

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17922

研究課題名(和文)バンコマイシン耐性腸球菌における新たな耐性遺伝子発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of a new mechanism of resistance gene expression in vancomycin-resistant enterococci

研究代表者

橋本 佑輔 (Hashimoto, Yusuke)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40649381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は腸球菌のバンコマイシン耐性遺伝子群の新規転写調節因子探索を目的とし、変異導入実験・Nisin誘導発現ベクターを利用して実施したが、バンコマイシン耐性に寄与する新規転写調節因子は発見できなかった。並行して行った研究では、国内で分離されたバンコマイシン耐性腸球菌から腸球菌初の線状プラスミド(pELF型プラスミド)を発見・報告した。本プラスミドは複数の薬剤耐性遺伝子を保有し、接合伝達にて受容菌を一度に多剤耐性化させること、更に本プラスミドは複数の腸球菌種へ伝達可能な広宿主域を示すことを明らかとした。またこのpELF型プラスミドを原因とする国内医療機関でのVREの院内伝播の存在も明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)が治療薬の少なさから全世界的な問題となっている。このバンコマイシン耐性遺伝子群の腸球菌間の伝達には、菌体内に染色体とは別に存在するプラスミドが重要な役割を果たしている。本研究成果として、腸球菌で初の線状プラスミド(pELF型プラスミド)を発見した。このプラスミドは複数の腸球菌種へ高頻度に伝達することが可能で、バンコマイシンを含む複数の薬剤耐性遺伝子を保有することから、受容菌を効率的に多剤耐性化させることが可能であった。日本国内では既にpELF型プラスミドを保有したVREの拡散が確認されており、VREの急速な増加・拡散に寄与するメカニズムを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Vancomycin-resistant enterococci (VRE) is a global problem due to the paucity of therapeutic agents. This study was conducted using a Nisin-inducible expression vectors to identify novel transcriptional regulators of the vancomycin resistance gene cluster in enterococci, but unfortunately, no transcriptional regulators contributing to vancomycin resistance were found. In the parallel, we discovered and reported the first linear plasmid (pELF-type plasmid) in enterococci from VRE isolated in Japan. This plasmid contained several drug resistance genes and showed a high transfer frequency to a broad range of enterococci. We also found a case in which a pELF-type plasmid caused the nosocomial spread of VRE in a Japanese medical institution, verifying that the pELF-type plasmid is a clinically important mobile genetic element.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性 プラスミド 腸球菌 バンコマイシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年に世界保健機関総会で薬剤耐性(AMR)に関する国際行動計画が採択されるなど、薬剤耐性菌は全世界的な課題と認識されている。バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は、米国CDCが“serious”と位置付けており、全世界的に大きな問題となっている薬剤耐性菌である。日本国内では1996年に初めてVREが分離されて以降、感染症法にて5類感染症として年間数十例の患者が報告され続けている。VREの耐性型には現在までに10の型(VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN, VanP)が報告されているが、そのうち临床上特に問題になるのはVanA型とVanB型である。バンコマイシン耐性は二成分制御系で発現調整が行われており、VanB型耐性ではresponse regulator 蛋白をコードする *vanR_B*、sensor 蛋白をコードする *vanS_B* とその下流に位置する耐性遺伝子群 *vanY_B*, *vanW*, *vanH_B*, *vanB*, *vanX_B* で構成されている。sensor 蛋白である *vanS_B* がバンコマイシンを感知すると、細胞質内ドメインの自己リン酸化が起こる。このリン酸基がresponse regulator である *vanR_B* へ転移することで活性化し、耐性遺伝子群の転写が誘導される。現在までのところ、バンコマイシン耐性の転写調節因子はVanS/VanR以外に報告はない。腸球菌は典型的な日和見感染菌ではあるが、compromised hostに感染症を引き起こした場合、治療薬の少なさもあり不幸な転機を迎えることが少なくない。このため、VREの疫学、耐性遺伝子群の伝達や耐性遺伝子の発現メカニズムに関する解明は、VREの感染対策、腸球菌感染症の検査法や治療法の開発の基盤となりうる重要な研究といえる。

2. 研究の目的

(1)これまでに我々は、国内の異なる医療機関に入院中の患者の尿検体、便検体から、VanB型耐性遺伝子群を保持しながらもバンコマイシンのMIC値が低く、通常の細菌学的検査では検出困難な複数のVanB型バンコマイシン低度耐性腸球菌の分子生物学的解析を行ってきた。興味深いことに、この耐性復帰実験の過程において、バンコマイシン耐性遺伝子群の転写調節因子(VanS/VanR)に新規変異を認めないにも関わらずVanB型耐性遺伝子群の転写量が増加する復帰変異株が複数存在した。全ゲノムシーケンスの結果から、これらの株はresponse regulatorを初めとした複数の遺伝子変異を保有していることが判明した。現在までに二成分制御系を構成する *vanS/vanR* 以外にバンコマイシン耐性遺伝子群の転写調節因子の報告はない。本研究の目的は、バンコマイシン耐性遺伝子群の新規転写調節因子についての解明である。また同時進行にて、(2)日本国内で初の検出となったVanM型VRE、並びに(3)全世界で数十例の報告に限られ極めて検出頻度の低いVanD型VREの全ゲノムシーケンス解析を基礎とした分子疫学を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1)我々が既に報告したバンコマイシン低度耐性腸球菌の耐性復帰株の全ゲノムシーケンス解析より同定された遺伝子変異情報をもとに、実験株へ遺伝子変異導入実験(pCJK47プラスミドを利用)を実施した。更に元来腸球菌が保有する二成分制御系とのクロストークの可能性について疑い、Nisin誘導発現ベクタープラスミド(pMSP3535)へのresponse regulatorのクローニングを実施し、バンコマイシン耐性遺伝子群の転写量の変化、バンコマイシン耐性の表現型への影響について解析を実施した。

(2)日本国内の医療機関より初めて分離同定されたVanM型VREについて、全ゲノムシーケンス解析(Hybrid assembly)により完全長のゲノムを取得、更に宿主染色体、プラスミドに関して薬剤耐性遺伝子の局在などの詳細な解析を実施した。

(3)世界で数十例の報告に留まるVanD型VREに関して、(2)同様に全ゲノムシーケンス解析(Hybrid assembly)により完全長のゲノムを取得し、薬剤耐性遺伝子を中心とした詳細な解析を実施した。更に、このVanD型バンコマイシン耐性遺伝子群は腸管内に存在する嫌気性菌がリザーバーとして疑われており、腸管内嫌気性菌と腸球菌のVanD型バンコマイシン耐性遺伝子群を含むMobile genetic element(MGE)について、public database検索から得たゲノム情報も加えた網羅的な解析を実施し、関係性を明らかにすることとした。

4. 研究成果

(1)バンコマイシン耐性遺伝子群の新規転写調節因子に関する解析

バンコマイシン低度耐性腸球菌の耐性復帰株の全ゲノムシーケンス解析より同定された遺伝子変異情報をもとに、実験株へ遺伝子変異導入を行った。バンコマイシン耐性を指標に表現型の変化を確認したが、関与は否定的な結果であった。腸球菌の他の二成分制御系とのクロスト

クの可能性を評価するため、腸球菌(*E. faecalis*)の保有する 15 個の response regulator のクローニングを実施した。*vanR* 遺伝子をクローニングした pMSP3535(Nisin 誘導発現ベクター)を利用し、実験株にて Nisin 用量依存性にクローニングした遺伝子の発現が起こることを RT-qPCR 法、SDS-PAGE で確認したうえで、15 個の response regulator のバンコマイシン耐性への関与について解析を実施したが、残念ながら関与を示唆する結果は得られなかった。

(2) pELF 型プラスミドの発見、構造・宿主域等の解析、並びに院内伝播事例の解明

並行して実施した VanM 型バンコマイシン耐性腸球菌の全ゲノム解析から、腸球菌において初となる線状プラスミド(pELF 型プラスミド, pELF1)を発見・報告した (Hashimoto et al, Front Microbiol, 2019)。本プラスミドは、片方の端が hairpin end、もう一方の端が 5' に蛋白が結合した Invertron end であることを実験的に証明した。この構造は極めて特異であり、新規性の高さがうかがえた。pELF1 には VanM 型バンコマイシン耐性遺伝子群以外に、VanA 型耐性遺伝子群や、臨床でも使用頻度の高いエリスロマイシン耐性遺伝子などが搭載されていた。*in vitro* の実験では、複数の腸球菌種へ伝達可能な広宿主域を示し、更に液体培地でも伝達可能な高頻度接合伝達性プラスミドであった。また、関西地方の病院にて pELF 型プラスミド(pELF2)による院内伝播事例の解析を実施・報告した (Hashimoto et al, mSphere, 2020)。この院内伝播事例では、VRE の患者間の水平伝播と共に、pELF2 が入院患者の腸管内において腸球菌間で水平伝達したことが推測された。VRE で最多の菌種の *E. faecium* 以外にも *E. casseliflavus* などの複数の菌種で pELF2 の保有が確認されたことから、実臨床においても広宿主域性を発揮することが確認された。これら pELF 型プラスミドは極めて新規性が高く、臨床的重要性も高い発見と考えられた。

(3) VanD 型バンコマイシン耐性遺伝子群を保有した genomic island の宿主多様性に関する解析

国内医療機関より分離・同定された、世界で数十例の報告しかない極めてまれなバンコマイシン耐性型である VanD 型 VRE について(2)同様に全ゲノムシーケンス解析を基に詳細なゲノム情報を明らかとした。VanD 型バンコマイシン耐性遺伝子群は genomic island に存在していることが既に報告されており、本株(AA620, AA622, AA624)も同様の genomic island に存在していた。更に AA622, AA624 では、VanD 型バンコマイシン耐性遺伝子群を含む領域が duplicate され存在していることを明らかとした。更に Public database より、この genomic island と類似性の高い genomic island が複数の菌種で確認されたため、コア遺伝子を抽出し系統解析を実施した。系統解析結果より、VanD 型バンコマイシン耐性遺伝子群を保有する genomic island の基本構造は類似しており、全世界に広く存在していることが明らかとなった。またこの genomic island と類似の genomic island を腸管内の複数の嫌気性菌が保有しており、系統解析でも菌種毎に cluster を形成しないことから、腸管内において複数の菌種間で VanD 型バンコマイシン耐性遺伝子群を保有した genomic island の水平伝播が起きている可能性を報告した (Hashimoto et al, JAC-antimicrobial resistance, 2022)。

(4) 今後の展望

我々の pELF 型プラスミドの報告ののち、国内外の複数のグループが類似の pELF 型プラスミドを臨床現場より発見・報告しており、その注目度は高まっていると考えられる。我々は既に国内医療機関にて検出されたおよそ 1700 株の腸球菌のストックから、複数の pELF 型プラスミド保有株を同定している。現在、これらの株の網羅的な疫学解析、並びに腸球菌への生物学的影響について詳細を検討している。更に線状プラスミドの複製や伝達、薬剤耐性遺伝子の獲得メカニズムに関して明らかとし、その成果を社会に還元していきたいと考えている。

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 Hashimoto Yusuke, Kita Izumi, Suzuki Masato, Hirakawa Hidetada, Ohtaki Hirofumi, Tomita Haruyoshi	4. 巻 5
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 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00102-20	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 Hashimoto Yusuke, Taniguchi Makoto, Uesaka Kazuma, Nomura Takahiro, Hirakawa Hidetada, Tanimoto Koichi, Tamai Kiyoko, Ruan Genjie, Zheng Bo, Tomita Haruyoshi	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 Frontiers in Microbiology	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） 10.3389/fmicb.2019.02568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashimoto Yusuke, Hisatsune Junzo, Suzuki Masato, Kurushima Jun, Nomura Takahiro, Hirakawa Hidetada, Kojima Naoko, Ono Yuichi, Hasegawa Yutaka, Tanimoto Koichi, Sugai Motoyuki, Tomita Haruyoshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Elucidation of host diversity of the VanD-carrying genomic islands in enterococci and anaerobes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JAC-Antimicrobial Resistance	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） 10.1093/jacamr/dlab189	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 佑輔, 鈴木 仁人, 野村 隆浩, 久留島 潤, 平川 秀忠, 谷本 弘一, 富田 治芳
2. 発表標題 Local Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci Ascribed to the Interspecies Transmission of a vanA Gene Cluster-Carrying Linear Plasmid
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 橋本 佑輔、平川 秀忠、谷本 弘一、富田 治芳
2. 発表標題 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VREに関する分子生物学的研究
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会東日本支部総会（仙台国際センター、宮城県）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 佑輔、野村 隆浩、谷本 弘一、富田 治芳
2. 発表標題 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 第31回日本臨床微生物学会総会（県立音楽堂等、石川県）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本 佑輔、野村 隆浩、平川 秀忠、谷本 弘一、富田 治芳
2. 発表標題 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 第93回日本細菌学会総会（ウインクあいち、愛知県）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本 佑輔、鈴木 仁人、野村 隆浩、久留島 潤、平川 秀忠、谷本 弘一、富田 治芳
2. 発表標題 腸球菌の線状プラスミドに関する分子疫学解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（オンライン開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 佑輔、久恒 順三、鈴木 仁人、野村 隆浩、久留島 潤、平川 秀忠、谷本 弘一、菅井 基行、富田 治芳
2. 発表標題 VanD型バンコマイシン耐性遺伝子群保有genomic islandに関する分子疫学解析
3. 学会等名 第104回日本細菌学会関東支部総会（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 佑輔、久恒 順三、鈴木 仁人、野村 隆浩、久留島 潤、平川 秀忠、谷本 弘一、菅井 基行、富田 治芳
2. 発表標題 VanD型バンコマイシン耐性遺伝子群保有genomic islandの宿主多様性 に関する分子疫学解析
3. 学会等名 第50回薬剤耐性菌研究会（伊豆長岡 ホテル天坊、静岡県）
4. 発表年 2021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		
中国	Peking University First Hospital		