

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08403

研究課題名(和文)細菌の2成分転写制御系による多剤耐性化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of multidrug resistance by a bacterial two-component transcriptional regulatory system

研究代表者

小川 和加野 (Ogawa, Wakano)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90397878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性肺炎桿菌Em16-1とその親株ATCC10031について、トランスクリプトーム解析を実施した。顕著に発現が変化した遺伝子(Log fold change = |2|以上)は44個見出された。変異株Em16-1では、kexDの他kdrABの発現上昇が観察された。従って、kdrABはこの遺伝子の発現をself controlしている可能性が高い。その他、Em16-1では、ホスホン酸の輸送や利用に関係する遺伝子の発現増加が認められた。また、ウリジン2リン酸グルクロン酸から4-アミノ-4-デオキシ-L-アラビノースを合成してLPS修飾を行う酵素遺伝子arnBCADTEFの発現上昇が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KdrABにより発現制御される遺伝子群を同定した。これらの遺伝子の一部は、コリスチン耐性株でも発現上昇が報告されていた。従って、KdrBの変異は多剤排出ポンプKexD発現を上昇させるのみでなく、コリスチン耐性化に関わる遺伝子群の発現を上昇させることが示唆された。一方で、Em16-1ではコリスチン耐性の上昇は認められなかった。この結果からコリスチン耐性化とKdrABの間には、別の因子が介在している可能性が考えられ、本研究は肺炎桿菌の抗菌薬耐性について、新たな知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis was performed on multidrug-resistant *K. pneumoniae* Em16-1. Compared to the parental strain ATCC10031, forty-four genes were significantly up-regulated. In the mutant strain Em16-1, we observed elevated expression of kdrAB as well as kexD. Therefore, it is highly possible that the expression of kdrAB is self-controlled by itself. Increased expression of genes related to phosphate transport and phosphate utilization was observed in Em16-1. Increased expression of the enzyme gene arnBCADTEF, which synthesizes 4-amino-4-deoxy-L-arabinose from uridine diphosphate glucuronic acid for LPS modification, was also observed.

研究分野：微生物学

キーワード：多剤排出ポンプ 薬剤耐性 転写制御 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌は世界的に増加、蔓延の傾向にある一方で、新たな抗菌薬の開発は減少傾向にあり、これは国際社会でも大きな課題となっている。2015年に薬剤耐性 (AMR) に関するグローバル・アクション・プランが採択され、日本においても AMR 対策についての活動が展開されている。しかし、本研究を開始してから今日に至るまで、画期的な進展があったわけではなく、薬剤耐性菌は社会問題であり続けている。そして、肺炎桿菌も薬剤耐性化が問題になっている細菌の一つである。

肺炎桿菌はヒト腸管や環境中に存在しているが、アルコール中毒、糖尿病などの基礎疾患を持つ患者において壊死性の大葉性肺炎を起こす。また、大腸菌に次ぐ尿路感染症の主要な原因菌である。本菌による感染症に対しては、通常は  $\beta$ -ラクタム系薬 (セフェム系、カルバペネム系) やキノロン系抗菌薬を用いる。しかし、カルバペネム耐性やキノロン耐性を示す肺炎桿菌が増加しており、臨床現場の深刻な問題となっている。

カルバペネム耐性は、広域スペクトルの  $\beta$ -ラクタマーゼの獲得、あるいは外膜タンパク質の変異・欠失により生じる例が一般的によく知られている。また、キノロン耐性は多くの場合、ゲノム上の DNA ジャイレース遺伝子の特定部位 (キノロン耐性決定領域) に変異が生じることで生じる。これらの耐性機構は構造的に異なる系統の抗菌薬に対して、交叉耐性を示さない。従って、各抗菌薬に対する耐性は順次獲得する必要がある。しかし、多剤排出ポンプによる耐性化は作用機序が異なる複数の系統の抗菌薬に対して同時に耐性を与える。

多剤排出ポンプは認識する基質の種類が幅広く、抗菌薬をはじめ、細菌に対して毒性を示す様々な化学物質を細胞外に排出し、その細胞内濃度を低下させることで多剤耐性を与える。ただし、細菌は一般的にゲノム上に複数の多剤排出ポンプ遺伝子を持っているものの、その全てが常に発現し、機能しているわけではない。しかし、緑膿菌の多剤排出ポンプ MexCD や MexEF のように通常はあまり発現していないが、発現誘導物質の存在や変異により、発現上昇する例がしばしば報告されている (J Antimicrob Chemother. 2003;51(4):991-4, Microbiol Immunol. 2013;57(4):263-72)。

研究開始当初、私は肺炎桿菌の高度多剤耐性変異株 13 株を分離していた。そして、これら全ての変異株で何らかの多剤排出ポンプの活性が亢進していることを明らかにしていた。さらに、13 株のうち 8 株が多剤排出ポンプ KexD の発現上昇株であることを確認していた。

これらの KexD 発現上昇株では一部の  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬、マクロライド、テトラサイクリンといった抗菌薬の他、界面活性剤や胆汁酸に対する耐性も上昇していた。KexD は緑膿菌の MexCD などと同様に通常は発現していない。従って、KexD の発現を抑制するメカニズムが存在していると考えられる。また、分離した変異株の *kexD* 遺伝子そのものやその隣接領域に変異は同定されなかった。さらに調べた結果、*kdrB* 遺伝子 (ゲノムプロジェクトによる遺伝子番号: KPN\_RS11140) に変異が存在していた。KdrB はタンパク質の一次構造上の類似性から、2 成分転写制御因子であり、KdrA (ゲノムプロジェクトによる遺伝子番号: KPN\_RS11135) とともに機能していると推定された。

## 2. 研究の目的

2 成分転写制御系は細菌に特有の系であり、細胞膜に存在する Sensor kinase が外界からの刺激を受けることにより、細胞質の Response regulator をリン酸化 脱リン酸化して遺伝子の転写制御を行うと考えられている。また、2 成分転写制御系はグローバルに細菌の様々な転写制御を行っている例が多く報告されている。

以上の点を踏まえて、大きく分けて、1) KdrAB による多剤排出ポンプ KexD の発現制御メカニズムの分子レベルでの解析、2) KdrAB によって制御される遺伝子群の同定、という 2 つの目的を掲げた。ただし、コロナ禍等の影響もあり、途中から 2) の目的に絞って本研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) KdrAB による多剤排出ポンプ KexD の発現制御メカニズムの分子レベルでの解析

KdrA が *kexD* 上流域と直接相互作用しているかどうか調べるため、Gel shift assay による検討を目指した。そして、そのためのタンパク質精製用プラスミドの構築およびタンパク質精製を実施した。

### (2) KdrAB によって制御される遺伝子群の同定

次世代シーケンサーを利用して RNA シーケンスを行い、KdrB 変異株と親株で発現遺伝子および発現量の比較を行った。次世代シーケンサーの利用は計画当初は、アウトソーシングする予定だったが、広島大学大学院医歯薬保健学研究科薬学分野 黒田照夫氏の協力のもと、広島大学自然科学研究支援開発センターにおいて実施した。

後期対数増殖まで培養した肺炎桿菌株について、キアゲンの RNAeasy mini kit を利用し、Total RNA を調製した。RNA のクオリティは RNA 調製後の電気泳動及びバイオアナライザー (Agilent 2100) で確認した。バイオアナライザーによる解析の結果、いずれのサンプルも RIN 値 = 10 であり、RNA の質は担保されていた。NEB Next rRNA Depletion Kit (Bacteria) (New England Biolabs Japan Inc.) を利用し、Total RNA から rRNA を除去した。除去後、バイオアナライザーにより rRNA が除かれていることを確認した。rRNA 除去後のサンプル調製には NEB Next Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina を使用した。シーケンシングは Illumina Miseq で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) KdrAB による多剤排出ポンプ KexD の発現制御メカニズムの分子レベルでの解析

*kdrA* 遺伝子を発現プラスミドに組み込み、タンパク質の大量発現を目指した。構築したプラスミドから大量発現することはできたが、ほぼ全てのタンパク質がインクルージョンボディを形成し、沈査画分に移行した。培養条件や IPTG 濃度の変更など条件検討を実施したが、改善されなかった。検討中にコロナ禍に見舞われたため、トランスクリプトーム解析を優先して進めることとした。

##### (2) KdrAB によって制御される遺伝子群の同定

###### サンプル調製法の検討

発現解析用の RNA サンプルから rRNA を除去するキットとして、イルミナ社の RiboZero が販売されていたが、これが本研究期間中に販売中止となり入手できなかった。そのため、rRNA の除去法の検討から実施する必要性が生じた。

まず、イルミナ社 RiboZero の後継試薬として推奨された Invitrogen MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit と Invitrogen MICROBExpress™ Bacterial mRNA Enrichment Kit について検討を行った。バイオアナライザーによる解析により、両キットともに rRNA が残存しており、トランスクリプトーム解析には使用できないことが判明した (図 2-C, D)。

その後、NEB 社から Next Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina が販売されたため、これについても検討を行った。Next Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina では RiboZero と類似の波形が観察され、rRNA が除去されていることが分かった。従って、この方法による rRNA 除去を行うことにした。

###### トランスクリプトーム解析

Illumina Miseq を利用した 75bp シングルエンドシーケンスにより、それぞれのサンプルについて 1.5 million 程度のリードを得た。RNA シーケンス結果の品質は、FASTQC 解析により評価した。その後、ATCC が提供する *K. pneumoniae* ATCC10031 ゲノムにアラインメントした。ゲノム情報をもとに、Prokka Genome Annotation (v1.14.5) を用いてアノテーションを行った。アラインメントの結果から各遺伝子領域内にアラインメントされたリード数をカウントし (raw count) それを元に発現量の定量化、および ATCC10031 を control とした 2 群間での有意差検定を実行した。raw count は負の二項分布に従うと仮定した Generalized Linear Model (GLM) で算出した。サンプル間のノーマライゼーションには TMM 法をもちいた。2 グループ間での有意差検定には Wald test を用いた。

肺炎桿菌 Em16-1 と ATCC10031 の遺伝子発現を比較した結果、有意に発現が変化した遺伝子は 61 遺伝子存在していた (P 0.05)。さらに

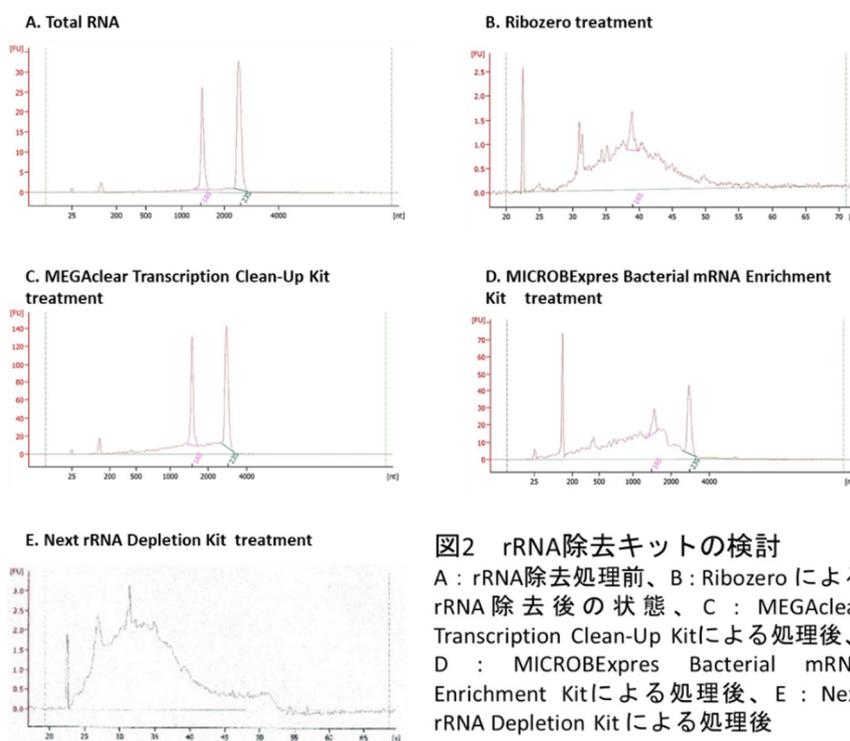


図2 rRNA除去キットの検討

A : rRNA除去処理前、B : Ribozero による rRNA 除去後の状態、C : MEGAclean Transcription Clean-Up Kit による処理後、D : MICROBExpress Bacterial mRNA Enrichment Kit による処理後、E : Next rRNA Depletion Kit による処理後

Log fold change = | 2 | 以上の遺伝子は 44 個見出された。表 1 にその一部の結果を示す。

多剤耐性変異株 Em16-1 では、親株と比較し、*kexD* の発現上昇が検出された。このことは、この実験系がきちんと機能していることを意味している。また、*kdrAB* の発現上昇も観察された。従って、*kdrAB* はこの遺伝子の発現を self control している可能性が高い。

Em16-1 では *kexD* や *kdrAB* の他に、リン酸の輸送や利用に関係する多くの遺伝子の発現の増加が認められた。ホスホン酸は炭素-リン(C-P)結合を構造中に含む有機リン化合物の総称である。肺炎桿菌のゲノムでは、このホスホン酸塩の利用に関する遺伝子が *phnEDC* と *phnFGHIJKLM* に分かれて存在しており、これら両オペロンの発現上昇が観察された。また、アミノエチルホスホン酸の輸送タンパク質をコードする *phnSTUV*、4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) 生合成に関与する *arnBCADTEF* 遺伝子の発現上昇も観察された。

過去にトランスポゾン (Tn) を用いて、*kdrAB* 以外の *kexD* 発現に関連する候補遺伝子として、imidazole glycerol phosphate synthase 遺伝子 や formate dehydrogenase、RNA helicase 遺伝子などが検出された。これらの遺伝子の既知の機能と *kexD* 発現の間にはどのような関連があるのかは明らかではないが、実際に Tn 挿入により *kexD* 発現が消失することを確認している。しかし、今回のトランスクリプトーム解析では、これら Tn により検出された遺伝子群は全く検出されなかった。

表1 発現変化が認められた遺伝子 (一部抜粋)

Gene ID	Gene Name	Log fold change	Description
KPN_RS11125		10.493	Hypothetical protein gene in upstream of <i>kexD</i>
KPN_RS11120	<i>kexD</i>	5.493	RND-type multidrug efflux pump, <i>kexD</i>
KPN_RS11140	<i>kdrB/crrB</i>	4.639	Response regulator gene of two component regulatory system
KPN_RS11135	<i>kdrA/crrA</i>	2.173	Histidine kinase gene of two component regulatory system
KPN_RS01550	<i>phnD</i>	6.729	phosphonate transport system substrate-binding protein gene, <i>phnEDC</i> operon
KPN_RS01555	<i>phnC</i>	5.566	phosphonate transport system ATP-binding protein gene, <i>phnEDC</i> operon
KPN_RS11115		5.022	putative GNAT family N-acetyltransferase gene in the downstream of <i>kexD</i>
KPN_RS24215	<i>phnJ</i>	4.875	$\alpha$ -D-ribose 1-methylphosphonate 5-phosphate C-P lyase gene, <i>phnFGHIJKLM</i> operon
KPN_RS01540	<i>phnE</i>	4.392	phosphonate transport system permease protein gene
KPN_RS10400		3.553	Hypothetical protein gene
KPN_RS21910	<i>phnT</i>	3.297	2-aminoethylphosphonate transport system ATP-binding protein gene, <i>phnSTUV</i> operon
KPN_RS20780	<i>arnB</i>	3.279	UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose-oxoglutarate aminotransferase gene, <i>arnBCADTEF</i> operon
KPN_RS16830	<i>sfnC</i>	-2.222	putative FMNH2-dependent monooxygenase <i>sfnC</i> gene
KPN_RS16825	<i>ssuA_3</i>	-2.247	aliphatic sulfonate ABC transporter substrate-binding protein
KPN_RS10890	<i>ddpD</i>	-2.314	peptide/nickel transport system ATP-binding protein gene, possibly KPN_RS10880-10895 operon
KPN_RS10885	<i>gsiD_2</i>	-2.634	ABC transporter permease, possibly KPN_RS10880-10895 operon
KPN_RS03445	<i>xyIG_2</i>	-2.465	sugar ABC transporter ATP-binding protein, possibly KPN_RS03435-03450 operon
KPN_RS21095	<i>yhjX</i>	-3.546	MFS transporter

本研究により、KdrB の変異は多剤排出ポンプ KexD 発現を上昇させるのみでなく、コリスチン耐性化に関わる遺伝子群の発現を上昇させることが示された。一方で、私が所有する多剤耐性肺炎桿菌 Em16-1 は、KdrB に変異があるものの、コリスチン耐性の上昇は認められなかった。この結果からコリスチン耐性化と KdrAB の間には、別の因子が介在している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ni Rui Ting, Onishi Motoyasu, Mizusawa Minako, Kitagawa Ryoko, Kishino Takanori, Matsubara Futoshi, Tsuchiya Tomofusa, Kuroda Teruo, Ogawa Wakano	4. 巻 10
2. 論文標題 The role of RND-type efflux pumps in multidrug-resistant mutants of <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-67820-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toba S, Minato Y, Kondo Y, Hoshikawa K, Minagawa S, Komaki S, Kumagai T, Matoba Y, Morita D, Ogawa W, Gotoh N, Tsuchiya T, Kuroda T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) efflux pumps from <i>Serratia marcescens</i> , Db10.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41237-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toba S, Minato Y, Kondo Y, Hoshikawa K, Minagawa S, Komaki S, Kumagai T, Matoba Y, Morita D, Ogawa W, Gotoh N, Tsuchiya T, Kuroda T	4. 巻 9(1):
2. 論文標題 Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) efflux pumps from <i>Serratia marcescens</i> , Db10.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41237-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小川和加野
2. 発表標題 薬系大学における基礎研究からの提案
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会西日本支部総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川和加野、堂段駿太、Ni Ruiting、世良希央、黒田照夫、松原大
2. 発表標題 二成分転写制御系KdrB の変異による肺炎桿菌の多剤耐性化
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤有馬、森田大地、小川和加野、熊谷孝則、黒田照夫
2. 発表標題 <i>Serratia marcescens</i> における新規2 成分制御系SarS を介した消毒薬への馴化・耐性機構の解析
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥丸顕正、森田大地、小川和加野、熊谷孝則、黒田照夫
2. 発表標題 緑膿菌における多剤排出ポンプMexXY 及びMexCD-OprJ 共発現時の生育遅延
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田大地、澤田紘実、小川和加野、宮地弘幸、黒田照夫
2. 発表標題 大環状 bis(bibenzyl)化合物riccardin C類似体の抗菌活性と作用機構の解析
3. 学会等名 第30回微生物シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川和加野、堂段駿太、世良希央、黒田照夫、松原大
2. 発表標題 転写制御因子KdrABによる多剤排出ポンプ遺伝子kexDの制御メカニズムについて
3. 学会等名 細菌学若手コロッセウム in OKAYAMA
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wakano Ogawa, Hayata Dodan, Rui-ting Ni, Motoyasu Onishi, Futoshi Matusbara, Tomofusa Tsuchiya and Teruo Kuroda
2. 発表標題 Isolation and analysis of multidrug resistant mutants from Klebsiella pneumoniae ATCC10031
3. 学会等名 New Zealand Microbiological Society (NZMS) and New Zealand Society for Biochemistry and Molecular Biology (NZSBMB) joint annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本万裕、内野愛理、小川和加野、松原大
2. 発表標題 夏季と冬季での寒冷暴露負荷による唾液成分の違い
3. 学会等名 第139年会日本薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakano Ogawa, Ryoko kitagawa, Rui-ting Ni, Motoyasu Onishi, Futoshi Matusbara, Tomofusa Tsuchiya, Teruo Kuroda
2. 発表標題 Analysis of genome-derived RND-type multidrug efflux pump OqxAB in antimicrobial resistant mutant from Klebsiella pneumoniae ATCC10031
3. 学会等名 IUMS2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北川良子、Ni Ruiting、土屋友房、黒田照夫、松原大、小川和加野
2. 発表標題 肺炎桿菌のRND型多剤排出ポンプoqxAB発現上昇変異株の分離と変異部位の同定
3. 学会等名 第29回微生物シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川和加野、岡村真弥、森田大地、松原大、黒田照夫
2. 発表標題 肺炎桿菌を用いた多剤耐性菌の分離および新規抗菌薬の探索
3. 学会等名 第51回ヒブリオシンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	黒田 照夫  (Kuroda Teruo)  (80304327)	広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・教授   (15401)	
連携研究者	森田 大地  (Morita Daichi)  (80826371)	広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・助教   (15401)	
連携研究者	廣村 信  (Hiromura Makoto)  (30411036)	第一薬科大学・薬学部・准教授   (37107)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------