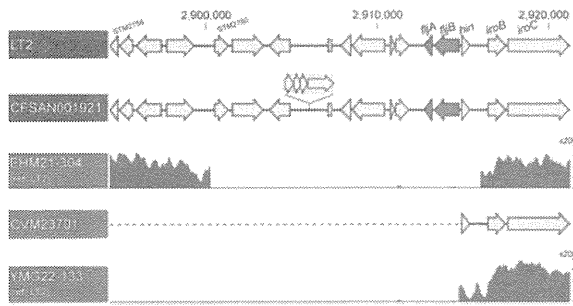


サルモネラ鞭毛抗原の相変異機構

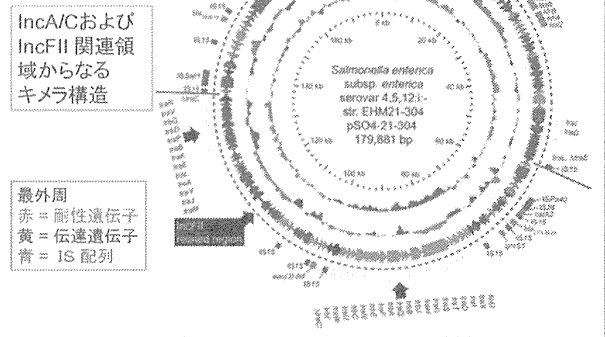


Aldridge, P.D., et al. *PNAS* 2006

愛媛株(EHM)および山口株(YMG)の第2相鞭毛抗原関連遺伝子領域の欠損



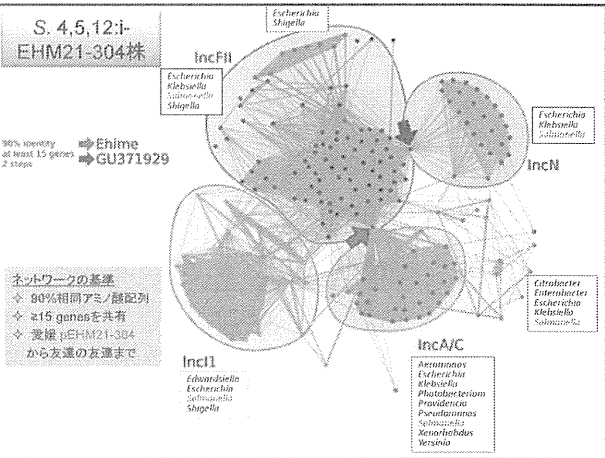
EHM21-304株由来多剤耐性プラスミドの遺伝子構造



EHM21-304株由来プラスミドpSO4-21-304の特徴

IncA/C 関連領域	耐性遺伝子	<i>bla</i> TEM-1b, <i>floR</i> , <i>tetA</i> / <i>tetR</i> , <i>strB</i> / <i>strA</i> , <i>sul2</i>
	伝達性遺伝子	<i>traD</i> , <i>traF</i> , <i>traG</i> など7個
	IS 配列	IS15, IS26, ISVsa3 など
IncFII 関連領域	耐性遺伝子	<i>catA</i> , <i>bla</i> CTX-M-55, <i>qnrS1</i> , <i>aac(3)-IId</i>
	伝達性遺伝子	<i>traR</i> , <i>traV</i> , <i>traY</i> など34個
	IS 配列	IS15, IS26, ISPa40 など

pSO4-21-304は、IncA/CとIncFIIからなるキメラ構造を有し、宿主域の広いIncA/Cと接合伝達能の高いIncFIIの特性を併せ持つことが示唆される。



まとめ

1. NGSゲノム解析による系統解析を実施し、分離S. 4,5,12:i- 株がS. Typhimuriumと近縁であることを明らかにした。
2. 全ゲノム解析が実施されているS. 4,5,12:i- CVM23701株と比較すると、愛媛株は異なるが山口株は近縁で、地域的に異なるS.4,5,12:i-の存在が示された。
3. 第2相H抗原に関する*fliB*(phase 2 flagellin)、*fliA*(repressor of phase 1 flagellin gene)等の遺伝子が存在する領域を解析し、愛媛株の遺伝子欠失パターンが、これまで報告のあったものとは異なることを明らかにした。
4. 愛媛株は7種の抗菌剤に耐性を示したが、そのプラスミドは179,881 bpからなる不和合性群Inc A/C repliconで、220個のORFsを含み、そのうち約100個は既知の遺伝子であった。このなかには、CTX-M-55を含む多くの薬剤耐性遺伝子のほか、遺伝子の接合伝達に関わる遺伝子も多く存在した。
5. これらの結果は、NGSゲノム解析がサルモネラ属菌の高精度同定や分子疫学解析において極めて有用であり、感染症対策に重要な分子基盤を提供していることを示している。

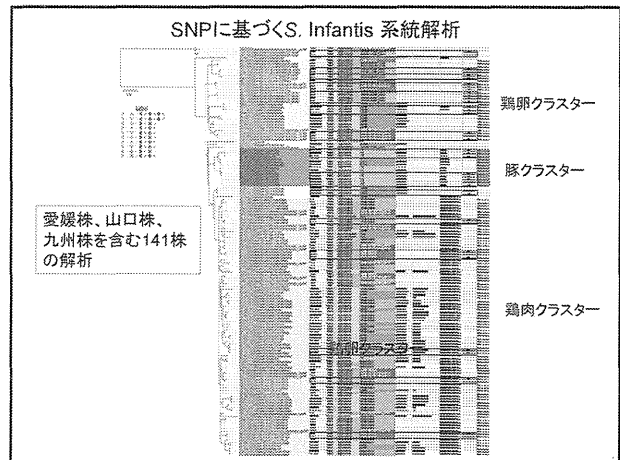
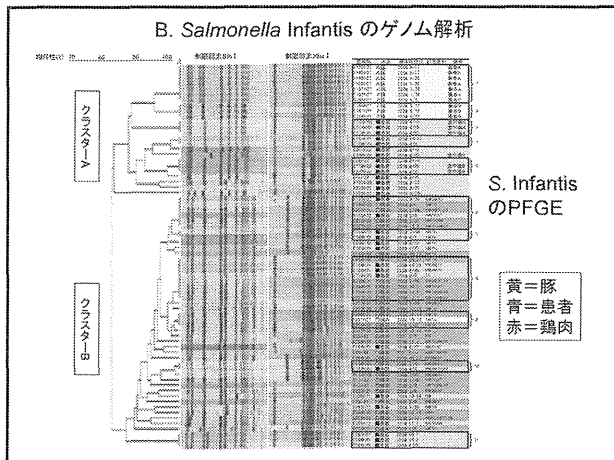
成果発表

学会発表
Salmonella enterica serovar 4:i- 株の次世代シーケンサーによるゲノム解析
 島谷竜哉, 関塚剛史, 山下明史, 黒田 誠, 野村恭晴, 讀 恒明, 仙波敬子, 宮本仁志, 四宮博人
 第67回日本細菌学会中国四国支部総会(徳島) 2014. 10.4-5

Characterization of genomic structures and multidrug resistances of *Salmonella* 4,5,12:i- isolates.
 Tatsuya Karasudani, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Makoto Kuroda, Komei Shirabe, Keiko Semba, Chizuko Kimura, Yasuharu Nomura, Hitoshi Miyamoto and Hiroto Shinomiya
 第88回日本細菌学会総会(岐阜) 2015. 3. 26-28 (予定)

論文発表
 地方衛生研究所における細菌学的検査・研究の最新事情
 四宮博人, 勢戸和子, 川瀬 遼, 有川健太郎, 松渡川圭次, 鈴木匡弘, 久保田寛顕, 讀 恒明
 日本細菌学雑誌 印刷中

Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i- isolates from Japan reveals a notable deletion in the *fliAB* operon and an IncA/C plasmid encoding CTX-M-55 extended-spectrum β -lactamase
 Tatsuya Karasudani, Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Makoto Kuroda, Komei Shirabe, Keiko Semba, Chizuko Kimura, Yasuharu Nomura, Hitoshi Miyamoto and Hiroto Shinomiya
 Submitted



SNP系統解析から示唆されること

全体の比較

- ◆ 薬剤耐性株は、1つのクラスターに含まれる。
- ◆ 豚由来株は、1つのクラスターを形成し、畜舎でまとまっている傾向。
- ◆ 鶏卵由来株と鶏肉由来株は、それぞれクラスターを形成する傾向。

細かな菌株同士の比較

- 20-157 (ヒト由来) および 20-132 (鶏肉由来) のSNVが一致。20-132株に非常に近い株に汚染された鶏肉が原因食の可能性高い
- 22-286 (鶏肉由来) および 21-267 (ヒト由来) が近い系統で、22-286株が存在していた鶏と同じ鶏舎由来のものから感染した可能性がある。
- E28H22 (鶏肉由来)、21-235 (鶏肉由来) および 22-358 (ヒト由来) が近い系統で、E28H22 および 21-235株が存在していた鶏と同じ鶏舎由来のものから感染した可能性がある。

来年度の予定(案)

1. サルモネラ株の解析を進展させる(株数、種類)
2. 薬剤耐性菌での解析(来年度から別研究課題として薬剤耐性菌株を収集・保管する予定)
3. ウイルスでの応用(メタゲノム解析など)

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号ページ	出版年
Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Singh H, Suda Y, Shirabe K, Toda S, Shimazu Y, Nomachi T, Gokuden M, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Uramoto M, Osako H, Kida K, Takimoto H, Kitamoto H, Terasoma F, Honda A, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M.	Phylogenetic and Geographic Relationships of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome Virus in China, South Korea, and Japan.	J Infect Dis.	In press	2015
Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H.	Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C.	Sci Rep.	2;5:8185.	2015
Kawase J, Kurosaki M, Kawakami Y, Kashimoto T, Tsunomori Y, Sato K, Ikeda T, Yamaguchi K, Watahiki M, Shima T, Kameyama M, Etoh Y, Horikawa K, Fukushima H, Goto R, Shirabe K.	Comparison of two methods of bacterial DNA extraction from human fecal samples contaminated with <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i>	Jpn J Infect Dis.	67(6):441-6.	2014

	<i>Typhimurium</i> , and <i>Campylobacter jejuni</i> .			
Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi Takahara M, Morishima T, Ichiyama T.	Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection.	Cytokine	69(2):206-10.	2014
Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H.	Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1.	Infect Genet Evol.	28:183-91.	2014
Saraya T, Kurai D, Nakagaki K, Sasaki Y, Niwa S, Tsukagoshi H, Nunokawa H, Ohkuma K, Tsujimoto N, Hirao S, Wada H, Ishii H, Nakata K, Kimura H, Kozawa K, Takizawa H, Goto H.	Novel aspects on the pathogenesis of Mycoplasma pneumonia pneumonia and therapeutic implications.	Front Microbiol	11;5:410.	2014
Saraya T, Kurai D, Ishii H, Ito A, Sasaki Y, Niwa S, Kiyota N, Tsukagoshi H, Kozawa K, Goto H, Takizawa H.	Epidemiology of virus-induced asthma exacerbations: with special reference to the role of human rhinovirus.	Front Microbiol	26;5:226.	2014
Niwa S, Tsukagoshi H, Ishioka T, Sasaki Y, Yoshizumi M, Morita Y, Kimura H, Kozawa K.	Triplex real-time polymerase chain reaction assay for detection and quantification of	Microbiol Immunol	58(1):68-71.	2014

	norovirus (GI and GII) and sapovirus.			
Watahiki M, Isobe J, Kimata K, Shima T, Kanatani J, Shimizu M, Nagata A, Kawakami K, Yamada M, Izumiya H, Iyoda S, Morita-Ishihara T, Mitobe J, Terajima J, Ohnishi M, Sata T.	Characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan.	J Clin Microbiol	52(8):2757-63	2014
Isobe J, Shima T, Kanatani J, Kimata K, Shimizu M, Kobayashi N, Tanaka T, Iyoda S, Ohnishi M, Sata T, Watahiki M.	Serodiagnosis using microagglutination assay during the food-poisoning outbreak in Japan caused by consumption of raw beef contaminated with enterohemorrhagic Escherichia coli O111 and O157.	J Clin Microbiol	52(4):1112-8.	2014
Iwata-Yoshikawa N, Uda A, Suzuki T, Tsunetsugu-Yokota Y, Sato Y, Morikawa S, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Nagata N.	Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine.	J Virol.	88(15):8597-614.	2014
Murayama Y, Masujin K, Imamura M, Ono F, Shibata H, Tobiume M, Yamamura T, Shimozaki	Ultrasensitive detection of PrP(Sc) in the cerebrospinal fluid and blood of macaques	J Gen Virol.	95(Pt11):2576-88.	2014

N, Terao K, Yamakawa Y, Sata T.	infected with bovine spongiform encephalopathy prion.			
Mine S, Suzuki K, Sato Y, Fukumoto H, Kataoka M, Inoue N, Ohbayashi C, Hasegawa H, Sata T, Fukayama M, Katano H.	Evidence for human herpesvirus-6B infection of regulatory T-cells in acute systemic lymphadenitis in an immunocompetent adult with the drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: a case report.	J Clin Virol.	61(3):448-52.	2014
Kanoh M, Maruyama S, Shen H, Matsumoto A, Shinomiya H, Przybilla K, Gouin E, Cossart P, Goebel W, Asano Y.	Listeria arpJ Gene Modifies T Helper Type 2 Subset Differentiation.	J Infect Dis.	In press	2015
Yamaguchi S, Suzuki T, Kobayashi T, Oka N, Ishikawa E, Shinomiya H, Ohashi Y.	Genotypic analysis of Pseudomonas aeruginosa isolated from ocular infection.	J Infect Chemother.	20(7):407-11.	2014

