

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07101

研究課題名(和文)バンコマイシン耐性腸球菌の新規薬剤耐性プラスミドの高頻度伝達能に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of the pMG1-like highly conjugative plasmids in vancomycin-resistance enterococci

研究代表者

富田 治芳 (Tomita, Haruyoshi)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70282390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)から発見したバンコマイシン耐性pMG1型高頻度伝達性プラスミドpHTの接合凝集は細胞外マトリックスを介した菌の付着性には関与しないことが示唆された。pHTの重要な伝達関連遺伝子としてtraDとtraFを新たに同定した。traDは接合凝集とプラスミドの伝達性に必須の遺伝子で伝達関連遺伝子群の正の転写調節因子であった。またtraD上流に存在するtraFはtraD上流からの転写活性を負に調節する遺伝子であった。一方、国内の臨床分離VRE株の解析から、pMG1型プラスミドとは異なる腸球菌の薬剤耐性高頻度伝達性線状プラスミド(pELF1型プラスミド)を新たに発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸球菌の効率的な多剤耐性化と耐性遺伝子の急速な伝播と拡散に寄与する薬剤耐性pMG1型高頻度接合伝達性プラスミドの高頻度伝達の分子機構の一部について解明し、多剤薬剤耐性菌の制御のための基盤となる知見を得た。pMG1型プラスミドの分子疫学研究の過程で、腸球菌としては世界で初めてとなる薬剤耐性伝達性線状プラスミド(pELF1型プラスミド)を発見した。pELF1型プラスミドはハイブリッド型末端構造を持ち、腸球菌の異菌種間の接合伝達が可能であった。またpELF1型プラスミドによるバンコマイシン耐性遺伝子の伝播と拡散が国内の一部の地域でVRE株が増加している一因であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mating aggregate of pHT plasmid (a pMG1-like plasmid) did not confer the bacterial adhesion through the extra cellular matrix.

Two key transfer genes of pHT plasmid, traD and traF were newly identified in this study. traD was a master regulator and essential for both of mating aggregates formation and plasmid transfer. traF was a negative regulator of the transcript of transfer region including traD and mating aggregate genes.

Through this research project, the novel enterococcal highly-conjugative linear plasmids named as pELF1-like plasmids, which were different from pMG1-like plasmids, were discovered from Japanese VRE clinical isolates for the first time in the world.

研究分野：医科細菌学(細菌の病原性)、薬剤耐性菌

キーワード：バンコマイシン耐性腸球菌 高頻度伝達性プラスミド 接合凝集 定着因子 転写調節因子 線状プラスミド 異菌種間接合伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

諸外国において院内感染症の起因菌として各種の多剤耐性菌が深刻な問題となっている。このうちバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE: Vancomycin-Resistant Enterococci) は欧米や近隣諸国で増加し、蔓延している。日本においても感染症法によって5類感染症(全数把握)として分類されているが、国内での報告数は年間100例前後のため、欧米諸国と比較して国内で分離されるVRE株についての基礎的研究は少ない。本研究では我が国の臨床分離VRE株における薬剤耐性遺伝子の伝播と拡散に寄与するpMG1型高頻度接合伝達性プラスミドに関する基礎研究を行なう。

2. 研究の目的

我々はこれまでの研究からVREに新規のpMG1型高頻度接合伝達性プラスミドが広く存在していること、およびこの新規プラスミドを保持する腸球菌が凝集性を示すことを明らかにした。本研究では、新規プラスミドによる凝集性の分子機構について詳細に解析すると共に、薬剤耐性遺伝子の伝達および病原性(腸管定着能)との関係を明らかにすることを目指す。特に菌凝集の制御に関わる遺伝子の同定、および凝集を誘導するシグナルの解明を行う。それらの結果を基に遺伝子発現や誘導シグナルに対する抑制物質探索の可能性を探り、新たなVRE感染症制御のための基礎的知見とする。

3. 研究の方法

本研究では腸球菌のpMG1型新規高頻度接合伝達性プラスミドについて以下のことを明らかにする。まず凝集に関与するプラスミド上の遺伝子の網羅的な同定を行なう。特に、凝集遺伝子の発現に関与する調節遺伝子群を明らかにし、個々の機能と役割を調べる。次に凝集性と伝達性との関連を明確にする。また腸球菌の接合凝集性と腸管内定着能(病原性)との関係を明らかにする。これらの解析を進める一方で、プラスミドの接合伝達を誘導するシグナルの同定を行なう。さらにプラスミドの伝達性、菌の接合凝集性と腸管内定着能を抑制する物質を探索し、最終的にはVREの拡散防止、VRE感染症の制御のための基礎的知見を得る。また、他国のVREを収集解析し、国内外におけるpMG1型プラスミドの拡散状況を分子疫学的に明らかにする。複数のpMG1型プラスミドが得られた場合、これらpMG1型プラスミドについての構造を比較解析し、その多様性およびpMG1型プラスミドの由来と起源、関連性を明らかにする。

具体的な研究内容として、次の から の項目を順次あるいは同時並列的に遂行する。

菌の凝集性と高頻度伝達性に関与する遺伝子を明らかにするために、プラスミド上の各ORF(open reading frame)破壊株を作成し、それらの表現形と遺伝子発現について調べる。凝集遺伝子発現調節機構を転写活性レベルで調べ、その誘導シグナルを探索する。転写活性を指標にしてその抑制物質の検索を試みる。凝集関連領域に存在する個々の遺伝子産物を生化学的に解析し、凝集性に直接関わる因子(細胞壁蛋白)およびドメイン領域を同定する。菌の凝集性と細胞外マトリクスへの付着との関連性をin vitroの系を用いて明らかにする。菌の凝集性とバイオフィルム形成能との関連性をin vitroの系を用いて明らかにする。他国の臨床分離VRE株が保持するpMG1型プラスミドの構造を明らかにし、比較解析を行なう。

4. 研究成果

上記の各研究項目について以下のような成果を得た。

トランスポゾン挿入変異株の解析によってpMG1型プラスミドの高頻度伝達性に関与する接合凝集性の責任領域を同定した。この領域内の最大のORFの欠失プラスミドを作成し、腸球菌に導入した。この株は元の野生型プラスミドを保持する株と比較し、液体培地中での菌凝集の減弱および伝達頻度が低下したことから、凝集関連遺伝子の一つと考えた。これら菌の接合凝集塊の形成に関与する領域の発現クローンをを用い、in vitroの付着アッセイ系を用い解析したところ、各種細胞外マトリクスへの明らかな付着性への関与(増強)は認められなかった。またこの遺伝子領域の転写活性を調べたところ、直上および下流のORF群と共にオペロンを構成していること、および直上のORF上流に存在するプロモーター活性が極めて強いことから、このプロモーターが接合凝集関連遺伝子群の発現に重要であることが推定された。またこのプロモーター領域の直下に存在するORFについて、その欠失プラスミドを構築した。この変異プラスミドを保持する株は液体培地中での接合凝集性の消失と同時に、固形培地中での接合伝達性も完全に失われていた。またこのORF変異体においては自身の転写と同時に凝集遺伝子領域とその下流の転写活性が著しく減弱していた。このORF全長をクローン化したプラスミドの共存によって変異が相補されたことから、このORFはプラスミドの伝達に必須の遺伝子であり、凝集遺伝子を含む

伝達関連遺伝子群の転写活性を正に調節していることが明らかとなり、新たに *traD* と命名した。また以前に同定した接合関連遺伝子 *traB* の変異体において *traD* 上流からの転写活性が減弱することから、*traB* による制御(正の調節作用)も受けていることが明らかとなった。さらに *traB* と *traD* の間に存在する複数の ORF についてその変異体を作製し解析したところ、一つの変異体において *traD* 上流のプロモーター活性が増強し、かつプラスミドの伝達頻度が上昇していた。またこの ORF をクローン化したプラスミドの共存によって *traD* 上流からの転写活性およびプラスミド伝達が抑制されたことから、この ORF は凝集遺伝子および伝達関連遺伝子の転写を負に調節する因子であることが明らかとなり、新たに *traF* と命名した。

一方、pMG1 型プラスミドの分子疫学研究として国内外で臨床分離された VRE 株を入手し解析を行った。海外(欧米、スペイン、台湾)の VRE (VanA 型 *E. faecium*) 株から複数の高頻度接合伝達性プラスミドを分離した。これらは pMG1 に特異的な *traA* および *traB* 遺伝子を保持しており、pMG1 型プラスミドであることが示された。これら国外の VRE 株から分離された複数の pMG1 型プラスミドの構造比較解析を行ったところ、国外の pMG1 型プラスミドはトランスポゾンや挿入配列 IS の挿入による差異が認められるものの、基本的なコア構造と各遺伝子(塩基配列)は高度に保存されており、国内で最初に発見された pMG1 と極めて類似した構造を持つことが明らかとなった。中国の臨床分離 VRE (VanA 型 *E. faecium*) 株から、プラスミド構造および塩基配列レベルでは pMG1 との高い同一性を認めない高頻度接合伝達性プラスミドを発見した。しかし、このプラスミドは pMG1 特異的な *traA* および *traB* 類似の遺伝子を保持することから、pMG1 とは遺伝学的にはやや離れているものの pMG1 類似の亜型プラスミドと考えられた。

この分子疫学研究(pMG1 型高頻度接合伝達性プラスミドの探索とその構造比較解析)の過程において国内の臨床分離 VRE 株から pMG1 型プラスミドとは全く異なる多剤耐性高頻度伝達性プラスミドを新たに発見した。プラスミド構造解析から、この新規の伝達性プラスミドは線状(直鎖型)プラスミドであることを明らかにし、pELF1(Enterococcal Linear-Formed plasmid)と命名した。pELF1 は腸球菌として初めての線状プラスミドであり、かつこれまで他の生物においても報告が無かったプラスミドの片端がヘアピン型、他端がインバートロン型構造を持つユニークなハイブリッド型構造の線状プラスミドであった。pELF1 はバンコマイシン耐性遺伝子を保持しており、腸球菌の異菌種間の接合伝達が可能であった。さらに pELF1 と類似構造のいわゆる pELF1 型伝達性線状プラスミドの異種間伝達によってバンコマイシン耐性を獲得した複数菌種の腸球菌が国内の一部の地域で拡散し、VRE が増加していることが明らかとなった。これらの発見は細菌学的また生物学的に、そして臨床的にも極めて重要な研究成果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Y, Taniguchi M, Uesaka K, Nomura T, Hirakawa H, Tanimoto K, Tamai K, Ruan G, Zheng B, Tomita H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel multidrug-resistant enterococcal mobile linear plasmid pELF1 encoding vanA and vanM gene clusters from a Japanese vancomycin-resistant enterococci isolate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 2568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.02568.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashimoto Y, Kita I, Suzuki M, Hirakawa H, Ohtaki H, Tomita H.	4. 巻 5(2)
2. 論文標題 First Report of the Local Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci Ascribed to the Interspecies Transmission of a vanA Gene Cluster-Carrying Linear Plasmid.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00102-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本祐輔, 野村隆浩, 平川秀忠, 玉井清子, 谷本弘一, 富田治芳
2. 発表標題 1.国内医療機関より分離されたVanA型とVanM型の2つのバンコマイシン耐性遺伝子群を保有する腸球菌の新規線状プラスミドに関する分子生物学的研究
3. 学会等名 薬剤耐性菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本祐輔, 野村隆浩, 谷本弘一, 富田治芳
2. 発表標題 2.国内医療機関より分離されたVanA型とVanM型の2つのバンコマイシン耐性遺伝子群を保有する腸球菌の線状プラスミドに関する分子生物学的研究
3. 学会等名 日本臨床微生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本祐輔, 野村隆浩, 平川秀忠, 谷本弘一, 富田治芳
2. 発表標題 9. VanA/VanM型の2つのバンコマイシン耐性遺伝子群を保有する腸球菌の線状プラスミドに関する分子生物学的研究
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020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

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