

Bacillus subtilis 耐熱性株のゲノムスケール配列解析

遠田 昌人

Whole-genome sequence analysis of *Bacillus subtilis* heat-resistant strains

Atsuhito Enda

Heat-resistant strains of *Bacillus subtilis* often survive sterilization and cause spoilage in packaged foods. Meanwhile, *B. subtilis* distributed widely in natural environment causes spoilages due to secondary contamination after the sterilization.

In order to search for genes that could be used as the indicator gene for rapid identification and investigation for heat-resistant *B. subtilis*, whole-genome sequences were analyzed using the next generation sequencer.

Polyketide synthetic enzyme operon (PKS) was deleted in extraordinary heat-resistant strains surviving sterilization at 120°C and other heat-resistant strains. Since most strains isolated from environments retain PKS, the lack of PKS was considered to be efficient as an indicator on investigation for eliminating raw materials contaminated by heat-resistant *B. subtilis*.

Key words: spore, heat resistance, NGS, genome, Polyketide synthase, *Bacillus subtilis*

枯草菌 *Bacillus subtilis* は土壌、用水など様々な自然環境に遍在しており、食品やその原材料にも広く汚染がみられる¹⁾。*B. subtilis* が形成する芽胞はときに高い耐熱性を備えており、容器包装詰食品・飲料において加熱殺菌後も生残する変敗原因菌として知られている。一方で、*B. subtilis* は環境に広範に存在することから、耐熱性の低い *B. subtilis* であっても殺菌後の容器包装詰食品に密封不良が存在すると冷却水とともに内部に侵入して、二次汚染型の変敗の原因にもなる。*B. subtilis* の芽胞は耐熱性の幅が広く、また様々な原材料に汚染があることから、食品の変敗事故に際しては変敗原因菌として特定されてもそれだけでは原因推定や汚染源特定は困難である。

従来、*B. subtilis* による変敗事故の原因調査においては、変敗品から分離された推定原因菌株の耐熱性試験が必要であったが、複数遺伝子の塩基配列に基づく菌株識別法である MLST (MultiLocus Sequence Typing) 系²⁾ の構築により、芽胞の耐熱性予測および原因推定が可能になった。しかしながら MLST は単離した菌株についてのみ適用可能であり、複数の系統の菌株が混在する試料の検査には適用できない欠点がある。

本研究においては変敗食品や汚染が疑われる原料の *B. subtilis* 耐熱性菌株の汚染を対象とした PCR ないしはリアルタイム PCR による検査を想定し、その際に指標とする耐熱性菌株に特徴的な遺伝子領域を探索することを目的とした。そのような耐熱性菌株特異的な検査・鑑別法を提供することで、変敗事故発生時の原因推定を迅速にし、また耐熱性菌株により汚染されている原料を特定し、排除することで安全性を高め、あるいは殺菌条件を緩和して食品

の品質を改善できる可能性がある。

当所で保有している *B. subtilis* の菌株群を用いて、110°C 程度の加熱に耐える耐熱性菌株群および 120°C での加熱後も生残する高度耐熱性の菌株を用いて、ゲノムスケールの塩基配列解析を行って、耐熱性菌株に特有の遺伝子領域を探索したので報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株

本研究において使用した菌株については変敗食品あるいは食品製造環境から分離し、保存していた菌株を用いた。詳細については以前の報告²⁾ で述べた。

2. ゲノムスケールシーケンシング

(1) ライブラリー DNA の調製

(a) ゲノム DNA 抽出

B. subtilis の各菌株を標準寒天培地 (Standard Method Agar ; SMA) 平板に塗抹し、35°C で 1 晩培養した。得られた菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline; PBS) 1 ml を用いて 4,000 rpm で 10 分間、遠沈洗浄した。酵素溶解液 (20mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1.2% Triton-X, 20 mg/ml リゾチーム, pH 8.0) 1 ml を加え、ペレットを再懸濁した。37°C で 1 時間静置して溶菌反応後、DNA を抽出した。抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いた。Proteinase K 25 μL と DNeasy 添付の AL バッファーを加え、56°C 30 分間静置した。溶菌液を抽出カラムに加え、洗浄バッファーで 2 回、カラムを洗

浄し、溶出バッファー 200 μ L で溶出し、DNA 溶液とした。抽出したゲノム DNA はエタノール沈殿後、Nuclease-free water に溶解して、Ion Xpress Plus Fragment DNA Library Kit を用い、以下のようにライブラリー DNA を調製した。

(b) ゲノム DNA の断片化

抽出したゲノム DNA は Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) を用いて定量し、各 100 ng をライブラリー DNA 調製に供した。ゲノム DNA は Ion Share Plus を用いて酵素的に断片化した。200 μ L のマイクロチューブに下記の通り試薬を加えた。

ゲノム DNA	3 μ L
Ion Share Plus x10 Reaction buffer	5 μ L
Nuclease-free water	32 μ L
Shear Plus Enzyme mix	10 μ L

ピペティングにより混合し、37°C で 20 分間、切断反応を行った。

断片化後の反応液は Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて DNA を回収し、70% (v/v) エタノールで 2 回洗浄後、25 μ L の LowTE 緩衝液で溶出した。

(c) アダプターライゲーション

断片化したゲノム DNA を用いてアダプタ DNA を結合した。下記の通り、試薬を混合し、25°C 15 min \rightarrow 72°C 5 min \rightarrow 4°C のプログラムでリガーゼ反応を行った。

断片化ゲノム DNA	25 μ L
10 \times Ligase buffer	10 μ L
Adapter DNA	2 μ L
dNTP mix	2 μ L
Nuclease-free water	51 μ L
DNA Ligase	2 μ L
Nick-repair Polymerase	8 μ L

ライゲーション反応後は切断反応後と同様に、AMPure XP を用いて精製を行った。

(d) サイズセレクション

断片化およびアダプターライゲーションを行ったゲノム DNA を、配列解析に最適となるようサイズセレクションを行った。配列解析を 200 塩基スケールで行うため、260 塩基近傍のサイズの DNA を E-gel size select Agarose gel を用いて分取した。2% の size-select agar を用いて、DNA 溶液 15 μ L をウェルにロードし、およそ 15 分間、電気泳動した。泳動を続け、ラダー DNA の 300 bp のバンドが回収ウェルに差しかかったタイミングで泳動を停止し、回収ウェルから DNA 溶液を採取し、さらに 25 μ L の Nuclease-free water を回収に加えて、ウェルを洗浄、回収した。採取した DNA 溶液は AMPure XP を用いて精製した。

(e) 増幅

サイズセレクションを行った DNA 溶液を用いて、増幅反応を行った。下記の通り、試薬を混合し、98°C 5 min \rightarrow [98°C 15 sec \rightarrow 58°C 15 sec \rightarrow 70°C 60 sec] \times 8 サイクル \rightarrow 4°C のプログラムで PCR を行った。

PCR super mix	100 μ L
Library amplification primer mix	5 μ L
精製 DNA ライブラリー	25 μ L

増幅後の反応液は AMPure XP を用いて精製し、TapeStation 2200 (Agilent Technologies) を用いてサイズ分布および濃度を測定した。増幅後の DNA 濃度が 100 pM となるように Nuclease-free water で希釈した。

(2) ライブラリー DNA の配列解析

調製したライブラリー DNA を用いて塩基配列解析を行った。解析チップは Ion 314 Chip Kit v2 を用い、シーケンシング反応には Ion PGM Template OT2 200 kit および Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 を用いた。

ライブラリー DNA は Ion OneTouch 2.0 システムを用いてエマルジョン PCR を行い、さらに Ion OneTouch ES システムを用いて濃縮処理を行い、テンプレート DNA を調製した。テンプレート DNA は 314 Chip にロードし Ion PGM を用いてシーケンシング反応を行った。

(3) ゲノム DNA の解析

シーケンシング反応後、得られたリードデータは Ion PGM 付属のソフトウェアでマッピングを行った。マッピングに際して、参照配列には基準株のゲノム配列データである *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (NC_000964.3) を用いた。

3. PKS 遺伝子群の存否

(a) プライマー

ポリケチド合成酵素遺伝子群遺伝子の有無を PCR により調べるため、Nishito ら¹⁾ の方法を用いた。Nishito らの PCR 系ではプライマー A: AGA-AAA-CAA-ATT-GCA-GAA-GCA-AC およびプライマー D: TAC-TCT-ACT-CAG-GTT-GAG-TGG-GC を用いて増幅反応を行うと、PKS 遺伝子群を欠失している場合、1.62 kb の増幅産物を生じ、PKS 遺伝子群が保持されている場合はプライマー間の距離が離れて、増幅産物を生じない。

(b) 染色体 DNA の抽出

全ゲノムスケールシーケンシング解析と同様に、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を得た。

(c) PCR

増幅酵素には ExTaq (TaKaRa) を用いた。反応スケールは 50 μ L として、200 μ L マイクロチューブに下記の通り

試薬を混合した。

dNTPs (10 mM)	4.0 μ L
10 \times ExTaq バッファー	5 μ L
ExTaq DNA ポリメラーゼ	0.1 μ L
ISBma2-F プライマー (10 μ M)	2.0 μ L
ISBma2-R プライマー (10 μ M)	2.0 μ L
抽出 DNA	2.0 μ L
滅菌水	35 μ L

増幅反応は 95°C 30sec \rightarrow 95°C 30sec \rightarrow 65°C 30sec \rightarrow 72°C 60sec] \times 35cycles \rightarrow 72°C 5 min のプログラムで行った。反応終了後、5 μ L を用い、アガロース電気泳動により用いて増幅産物を観察した。

実験結果および考察

1. 高度耐熱性株のゲノムスケール塩基配列解析

(1) マッピング解析

遺伝子の変異には様々な様式で表現型に影響を与えるが、*Bacillus subtilis* についてはこれまでのゲノム解析で、菌株によってはトランスポゾン転移酵素によると推測されるゲノム上の遺伝子の転移もしくは欠失、重複が存在することが知られている^{3,4)}。当所で分離した耐熱性の高い *B. subtilis* 菌株においても、納豆菌系統の BEST195 と同様に *ISBma2* をはじめとしてトランスポゾン転移酵素を多く保持している傾向が見出されており、供試した耐熱性菌株においてもトランスポゾンが介在したゲノム上の遺伝子の大域的な再配置が、耐熱性に影響する可能性を示唆すると考えられた。

そこで、*B. subtilis* 耐熱性菌株の遺伝子の特性を検索するために、大域的な比較が可能な、次世代シーケンサーによる全ゲノムスケールでの塩基配列解析を行うこととした。

Ion PGM システムを用い、まず 120°C での D 値が 1 分間を超える高度耐熱性の 2 菌株 (TIFT 111016 および TIFT 111018) について全ゲノムスケールの塩基配列解析を行った。TIFT 111016 では 460,037 リード、TIFT 111018 では 501,469 リードの配列が解析された。基準株 *B. subtilis* subsp. *subtilis* 168 のゲノムデータへのマッピングの結果、カバレッジ深さの平均が TIFT 111016 では 15.5x、TIFT 111018 では 18.4x で得られた。

マッピング解析の結果を横軸に直線として展開した基準株 168 ゲノムに対してマッピングされたリード数の対数をプロットして図 1 (TIFT 111016) および図 2 (TIFT 111018) に示した。部分的にマッピングリード数が落ち込んでいる領域は、参照配列とした基準株 168 のゲノムには存在するが、供試菌株のゲノムには含まれていないことを表している。この図で明らかかなように、TIFT 111016 株と TIFT 111018 株とでは基準株 168 との比較において欠失している領域が非常に類似していた。これは以前、構築した *B. subtilis* の MLST 系による解析において、これらの菌株が分離時期や場所が離れているにも関わらず、同一の ST (Sequence Type) となったことに加え、これらの菌株が遺伝子の上からは非常に近い系統であることを裏付けた。

また、このリード分布において、中央付近で広範囲にマッピングリード数が落ち込んでいる部分はポリケチド合成酵素やメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含み、ポリケチド類の合成に関わる遺伝子群 (*pksB*, *pksC*, *pksD*, *pksE*, *acpK*, *pksF-pksJ*, *pksL-pksN*, *pksR* および *pksS*) に相当するが、高度耐熱性の 2 菌株はこれらの領域を失っていることを示す。このポリケチド合成遺伝子群 (PKS)⁵⁾ については BEST195 など納豆菌についても欠失していることが報告されており³⁾、この点において高度耐熱性菌株は納豆菌と共通していた。

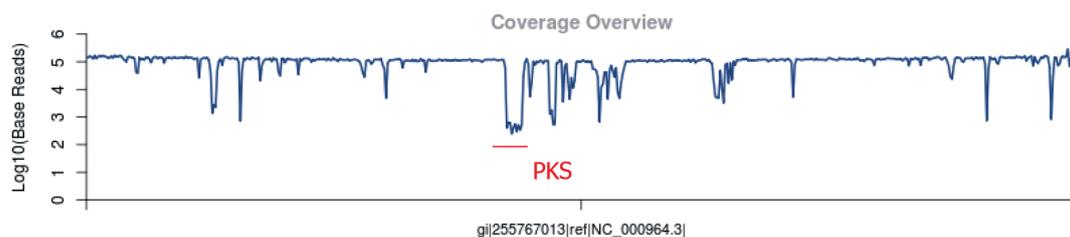


図 1 168 株ゲノムに対する TIFT 111016 の coverage 分布

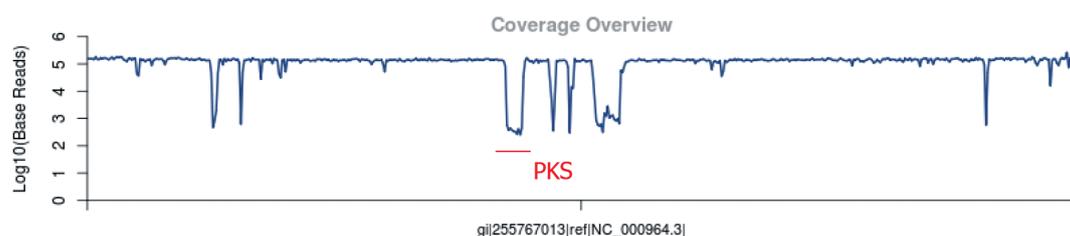


図 2 68 株ゲノムに対する TIFT 111018 の coverage 分布

参照配列とした基準株 168 のゲノムに対して、高度耐熱性菌株で解析した配列データがカバーした領域は TIFT 111016 株で 86.35%、TIFT 111018 株で 88.77% であった。したがって、高度耐熱性菌株では、基準株が保持している遺伝子のうち 12-14% を欠失していると考えられた。耐熱性株でもゲノムサイズは基準株とほぼ同サイズと考えられるが、逆に高度耐熱性株が保持しているが基準株では欠失している領域も 1 割程度は存在するものと推定された。

(2) マッピングされなかったリードの解析

高度耐熱性株の検出対象領域として利用するため、基準株には存在せず、高度耐熱性株にのみ存在する配列領域を検索した。基準株 168 を参照配列としてマッピングした際に、マッピングされなかったリードの配列データを抽出し、その由来をデータベースで検索した。

リードの抽出はシーケンシング解析で得た BAM (Binary Alignment/Map) ファイルを SAM tools ソフトウェア⁶⁾ で解析し、リード配列を抽出した。抽出したリードは BLST プログラムにより NCBI のデータベースより類似した配列を検索した。

検索の結果、見出された配列はほとんど全てが *ISBma2* 様トランスポゾン転移酵素遺伝子をはじめ、*IS256Bsu1*、*IS643* 様トランスポゾン転移酵素遺伝子に由来する配列、

あるいは機能未知の領域由来であり、耐熱性との関連性が疑われる領域ではなかった。

2. 耐熱性株および環境由来株のゲノムスケール塩基配列解析

耐熱性菌株 TIFT 111022、および環境由来菌株 TIFT 111005 および TIFT 111025 について、高度耐熱性株と同様にゲノムスケールの塩基配列解析を行った。

参照配列には基準株 168 のゲノムデータを用いたマッピングの結果を図 3 に示した。耐熱性株 TIFT 111022 のゲノムにおいては、PKS を欠失しているなど欠失している領域が高度耐熱性株の TIFT 111016 および TIFT111018 と非常に類似しており、大域的なゲノム比較においては耐熱性株と高度耐熱性株との峻別がむずかしいことが示された。

一方で、環境由来株の TIFT 111005 (図 4) および TIFT 111025 (図 5) では欠失している遺伝子の分布は耐熱性菌株と大きく異なり、欠失している遺伝子領域の数も少なく、基準株との類似性を示す結果となった。また TIFT 111005 および TIFT 111025 ともに PKS を保持していた。PKS に関しては、高度耐熱性株である TIFT 111016 株および TIFT 111018 株、耐熱性株 TIFT 111022 株では欠失していたのに対し、環境由来の菌株 TIFT

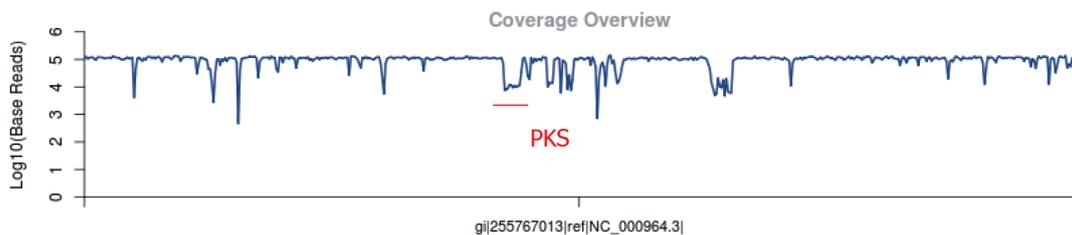


図 3 168 株ゲノムに対する耐熱性株 TIFT 111022 の coverage 分布

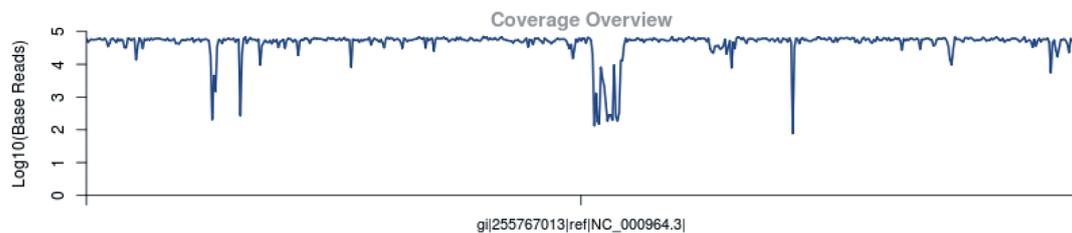


図 4 68 株ゲノムに対する環境由来株 TIFT 111022 の coverage 分布

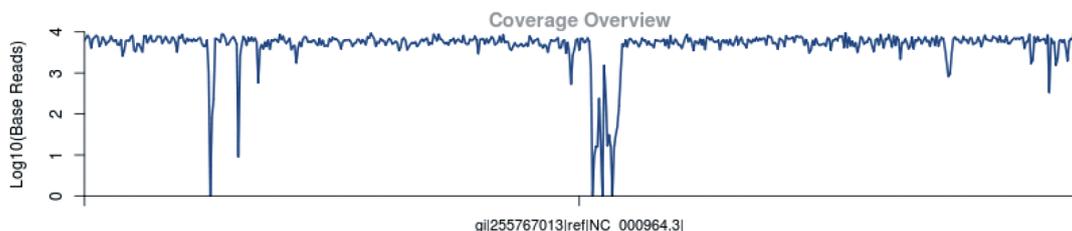


図 5 168 株ゲノムに対する環境由来株 TIFT 111025 の coverage 分布

111005 および TIFT 111025 株では保持されており、菌株の耐熱性を判別する指標遺伝子として有望と考えられた。

3. 供試菌株におけるポリケチド合成系遺伝子群の存否

殺菌不足による変敗を引き起こす可能性のある高度耐熱性菌ないし耐熱性の *B. subtilis* 菌株が PKS を欠失している可能性が示唆されたため、本遺伝子群の保持あるいは欠失を PCR により多数の菌株について調査した。当所で保存している *B. subtilis* の 16 菌株を用いた。環境由来の菌株として TIFT 111005, 111006, 111007, 111008, 111015, 111025 および 111026 の 7 菌株、耐熱性の菌株としては TIFT 111016, 111017, 111018, 111019, 111020, 111021, 111022, 111023 および 111024 の 9 菌株を使用した。

PKS を対象領域とした PCR の結果をアガロースゲル電気泳動の泳動像として図 6 に示した。高度耐熱性株 2 株および耐熱性菌株 7 菌株すべてで予想したサイズの増幅産物が認められ、PKS を欠失していることが示された。環境由来の菌株では TIFT 111015 でのみ欠失が認められたが、本菌株は製造環境から分離されているものの耐熱性については未詳である。その他の菌株については PKS を保持していることが認められた。この結果から、耐熱性と PKS 欠失の間には強い関連性があるものと考えられた。

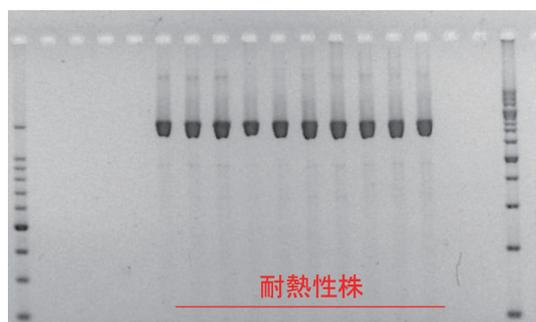


図 6 PKS を対象とした供試菌株の PCR

左レーンより 100bp ラダー, TIFT 111005, 111006, 111007, 111008, 111015, 111016, 111017, 111018, 111019, 111020, 111021, 111022, 111023, 111024, 111025, 111026 および 200bp ラダー

商業的に生産されている容器包装詰食品では耐熱性の *B. subtilis* が主要な制御対象菌となっている製品が少なからず存在しており、変敗事故防止には原料検査によって、*B. subtilis* 耐熱性菌株の汚染が著しい原料を使用しないという対策が有効と考えられる。本報で使用した PKS を対象とした PCR 系は増幅産物が 1.62 kb と長く、実用的な検査系としては短い増幅産物を生じる、効率の高い系へと改良する必要があるが、PKS を指標とした遺伝子検査は *B. subtilis* 耐熱性株汚染原料の排除、さらに変敗事故に際しての迅速な原因推定に有効なものと考えられた。

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) 遠田昌人, MLST を利用した *Bacillus subtilis* 変敗品分離株の系統解析, 東洋食品研究所研究報告書, **30**, 63-67 (2014)
- 3) Nishito, Y. *et al.*: Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis natto* from very short read data. *BMC Genomics*, **11** (2010)
- 4) Chi-Shing Yu *et al.*: Complete Genome Sequence of *Bacillus subtilis* Strain QB928, a Strain Widely Used in *B. subtilis* Genetic Studies, *J Bacteriol*, **194**(22), 6308-6309 (2012)
- 5) Straight, P.D. *et al.*: A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**(1), 305-310 (2007)
- 6) Li H. *et al.*: The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078-9 (2009)