

MLST を利用した *Bacillus subtilis* 変敗品分離株の系統解析

遠田 昌人

Phylogenetic Analysis of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Spoiled Foods and Drinks by Multilocus Sequence Typing

Atsuhito Enda

Bacillus subtilis is a typical causal sporeformer of spoilage on packaged foods and drinks. *B. subtilis* is widely distributed throughout the natural environment, particularly in soil, water and food raw materials.

Besides the wide distribution, heat resistance of *B. subtilis* spore is various in strains, therefore heat resistance measurement and assessment are required for determination the cause of spoilage by *B. subtilis*. Accordingly, genetic profiling of *B. subtilis* strains on heat resistance by MLST (Multilocus Sequence Typing) method was attempted for rapid investigation.

A MLST scheme constructed using seven genes, *aroE*, *dtdS*, *murI*, *sodA*, *tkl*, *xpt* and *yqiL*, revealed a relationship between genetical types and heat resistance of spores.

Heat resistant strains made a clade in phylogenetic tree and some sequence type (ST) were found to cause spoilage repetitively.

Key words: spore, heat resistance, MLST, *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis は菌株によっては芽胞の耐熱性が高く、レトルト殺菌後も生残して容器包装詰食品の変敗を引き起こす場合がある¹⁾。また同時に *B. subtilis* は土壌、用水といった環境や種々の食品原料に広く分布しており²⁾、その多くは 100℃以上での高温殺菌に耐えるほどではないものの、殺菌工程における冷却時の吸い込みによる二次汚染の原因ともなる。

通常、容器包装詰食品の変敗事故における原因調査では、原因菌を分離し、菌種を同定することで変敗事故の原因推定が可能な場合が多いが、原因菌が *B. subtilis* である場合は芽胞の耐熱性分布が広いいため、実際に芽胞を調製して耐熱性試験を行い、その結果に基づいて原因を推定する必要があり、迅速な原因推定がむずかしい。

そこで、主に食中毒菌で発展しているフィンガープリンティング法のひとつである Multilocus Sequence Typing (MLST)³⁾ を *B. subtilis* に適用し、遺伝子解析に基づいたタイピングによる系統と芽胞耐熱性との関連性を調査した。

実験材料および方法

(1) 使用菌株

変敗食品あるいは食品製造環境から分離し、当所で保存していた *B. subtilis* subsp. *subtilis* を用いた。菌株の詳細については表 1 に示した。芽胞耐熱性は分離時に測定したもので、芽胞懸濁液は、100 ppm MnSO₄ 添加普通寒天培地 (Nutrient Agar; NA) の平板培地にて 35℃ 1 晩、静置培

養し、菌体を掻き取り、リン酸生理緩衝食塩水 (Phosphate Buffered Saline; PBS) で 2 回遠心洗浄後、PBS に再懸濁して調製した。芽胞懸濁液の 1 ml を小型試験管に熔封して、オイルバス中で加熱、冷却後、標準寒天培地 (Standard Method Agar; SMA) の平板に混釈、35℃ で 48 時間培養後、出現したコロニーから生残菌数を計数して、D 値を算出した。

(2) 塩基配列解析

B. subtilis の MLST において対象候補遺伝子の増幅および塩基配列解析に使用したプライマーの配列を表 2 に示した。これらのプライマーは NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov) に登録されている塩基配列に基づいて Primer3 ソフトウェア⁴⁾ を用いて作成した。

SMA 平板培地表面に塗抹接種し、35℃ で一晩培養した後、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として、ExTaq (TaKaRa) キットを用いて PCR を行った。増幅産物のダイレクトシークエンシング反応は DTCS QuickStartKit (Beckman Coulter) を用いた。シークエンシング反応後の産物はエタノール沈殿による精製の後、DNA シークエンサー CEQ 8000 (Beckman Coulter) を用いて塩基配列を解析した。塩基配列解析は 5'-側および 3'-側の両方向について行い、それらを統合してコンティグ配列として以後の解析に用いた。

表1 使用菌株

菌株	由来	芽胞耐熱性
TIFT 111005, 11106, 11107, 111008, 111015	充填環境	—
TIFT 111016	カップ詰 (デザート類)	D ₁₂₀ 1.5 (min)
TIFT 111017	缶詰 (ソース類)	D ₁₁₅ 0.7 (min)
TIFT 111018	缶詰 (スープ)	D ₁₂₀ 1.5 (min)
TIFT 111019	缶詰 (スープ)	D ₁₁₀ 7.5 (min)
TIFT 111020	缶詰 (飲料)	D ₁₁₅ 2.2 (min)
TIFT 111021	パウチ詰 (デザート類)	D ₁₁₀ 6.9 (min)
TIFT 111022	パウチ詰 (デザート類)	D ₁₁₅ 3.4 (min)
TIFT 111023	パウチ詰 (デザート類)	D ₁₁₀ 3.9 (min)
TIFT 111024	パウチ詰 (デザート類)	D ₁₁₀ 2.1 (min)
TIFT 111025	包装資材	—
TIFT 111026	製造環境	—

表2 MLST 対象候補遺伝子の増幅プライマー

遺伝子	Forward プライマー	Reverse プライマー	産物 (bp)
<i>aroE</i>	AAAAATGGGGCTAAAATCG	CATCAATTAACCGGAATG	551
<i>tdtS</i>	AATGGGCACGTCAGAGAATC	GCAAGCCTCAGCCTGTATTC	466
<i>murI</i>	TAACCGTTGCGAAGGAAATC	AGAAACTCCCCTTTCCAC	427
<i>sodA</i>	AGAACCGCATATCGACAAGG	GATAGGCGTTTTGCCTTCTG	436
<i>tkt</i>	TGTACGTGAATTTGCGATGG	GAAGGCATGCTGACAACAGA	537
<i>xpt</i>	CCAAATTGATCCGCTGCTTA	ATCTCTCCCGGCTGAAATG	406
<i>yqiL</i>	CTTCGCGCTGTCACTTTATG	CGAGCTGATCCAGACTTGTG	415

結果および考察

(1) MLST 系の構築

MLST で用いる遺伝子には, (1) その領域が全ての菌株に存在し, (2) 大きな挿入, 欠失がなく安定している, (3) 菌株同士が識別可能な程度に塩基置換を含み,かつ (4) その変異がアミノ酸置換を伴わない中立的な変異であること, また (5) 遺伝子同士が互いに十分に離れていて, 同時に転位しないことが望ましい。

NCBI のゲノムデータベースを用いた予備的調査の結果, *aroE* (5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase), *tdtS* (L-threonine 3-dehydrogenase), *murI* (Glutamate racemase), *sodA* (Superoxide dismutase), *tkt* (transketorase), *xpt* (xanthine phosphoribosyl transferase) および *yqiL* (acetyl-CoA acetyltransferase) の7つの遺伝子を MLST で対象とする遺伝子として選抜した。これらの遺伝子の特性について表3に示した。最も多型塩基の割合が高かった *yqiL* で7.5%と, いずれの遺伝子も多型は多くなかったが, 菌株間識別には十分可能な範囲と考えられた。多型塩基の

うち, 翻訳された際にアミノ酸レベルでの置換となる変異と, アミノ酸配列に影響しない変異との割合を示すパラメータである dN / dS を START2⁵⁾ プログラムを用いて計算したが, いずれの遺伝子も0.2を下回り, 中立的な変異の割合が高く, MLST で用いる遺伝子として適合するものと評価した。また, 7遺伝子の相互の染色体における距離も基準株168のゲノムデータにおいては互いに20 kbを超えており, 十分に離れているものと評価し, これら7遺伝子を *B. subtilis* での MLST の対象遺伝子として選定した。

(2) 対象遺伝子の塩基配列解析

16菌株について7遺伝子の塩基配列を解析し, 公開されている6つのゲノム配列データと併せ, 各々の遺伝子について塩基配列を比較し, ユニークな配列をアレル配列データとして収集した。ゲノム配列についてはNCBIに登録されている *B. subtilis* のデータのうち, *B. subtilis* subsp. *subtilis* であることが確実な菌株168 (AL009126), SMY (ABQN01000008), JH642 (ABQM01000008), NC3610

(ABQL01000008), BS_n5 (CP002468) および RO-NN-1 (CP002906) を用いた。

解析した塩基配列はワンパスシーケンスでも解析可能なように、プライマー部からさらに内側 60 塩基を除いた領域を解析対象とした。アレルプロファイル作成には START2 ソフトウェアを用いて MLST データベースを作成し、個々のアレル配列データを登録した。各々の遺伝子のアレル配列データに基づき、ユニークな組み合わせとなるデータを Sequence Type (ST) とした。

プロファイル作成の結果、供試 16 菌株の塩基配列および 6 つのゲノム配列は計 15 の ST に層別された。おのおの ST について各遺伝子のプロファイルを表 5 に示した。

(3) MLST 系を用いた変敗原因菌の系統解析

ゲノムデータ 6 件および 16 菌株について解析した塩基配列のデータから得られた MLST のアレルプロファイルを表 4 に示した。最も多型が多く、アレル数が多くなったのは *dtdS* の 11 アレルで、最も少なかったのは *sodA* および *ikt* の 6 アレルであった。これらのアレルの組み合わせから、計 22 菌株のプロファイルは 15 の ST に収束した。

表 3 MLST の標的遺伝子

遺伝子	塩基多型 (%)	dN / dS	遺伝子座
<i>aroE</i>	4.6	0.1413	2367954
<i>dtdS</i>	6.5	0.1027	1770461
<i>murI</i>	4.0	0.0000	2903217
<i>sodA</i>	2.8	0.0504	2585434
<i>tkl</i>	4.1	0.0644	1921036
<i>xpt</i>	6.1	0.1086	2319440
<i>yqiL</i>	7.5	0.0983	2513815

また、*ikt* の 6 アレルであった。これらのアレルの組み合わせから、計 22 菌株のプロファイルは 15 の ST に収束した。

これらのプロファイルに基づき、各菌株について ST を判定した結果を表 5 に示した。基準株 168 およびその派生株である SMY, JH642, NC 3610 のゲノムデータはいずれも ST 1 となり、また基準株系統とは由来の異なる BS_n5 および RO-NN-1 がおのおの ST 2 および ST 3 として異なる株であることが示された。この結果から、菌株の由来の同一性を本 MLST 系によって系統的に評価できることが確認された。

当所保有株においては ST 4 となった TIFT 111005 および TIFT 11107 は同一の製造環境から同時に分離されており、同一起源であることを示していると考えられた。

ST 9 にグルーピングされた 3 菌株のうち、TIFT 111023 および 111024 は同一事例からの分離菌株であるが、これらとは製造者も発生時期においても全く異なる由来であるにもかかわらず TIFT 111017 株は同一の ST と判定された。この結果はこれらのごく近縁な菌株を含む同じ系統の菌株が繰り返し変敗原因を引き起こしているものと推測された。また、120℃での D 値が 1.5 分と非常に耐熱性の高い TIFT 111016 および TIFT 111018 の 2 菌株はやはり由来が異なるが同じ ST 8 であることが示され、高度に耐熱性の高い系統が存在することが示唆された。

MLST においては必ずしも同一の ST とならなくても、プロファイルのうち 2 遺伝子以下しか異ならない ST 同士を Clonal complex (CC) として同一の起源の菌株である可能性が高いと評価される。本 MLST におけるプロファイルでは ST 4 および ST 5, ST 9, ST 11 および ST 12 が CC に相当し、ST 4 および ST 5 の菌株は同一の製造環境由来であるが、ST 9-ST 11-ST 12 の CC は異なる事例からの分離菌であり、これらの菌株も系統的には近縁であることが推定された。

図 1 に MLST で対象とした 7 遺伝子の塩基配列を連結した配列に基づいた系統樹を示した。ST-8 から ST-13 までを含む耐熱性菌株が単系統群を成しており、これらの耐熱性菌株が *B. subtilis* の中で系統的に近いグループとして存在することが示された。

本 MLST 系で採用した対象遺伝子はいずれも生存に欠かせない遺伝子で、芽胞形成など耐熱性に直接関与するものではない。これらの遺伝子によって示される系統が耐熱性に関係する因子は明らかではないが、*B. subtilis* の耐熱性系統株を遺伝子解析により判定することが可能となった。*B. subtilis* の耐熱性系統を対象とした原料検査による変敗防止、さらには汚染原料の排除による殺菌条件の緩和および品質改善につながる知見が得られた。

表4 *B. subtilis* MLST 系のアレルプロファイル

ST	<i>aroE</i>	<i>dtdS</i>	<i>murI</i>	<i>sodA</i>	<i>tkt</i>	<i>xpt</i>	<i>yqiL</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	1	2	1
3	3	3	2	3	2	1	2
4	4	4	4	4	3	3	3
5	5	4	4	4	3	3	3
6	6	6	5	2	1	4	3
7	7	7	6	3	4	5	4
8	8	8	7	5	1	6	1
9	9	6	7	6	1	6	5
10	10	8	1	6	1	6	6
11	9	6	1	6	1	6	7
12	9	6	1	6	1	6	5
13	9	9	6	5	5	7	5
14	7	10	1	1	6	2	8
15	1	11	8	2	5	2	1

表5 供試菌株の ST

ST	菌 株	CC
1	168, SMY, JH642, NC3610	
2	BSn5	
3	RO-N-N-1	
4	TIFT 111005, 111007	4
5	TIFT 111005	5
6	TIFT 111008	
7	TIFT 111015	
8	TIFT 111016, 111018	
9	TIFT 111017, 111023, 111024	11, 12
10	TIFT 111019	
11	TIFT 111020	9, 12
12	TIFT 111021	9, 11
13	TIFT 111022	
14	TIFT 111025	
15	TIFT 111026	

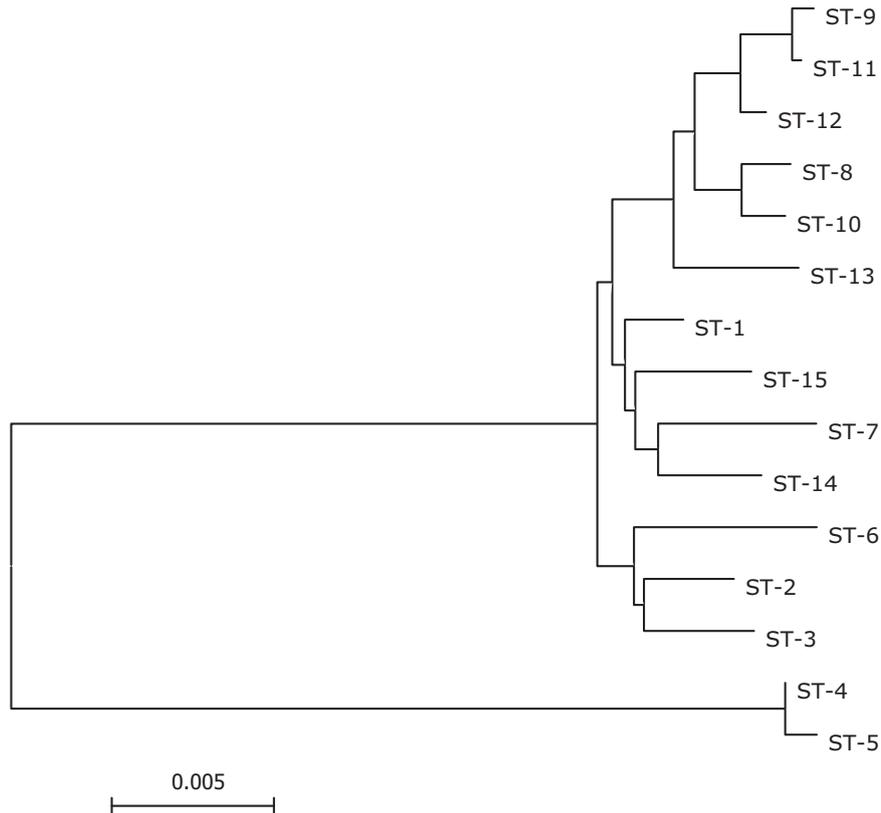


図1 UPGM法によるMLSTの7遺伝子連結配列に基づく系統樹解析

参考文献

- 1) 駒木勝, 缶詰・レトルト食品, 食品の腐敗変敗防止対策ハンドブック, 食品産業戦略研究所 (編), サイエンスフォーラム, 333-344, (1996).
- 2) 東量三, 食品中の好気性芽胞菌とその簡易同定, ニューフードインダストリー, 4(9), 67-77 (1962).
- 3) Maiden, M. C., et al., Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl.Acad. Sci.* **95**: 3140-3145, (1998).
- 4) Rozen, S and Skaletsky, H. J., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 365-386 (2000).
- 5) Jolley K. A., Feil E. J., Chan M. S. and Maiden, M. C., Sequence type analysis and recombinational tests (START), *Bioinformatics*, **17**, 1230-1231 (2001).