

称号及び氏名	博士（獣医学）	新井 暢夫
学位授与の日付	2020年3月31日	
論文名	全ゲノム情報を活用した家畜由来 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 及びその非定型株の分子疫学研究	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	渡来 仁
	副査	三宅 眞実
	副査	秋庭 正人
	（農研機構動物衛生研究部門 研究推進部長）	

論文要旨

緒言

家畜のサルモネラ症は酪農や肉牛生産、養豚における最も被害の大きい損耗要因の一つである。*Salmonella* 属菌は菌体（O）抗原及び2つの鞭毛（H）抗原の組み合わせにより、現在、2,600以上の血清型が報告されている。このうち、牛からは4,[5],12:i:1,2という抗原構造を有する*S. Typhimurium*（ST）が高頻度に分離される。1980年代まではSTによる牛のサルモネラ症の多くは子牛の下痢症であったが、1990年代には成牛のサルモネラ症が全国的に多発した。所属する研究グループでは、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）等による解析から、1990年代に流行した成牛のサルモネラ症に関与したPFGE型（PFGE I型）を特定し、さらに2000年代には最優勢PFGE型が多剤耐性化の進行したPFGE VII型に置き換わったことを明らかにした。一方で、これらPFGE型の系統関係は不明であった。すなわち、これまでに観察されたPFGE型の変遷が小進化に基づくのか、播種に基づくのか明らかにされていない。

また、農林水産省の統計によれば、近年、家畜サルモネラ症の届出数は減少傾向にある一方で、STが発現できる2相H抗原を発現できない、4,[5],12:i:-という抗原構造を有する単相変異型（非定型）STの分離頻度が上昇している。世界的には特に欧州諸国で、非定型STの特定の系統に汚染された豚肉や、その加工品を介したヒトの集団食中毒事例が増加している。しかし、我が国の家畜から分離される非定型STについて、過去に国内で分離されたSTや欧州で流行中の非定型STとの遺伝的関連は明らかにされていない。そこで本研究では、国内外で分離されたST及び非定型STの全ゲノム系統解析を行い、近年の優勢系統を特定するとともに、当該系統の流行の背景を明らかにすることを目的として分子遺伝学的解析を行った。

第1章：我が国で分離された*S. Typhimurium* 及びその非定型株のゲノム系統解析

本章では、過去 40 年間に我が国で分離された ST 及び非定型 ST の遺伝的系統を明らかにし、近年の優勢系統を特定することを目的とした。

1980 年～2014 年に 30 都道府県で分離された家畜、野生動物、ヒト臨床検体、環境材料由来 95 株に加え、欧州を代表してイタリアにおける家畜等由来 24 株の計 119 株について全ゲノム塩基配列解析を実施した。各菌株のコアゲノムから抽出した一塩基多型 (SNP) を連結した仮想配列を用いて最尤法により分子系統樹を作成した。また、塩基配列情報を利用して、multilocus sequence typing (MLST) を行うとともに、薬剤耐性遺伝子、及び欧州で流行中の非定型 ST 系統が特異的に保有する遺伝因子の検索を行った。さらにディスク法による薬剤感受性試験を実施した。これらの解析結果を総合し、互いに区別すべきクレードを決定した。続いて、各クレードを遺伝子型とし、各遺伝子型固有の SNP を検出するための allele specific-PCR (AS-PCR) 系を構築した。本法の妥当性は過去に PFGE 及び multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) による解析を行なった 545 株を用いて確認した。1976 年～2017 年に国内の牛と豚から分離された ST と非定型 ST を本法で型別し、過去 40 年間の遺伝子型の変遷を解析した。

全ゲノム系統解析の結果、119 株は 9 つのクレードに区分され、過去に主要な PFGE 型であった PFGE I 型と VII 型は、それぞれ異なる 1 つのクレードに集約され、系統的に離れた位置関係にあることがわかった。非定型 ST は 3 つのクレードに集約された。すなわち、鞭毛相変異に関与する遺伝子の点変異により単相化したクレード 4、PFGE VII 型と系統的に近いクレード 8、そして MLST によって sequence type 34 と型別された菌株で構成されるクレード 9 である。さらに、クレード 9 は染色体上に SGI3 を有し、薬剤耐性遺伝子が近接して存在する複合トランスポゾン (Tn) を保有していた。クレード 9 の各株は、これらの遺伝子に対応する 4 薬剤 (アンピシリン、ストレプトマイシン、サルファ剤、テトラサイクリン; ASSuT) を基本とする薬剤耐性パターンを示した。以上の特徴は、欧州で流行中の非定型 ST と類似しており、欧州型非定型 ST が我が国の牛と豚に分布していることが示唆された。

AS-PCR による SNP 遺伝子型別の結果、1990 年代の株は成牛型サルモネラ症の原因となったファージ型 DT104 で構成される SNP1 型、2000 年代の株は非 DT104 多剤耐性 ST で構成される SNP7 型が最優勢であり、過去に明らかにした PFGE 型の変遷と相関した。そして 2012 年から 2017 年にかけて分離された株は欧州型非定型 ST に相当する SNP9 型が最優勢であった。

以上の結果より、2000 年代に観察された PFGE I 型から VII 型への変遷は、国内における ST の小進化ではなく、異なる系統の播種に基づくものと推察された。さらに、近年の我が国における非定型 ST による家畜サルモネラ症の顕在化が、欧州型非定型 ST の世界流行の一部である可能性を示唆した。

第 2 章 : SNP9 型 *S. Typhimurium* とその非定型株の小進化

本章では、時系列系統解析と SNP9 型菌がこれまでに獲得あるいは欠失した遺伝因子を特定することで、本遺伝子型流行の背景の一端を明らかにすることを目的とした。

1998 年から 2017 年の間に分離された SNP9 型株、合計 230 株の全ゲノム情報を解析に供した。内訳は国内で分離された ST 2 株と非定型 ST 212 株、イタリアで分離された ST 2 株と非定型 ST 11 株、オーストラリアと中国で分離され、公共データベースに登録されている欧州型非定型 ST 3 株である。国内で分離された 200 株について、本章で新たに全ゲノム塩基配列解析を行い、230 株の全ゲノム情報を得た。さらに国内分離株のうち、20 株の完全長ゲノムを決定した。230 株のコアゲノムから抽出した SNP を連結した仮想塩基配列を用いて、ベイズ法に基づく時系列系統解析を行った。また、全ゲノム情報を用いて保有するプラスミドや薬剤耐性遺伝子を検索するとともに薬剤感受性を確認した。

時系列系統解析の結果、1998 年に分離された ST の L-4126 株と L-4127 株は、系統樹の根元に位置し、SNP9 型非定型 ST の祖先株である可能性が示唆された。L-4126 株では、SNP9 型を特徴づける Tn が染色体上の 2 相鞭毛抗原遺伝子 (*fljB*) の近傍に存在していた。これら 2 株から SNP9

型非定型 ST の株への分岐は 1990 年頃に生じたと推定された。続いて、比較的大きな分岐が 2000 年頃に生じていることが推定された。この分岐の先には、2012 年以降に分離された菌株が集簇していた。この分岐を基準に、サブクレード 1 及びサブクレード 2 に区分した。

完全長ゲノムの比較によって、サブクレード 1 よりサブクレード 2 の染色体サイズは、最大で 126 kbp 小さくなっていることがわかった。サブクレード 1 の非定型 ST では、Tn 由来 IS26 の分子内転移により *fliB* を欠失したと考えられた。サブクレード 2 では、サブクレード 1 より *fliB* 周辺の欠失範囲が拡大するとともに、複数のプロフェージの欠失が認められた。*fliB* 周辺の欠失領域には、グルコースの取り込みと代謝への関与が予測される遺伝子が含まれていた。

このように染色体サイズが減少する一方、両クレードにおいて複数の薬剤耐性遺伝子を搭載したプラスミドの獲得が認められた。特に、クロラムフェニコールと ST 合剤への耐性を示す菌株が、2014 年以前は 5.3%であったのに対して、2015 年以降は 35%となっていた。薬剤耐性遺伝子周辺の塩基配列解析から、両薬剤に対する耐性遺伝子はプラスミド上に存在することが示唆された。

以上の結果より、我が国の SNP9 型内で 2000 年頃に染色体サイズの縮小を伴う小進化が生じており、これによりフィットネスクストが低減している可能性が考えられた。さらに SNP9 型は、近年では多剤耐性化が進行していることが明らかとなり、本遺伝子型の顕在化の一因である可能性が考えられた。

第 3 章：SNP9 型が保有する *Salmonella genomic island 3* の機能解析

本章では、*Salmonella genomic island 3* (SGI3) の機能、特に伝達性と宿主細菌の重金属抵抗性へ与える影響を明らかにすることを目的とした。

まず、塩基配列情報を基に SGI3 内部及び周辺領域の構造を解析した。さらに、供与菌として L-3841 株を、受容菌として SGI3 を保有しない ST と非定型 ST (SNP1 型～SNP8 型)、加えて ST 以外の 9 つの血清型から各 1 株を選び、合計 17 株を用いてフィルター法による伝達試験を行うとともに、SGI3 の挿入部位の特定を試みた。

SGI3 内部遺伝子の機能予測の結果、銅抵抗性への関与が予測される 2 つの遺伝子領域 (*cus* 領域、*pco* 領域) とヒ素化合物抵抗性に関与する *ars* 領域が存在していた。その他、インテグラーゼと IV 型分泌装置を規定する *tra* 遺伝子群が存在し、SGI3 の両端には 55 bp の繰り返し配列が認められた。これらの特徴から、SGI3 が可動性遺伝因子の一つである integrative and conjugative element (ICE) である可能性が示唆された。

伝達試験の結果、受容菌として用いた全ての ST と非定型 ST、及び ST 以外の 5 つの血清型からトランスコンジュガント (TC) が得られ、伝達頻度は供与菌あたり 10^{-9} ～ 10^{-4} であった。SGI3 の挿入部位を明らかにする目的で PCR と増幅産物の塩基配列解析、サザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、SGI3 は染色体上の tRNA を規定する *pheV* あるいは *pheR* の 3' 末端領域に組み込まれていた。各伝達株は好気条件下でのヒ酸水素二ナトリウム及び嫌気条件下での硫酸銅に対する最小発育阻止濃度 (MIC) が親株と比較して、それぞれ 128 倍以上及び 4～6 倍高かった。L-3841 株と SGI3 を伝達させた LT2TC 株を親株として、SGI3、*cus* 領域、*pco* 領域の欠失変異株を作製し、硫酸銅に対する MIC を比較したところ、*cus* 領域欠失変異株と SGI3 欠失変異株の硫酸銅に対する MIC が、受容菌である LT2 株と同程度まで低下した。続いて、硫酸銅濃度を 0、150、500 ppm に調製した飼料を給餌したマウスを用いた SGI3 保有株と非保有株の競合試験を行った。菌投与 2、4、7 日後の糞便における両株の割合を、0 ppm と他の 2 濃度で比較したところ、硫酸銅存在下において SGI3 保有株である L-3841^{NA} 株と SL1344TC^{NA} 株の割合が、SGI3 非保有株である L-3841ΔSGI3 株と SL1344 株よりそれぞれ大きい傾向にあり、一部の検体間で統計的に有意な差が認められた。

以上の結果より、SGI3 は遺伝子型の異なる ST 及び ST 以外の一部の血清型に伝達し得る ICE であり、受容菌の重金属抵抗性を増強すること、加えて銅抵抗性には *cus* 領域が寄与することが

明らかとなった。さらに SGI3 は硫酸銅存在下におけるマウス腸管内でのサルモネラの定着性を増強することが示唆された。

総括

1. 全ゲノム系統解析によって、過去の流行 PFGE 型の系統関係と我が国に分布する非定型 ST の遺伝的背景が明らかとなった。また、欧州型非定型 ST に相当する SNP9 型が我が国に分布していることを明らかにした。AS-PCR による新規遺伝子型別法の構築と適用によって、我が国の過去 40 年間の遺伝子型の変遷と近年の最優勢系統 (SNP9 型) を特定した。
2. SNP9 型内に 2 つのサブクレードが存在することを明らかにした。近年では薬剤耐性遺伝子を搭載したプラスミドの獲得により、SNP9 型株の多剤耐性化が進行していた。さらに、サブクレード間で *fliB* 周辺領域の欠失範囲が異なることを明らかにした。
3. SNP9 型に広く分布する SGI3 について、構造解析及び伝達試験から、本因子が自己伝達能を有する機能的な ICE であることを明らかにした。また、伝達株及び欠失変異株を用いた実験から、SGI3 がサルモネラ属菌の重金属抵抗性を増強することを明らかにした。

審査結果の要旨

家畜のサルモネラ症は畜産業における最も被害の大きい損耗要因の一つである。*Salmonella* 属菌は、現在、2,600 以上の血清型が報告されているが、牛からは *S. Typhimurium* (ST) が高頻度に分離される。1980 年代までは ST による牛のサルモネラ症の多くは子牛の下痢症であったが、1990 年代には成牛のサルモネラ症が全国的に多発した。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 等による解析から、成牛のサルモネラ症に関与した PFGE 型 (PFGE I 型) が特定され、さらに 2000 年代には最優勢 PFGE 型が多剤耐性化の進行した PFGE VII 型に置き換わっていることが報告されている。一方、これら PFGE 型の系統関係は明らかではない。近年、ST の 2 相 H 抗原 (FliB) を発現できない単相変異型 (非定型) ST の国内での分離頻度が上昇している。欧州諸国では、非定型 ST の特定の系統に汚染された豚肉やその加工品を介したヒトの集団食中毒事例が増加している。しかし、我が国の家畜から分離される非定型 ST について、過去に国内で分離された ST や欧州で流行中の非定型 ST との遺伝的関連は明らかにされていない。それゆえ、国内外で分離された ST 及び非定型 ST の全ゲノム系統解析を行い、近年の優勢系統の特定、当該系統の流行の背景を明らかにすることが重要である。

第 1 章では、我が国及び欧州で分離された 119 株の ST と非定型 ST について全ゲノム系統解析を行なうとともに、遺伝子型として互いに区別すべきクレードを決定した。続いて各遺伝子型を識別可能な SNP 遺伝子型別法を構築後、国内の牛と豚から分離された ST と非定型 ST、合計 976 株に適用した。系統解析の結果、各株は 9 つのクレードに区分された。特にクレード 9、すなわち SNP9 型は multilocus sequence typing によって ST34 に型別され、染色体上に薬剤耐性遺伝子がまとまって存在する複合トランスポゾン (Tn) と *Salmonella genomic island 3* (SGI3) を保有していた。SNP9 型は Tn 内の薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤耐性パターンを示した。これらの特徴からクレード 9 の各株が欧州で流行中の系統 (欧州型非定型 ST) に相当することが明らかとなっ

た。遺伝子型別の結果、1990年代には PFGE I型に相当する SNP1 型、2000年代には PFGE VII型に相当する SNP7 型が最優勢であり、過去に明らかにした PFGE 型の変遷と相関した。そして2012年以降の分離株では SNP9 型が最優勢であった。以上の結果より、我が国における近年の非定型 ST による家畜サルモネラ症の顕在化が、欧州型非定型 ST の世界流行の一部である可能性を見出した。

第2章では、我が国における SNP9 型の小進化を明らかにすることを目的に、1998年から2017年に国内外で分離された SNP9 型 ST と非定型 ST、合計230株の系統解析を行った。その結果、1998年に分離された ST の2株が SNP9 型非定型 ST の祖先と考えられた。この2株は SNP9 型を特徴付ける Tn が *fljB* の近傍に挿入されていた。2000年頃の変異を基準にサブクレード1と2に区分できた。サブクレード1は Tn 由来 IS26 の分子内転移により *fljB* を欠失していた。サブクレード2では、サブクレード1より当該領域の欠失範囲の拡大と複数のプロフェージの欠失が認められた。このように染色体サイズは減少する一方、両クレードにおいて複数の薬剤耐性遺伝子を搭載したプラスミドの獲得が認められ、さらに多剤耐性化が進行したことが、本遺伝子型の顕在化の一因である可能性を見出した。

第3章では、SGI3 の伝達性と宿主細菌の重金属抵抗性へ与える影響を明らかにすることを目的とし解析した。SGI3 内部遺伝子の機能予測の結果、本因子が可動性遺伝因子の一つである integrative and conjugative element (ICE) と考えられた。続いて実施した伝達試験、挿入部位の解析、中間環状体の検出結果より、SGI3 が自己伝達性を有する機能的な ICE であることを明らかとした。各伝達株と親株の重金属抵抗性の比較より、SGI3 が好気条件下及び嫌気条件下でのヒ酸水素二ナトリウムと硫酸銅抵抗性をそれぞれ増強することを明らかとした。さらに、硫酸銅濃度調製飼料を給餌したマウスへの SGI3 保有株と非保有株の競合試験から、SGI3 は硫酸銅存在下におけるマウス腸管内でのサルモネラの生存性を増強することを見出した。

以上の結果は、全ゲノム塩基配列情報を基にした詳細な系統解析によりこれまで情報の乏しかった我が国の家畜に分布する非定型 ST の遺伝的な特徴について明らかにし、特に SNP9 型非定型 ST が家畜と人において世界流行の様相を呈している欧州型非定型 ST に相当することを示した。さらに、最新の薬剤耐性状況を含め各種特徴を解析した研究成果は家畜衛生のみならず公衆衛生の観点からも重要な知見を示した。よって、これらの研究成果は獣医学の分野のみならず公衆衛生学の分野においても多大な貢献をすると考えられる。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。