

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790712
 研究課題名（和文）
 伝達性キノロン耐性遺伝子の分布とその伝播過程に関する研究
 研究課題名（英文）
 Analysis of the distribution and the transmission process of transferable quinolone resistance determinants
 研究代表者
 嵯峨 知生 (SAGA TOMOO)
 東邦大学・医学部・助教
 研究者番号：80459809

研究成果の概要（和文）：

キノロン系抗菌薬耐性菌の増加は临床上問題である。本研究は、耐性菌の急速な蔓延を招きうるプラスミド伝達性キノロン耐性化遺伝子 *qnrB* に焦点を当て、その伝播と分布に注目して立案された。*Citrobacter* 属菌の中には、基準株および抗菌薬導入以前に分離された株にも、同遺伝子の全長および一部を保有しているものがあり、同菌群と同遺伝子との関連が示唆された。同遺伝子およびその周辺にはストレス応答制御に関連するものがあり、同遺伝子が薬剤耐性以外の役割を果たしている可能性を想定している。

研究成果の概要（英文）：

Increase of quinolone-resistant bacteria is an important clinical problem. At the beginning of this study, I focused on the transmission and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrB*, which might cause rapid increase of drug resistant pathogens. Certain strains of *Citrobacter* species, including type strains or an isolate in pre-antibiotic era, harboured whole-length or partial *qnrB*-like nucleotide sequence, suggesting that *qnrB* might have certain relationship with this species. Not only *qnrB*-like gene itself but also operons neighbouring it seemed involved in stress-response system, implying the possible role of *qnrB* other than antimicrobial resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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：キノロン耐性化遺伝子、プラスミド伝達性、*qnr*

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌（以下、耐性菌）は臨床きわめて重要な問題である。キノロン系抗菌薬

（以下、キノロン）は高い有効性と安全性を持ち繁用される抗菌薬であるので、キノロン耐性菌の増加が臨床にもたらすインパクトは大きい。一般に薬剤耐性の原因遺伝子が伝

達性プラスミド上に存在した場合、他菌体へプラスミドが伝播されて耐性菌が短時間で蔓延する危険性がある。

近年、プラスミド伝達性キノロン耐性化遺伝子 *qnrA* が肺炎桿菌で報告された (Martinez-Martinez L et al. Lancet, 1998) (Tran JH et al. PNAS, 2002)。*qnr* は耐性機序の点でも目新しく、多くの臨床家および研究者が関心を寄せ研究された結果、研究開始当初の段階で A, B, S の各サブタイプが世界各地の腸内細菌科細菌から報告されている (Robicsek A et al. Lancet Infect Dis, 2006)。

国内の臨床分離株についても申請者らは各型の *qnr* およびその相同遺伝子を保有する菌株を解析し、結果を報告してきた。

一方、*qnr* 遺伝子が伝達性プラスミド上に存在するようになった経緯は未解明点が残る。*qnrA* 遺伝子は海洋細菌の *Shewanella* 属菌の染色体上に由来すると言われるが、臨床分離株と海洋細菌との間の接点は不明で、耐性遺伝子の伝達がどこで、どのように起こっているのかは分かっていない。加えて、*qnrB* および *qnrS* の起源は未同定であった。

研究代表者は予備検討 (未発表) で、*Citrobacter freundii* およびその類縁菌種 (以下、*C. freundii* 群) の臨床分離株の *qnrB* 様遺伝子保有率が他菌種の場合よりも高いことを見出していた。*C. freundii* 群は腸内細菌科で、しばしば臨床分離されるほか、動物の体内や水中、土壌など自然界にも広く存在する。この広い生息域は多くの菌種と接点を持ちうることを意味し、耐性遺伝子の授受には好都合であると解釈できる。実際、*qnrB* 遺伝子以外でも、*C. freundii* 群がもともと保有していた β ラクタマーゼが他菌の伝達性プラスミドに見出された例が報告されている (Nakano R et al. Antimicrob Agents Chemother, 2004)。

これを踏まえて研究代表者は、*C. freundii* 群が *qnrB* 遺伝子をはじめとした耐性遺伝子のリザーバ (貯蔵庫) としての役割を果たしているという着想を持つに至った。

2. 研究の目的

本研究は、*qnr* 遺伝子保有状況を確認し、*qnr* 遺伝子保有菌株の特徴を明らかにすることを通じて、同菌群が耐性遺伝子リザーバとしての役割を果たしているという仮説を検証することを目的とした。

それと並行する形で、菌株バンクから購入した基準株等を解析対象とすることで、同菌群と本遺伝子との関連をより普遍的な形で明らかにすることを狙って本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 対象菌株

Citrobacter 属菌として、菌株バンクである American type culture collection (ATCC) から購入した type strain (菌種同定の際の基準となる菌株) 3 株を含む以下の 5 株を解析対象とした。

- *C. freundii* ATCC 8090^T
- *C. braakii* ATCC 51113^T
- *C. freundii* ATCC 43864
- *C. freundii* ATCC 6879
- *C. koseri* ATCC 27028^T

(2) PCR による遺伝子検出と塩基配列解析

qnrA, *qnrB*, *qnrS* の各群遺伝子を特異的に増幅するプライマセットを用いた PCR で遺伝子検出を行った。*psp* および *sap* 両オペロン間の領域を PCR 増幅した。得られた増幅産物は塩基配列解析を行った。

(3) サザンハイブリダイゼーション

I-CeuI (染色体を特異的に切断する酵素) で処理した全菌体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動し、メンブランに転写した。16SrDNA および *qnrB* 様塩基配列を検出するプローブでハイブリダイゼーションを行った。

(4) クローニング

qnrB 様塩基配列を含む領域をクローニングし、大腸菌に導入した。得られた産物は塩基配列解析を行った。

(5) 薬剤感受性測定

キノロン系抗菌薬の薬剤感受性を微量液体希釈法で測定した。

(6) ストレス応答遺伝子の転写解析

キノロン系抗菌薬存在下での *qnrB* 様遺伝子および SOS 応答関連遺伝子の転写量を定量 RT-PCR 法で検討した。

4. 研究成果

(1) *qnrB* 様遺伝子を保有する *Citrobacter* 属菌基準株とその特徴

Citrobacter 属菌の普遍的性質を明らかにすることを狙い、菌株バンクである American type culture collection (ATCC) から購入した type strain (菌種同定の際の基準となる菌株) 3 株を含む 5 株を解析した。

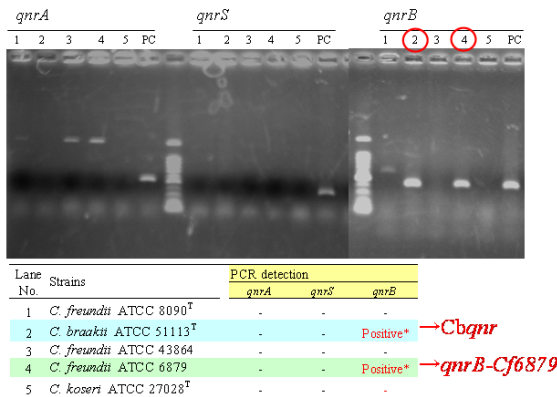
① *qnrB* 様遺伝子保有株の検出

Citrobacter braakii ATCC 51113^T および *Citrobacter freundii* ATCC 6879 は *qnrB* 様

遺伝子の全長を保有していた (図 1)。

前者は *C. braakii* の type strain であり、1993 年以前にへビから分離された。後者は 1932 年以前にチーズ原料から分離された。キノロンは合成抗菌薬であり、自然界にはもともと存在しなかったと考えられている。最初のキノロン系抗菌薬が臨床使用されたのが 1962 年なので、キノロン系抗菌薬が広く使用される以前の時代から *qnrB* 様遺伝子保有株は存在したことになる。

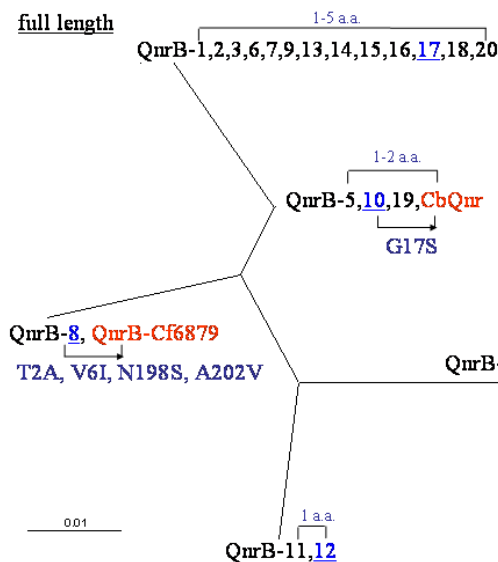
図1: *Citrobacter*属菌ATCC菌株のPCRによる*qnrB*の検出



② ATCC 株の *qnrB* 遺伝子とその局在

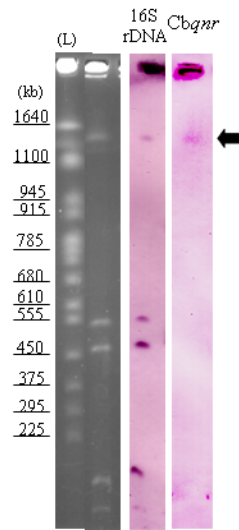
両遺伝子がコードするタンパクは、前者が QnrB10 と 1 アミノ酸残基のみ、後者が QnrB4 と 4 アミノ酸残基のみ、それぞれ異なるアミノ酸配列を有しており、いずれも *qnrB* 遺伝子の一員とみなすことができると考えられた (図 2)。

図2: 今回新たに検出された遺伝子を含むQnrBの系統図



C. braakii は *qnrB* 様遺伝子を染色体上に保有していることをサザンハイブリダイゼーションで確認した (図 3)。

図3: *C. braakii* ATCC51113^Tは染色体上に*qnrB*様遺伝子を保有する



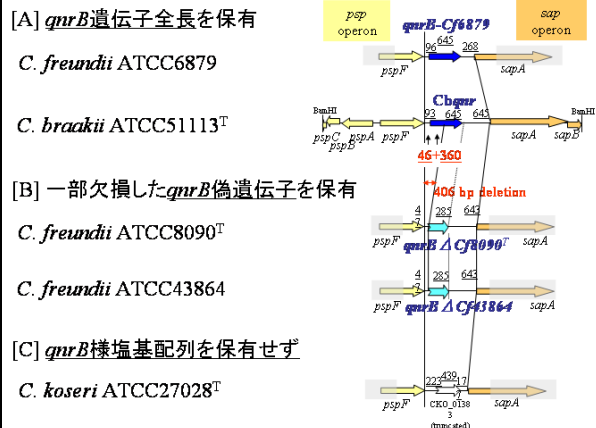
③ *qnrB* 様塩基配列の周辺塩基配列

C. braakii ATCC 51113^T の *qnrB* 様遺伝子周辺構造の解析で、同遺伝子は *psp* オペロンおよび *sap* オペロンの間に存在していた。*C. freundii* ATCC6879 株も同様であった。

一方、PCRで *qnrB* 様遺伝子が検出されなかった *C. freundii* ATCC8090^T および *C. freundii* ATCC43864 は、*qnrB* 様塩基配列の後半部のみをコードする偽遺伝子を保有していることが判明した (図 4)。また、*C. koseri* ATCC27028^T は *psp*、*sap* の両オペロンを保有しているにもかかわらず、その間に *qnrB* 様塩基配列は見出されなかった (図 4)。

psp、*sap* オペロンが近接して存在する構造は腸内細菌科の全ゲノム解析等で広くみられるが、その間の配列は多様である。*Citrobacter* 属菌は分類学上、*C. freundii* 群、*C. koseri*、および *C. amalonaticus* 群に大別されるため、菌種間の系統関係と QnrB 保有は相関している可能性がある。

図4: *Citrobacter*属ATCC菌株の*qnrB*周辺構造の比較



以上の知見と、*Citrobacter* 属菌の *qnrB* 遺伝子の多様で高い保有率を考え合わせると、*qnrB* は *Citrobacter* 属菌株にその起源を有すると考えるのが自然だと思われる。耐性遺伝子リザーバとしての *Citrobacter* 属菌の役割の一端を明らかにした例と考えている。

得られた知見をもとに、臨床分離株における *qnrB* 様塩基配列の保有状況および多様性の解析を引き続き行っていく。

(2) *qnrB* の機能的側面

qnr はキノロン感受性低下能を有することが明らかにされていた。しかし、上述のように、合成抗菌薬であるキノロンが使用されるはるか以前に分離された菌株が同遺伝子を保有することは、同遺伝子が薬剤耐性以外の役割を有している可能性を示唆している。

多菌種間を水平伝播する同遺伝子の機能の解明は本質的な困難を伴うが、*qnrB* の起源が *Citrobacter* 属であるという前提に立つことで初めて議論可能であると研究代表者は考え、以下の検討を行った。

① *qnrB* 様遺伝子のキノロン感受性低下能

C. freundii ATCC8090^T が保有する前半部を欠いた *qnrB* 様遺伝子にはキノロン感受性低下能は認めなかった。

一方、*C. braakii* ATCC 51113^T および *C. freundii* ATCC6879 が保有する全長の *qnrB* 様遺伝子はキノロン感受性低下能を有した。しかし *C. braakii* ATCC 51113^T が保有する *qnrB* 様遺伝子の N 末端部・C 末端部のいずれかを欠いた場合はキノロン感受性低下能がみられなかった。*Qnr* の構造と機能の関連が示唆された。

② ストレス応答因子としての *qnrB* 様遺伝子

qnrB 様遺伝子の転写は、キノロン曝露によってストレス応答系である SOS 応答関連遺伝子とともに増加した。

また、これら *qnrB* 様塩基配列の上下流にある *psp*、*sap* の両オペロンはストレス応答に関与している。その機能に連関する可能性を考えて、引き続き検討を続けている。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) 嵯峨 知生. 新しい細菌耐性メカニズム: *Qnr* 蛋白による作用点の保護. 分子呼吸器病 (査読無), 14 巻, 2010 年, pp8-10.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 嵯峨 知生, 他 3 名. *Citrobacter* 属菌が保有する *qnrB* 遺伝子の構造と機能に関する解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 平成 22 年 3 月 29 日, 横浜.

(2) Tomoo Saga 他 4 名. Characterization of *qnrB*-like gene in *Citrobacter* species of American Type Culture Collection (ATCC) strains. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 13th Sep 2009, San Francisco, USA.

(3) 嵯峨 知生, 他 3 名. *Citrobacter* 属菌が保有する *qnrB* 遺伝子に関する解析. 第 82 回日本細菌学会総会. 平成 21 年 3 月 12 日, 名古屋.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嵯峨 知生 (SAGA TOMOO)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号: 80459809

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()