

Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)解析による黄色ブドウ球菌ゲノムタイピング

藤本, 秀士
九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

小島, 夫美子
九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

<https://doi.org/10.15017/301>

出版情報 : 九州大学医療技術短期大学部紀要. 28, pp.99-105, 2001-02. Kyushu University School of Health Sciences Fukuoka, Japan

バージョン :

権利関係 :

Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)解析による 黄色ブドウ球菌ゲノムタイピング

藤本 秀 士, 小 島 夫美子
(九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科)

Genotyping of *Staphylococcus aureus* Based on Random Amplified Polymorphic DNA Analysis

Shuji Fujimoto and Fumiko Kojima

ABSTRACT

To perform the genotyping method of *Staphylococcus aureus* based on random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), we optimized the several polymerase chain reaction (PCR) conditions such as Mg^{2+} concentration, annealing temperature and DNA polymerase. In order to assess the discriminatory power of this typing method, 18 epidemiologically unrelated *S. aureus* strains were examined and the results were compared with the coagulase gene typing method. Among the five primers, RAPD PCR using primer 7 yielding 15 different types was the most discriminative primer. All the strains except two were distinguished each others by the combination of RAPD profiles acquired using the three primers. These data suggest that the discriminatory power of the RAPD genotyping method is great enough to be used as the sole method to type *S. aureus* and this method is useful as an epidemiological tool.

Key Words: Genotyping, *Staphylococcus aureus*, Random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD)

I. 緒 言

黄色ブドウ球菌はグラム陽性の球菌で、コアグララーゼ、溶血毒、腸管毒などの種々の毒素を産生し、皮膚などの化膿性疾患や食中毒の起原菌として医学上重要な病原菌である。本菌は、ヒトの皮膚、鼻腔、咽頭などに定着し、内因性感染や交差感染により病人や老人、未熟児・新生児に重篤な感染症を惹起する、いわゆる日和見感染および院内感染の主要な原因菌である⁽¹⁾。黄色ブドウ球菌の院内感染の多くは、医療従事者を介した交差感染に起因するといわれ、多くの医療施設において黄色ブドウ球菌の院内感染防止マニュアルが作られ、対策が施行されている。

院内感染対策のためには、病院内部の常在菌の分布や医療スタッフの付着菌ならびに患者分離菌

株の疫学調査が不可欠である。黄色ブドウ球菌においては、従来から、ファージ型別やコアグララーゼ型別、抗生物質耐性などの生物学的特性に基づいた解析が行われている。近年、遺伝子工学の発展により、分子疫学の進歩がめざましく、プラスミドによる遺伝子型別⁽²⁾、リポタイピング⁽³⁾、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) によるゲノム DNA の制限酵素切断多形 (RFLP) パターン解析⁽⁴⁾など遺伝子多型を利用した疫学マーカーが開発され、感染疫学に盛んに応用されている。なかでも PFGE-RFLP 法は、最も菌株間の識別能力の高い方法であるが、手技に熟練を要し、専用装置を必要とするため、限られた施設でしか行われていないのが現状である。

Random amplified polymorphic DNA

(RAPD) 法もしくは Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) 法は、1990年に報告された、DNA フィンガープリンティング法の1種である^(5,6)。本法は、ランダムに設定した短い(10塩基対程度)プライマーを単独で用いて、通常よりも緩やかな条件下でPCRを行い、増幅された産物を菌株間で比較・解析する方法で、手技の簡便さに加えて、所要時間も短く(迅速)、細菌感染症の疫学調査研究には大変優れた方法である。これまで、*Helicobacter pylori*⁽⁷⁾、*Campylobacter jejuni*⁽⁸⁾、病原大腸菌 O157⁽⁹⁾など多くの細菌の菌株比較解析に応用されて、有効性が認められている。

今回、黄色ブドウ球菌の、RAPD法に基づくゲノムタイピングを試みた。本法は、PFGE-RFLPの行えない一般病院・検査室において、感染疫学調査の道具として非常に有用と考えられる。RAPD法で最良の結果を得るための個々の条件は、菌種により異なる。そこで、本研究では、RAPD法に影響する諸条件(Mgイオン濃度、アニーリング温度、DNAポリメラーゼ、プライマー)の検討を行い、さらに健康成人18名より分離された黄色ブドウ球菌18菌株を用いて本法の有用性を検討した。

II. 材料ならびに方法

A. 使用菌株とゲノム DNA の調整

健康成人(九州大学医療技術短期大学部衛生技術学科学生)18名の鼻腔より分離した黄色ブドウ球菌18株を使用した。-80°Cに保存された菌株を普通寒天培地(栄研)で37°C、24時間培養し、一白金耳分をゲノムDNAの分離に用いた。ゲノムDNAの分離は、ゲノムDNA分離キット「Genとる君(酵母・グラム陽性菌用)」(宝酒造)を用い、解説書に基づいて行った。分離したゲノムDNAは、50 μ lのTEバッファー(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.6)に溶解し、-20°Cに保存してPCRに使用した。

B. RAPD PCR

使用プライマーの塩基配列は、Barg254⁽⁷⁾ 5'-CCGCAGCCAA-3', Barg257⁽⁷⁾ 5'-GTGGATGC-

GA-3', P7⁽¹⁰⁾ 5'-GTGGATGCGA-3', OPA-11⁽¹¹⁾ 5'-CAATCGCCGT-3', NCH1-A 5'-ACGTATCTGC-3'である。PCR反応は、通常、10 \times 反応液(Mgイオン濃度30mM) 1 μ l, 2.5mM dNTP 1 μ l, 1種類のプライマー 1 μ l (20 pM), ゲノムDNA 1 μ l, Taq DNAポリメラーゼと滅菌水を加えて全量10 μ lで行った。反応には、Rapid Cycler (Idaho Technology)を使用し、熱変性94°C 30秒, アニーリング 37°C 7秒, 伸長反応72°C 1分を2サイクル, 引き続き94°C 0秒, アニーリング 37°C 7秒, 伸長反応 72°C 1分を33サイクル行い, 最後に72°C 4分の伸長反応を1サイクル加えて標準サイクルとした。反応液のMgイオン濃度, アニーリング温度ならびにDNAポリメラーゼは, 各実験に応じて変化させた(結果参照)。PCR増幅物の確認には, 1.5%アガロースLEゲル(ナカライテスク)で電気泳動し, エチジウムブロミド (EtBr) で染色後, UVライト照射下に観察し, 写真撮影した。分子量マーカーには, 100bp ladder (GibcoBRL)を用いた。

C. コアグララーゼ遺伝子のPCRとゲノム型別

コアグララーゼ遺伝子の増幅には, Gohら⁽¹²⁾の方法のPCRプライマー COAG2; 5'-CGAGACCAAGATTCAACAAG-3', COAG3; 5'-AAAGAAAACCACTCACATCA-3'を使用した。PCR反応は, 10 \times 反応液(Mgイオン濃度30mM) 2.5 μ l, 2.5mM dNTP 2.5 μ l, 混合プライマー 2.5 μ l (20 pM), 鋳型DNA 2.5 μ l, Taq DNAポリメラーゼ (Promega) と滅菌水を加えて全量25 μ で行った。反応には, Rapid Cycler (Idaho Technology)を使用し, 熱変性 94°C 0秒, アニーリング 45°C 0秒, 伸長反応 72°C 15秒を30サイクル行った。

PCR増幅産物は, 1.5%アガロース電気泳動にて分子量を確認した。さらに, 制限酵素 *Alu* Iにより一晩処理後, 2%MS 8アガロース(コスモ・バイオ)で電気泳動して切断断片の分子量を確認し, バンドパターンを解析した。

III. 結 果

A. 反応液中の Mg イオン濃度の検討

RAPD 法の結果を左右する要因の一つとして、Mg イオン濃度がある。Mg イオン濃度は、低すぎると増幅産物が確認できず、高すぎると非特異反応が強すぎる結果、増幅パターンに差がでなくなる。そこで、2種類の菌株のゲノム DNA と2種類のプライマーを各々用いて、アニーリング温度 42°C の条件で、Mg イオン濃度を、1.0mM, 2.0mM, 3.0mM, 4.0mM に変化させて増幅産物を比較した。その結果、いずれの菌株、いずれのプライマーにおいても、1.0mM では増幅産物は見られず、2.0mM でも識別に十分な量が得られなかった。一方、3.0mM, 4.0mM では十分な増幅産物が得られ、両者の間ではバンド数、量ともに優劣はなかった。また、各々のプライマーを用いた PCR において、異なる菌株では、異なるバンドパターンを示した。その為、以後の検索は、Mg イオン濃度 3.0mM で行うことにした。

B. アニーリング温度の検討

アニーリングの温度も RAPD 法に大きく影響する。通常の PCR では、55°C 程度で行われるアニーリングの温度を RAPD 法では 30~40°C くらいの温度に設定する。アニーリング温度が低いほどプライマーの選択度が穏和になる反面、到達までに時間がかかるようになり不利である。今回、42°C, 37°C, 32°C のアニーリング温度で、2種類の菌株を用いて検討した。その結果、42°C では、分子量 1kb 以上の産物の増幅が增強され、反対に 32°C では、1kb 以下の産物が優勢であった。反応時間を短縮させ、かつ、識別に十分な PCR 産物を得るために、今後の検討は 37°C を選択した。

C. DNA ポリメラーゼの種類の見直し

今回、各メーカーの 6 種類の DNA ポリメラーゼ (Taq DNA ポリメラーゼ 5 種類: rTaq DNA polymerase (宝酒造), Taq DNA polymerase (Promega), AmpliTaq DNA polymerase (Parkin Elmer), TaqPlus DNA polymerase (Stratagene), KlenTaq DNA polymerase (Sigma) と KOD Dash (東洋紡) について検討した。3種類の菌株について検討した結果、同一

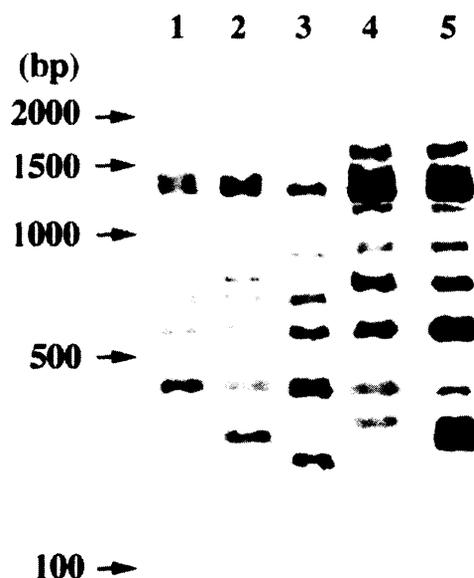


図1. DNAポリメラーゼの種類による RAPD パターンの違い
1~5は、順に、rTaq, Taq(Promega), AmpliTaq, TaqPlus, KlenTaq。

菌株・同一プライマーでも、酵素の違いによって異なるパターンを示した(図1)。今回検討した中では、long PCR 用 DNA ポリメラーゼ: KlenTaq が低分子から高分子まで均一に増幅し、良好な結果であった。以後の検討には、KlenTaq を使用した。

D. 適正プライマーの検索とコアグラマーゼ遺伝子型別との比較

RAPD 法で使用するプライマーはランダムに設定されるが、その配列によっては、全ての菌株が非常に類似した RAPD パターンを示してしまう。そのため、有効なプライマー、つまり、個々の菌株特有の増幅パターンを提供するプライマーの選択が最重要である。今回、18名の健康成人の鼻腔より分離した黄色ブドウ球菌18菌株を使用して、5種類の10mer プライマーを検討した。これらのプライマーは、すでに *Campylobacter jejuni* や *Helicobacter pylori* において有効性が認められているものである。図2に菌株 SA98334D1における各プライマーの RAPD パターンを示す。いずれも比較解析に十分なバンド数が増幅されている。この5種類のプライマーをそれぞれ用いて RAPD-PCR を行い、18菌株のプロファイルを比較検討した。図3にプライマー-NCH1-A による

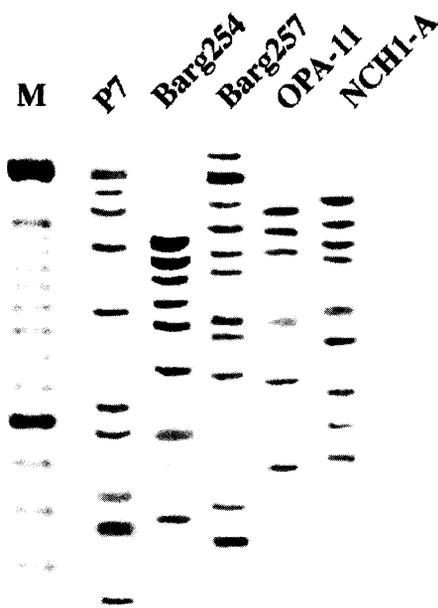


図2. 5種類のプライマーの RAPD パターン
使用菌株は, SA98334D1。Mは, 分子量マーカー。

18菌株の RAPD パターンを示す。また, 各プライマーを使用した18菌株の全 RAPD プロファイルとコアグラージェ遺伝子型別を表1にまとめた。今回調べた18菌株は, 12のコアグラージェ遺伝子型 (A~L) に分かれた。一方, RAPD 法では, 最も識別能の高かったプライマー, P 7により, 18菌株中15パターンが得られた。同一パターンを示した株

表1 黄色ブドウ球菌18菌株の RAPD プロファイルとコアグラージェ遺伝子型別

菌株	RAPD パターン					コアグラージェ 遺伝子型別
	P 7	NCH1-A	OPA-11	HP257	HP254	
SA98301B1	1	1	1	1	1	A
SA98326D1	2	2	2	2	1	A
SA98302A1	3	3	3	3	1	B
SA98303D1	4	4	4	4	1	C
SA98308D1	5	5	5	5	1	D
SA98305B1	6	6	5	5	1	D
SA98335B1	7	5	6	5	1	D
SA98312D1	5	5	1	5	2	D
SA98309D1	4	2	7	1	3	E
SA98316D1	8	7	4	6	4	F
SA98318C1	9	8	5	7	1	G
SA98321C1	9	8	5	7	1	G
SA98322D1	10	1	8	7	1	H
SA98323D1	11	9	9	1	3	I
SA98336B1	12	10	10	1	1	J
SA98334D1	13	10	10	8	5	J
SA98328D1	14	11	5	2	1	K
SA98331A1	15	8	5	5	6	L

は,それぞれ同一コアグラージェ遺伝子型別(D型: SA98308D1, SA98312D1と G型: SA98318C1, SA98321C1)であり, これらの菌株では, 他のプライマーでも同一パターンを示す傾向にあった(表1参照)。一方, 最も識別能の低かったプライマーでは, 6パターンしか得られず, 菌株の多くが1型を示した。識別能の高かった上位3種類のプライマー(P 7, NCH1-A, OPA-11)によるパターンの組み合わせにより, 今回調べた菌株は2株を除いて全てが識別可能であった。識別できな

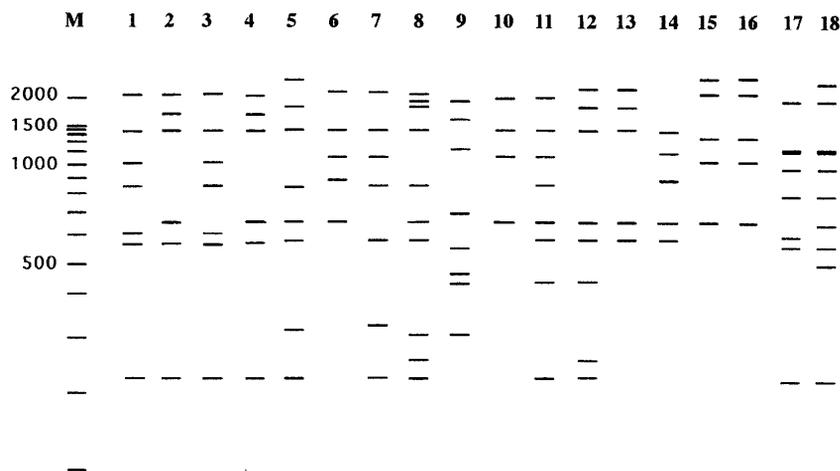


図3. 黄色ブドウ球菌18菌株の RAPD パターン (P 7プライマー)

1~18は, SA98303D1, SA98308D1, SA98309D1, SA98312D1, SA98316D1, SA98322D1, SA98323D1, SA98334D1, SA98302A1, SA98331A1, SA98301B1, SA98305B1, SA98335B1, SA98336B1, SA98318C1, SA98321C1, SA98326D1, SA98328D1, Mは分子量マーカー (100bp ladder)

かった2株 SA98318C1, SA98321C1は他の2種類を加えた5種類の検討でも同じプロファイルであり識別できなかった。

IV. 考 察

これまで黄色ブドウ球菌の疫学調査は、ファージ型別およびコアグララーゼ型別分類によって実施され、年次別の流行株の把握や薬剤耐性との関連についてその成果をあげてきた。しかし、特定の薬剤耐性株の全国的な蔓延などから、その有用性が低下してきつつある。一方、近年の遺伝子工学技術の進歩に伴って、病原菌の同一性を遺伝子レベルで調べ、疫学に応用する試みがなされてきた。このような遺伝子多型を利用した疫学マーカーとしてプラスミド DNA⁽²⁾, コアグララーゼ遺伝子型別法⁽¹²⁾, 制限酵素で切断したゲノムのパルスフィールド電気泳動による DNA 断片パターンの解析 (PFGE-RFLP)⁽⁴⁾などがあり、中でも PFGE によるゲノムタイピングは、制限酵素 *Sma* I によるゲノム DNA の切断パターンにより、多様な DNA パターンを解析することが可能で、従来法に比べ格段に感度が高く、黄色ブドウ球菌の疫学マーカーとして有効であることが示されてきた⁽¹³⁾。しかしながら、この方法は多量の DNA を必要とし、細胞壁の特に強固な黄色ブドウ球菌ではリゾチームならびにリゾスタフィン処理を必要とするためコストと時間がかかる。さらに、操作が煩雑で、特殊な装置を必要とするため、一般の検査室などで施行することは難しい。

一方、RAPD 法は、ランダムなプライマーを用いてゲノム全体を調べる方法であり、プライマーや PCR プログラムを目的菌種に応じて決定し直さなければならないものの、いったん条件が決まれば、簡便な PCR 技術で可能であり、鋳型となるゲノム DNA も微量ですむ。また、今回、キットを用いて抽出した黄色ブドウ球菌ゲノム DNA でも解析可能であったことから、一般検査室でも十分施行可能である。また、多検体を一度に処理可能であることや、同じサンプルで他の遺伝子型別(コアグララーゼ遺伝子型別など)が併用出来るなど利点も多い。

今回の検討で、RAPD PCR に使用する DNA ポリメラーゼの種類により、同じ菌株、同じプライマーでも増幅パターンに違いが見られた。PCR の普及に伴い、現在、各社で、様々な用途別に DNA ポリメラーゼが開発され、販売されている。PCR 法で使用されるポリメラーゼとしては、*Taq* DNA polymerase が一般的であるが、他にも今回使用した KOD など由来の異なる酵素もある。また、*Taq* DNA polymerase にも、正確性 fidelity と増幅鎖長に特徴を持たせた製品が他種類開発されている。long PCR 用の酵素は、増幅鎖長が従来品よりも長く、10kb 以上の産物の増幅に適したものである。今回、RAPD-PCR において、長鎖、短鎖の増幅物が他の酵素に比べて均等に増幅されたことから、本来の用途とは異なるが RAPD 法の改良に大きく貢献すると考えられる。

今回決定した PCR 条件を用いて行った RAPD-PCR では、最も識別能の高いプライマー単独により、18菌株中14株が識別できた。識別できなかった4株は他のプライマーでも同一もしくは類似のパターンを示し、このうち2株は、5種類のプライマーの組み合わせでも識別不能であった。由来の同じ菌株どうしは、異なる由来の菌株に比べ、遺伝子構造の類似性が高い。故に、非常に似た RAPD パターンを示す菌株どうしは、遺伝学的に近縁である可能性が高い。たとえ同じ生化学的性状や血清型をもつ菌であっても、染色体遺伝子の配列が異なる場合には異なる増幅パターンとして観察される。

黄色ブドウ球菌の有用な遺伝子疫学マーカーとして、コアグララーゼ遺伝子型別法⁽¹²⁾がある。この方法は、本菌の病原因子の一つであるコアグララーゼ遺伝子を PCR で増幅し、産物の分子量とその制限酵素切断パターンで型別するもので、ゲノムの一部の多様性に基づいている。今回の検討で、RAPD-PCR とコアグララーゼ遺伝子型別との相関をみると、前述の菌株は同一コアグララーゼ遺伝子型別であり、その他の同一コアグララーゼ遺伝子型別の菌株も互いに類似した RAPD パターンを示す傾向にあった。今回識別能の高かった上位3種類のプライマーの RAPD パターンの組み合わせ

で、2株を除いて全ての菌株が識別できた。コアグラゼ遺伝子型別D型の4菌株もそれぞれ識別され、近縁菌株の比較にも有効であることが伺えた。同じゲノムタイプの黄色ブドウ球菌が同じ外毒素産生能を持つことが報告されており⁽⁴⁾、RAPD-PCR やコアグラゼ遺伝子型別などによるゲノムタイプの解析は、病原性を示す菌株を特定し、感染防止に役立つことが期待される。

V. 結 語

RAPD-PCR 法は、微量のゲノム DNA で迅速かつ簡便に行え、厚い細胞壁を持ち、ゲノム DNA の大量分離が難しくコストのかかる黄色ブドウ球菌には適した方法である。黄色ブドウ球菌においても高い識別能を示し、かつ、多検体処理も可能なことから、検査室などでの分離菌株の異同の判定や院内感染の実態調査の疫学に有用である。コアグラゼ遺伝子型別法などとの併用も容易で、院内感染防止対策を立てる上でもおおいに役立つものと考えられる。

本研究は、中村奨励金（財団法人中村治四郎育英会）により行われた。

文 献

- 1) Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *American Journal of Medicine* 94: 313-328, 1993
- 2) Archer GL and Mayhall CG: Comparison of epidemiological markers used in the investigation of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Clinical Microbiology* 18: 395-399, 1983
- 3) Blumberg HM, Rimland D, Kiehlbauch JA, Terry PM, and Wachsmuth IK: Epidemiologic typing of *Staphylococcus aureus* by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes: elucidation of the clonal nature of a group of bacteriophage-nontypeable, ciprofloxacin-resistant, methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 362-369, 1992
- 4) Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, Kato N, and Takeuchi J: Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 2690-2695, 1991
- 5) Welsh J and McClelland M: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218, 1990
- 6) Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, and Tingey SV: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535, 1990
- 7) Akopyanz N, Bukanov NO, UlfWestblom T, Kresovich S, and Berg DE: DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research* in press, 1992
- 8) Fujimoto S, Allos BM, Misawa N, Patton CM, and Blaser MJ: Restriction fragment length polymorphism analysis and random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* strains isolated from patients with Guillain-Barre syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 176: 1105-1108, 1997
- 9) Birch M, Denning DW, and Law D: Rapid genotyping of *Escherichia coli* O157 isolates by random amplification of polymorphic DNA. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 15: 297-302, 1996
- 10) van Belkum A, Kluytmans J, van Leeuwen W, et al.: Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus*

- aureus* strains. Journal of Clinical Microbiology 33: 1537-1547, 1995
- 11) Yu JR, Chung JS, and Chai JY: Different RAPD patterns between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus Miyata* type. Korean Journal of Parasitology 35: 295-298, 1997
- 12) Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, and Chow AW: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology 30: 1642-1645, 1992
- 13) Schmitz FJ, Steiert M, Tichy HV, et al.: Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Dusseldorf by six genotypic methods. Journal of Medical Microbiology 47: 341-351, 1998