

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10055

研究課題名(和文)ブドウ球菌属の耐性獲得と水平伝播の背景は？：可動性遺伝因子の構造比較

研究課題名(英文)How the staphylococcal species acquire resistance, and how they exchange genetic information?

研究代表者

漆原 範子 (Urushibara, Noriko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80396308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ブドウ球菌属細菌は可動性遺伝子エレメント Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) の水平伝播により薬剤耐性をはじめとする遺伝情報を共有し、巧みに環境に適応する。本研究は、SCC の進化・伝播の様式を明らかにすることを目的とし、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)臨床分離株における SCC の遺伝子配列を決定し、既存の配列と比較構造解析を行った。新たな遺伝子構造を明らかにすると共に、コアグラールゼ陰性ブドウ球菌ゲノムからの水平伝播の可能性、及び形質への影響を考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌の蔓延は世界的な問題である。一方、新規の抗菌薬等の開発は停滞しており、耐性菌を含めた感染起因菌の動向調査に基づいた感染制御が必要不可欠である。特にわが国では MRSA の検出率がいまだ高く、克服すべき課題である。本研究ではブドウ球菌に特徴的な可動性遺伝因子に着目し、新規の遺伝子構造を見出し、宿主の表現型への寄与を検討した。得られた結果は、遺伝子構造多型に基づく感染起因菌の型別法に新たな情報を付加し、医療施設および市中での耐性菌の監視及び動向予測に資する結果と言える。

研究成果の概要(英文)：MRSA infection is an ongoing challenge. Staphylococcal species exchange genetic information through staphylococcal cassette chromosome (SCC). It encompasses not only drug resistance genes but also diverse genes useful for better adaptation to the unfriendly environment. The present study has aimed to reveal how the mobile genetic elements emerged, evolved, and spread among staphylococcal species. SCC elements obtained from MRSA clinical isolates were determined for their nucleotide sequences, and compared with staphylococcal genomes deposited in a public databank. Following two novel elements were identified: a novel subtype of type IX SCC carrying mec gene (SCCmec) in Myanmar MRSA, an SCC in MRSA from including speG and a staphylococcal surface protein coding gene (sasG) in Japanese MRSA. Obtained data suggests that they have originated in coagulase-negative staphylococcal species.

研究分野：衛生学

キーワード：ブドウ球菌 MRSA 可動性遺伝因子 水平伝播 SCCmec livestock

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトや哺乳動物の鼻腔・表皮粘膜の常在菌である一方、高い病原性と巧妙な耐性獲得のメカニズムを持ち、日和見感染や院内感染の重要な起因菌である。我が国ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の検出率がまだ高く、克服すべき課題である。ブドウ球菌属細菌は可動性遺伝子エレメント Staphylococcal cassette chromosome (SCC) の水平伝播によって遺伝情報を共有し、様々な環境下で定着してきた。最も良く研究されている SCC としてメチシリン耐性を担う SCC_{mec} を挙げることができる。SCC_{mec} は多様性に富み、14 種の遺伝子型が報告されている (I - XIV)。SCC_{mec} にコードされる β -ラクタム耐性遺伝子 *mecA/mecC* のみならず、non-*mec* SCC にも多様な耐性遺伝子が見られ、生物学的に優れた形質を付与している。例を挙げると、世界的に最も広く分布するクローン USA30 に見いだされた I 型 arginine catabolic mobile element (ACME) は低 pH 耐性を付与し、アセチルアセチルトランスフェラーゼ酵素遺伝子の一つ *speG* はポリアミン耐性に関与する。その多くはコアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) から伝播したと考えられている。SCC_{mec}、ACME、その他 SCC が連結して挿入された SCC 複合体 (SCC composite islands: SCC-CIs) も見出され、こうした SCC 複合体の集積および進化は、ブドウ球菌属細菌の環境適応における進化と関連していると考えられている。

2. 研究の目的

2014 年 WHO より薬剤耐性菌が全世界で拡大傾向にあると報告された。しかしながら新規抗菌薬等の開発は停滞しており、耐性菌を含めた感染起因菌の動向調査に基づく感染制御が必要不可欠である。

本研究は、MRSA 臨床分離株に見いだされた SCC/SCC-CIs の遺伝子構造を明らかにすることにより、(1) 比較ゲノム解析により進化・伝播の過程を考察し、(2) 分子疫学解析を行うにあたり必要な新規遺伝子データの充実に寄与する、の 2 点を通じ、今後の動態予測の基盤とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規 SCC_{mec} XIV 型とその構造

我々は、北海道の医療施設を訪れた外来患者由来の MRSA 2 株から新規の SCC_{mec} 型 XIV を見出して報告した (SC640 及び SC792 株)。うち SC640 株は truncated 型 (SCC_{mec} XIV Δ kdp/L-DR) で、組換え酵素が認識する直接繰り返し配列を欠いており、可動性を失っているものと予測された。抗生剤を含まない液体培地にて継代を繰り返し、PCR にて SCC_{mec} XIV Δ kdp/L-DR の脱落を検討した。

(2) *speG* 遺伝子を含む SCC の構造決定と宿主のポリアミン耐性

北海道の医療施設にて血液検体から分離された MRSA のうち、ポリアミン耐性に関与するアセチルアセチルトランスフェラーゼ酵素遺伝子 *speG* を保有する菌体が 2 株得られた (K504, K573)。 *speG* は、それぞれ稼働遺伝因子 SCC 内にコードされていた (SCC_{speG})。既存の配列を元に long-ranging PCR とサンガーシーケンス法を用いて SCC_{speG} を含む SCC-CIs の遺伝子構造を決定した。さらにディスク法にてポリアミン感受性を調べた。

(3) SCC_{mec} IX 型の新規サブタイプの構造決定

ヤンゴン市 (ミャンマー) の医療施設にて分離された MRSA 株に SCC_{mec} IX 型の新規サブタイプを見出し、次世代シーケンス法にて遺伝子構造を決定し、既存の配列と比較解析した。

4. 研究成果

(1) SCC_{mec}XIV Δkdp/L-DR の可動性

SC640 は 4 つの SCC 及び SCC-like ユニットから成っている。抗生物質を含まない培地で 300 継代まで培養し、構成している各ユニットの脱落を調べた。その結果、SCC_{mec}XIV Δkdp/L-DR の脱落を示す結果は得られなかった。淘汰圧のない環境では、fitness cost の高い SCC/SCC-CIs は組み換え酵素によって切り出されると考えられている。しかし、認識配列を失った場合は組み換え酵素の標的にはならず、耐性遺伝子が細菌染色体 ゲノムに定着する可能性が示唆された。同様の構造はルーマニア、及び韓国から分離された MRSA にも見られ、同じく可動性を失っていると推察されている。次世代シーケンス法の普及により、SCC_{mec}XIV Δkdp/L-DR を例とする不完全な SCC が現在に比べて高頻度で検出・同定されるものと予測される。遺伝情報の集積により、生成の様式や動態について新たな知見が得られるものと期待される。

(2) *speG* 遺伝子を含む SCC (SCC_{speG}) の構造決定と宿主のポリアミン耐性

アセチルアセチルトランスフェラーゼ酵素遺伝子 *speG* を保有する菌体 2 株 (K504, K573) の SCC-CIs の遺伝子構造を決定した。K573 の SCC-CIs は 4 つの SCC にて構成され、*speG* をコードする SCC_{speG} はデンマーク由来の MRSA 株 M1 に見出された SCC (SCC_{M1}) と同一の配列であった。K504 の SCC_{speG} (SCC_{speG_K504}) は、新規の構造であり、3' 側に、グラム陽性菌表面タンパク質 (*S. aureus* surface protein: SAS) の一つ、*sasG* をコードしていた。遺伝子データベースにて類似配列を検索すると、黄色ブドウ球菌に加え、CoNS のひとつ、*Staphylococcus epidermidis* 由来の配列が多くヒットした。比較構造解析から、SCC_{speG_K504} は 5' 側と 3' 側配列の由来が異なっており、遺伝子組み換え/編纂によって形成されたと考えられた。デンマーク分離株ゲノム中の SCC_{M1} も *S. epidermidis* 由来と考えられている。黄色ブドウ球菌は細菌の中では例外的に *speG* を持たず、ポリアミン感受性である。ポリアミンのひとつスペルミンに対する感受性を検討したところ、K504, K573 株はいずれも耐性を示し、一方、対照として用いた *speG* (-) の臨床分離株は感受性であった。以上のことから、K504, K573 株ゲノムの SCC_{speG} は各々 *S. epidermidis* から由来したと推察され、また宿主のポリアミン耐性に寄与することが明らかになった。

(3) SCC_{mec}IX 型の新規サブタイプの構造決定

ヤンゴン市 (ミャンマー) の医療施設にて分離された MRSA, S286 株は定法の PCR を用いた SCC_{mec} 型別によって、IX 型と同定された。次世代シーケンス法にて SCC_{mec} 全領域 (36kbp) の遺伝子構造を決定した。組み換え酵素を 2 組持つこと (*ccrA1B1* 及び *ccrA5B7*)、*mecA* 遺伝子の挿入方向が異なる等、既報のタイ由来株の SCC_{mec}IX (2 例) と遺伝子構造が異なり、新たなサブタイプと考えられた。SCC_{mec}IX は主として sequence type 9 (ST9) の遺伝子系統に属する MRSA に見出されている。ST9 はアジアにおける家畜由来 MRSA (LA-MRSA) の中心的な系統であり、近年では市中 (ヒト) から分離されている。既報の 2 例は CoNS 由来配列と相同性が高い領域をモザイク状に含んでおり、且つ互いに相同性が低く、各々が個別に形成されたと考えられている。S286 株の SCC_{mec}IX も同様であり、この特徴が SCC_{mec}IX に共通するか否か、地理的差異はどのように関連するか等、興味深く感じられた。しかしながら、現在のところ配列が決定・公開されている SCC_{mec}IX が本課題で解析した S286 も含めて僅か 3 例と少なく、これらの考察を行うに十分ではない。公的データベースも含めて配列情報の更なる充実により、発生・進化と環境や属性との関連について解析が可能になるものと期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Aung MS, Urushibara, Kawaguchiya M, Ito M, Habadera S, Kobayashi N	4. 巻 12
2. 論文標題 Prevalence and Genetic Diversity of Staphylococcal Enterotoxin (-Like) Genes sey, selw, selx, selz, sel26 and sel27 in Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins (Basel)	6. 最初と最後の頁 347 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12050347	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 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Hirose M, Ito M, Habadera S, Kobayashi N	4. 巻 24
2. 論文標題 Clonal diversity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from bloodstream infections in northern Japan: Identification of spermidine N-acetyltransferase gene (speG) in staphylococcal cassette chromosomes (SCCs) associated with type II and IV SCCmec	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 207 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.12.008	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 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Hirose M, Ike M, Ito M, Kobayashi N	4. 巻 10
2. 論文標題 Distribution of virulence factors and resistance determinants in three genotypes of Staphylococcus argenteus clinical isolates in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10020163	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 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Takahashi S, Ike M, Ito M, Habadera S, Kobayashi N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Molecular Epidemiological Characterization of Staphylococcus argenteus Clinical Isolates in Japan: Identification of Three Clones (ST1223, ST2198, and ST2550) and a Novel Staphylocoagulase Genotype XV.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms7100389	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 Urushibara N, Aung MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N.	4. 巻 75
2. 論文標題 Novel staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type XIV (5A) and a truncated SCCmec element in SCC composite islands carrying speG in ST5 MRSA in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Antimicrob Chemother	6. 最初と最後の頁 46-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jac/dkz406	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 -

1. 著者名 Aung MS, San T, Urushibara N, San N, Oo WM, Soe PE, Kyaw Y, Ko PM, Thu PP, Hlaing MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N.	4. 巻 26
2. 論文標題 Molecular Characterization of Methicillin-Susceptible and -Resistant Staphylococcus aureus Harboring Panton-Valentine Leukocidin-Encoding Bacteriophages in a Tertiary Care Hospital in Myanmar.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microb Drug Resist	6. 最初と最後の頁 360-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mdr.2019.0208	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 Sakurada M, Sumi H, Kaji K, Kobayashi N, Sakai Y, Aung MS, Urushibara N, Kobayashi N.	4. 巻 35
2. 論文標題 Pacemaker-associated infection caused by ST81/SCCmec IV methicillin-resistant, vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Microbes New Infect	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nmni.2020.100656	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 Aung MS, San T, San N, Oo WM, May Ko PM, Thet KT, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sum A, Kobayashi N	4. 巻 68
2. 論文標題 Molecular characterization of <i>Staphylococcus argenteus</i> in Myanmar: identification of novel genotypes/clusters in staphylocoagulase, protein A, alpha-haemolysin and other virulence factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Microbiol	6. 最初と最後の頁 95-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mdr.2018.0267	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 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ayako Sumi, Shinagawa M, Takahashi S, Kobayashi N	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Clonal diversity and genetic characteristics of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolates from a tertiary care hospital in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小林宣道, アウン メイジソウ, 川口谷充代, 漆原範子, 伊藤政彦, 幅寺敏
2. 発表標題 北海道における新規ブドウ球菌種 <i>Staphylococcus argenteus</i> の分子疫学的解析
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 アウン メイジソウ, 漆原 範子, 川口谷 充代, 小林 宣道
2. 発表標題 北日本の北海道における <i>Staphylococcus argenteus</i> の分子疫学
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 漆原 範子, アウン メイジソウ, 川口谷 充代, 小林 宣道
2. 発表標題 ミャンマーにて分離された ST9 黄色ブドウ球菌の全ゲノム解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Meiji Soe Aung, Thida San, Nilar San, Win Mar Oo, Phyo May Ko, Yamin Kyaw, Noriko Urushibara, Nobumichi Kobayashi
2. 発表標題 Molecular characterization of Staphylococcus argenteus in Myanmar: identification of novel genotypes/clusters in staphylocoagulase, protein A, alpha-hemolysin and other virulence factors
3. 学会等名 66th Myanmar Medical Conference
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Meiji Soe Aung, Thida San, Nilar San, Win Mar Oo, Phyo May Ko, Yamin Kyaw, Noriko Urushibara, Nobumichi Kobayashi
2. 発表標題 Molecular characterization of Staphylococcus aureus harboring Panton-Valentine leukocidin (PVL)-encoding bacteriophages in Myanmar
3. 学会等名 66th Myanmar Medical Conference
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 genetic characterization of virulence factor genes in Staphylococcus argenteus
2. 発表標題 Meijisoee Aung, Thida San, 漆原範子, 川口谷充代, 小林宣道
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 漆原 範子, Meijisoe Aung, 川口谷 充代, 小林 宣道
2. 発表標題 Novel SCCmec-SCC CIs in MRSA obtained in Hokkaido: Novel SCCmec type XIV (5A)
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 漆原 範子, アウン・メイジ・ソウ, 川口谷 充代, 小林 宣道
2. 発表標題 北海道にて分離された MRSA に見いだされた新規 SCCmec-SCC 複合体
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Urushibara N, Aung MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N
2. 発表標題 Novel SCCmec-SCC CIs in Japanese MRSA: Novel SCCM1-like elements and an SCCmec-related structure lacking the chromosomal attachment site
3. 学会等名 18th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aung MS, Urushibara N, San T, Kawaguchiya M, Kobayashi N
2. 発表標題 Molecular characterization of Staphylococcus aureus and Staphylococcus argenteus from food handlers in myanmar
3. 学会等名 第63回日本ブドウ球菌研究
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 漆原 範子, メイジ・ソウ・アウン, 川口谷 充代, 小林 宣道
2. 発表標題 北海道にて分離された MRSAゲノムの SCCmec-SCC 複合体遺伝子構造
3. 学会等名 第63回日本ブドウ球菌研究
4. 発表年 2018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
研究 分担者	アウン メイジソウ (Aung Meiji Soe) (10749584)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究 分担者	小林 宣道 (Kobayashi Nobumichi) (80186759)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

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
---------	---------