

平成22年6月21日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390127

研究課題名（和文）細菌の薬剤耐性遺伝子の集積と再配列の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism of accumulation and rearrangement of antibiotic resistance gene in bacteria.

研究代表者

荒川 宜親（アラカワ ヨシチカ）

国立感染症研究所・細菌第二部・部長

研究者番号：10212622

研究成果の概要（和文）：本研究では臨床分離 *Serratia marcescens* および *Pseudomonas putida* におけるクラス3インテグロンの構造を決定した。クラス3インテグロンは25bpの反復配列に挟まれるDNA領域に含まれ、さらにTniA, TniB, TniQ, TniCなどDNA転位因子とともに存在した。また本研究では、リコンビナントIntI3蛋白の結晶作製を試みたが、X線結晶構造解析までには至らなかった。臨床分離アシネトバクターにおけるカルバペネム耐性因子である *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子上流領域を決定したところ、ISAbalが存在することがあきらかとなった。このISAbalが下流に存在する *bla*_{OXA-51-like} のプロモーターを供与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We determined the genetic structure of class 3 integrons in *Serratia marcescens* and *Pseudomonas putida* clinical isolates. The nucleotide regions including class 3 integron were flanked by 25 bp inverted repeats and co-located with the elements such as TniA, TniB, TniQ, and TniC, which are thought to be required for the transposition of class 3 integron. Recombinant IntI3 protein was expressed in *Escherichia coli*, purified using column chromatography, and crystallized by hanging drop vapor diffusion method. However, we could not obtain a good X-ray diffraction data from the crystals. In *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, ISAbal was located upstream of *bla*_{OXA-51-like}, and appeared to provide a promoter activity for expression of adjacent *bla*_{OXA-51-like}.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	0	6,800,000
2008年度	3,500,000	0	3,500,000
2009年度	3,000,000	0	3,000,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	0	13,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 細菌学(含真菌学)

キーワード：薬剤耐性菌、遺伝子転位機構、クラス3インテグロン

1. 研究開始当初の背景

細菌は、補体や抗体、抗菌薬などが存在する過酷な環境に適応するため進化を続けている。その上で重要な役割を果たしているのが細菌特有の外来遺伝子獲得機構である。細菌は外部から取り入れた遺伝子を染色体やプラスミド上に挿入・集積させ、それらを巧みに利用することで、本来生存困難な過酷な環境下でも生き抜くことができるようになった。

医療環境に適応した細菌は、消毒薬や抗菌薬の攻撃から逃れるために、各種耐性遺伝子を獲得してきた。その遺伝子獲得のシステムとしてトランスポゾンや挿入配列 (IS) などの関与が明らかにされてきた。また、近年、インテグロンと命名されたチロシンリコンビナーゼを利用した新しい遺伝子獲得機構が解明されつつある。本研究では、本邦で分離された薬剤耐性菌を研究試料とし、それらにおける未知の薬剤耐性遺伝子獲得機構 (インテグロンを含む) を把握、解明していきたいと考えている。

2. 研究の目的

これまでに薬剤耐性遺伝子の挿入や集積、再配列に関与するインテグロンとして、4種類の主要な型が発見されている。我々は1995年に新規にクラス3インテグロンを発見し、報告した。しかし、本インテグロンにおける薬剤耐性遺伝子組換え機構には未だ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、クラス3インテグロンによる薬剤耐性遺伝子組換え機構の全容を明らかにしたいと考えている。さらに、インテグロンシステムにおけるDNA組換え機構の中心を担うインテグラーゼ蛋白の立体構造を決定し、3次元構造情報を利用した機能解明も合わせて進める。

また近年、多剤耐性アシネトバクターの世界的伝播が問題視されている。多剤耐性アシネトバクターのカルバペネム耐性獲得にはISなどのDNA転位機構が一部関与していることが明らかにされているが、未だ不明な点も多い。本研究では、本邦で分離された多剤耐

性アシネトバクターを用いて、カルバペネム耐性獲得に関与するDNA転位機構を明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 当研究所に保存されているクラス3インテグロン保有株からプラスミドを抽出し、大腸菌に導入した。導入されたプラスミド上にクラス3インテグロンが存在することを確認した。再度、形質転換体からプラスミドを抽出し、制限酵素を用いて切断後、クラス3インテグロンが含まれるDNA断片を単離した。単離したDNA断片の塩基配列を決定した。

(2) インテグロンにおけるDNA組換え機構の中心を担うintI3遺伝子を各種蛋白発現用ベクターに連結した。pCold-TFベクターに連結し、大腸菌にて発現させた場合のみ、目的蛋白が可溶性画分に現れた。ニッケルカラムおよびゲルろ過カラムを用いて蛋白精製を行った。可溶化タグの切断はFactor Xaにより行った。濃度5 mg/mL及び10 mg/mLの蛋白溶液を用意し、市販品のスクリーニングキットを用いて4°C及び20°Cにて結晶化を行った。

(3) アシネトバクターにおけるOXA型β-ラクタマーゼ遺伝子の型別を行い、その上でその周辺領域に存在するDNA転位因子の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 本邦で分離された*Serratia marcescens*や*Pseudomonas putida*が持つクラス3インテグロンおよびその周辺の塩基配列を決定したところ、クラス3インテグロンは25 bpの反復配列(IR)に挟まれるDNA領域に共通して含まれることがあきらかとなった。さらに、このDNA領域にはTniA、TniB、TniC、TniQなど、Tn5090やTn402で確認されているDNA断片の挿入や転位に関わる遺伝子群が存在した。すなわち、クラス3インテグロンは、TniA

、TniB、TniC、TniQなどに媒介され、25 bpの反復配列(IR)に挟まれるDNA領域を転位ユニットとして、DNA間を移動する可能性が示唆された。現在、大腸菌を利用したin vitroでのDNA転位実験系を構築しており、今後、25 bpの反復配列(IR)に挟まれる領域が転位するか否かを検証する予定である。

また、クラス3インテグロンでは、クラス1インテグロンで見られる*sul1-qacEΔ I-orf513*のような、3'-端保存セグメントがなく、かわりに144 bpの共通配列が存在することが明らかとなった。この事は、クラス3インテグロンは、グラム陰性桿菌に広く分布しているクラス1インテグロンと遺伝的に独立した進化経路を辿って構築された遺伝子の集積と再配列に関与する新しいシステムであるという可能性を示唆している。

(2) 各種発現ベクターと宿主大腸菌を用いてIntI3蛋白の大量発現を試みたところ、大腸菌のシャペロンの1種であるトリガーファクターを可溶化タグとして用いることができるpCold-TF vectorを利用することで、IntI3蛋白の大量発現に成功した。ニッケルカラムおよびゲルろ過カラムを用いて蛋白精製を行った。しかし、FactorXaによる可溶化タグの切り離しを行うことができなかった。可溶化タグと目的蛋白の両者の間で強い非特異的相互作用が働いているものと予測された。そこで、可溶化タグを切断せずに結晶化を試みたが、最終的にX線構造解析解析に至る結晶を得ることができなかった。現在、蛋白発現系構築の段階から見直しを行っている。

(3) 本邦で分離された *Acinetobacter baumannii* の *bla_{OXA-51-like}* 遺伝子周辺配列を調べた結果、その上流には *IS_{Aba1}* が存在することがわかった。この *IS_{Aba1}* 内に存在するプロモーターが下流の *bla_{OXA-51-like}* 遺伝子の発現を担っているものと予測された。最近の研究により、*IS_{Aba1}* はプロモーターの供与のみならず、従来の *IS* の役割である DNA 転位機構も担っていることがあきらかとなった。また、*IS_{Aba1}* は多種多様な薬剤耐性遺伝子と組み合わせで存在することもあきらかとなった。したがって *IS_{Aba1}* はアシネ

トバクター属において多剤耐性の獲得ならびに薬剤耐性遺伝子の伝播・拡散に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

また、OXA-23-like、OXA-58-like など海外で流行しているカルバペネム耐性 OXA 型β-ラクタマーゼの存在も確認された。これらは国内では未だ稀なタイプであるが、海外での事例同様、今後国内の増加が懸念される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

投稿準備中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 宜親 (ARAKAWA YOSHICHIKA)
国立感染症研究所・細菌第二部・部長
研究者番号：10212622

(2) 研究分担者

柴山 恵吾 (SHIBAYAMA KEIGO)
国立感染症研究所・細菌第二部・室長
研究者番号：50283437

森 茂太郎 (MORI SHIGETAROU)
国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官
研究者番号：60425676

山根 一和 (YAMANE KUNIKAZU)
国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官
研究者番号：00356247

鈴木 里和 (SUZUKI SATOWA)
国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官
研究者番号：30373400

木村 幸司 (KIMURA KOUJI)
国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官
研究者番号：50425675

和知野 純一 (WACHINO JUN-ICHI)
国立感染症研究所・細菌第二部・研究員
研究者番号：00535651

松井 真理 (MATSUI MARI)
国立感染症研究所・細菌第二部・研究員
研究者番号 : 50555761