

原著

Variable number of tandem repeats (VNTR) 法を用いた結核菌の遺伝子型別 —繰り返し回数算出における基礎的検討—

前田詠里子・大石明・江藤良樹・村上光一・世良暢之・堀川和美

結核菌の Variable number of tandem repeats (VNTR) 解析の上で重要となる繰り返し回数の算出方法を確立することを目的として、VNTR 領域の塩基配列の決定・解析により得られた値（真の値）とシーケンサーを用いたフラグメント解析により得られた値（見かけの値）の相関性を明らかにした。その結果、真の値と見かけの値の関係は一定の範囲内の大きさの PCR 産物においては相関することが分かった。この範囲内では、繰り返し回数が既知である PCR 産物を、検量線作成用として使用できることが判明した。また、真の値と見かけの値の直線性が低い、大きい PCR 産物の繰り返し回数の算出には、シーケンサーを用いたフラグメント解析時に見られるスタッターピーク数の計測やパルスフィールド・ゲル電気泳動による測定が有用であることが示された。さらに、一部の VNTR 領域（QUB11a、QUB11b）の 2000 bp 程度の大きな産物には IS6110 が挿入されていることが塩基配列の解析によって確認された。これらの結果より、結核菌の VNTR 解析は、シーケンサーによるフラグメント解析、スタッターピーク数の計測及びパルスフィールド・ゲル電気泳動を組み合わせることによって、繰り返し回数を適切に算出できることが分かった。

[キーワード：結核、VNTR、フラグメント解析、遺伝子型別]

1 はじめに

結核は主に人の肺に病変を起こす病気である。結核患者として 1 年間に新規登録される患者数は全国で約 2 万人、死亡者数は約 2 千人と、現在でも公衆衛生上重要な感染症となっている。福岡県における結核患者の罹患率は過去 10 年間全国平均よりも多く、平成 23 年の厚生労働省の調査では全国で 16 番目に多い県となっている¹⁾。福岡県では、平成 24 年度より感染源の究明及び予防対策を支援することを目的に“結核病原体サーベイランス事業”を開始した。このなかで当所は、主に新たに発生した患者から分離された結核菌の遺伝子型別、解析を行い、得られたデータを行政機関や医療機関に情報提供している。

近年、結核菌の遺伝子型別法として Variable number of tandem repeats (VNTR) 法という手法が開発、汎用されており、なかでも日本においては JATA (12) - VNTR 分析法が日本国内の結核菌を対象とした標準法として提唱され、全国的な普及が進められている²⁾。当所においても、結核菌の遺伝子型別法として JATA (12) - VNTR 法の領域に QUB18、QUB11a、ETR-A を加えた領域（以上、JATA (15) - VNTR 法の領域）、超多変 (hypervariable, HV) 領域及び国際標準領域を加えた計 24 領域を用い、福岡県内で流行している結核菌の分子疫学的解析を試みているところである。

VNTR 法の原理は、結核菌のゲノム上に数 10 ヶ所存在する

50-100 bp を単位として繰り返される「繰り返し配列の数」を、菌株間で比較することによる遺伝子型別法である。特徴として、PCR をベースとした手法であるので、用いる菌量が少なくすみ、比較的迅速に結果が出る利点がある。また、結果を数値で表すことができるので、他の検査機関や過去のデータと結果を容易に比較でき、データの保存も簡単である。一方で、繰り返し回数算出の基準を明確にしなければ株間での比較が無意味になってしまうという注意点がある³⁾。

繰り返し回数の算出法として、最も正確な方法は VNTR 領域の塩基配列を決定・解析し、繰り返し配列の数を数える方法である。しかしながら、一般的には費用や時間の問題で、ゲル電気泳動やシーケンサーのフラグメント解析機能を用い、PCR 産物の大きさを元に繰り返し配列の数を推定する方法が採用されている。そこで、今回、当所において結核菌の VNTR 解析法を導入するにあたり、数株の VNTR 領域計 24 領域の塩基配列を決定・解析し、繰り返し配列の数を確認したもの（これを真の値とする）とシーケンサーのフラグメント解析により得た値（これを見かけの値とする）の相関を明らかにし、より正確な検査系の確立を目的とした（なお、各株の詳細な塩基配列等については福岡県保健環境研究所のウェブページの所定の場所に掲載予定である）。

2 方法

2・1 供試菌株

平成 24 年度に当所に搬入された福岡県内在住の結核患者から分離された結核菌株 91 株、また、BCG Tokyo 株（日本ビーシージー製造株式会社）を用いた。なお、本研究は行政依頼検査の一環として行われたものをまとめたものである。

2・2 DNA 抽出

小川培地に培養された結核菌株をエーゼで Fast Prep 用破砕用ビーズの入った 2 mL チューブ (MP Biomedicals) に分取し、Fast Prep (MP Biomedicals) を用いて破砕した。その後、5%キレックス (バイオ・ラッド) 加 TE buffer を加え、適宜ボルテックスしながら 56℃、30 分間および 100℃、10 分間の加熱を行った。10000 rpm で 10 分間遠心し、上清を DNA 抽出液として回収した。

2・3 VNTR 領域 (24 領域) の PCR

PCR は千葉県衛生研究所 横山栄二先生にご教授いただいたプライマー⁴⁾を用いて行い、一部、公益財団法人結核予防会結核研究所の開発した JATA (15) -VNTR キットのプライマー²⁾を使用した。解析に用いた VNTR 領域名は表 1 の通りである。なお、PCR 産物の塩基配列決定用には両側とも非標識のプライマーを、シーケンサーを用いたフラグメント解析用には片側に蛍光で標識したプライマーを用いて PCR を行った。PCR の条件は前田ら²⁾の方法を一部改変 (アニーリング温度を 60℃に変更) して行い、DNA 量が少ない場合はサイクル数を 40 サイクルまで延長した。

表 1 解析に用いた VNTR 領域 (24 領域)
(下記の 6 グループに分けて解析)

グループ	領域名			
mix 1	miru4	miru10	miru16	miru26
		J2 [*]		J7
mix 2	miru31	miru40	ETR-A	ETR-C
	J9		J15	
mix 3	Mtub04	Mtub21	Mtub30	Mtub39
	J1	J3		
mix 4	QUB11b	QUB26	QUB4156	Mtub24
	J5	J11	J12	J4
mix 5	QUB11a	QUB15	QUB18	QUB3232
	J14	J8	J13	HV ^{**}
mix 6	QUB3336	VNTR3820	VNTR4120	VNTR2372
	J10	HV ^{**}	HV ^{**}	J6

* J1-J15 : JATA (15) キット内における表示名

** HV : 超多変領域

2・4 PCR 産物の塩基配列解析

臨床株 22 株及び BCG 株の PCR 産物 (延べ 259 領域) を精製し、ダイレクトシーケンセスをおこなった。プライマー両端部位を含め塩基配列を決定・解析することによって PCR 産物の大きさを算出する (真の値) とともに、繰り返し配列以外の部分の大きさ (オフセット値)、一繰り返し配列の大きさ及び繰り返し回数を算出した。また、QUB11a 領域および QUB11b 領域の一部の株 (1800 bp を超える PCR 産物) については、IS6110 の挿入の有無を確認するため、IS6110 に特異的なプライマー⁵⁾も用いて塩基配列の解析を行った。

2・5 電気泳動

2・5・1 シーケンサーを用いたフラグメント解析

得られた PCR 産物は適宜希釈し、表 1 の mix1-mix6 に従って 4 領域ごと混合したものを、Hi-Di ホルムアミド (AB) および LIZ 1200 マーカー (AB) の入った 96 ウェルプレートへ混和した。95℃5 分間、氷上 5 分間以上処理することによって DNA を一本鎖へ変性させ、シーケンサー (AB3500、AB) にて電気泳動を行った。PCR 産物の大きさは GeneMapper ソフトウェア (AB) を用いて算出した (見かけの値)。また、Iwamoto らの方法⁶⁾を参考にし、VNTR 領域を増幅した際に出現するスタッターピーク (目的のピークより n 回繰り返し回数が少ないピーク) の数を計測することにより、繰り返し回数を算出した。カレイダグラフを用いて、各領域の真の値と見かけの値の一次回帰式及び相関係数を求めた。

2・5・2 ゲル電気泳動

LIZ 1200 マーカーの範囲 (40-1200 bp) を超える大きさの PCR 産物の繰り返し回数を算出するためにパルスフィールド・ゲル電気泳動を行った。泳動条件は、ゲルとして 1% Seakem GTG ゲル (0.5% TBE バッファー)、泳動装置として CHEF-DR III (バイオ・ラッド) を用い、3.5V/cm、5-5 s、120°、14℃、24 時間の条件で泳動した。サイズマーカーとして、100-4000 bp まで 100 bp 単位でバンドが得られる 100 bp DNA Step Ladder (プロメガ) を用いた。泳動後、エチジウムブロミドにてゲルを染色し、紫外線下でゲルの撮影を行った。ゲル電気泳動による繰り返し回数の算出は、得られたバンドの大きさをサイズマーカーとの移動度の差異を目視で計測し、表 2 に記載のオフセット値及び繰り返し単位塩基数を用いて推察した。

3 結果・考察

3・1 VNTR 領域の塩基配列の解析

表 2 に VNTR 領域の塩基配列の解析の結果得られた各領

域のオフセット値、繰り返し単位塩基数を示した。なお、今回オフセット値は、すべての領域において、不完全な繰り返し領域はオフセット値として組み込んだ。供試した株において、オフセット値が一定の株がほとんどであったが、miru4 領域においては BCG 株とその他臨床株で比較すると、オフセット値が異なっていた。また、QUB3336 領域と VNTR3820 領域においては繰り返し単位塩基数が株によって、あるいは一つの株の中でも異なっていた（なお、表 2 中で、QUB3336 および VNTR3820 のシーケンス確認リピート数が整数値にならないものがあるのは繰り返し単位塩基数を数値の大きなものに合わせているためである）。

表 2 VNTR24 領域のオフセット値及び
繰り返し単位塩基数

領域名	繰り返し単位 (bp)	不完全リピート	オフセット値 (bp)	シーケンス確認リピート数*
miru4	77	41bp の不完全配列が繰り返し配列の後に (ただし、BCGには不完全配列なし)	114 (BCGのオフセット値は61)	1,2,3,4
miru10	53	51bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	273	0,1,2,4
miru16	53	7bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	369	1,3
miru26	51	12bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	246	1,5,6,7
miru31	53	49bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	162	2,3,4
miru40	54	16bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	230	1,2,3,4
ETR-A	75	23bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	195	3,4
ETR-C	58	37bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	102	3,4
Mtub04	51	30bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	167	0,2,3,4
Mtub21	57	34bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	149	2,3,4
Mtub30	58	44bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	261	1,3,4
Mtub39	58	52bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	283	0,1,2,3,4
QUB11b	69	9bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	67	2,3,4
QUB26	111	24bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	324	2,3,4,5
QUB4156	59	51bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	106	0,2,3,4
Mtub24	56	17bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	365	0,1,2
QUB11a	69	20bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	167	5,6,8,9,10
QUB15	54	45bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	90	1,2,3,4
QUB18	78	21bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	231	3,7,8,9
QUB3232	56	46bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	423	0, 4, 5
QUB3336	59/58	34bp の不完全配列が繰り返し配列の後に 一塩基欠損不完全リピート複数あり	171	5.0, 5.9, 7.9, 9.0
VNTR3820	59/57	合計52bp の不完全配列が繰り返し配列の前後に分かれて存在 2塩基欠損不完全リピート多数あり	328	1.9, 3.9, 4.9, 6.0, 6.8,
VNTR4120	57	23bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	333	2,4,7,8,9,10,12
VNTR2372	57	10bp の不完全配列が繰り返し配列の後に	184	1,2,3,4

*用いた菌株のシーケンスにより確認した繰り返し回数

3・2 繰り返し回数の算出

3・2・1 VNTR 領域の真の値と見かけの値の相関性

表 3 に真の値と見かけの値の相関性を表した式を示す。比較した大きさの範囲内において、miru10 領域のように真の値と見かけの値にほとんど差がない領域 ($y = 0.85201 + 1.0092x$) がある一方、QUB3232 のように傾きが大きく、PCR 産物の大きさが大きくなるほど真の値と差が広がる領域 ($y = -155.64 + 1.4297x$) があつた。シーケンサーでの泳動の場合、1 本鎖での泳動となり、さらに結核の VNTR 領域の場合 GC 含量が高いため、領域によっては立体構造をとることにより真の値とずれが大きくなる可能性が考えられた。しかしながら、いずれの領域においても比較した大きさの範囲内においては、真の値と見かけの値の間で良好に線形性を示した ($r = 0.999$ 以上) ことから、繰り返し回数が既知の PCR 産物を適切に組み合わせることによって検量線として用いることができることが分かった。

表 3 真の値とみかけの値の相関性

領域名	真の値と見かけの値の相関式 (y : 真の値、 x : 見かけの値)	r	相関式作成に 用いた検体数
miru4	$y = 1.2388 + 1.0307x$	$r = 0.99997$	12
miru10	$y = 0.85201 + 1.0092x$	$r = 0.99997$	12
miru16	$y = 7.163 + 1.0323x$	$r = 0.99972$	12
miru26	$y = 12.137 + 1.062x$	$r = 0.99995$	11
miru31	$y = 3.7058 + 1.0089x$	$r = 0.99996$	12
miru40	$y = 8.2885 + 1.0585x$	$r = 0.99999$	15
ETR-A	$y = 3.1236 + 0.99811x$	$r = 0.99996$	12
ETR-C	$y = 4.6071 + 1.0938x$	$r = 0.99889$	12
Mtub04	$y = 5.6432 + 1.0857x$	$r = 0.99986$	11
Mtub21	$y = 6.3069 + 1.0628x$	$r = 0.99984$	11
Mtub30	$y = 1.3387 + 1.0082x$	$r = 0.99997$	12
Mtub39	$y = 72.022 + 1.3402x$	$r = 0.99999$	7
QUB11b	$y = 2.1196 + 1.0106x$	$r = 1$	12
QUB26	$y = 20.867 + 0.99484x$	$r = 0.99995$	6
QUB4156	$y = 0.40108 + 1.0361x$	$r = 0.99992$	11
Mtub24	$y = 11.667 + 1.0441x$	$r = 0.99992$	12
QUB11a	$y = 6.3427 + 0.99274x$	$r = 0.99992$	10
QUB15	$y = 2.3929 + 1.0175x$	$r = 0.99995$	12
QUB18	$y = 4.9181 + 0.99942x$	$r = 0.99998$	6
QUB3232	$y = 155.64 + 1.4297x$	$r = 0.99999$	7
QUB3336	$y = 22.451 + 1.1547x$	$r = 0.999$	10
VNTR3820	$y = 41.557 + 1.1843x$	$r = 0.99982$	9
VNTR4120	$y = 87.268 + 1.2753x$	$r = 0.99999$	9
VNTR2372	$y = 64.966 + 1.3471x$	$r = 0.99995$	9

3・2・2 パルスフィールド・ゲル電気泳動による繰り返し回数算出

図 1 に LIZ 1200 マーカーの範囲 (40-1200 bp) 外の大きさの PCR 産物をパルスフィールド・ゲル電気泳動した結果を示す。前述の条件で、2000 bp 程度の比較的大きな産物も 50 bp 程度の分解能を示した。パルスフィールド・ゲル電気泳動は、シーケンサーによるフラグメン

ト解析と異なり、DNA の大きさをデジタルで表示するのは難しく、また、泳動にも時間を要するが、DNA を 2 本鎖のまま泳動するので、特に大きい産物においては見かけの値よりも真の値を反映していると考えられる。また、QUB11a 領域は 1800-2200 bp の間に 4 通りの大きさのバンドが (図 1、Lane 13-16)、QUB11b 領域は約 2000 bp の大きさのバンドが存在することが分かった (図 1、Lane 1)。しかしながら、これらの PCR 産物の繰り返し回数を算出しようと試みたところ、それぞれ数 10 bp 程度ずつ真の値とずれがでていることが分かった。一方、同時に参考に泳動した 1000 bp 以下の QUB11a 領域の PCR 産物の大きさは、真の値に近い泳動像を示した (図 1、Lane 9-12)。

3・2・3 スタッパーピーク数の計測による繰り返し回数算出

岩本らは⁶⁾、LIZ 1200 マーカー (40-1200 bp) の範囲を超える大きさの PCR 産物の繰り返し回数を簡易に算出する方法として、繰り返し回数が既知の PCR 産物を基準とし、スタッパーピーク数を計測する方法を示している。そこで、本方法の有用性を確認するため、パルスフィールド・ゲル電気泳動による結果と比較したところ、QUB3232 領域において一致した結果を得ることができた (図 1、図 2)。よって、本方法を用いれば比較的大きな産物においても、ゲル電気泳動することなく、より正確な繰り返し回数を算出できることが分かった。一方、QUB11a 領域の大きい産物についてはスタッパーピークがほとんど見られなかったことから比較ができなかった。

3・3 QUB11a 領域への IS6110 の挿入

3・2・2 の結果から、QUB11a 領域への何らかの配列の挿入が疑われた。QUB11a 領域に関して IS6110 の挿入の報告⁷⁾があったため、QUB11a 領域、QUB11b 領域の 1800 bp 以上の PCR 産物 10 検体について IS6110 の挿入の有無を塩基配列解析したところ、全ての検体において IS6110 (1360 bp) の挿入が確認された。IS6110 が挿入されているものについての繰り返し回数の算出については、仮に QUB11a の PCR 産物の大きさが 2080 bp であったとすると、その大きさのみで繰り返し回数を算出すると 27-28 となるが、IS6110 の大きさ 1360 bp を考慮した場合は 2080 bp から 1360 bp を減じて繰り返し配列の数は約 8 ということになる。しかし、一般的な VNTR 解析条件では、PCR 産物の大きさのみを対象とすべき、つまり、IS6110 が挿入された繰り返し回数 n の株と IS6110 が挿入されていない繰り返し回数 n の株は異なる物と考えられる。よって、当所においては、塩基配列解析によって IS6110

の挿入が確認された株においても、IS6110 分の大きさを差し引かずに繰り返し回数の算出を行うこととした。

4 まとめ

VNTR 解析の上で重要となる繰り返し回数の算出方法を確認することを目的として、VNTR 領域の塩基配列決定・解析、シーケンサーによるフラグメント解析、スタッパーピーク数の計測およびパルスフィールド・ゲル電気泳動を行った。今回の検討結果を考慮して、今後の VNTR 解析は、①シーケンサーによるフラグメント解析を行い、検量線により繰り返し回数を算出、②シーケンサーによるフラグメント解析の直線性が低くなる大きい PCR 産物の場合はスタッパーピーク数を計測することにより算出、③QUB11a や QUB11b の 2000 bp 程度の大きい PCR 産物の場合はゲル電気泳動で算出するといった 3 つの段階を踏んで行っていく予定である。

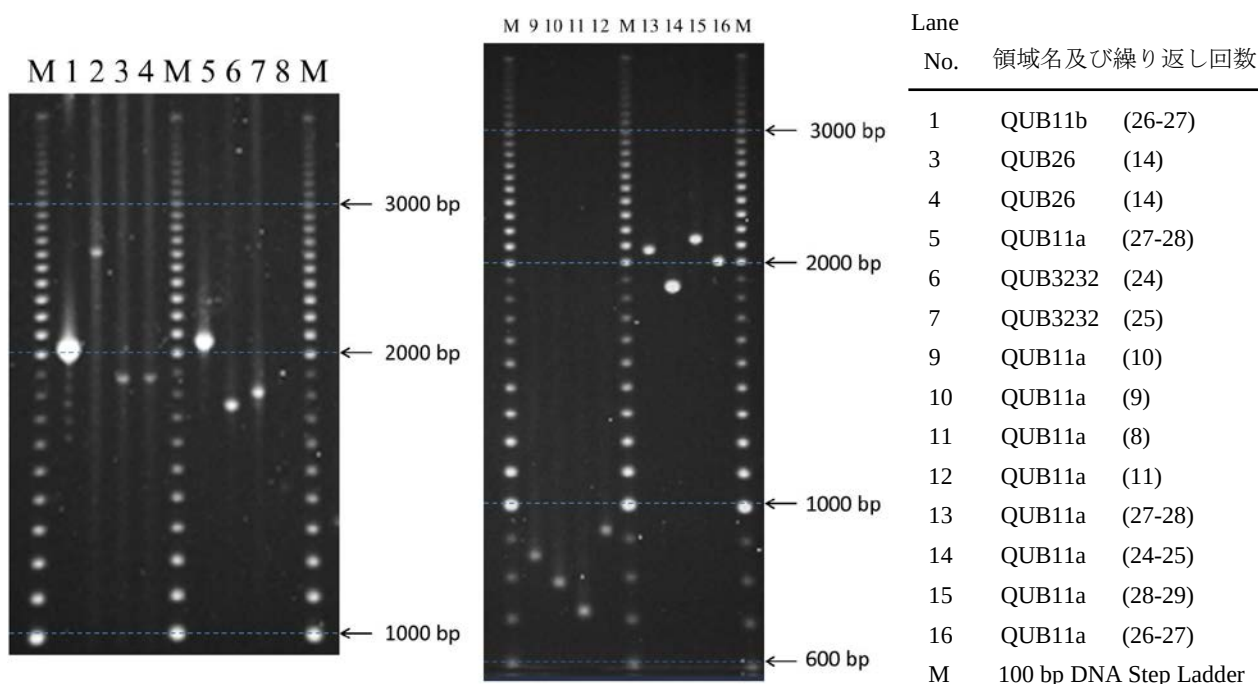
VNTR 解析の最終的な目標は用いた VNTR 領域 24 領域をそれぞれ株間で比較し、一致する株はないか、流行株はないか検索し、実地疫学とリンクさせることで新たな集団感染を感知したり、注意喚起を促すことであると考えられる。今回の検討はあくまで VNTR 解析の基礎となる部分に過ぎないが、今後、分与いただいた株の VNTR 解析を蓄積することにより、福岡県の結核対策の一役を担うと考えられる。

謝辞

当所で VNTR 解析を開始するにあたって、多大なるご助言をいただきました大分県衛生環境研究センター 緒方喜久代先生、千葉県衛生研究所 横山栄二先生並びに長崎大学熱帯医学研究所 和田崇之先生に深謝いたします。

文献

- 1) 厚生労働省
(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-ka nsenshou03/11.html>)
- 2) 前田 伸司ら：結核，83 (10)，673-678，2008.
- 3) 和田 崇之，長谷 篤：結核，85 (12)，845-852，2010.
- 4) E. Yokoyama *et al.* : Infect Genet Evol., 10 (7), 913-918, 2010.
- 5) S.H. Mehdikhani and N. Rokni : World Appl Sci J., 19 (4), 504-509, 2012.
- 6) T. Iwamoto *et al.* : FEMS Microbiol Lett., 270 (1), 67-74, 2007.
- 7) S. Rodríguez *et al.*: Emerg Infect Dis., 17 (3), 532-535, 2011.



※()内はパルスフィールド・ゲル電気泳動により算出した繰り返し回数

図1 2000 bp 付近の PCR 産物のパルスフィールド・ゲル電気泳動像

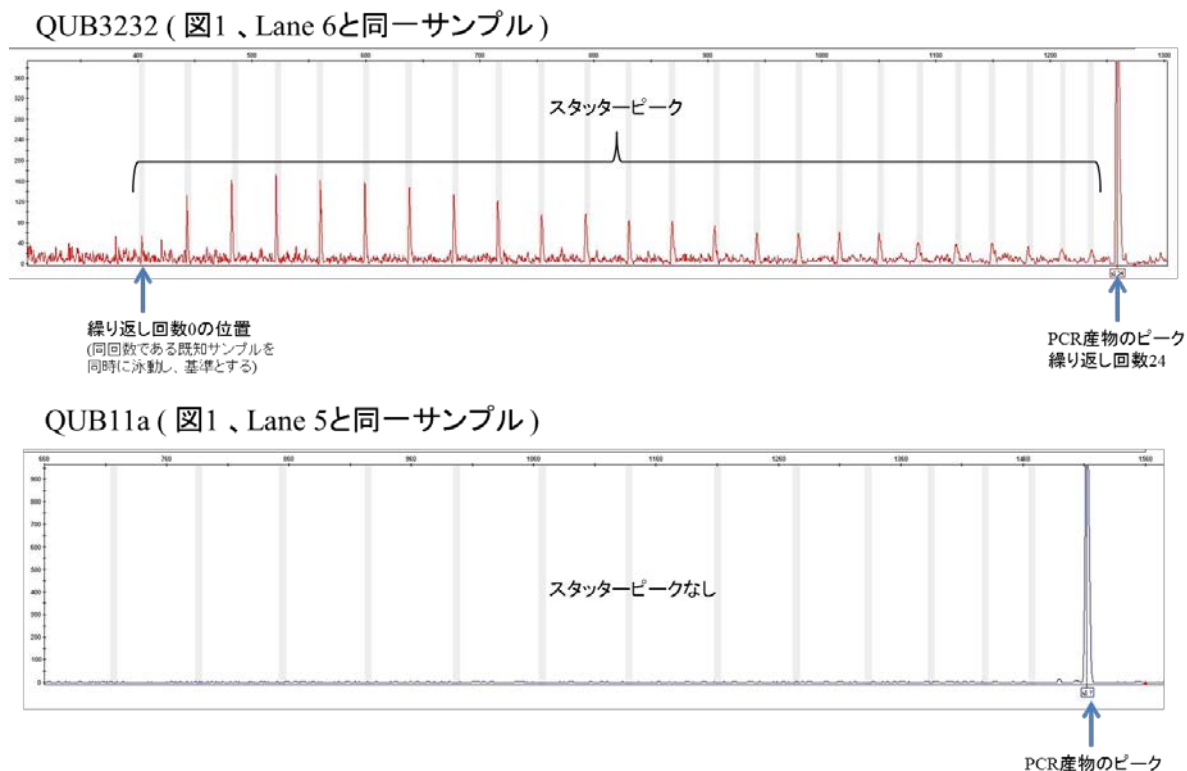


図2 スタッターピークを利用した繰り返し回数の算出

Genotyping method by variable number of tandem repeats (VNTR) for *Mycobacterium tuberculosis*

— Basic study for calculation of repeat number —

Eriko MAEDA, Akira OISHI, Yoshiki ETOH, Koichi MURAKAMI, Nobuyuki SERA and Kazumi HORIKAWA

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

VNTR analysis is a useful method to evaluate *M. tuberculosis* isolates molecular epidemiologically. This research was performed to establish the method for analyzing variable number of tandem repeats (VNTR) of the pathogen in our laboratory. In the results, it was confirmed that the relation between number of tandem repeats of *Mycobacterium tuberculosis* based on DNA sequencing (defined as “true value”) and those based on fragment analysis with sequence analyzer (defined as “apparent value”) showed a linear correlation during a certain size of PCR products. Therefore, VNTR can be analyzed by means of calibration curve obtained from PCR products of each VNTR-region that repeats number had been acquired. For calculation of repeat number for large size of PCR products showing low linearity between the true value and apparent value, it was useful to use counting the number of stutter peaks, which are observed in fragment analysis by sequence analyzer, or determining size of PCR products by pulsed field-gel electrophoresis. Moreover, it was revealed that around 2000 bp PCR products of certain locus (QUB11a and QUB11b) was occasionally inserted with sequence of IS6110 with the base sequence. In conclusion, repeats number can be accurately calculated by combining fragment analysis by sequence analyzer, counting the number of stutter peaks and pulsed field-gel electrophoresis.

[Key words; *Mycobacterium tuberculosis*, VNTR, fragment analysis, Genotyping]