

平成22年6月1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591196

研究課題名（和文）病原性放線菌ノカルジアのレジストームの解明

研究課題名（英文）Deciphering the resistome of a pathogenic actinomycete *Nocardia farcinica*

研究代表者

石川 淳（ISHIKAWA JUN）

国立感染症研究所・生物活性物質部・室長

研究者番号：40202957

研究成果の概要（和文）：ノカルジア菌（*Nocardia*）は放線菌と呼ばれる菌群の一種で、主に土壌中に生息するが、まれにヒトや動物に感染しノカルジア症をひきおこす日和見病原菌である。ノカルジア症の治療を困難にしている原因のひとつは、ノカルジアが多くの抗生物質に耐性を示すことであるが、それら耐性の原因はほとんど調べられていない。そこで、ノカルジアのすべての薬剤耐性因子を明らかにするために遺伝子解析を行った結果、リファンピシン、アミノグリコシド、クロラムフェニコール耐性に関わる遺伝子を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Nocardia* is a species of soil actinomycetes and an opportunistic pathogen caused nocardiosis on human or animal. Treatment of nocardiosis is difficult because of the multi-drug resistant profile of *Nocardia*. However, the mechanisms of the resistance have not been studied with a few exceptions. We demonstrated the resistance mechanisms for rifampicin, aminoglycosides, and chloramphenicol as part of deciphering all the resistance mechanisms (resistome) of *M. farcinica*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	900,000	0	900,000
2009年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究分野：微生物ゲノム

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：薬剤耐性、抗生物質、感染症、ノカルジア、レジストーム

## 1. 研究開始当初の背景

感染症治療における問題点はいくつもあるが、薬剤耐性菌の問題は最も重要なもののひとつである。特に最近では、多剤耐性の結核菌や緑膿菌がマスコミでも取り上げられ

るなど、「薬が効かない病原菌」として国民の大きな関心事ともなっている。

薬剤耐性菌の保有する薬剤耐性遺伝子は、プラスミドやトランスポゾンなどの動く遺伝子によって水平伝播したと考えられるものが多く、最近の例では、カナマイシンやゲ

ンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質に高度な耐性を示す新規な薬剤耐性遺伝子 (*rmtB*; Doi et al., Antimicrob. Agents Chemother. 48:491-496, 2004) がセラチア菌 (*Serratia marcescens*) で報告され、その耐性機構は、環境 (土壌) 細菌である放線菌の一種で、ゲンタマイシン生産菌である *Micromonospora* の自己耐性機構と基本的に同一であった。このことは、*Micromonospora* の遺伝子がセラチアに伝播し進化した結果とも考えられる。多くの環境細菌は、ヒトの病原菌と接触する機会は極めて少ないと考えられるが、環境とヒト体内の両方で生育可能な細菌が新規な薬剤耐性遺伝子を保有していた場合には、そのヒト病原菌への伝播頻度は高くなると予想される。したがって、環境とヒト (あるいは動物) の両方で生育可能な細菌の持つ薬剤耐性遺伝子を解明することは、将来的に出現すると考えられる薬剤耐性菌を予測し、それへの対策を予め講ずることにつながると考えられる。ノカルジア (*Nocardia*) は放線菌と呼ばれる菌群の一種で、主に土壌に生息する環境細菌であるが、稀にヒトを含む動物、魚、植物に感染しノカルジア症をひきおこす日和見病原菌である。ノカルジアは多剤耐性を示すことでも知られており、その耐性機構は、近縁な結核菌と同様に、ミコール酸を含む疎水性に富んだ細胞壁が、抗生物質の菌体内への浸透を阻止することに因ると考えられてきた。しかしながら、申請者らは、臨床分離 *Nocardia farcinica* IFM 10152 株のゲノム解析によって、本菌株が耐性を示す抗生物質の不活化酵素、抗生物質のターゲットを修飾する酵素、抗生物質の排出ポンプなどの薬剤耐性遺伝子候補を見出し、ノカルジアの多剤耐性が疎水性の細胞壁による抗生物質の浸透阻害というような非特異的な機構ではなく、各々の抗生物質に特異的な機構によるであろうことを報告した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:14925-14930, 2004)。それらの薬剤耐性機構の中には新規な機構が含まれていると予想され、実際に RNA ポリメラーゼ  $\beta$  サブユニット遺伝子の重複 (*rpoB* および *rpoB2*) という新規なリファンピシン耐性機構を実験的に証明した (Antimicrob. Agents Chemother. 50:1342-1346, 2006)。

## 2. 研究の目的

上述のように、ノカルジアは環境とヒトの両方で生育できることから、ノカルジアがヒトの常在菌などと接触し、その薬剤耐性遺伝子が伝播される機会は、環境中のみで生育可能な他の放線菌よりも多いと考えられる。そこで本研究では、*N. farcinica* ゲノムに存在する「全ての薬剤耐性遺伝子 (レジスト

ム; resistome)」を明らかにし、その耐性機構を解明することを目的とする。その成果は、ノカルジア症の治療に役立つばかりでなく、ノカルジアの薬剤耐性遺伝子が将来的に臨床で問題となる前に対策を講じるための一助となるであろう。

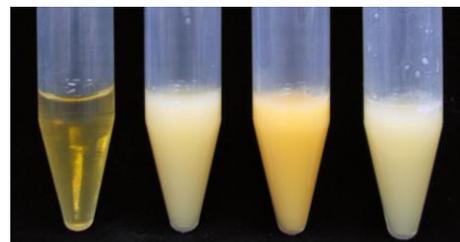
## 3. 研究の方法

ゲノム解析により明らかになっている薬剤耐性因子候補を、発現ベクターを用いて *E. coli* で発現させ、さらに *N. farcinica* において当該遺伝子の破壊を行い、薬剤耐性因子であることを証明する。

## 4. 研究成果

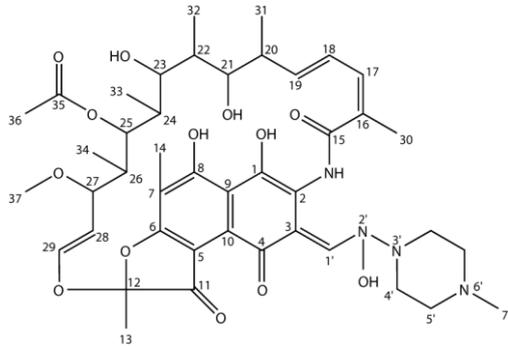
### (1) リファンピシンモノオキシゲナーゼ

我々は本研究に先だって、本菌のリファンピシン耐性は、耐性となるような複数のアミノ酸置換を含む RNA ポリメラーゼ  $\beta$  サブユニット遺伝子の重複コピー (*rpoB2*) によることを証明したが (Antimicrob. Agents Chemother. 50:1342-1346, 2006)、本菌はリファンピシンを脱色 (分解) する能力があり、これも耐性に関与することが考えられたため、ゲノム情報を精査したところ、リファンピシンを酸化する酵素 (モノオキシゲナーゼ) の遺伝子と考えられる *nfa35380* をゲノム中に見出した。



ノカルジアによるリファンピシンの脱色。  
(左から) 陰性対照、野生株、破壊株、相補株。

そこでこの遺伝子を発現ベクター pET-19b にクローニングし、大腸菌にタンパク質を生産させ、その休止菌体を用いてリファンピシンの変換実験を行った。その結果、リファンピシンよりも分子量が 16 大きい物質が生成し、その構造は 2'-N-hydroxy-4-oxo-rifampicin であった。このことから、*nfa35380* はリファンピシン酸化酵素をコードすることが明らかとなり、本遺伝子を *rox* (rifampicin monooxygenase) と命名した。さらに、生成物が新規物質であることから、本酵素およびその反応機構も新規であることが明らかとなった。



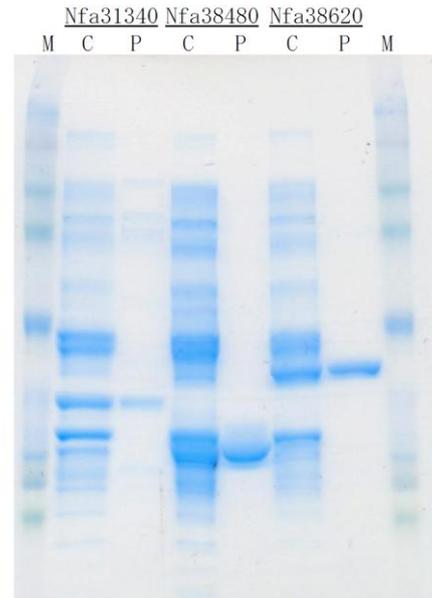
2'-*N*-hydroxy-4-oxo-rifampicin

次に、*rox* の遺伝子破壊を行ったところ、*rox* 破壊株のリファンピシン耐性には変化がなかった。このことから、本菌の主要なリファンピシン耐性は *rpoB2* によって担われていることが明らかとなった。しかしながら、*rpoB2* 破壊株において *rox* を過剰発現させると、*rpoB2* 破壊株のリファンピシン耐性は 8 倍上昇することが明らかとなった。このことから、*rox* も本菌のリファンピシン耐性にある程度貢献していることが窺われた。

## (2) アミノグリコシドリン酸化酵素

ゲノム解析によって見出された、カナマイシンやストレプトマイシンなどのアミノグリコシド抗生物質をりん酸化して失活させる新規なアミノグリコシドリン酸転移酵素 (APH) 遺伝子と考えられる *nfa31340*、*nfa38480* および *nfa38620* を、発現ベクター pET-19b にクローニングし、大腸菌にタンパク質を生産させ、タンパク質を精製し、APH 活性の有無を調べた。その結果、すべてのタンパク質に APH 活性が認められ、その基質特異性から *nfa31340*、*nfa38480* および *nfa38620* は、それぞれ APH(2'')、APH(3') および APH(6) であることを明らかにした。

次に、それぞれの遺伝子破壊株を作製した結果、それぞれの酵素活性に応じたアミノグリコシド耐性が消失し、本菌のアミノグリコ



APH の精製. C, 精製前; P, 精製後; M, サイズマーカー。

シド耐性は、すべてこれらの APH 遺伝子によって担われていることが明らかとなった。

## (3) トランスポーター

本菌のゲノム中には 74 個の MFS 型および 3 個の SMR 型トランスポーター遺伝子が存在するが、それらのうち既知の薬剤耐性トランスポーターにある程度の相同性を持つ 16 個を選抜し、大腸菌で発現させた。その結果、*nfa18410* がクロラムフェニコール耐性を与えることが明らかとなり、この遺伝子が *N. farcinica* のクロラムフェニコール耐性を担っていることが示唆された。一方、*nfa1440*、*nfa9260*、*nfa14430*、*nfa18010* および *nfa25340* を発現させた大腸菌は、アクリフラビン耐性が上昇したため、これらの遺伝子が本菌の何らかの耐性に関与している可能性が示唆された。今後、遺伝子破壊による解析が必要である。

## ノカルジアのアミノグリコシド耐性

	KM	GM	NM	TOB	SISO	SM
野生株	+	+	±	+	+	+
<i>aph</i> (2'')破壊株	+	-	±	-	-	+
<i>aph</i> (3')破壊株	-	+	-	+	+	+
<i>aph</i> (6)破壊株	+	+	±	+	+	-

+, 耐性; ±, 低度耐性; -, 感受性; KM, カナマイシン; GM, ゲンタマイシン; NM, ネオマイシン; TOB, トブラマイシン; SISO, シソマイシン; SM, ストレプトマイシン

#### (4) アリルアミンアセチル化酵素

*nfa18420*は、アリルアミンアセチル化酵素遺伝子と予測されるが、つい最近、Martinsらによってタンパク質の結晶構造解析が行われ、イソニアジドのアセチル化活性のあることも示された(J. Mol. Biol. **383**:549-560, 2008)。結核菌の同酵素はイソニアジド耐性に関与しているため、本遺伝子の破壊を行ったが、遺伝子破壊株のイソニアジド耐性に変化はなく、本菌のイソニアジド耐性は、他のメカニズムによると考えられた。結核菌のイソニアジド耐性には *inhA*、*katG* など複数の遺伝子の関与が明らかとなっているため、本菌においても、それらの解析が必要とされるだろう。

#### 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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Hoshino, Y., Fujii, S., Shinonaga, H., Arai, K., Saito, F., Fukai, T., Satoh, H., Miyazaki, Y., and Ishikawa, J.: Monooxygenation of rifampicin catalyzed by the *rox* gene product of *Nocardia farcinica*: structure elucidation, gene identification and role in drug resistance. Journal of Antibiotics **63**:23-28, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計6件)

- ① 石川 淳: *Nocardia* の遺伝子解析. 日本放線菌学会第45回講演会、2007年10月5日(東京)
- ② 藤井匠子: 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるアミノ配糖体リン酸化酵素遺伝子の同定. 第23回日本放線菌学会大会、2008年7月10-11日(山梨)
- ③ 石川 淳: 放線菌のゲノム解析基盤技術の開発とその応用. 第23回日本放線菌学会大会、2008年7月10-11日(山梨)
- ④ 藤井匠子: 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるリファンピシンモノオキシゲナーゼ遺伝子の同定. 第24回日本放線菌学会大会、2009年7月16-17日(秋田)
- ⑤ 星野泰隆: Identification of the rifampicin monooxygenase gene of *Nocardia farcinica*. 第15回国際放線菌学会議、2009年8月20-24日(上海)
- ⑥ 藤井匠子: 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* のアミノグリコシド耐性機構の解明. 第83回日本細菌学会総会、2010年3月27-29日(横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://nocardia.nih.go.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石川 淳 (ISHIKAWA JUN)

国立感染症研究所・生物活性物質部・室長  
研究者番号: 40202957

##### (2) 研究分担者

石野 敬子 (ISHINO KEIKO)

国立感染症研究所・生物活性物質部・主任  
研究官

研究者番号: 50332359

星野 泰隆 (HOSHINO YASUTAKA)

国立感染症研究所・生物活性物質部・主任  
研究官

研究者番号: 40399457

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

藤井 匠子 (FUJII SHOKO)

東邦大学大学院・理学研究科