

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月11日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590064

研究課題名（和文）

肺炎桿菌の多剤耐性化に関わる遺伝子の同定とそれらの耐性化メカニズムの解析

研究課題名（英文） Identification of multidrug resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* and analysis of the function of these gene products.

研究代表者

小川 和加野 (Wakano Ogawa)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90397878

研究成果の概要（和文）：12株の肺炎桿菌高度多剤耐性変異株において、発現が上昇している多剤排出ポンプ遺伝子を同定した。これらのうち8株が *KexD* の発現上昇株であり、2株は *KexGH* の発現上昇株であった。残り2株のうち1株は *kexAB* 発現上昇株であった。残りの1株は *kexF* 発現上昇株 (Nov2-2株) であった。この株では *kexF* の上流領域（約3kbp）が大きく欠損していた。この変異株はこの領域の欠損により、*kexF* の発現が上昇し、多剤耐性化したと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Of twelve multidrug resistant mutants from *K. pneumoniae* ATCC10031, we revealed that the expression of a multidrug efflux pump gene, *kexD* was increased in eight mutants. We also identified that two mutants whose expression of *kexGH* was increased and the expression of *kexAB* or *kexF*, was respectively increased in the other two mutants. Especially, 3kbp of deletion in the upstream of *kexF* was confirmed in the overexpressing mutant of *kexF*, and it was thought that the deletion caused the multidrug resistant phenotype.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：細胞生物学 多剤排出ポンプ 肺炎桿菌

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生活環境には多くの細菌が存在している。このような細菌は通常、健常人に対して病原性を示すことは少ない。しかし、中には、乳幼児や高齢者、あるいは基礎疾患を

持つ患者に対して日和見的に感染症を起こすものが存在している。近年、このような常在菌の抗菌薬に対する耐性化が進んでいる。耐性菌の中でも、構造や機能の異なる複数の抗菌薬に耐性を獲得した多剤耐性菌の出現

と拡大は、臨床現場での重大な問題である。

肺炎桿菌はヒト腸管や環境中に存在する細菌であり、日和見感染の原因菌の一つである。肺炎桿菌はアルコール中毒、糖尿病などの基礎疾患を持つ患者において壊死性の大葉性肺炎を起こすほか、尿路感染症や菌血症の原因となる。この菌による感染症治療には第3世代セフェム系抗菌薬やニューキノロンが多く用いられるが、現在、これらの抗菌薬に対して耐性を獲得した肺炎桿菌が、世界中で報告されている。

細菌の抗菌薬耐性化は、その原因が外来性遺伝子に由来する場合と、内在性の遺伝子によるものに大別される。肺炎桿菌のセフェム系抗菌薬やキノロン系抗菌薬それぞれに対する耐性化には、プラスミドやインサーションシーケンスなどの可動性因子が関与している例が報告されている。一方、申請者らの調査によると、肺炎桿菌のゲノム上には、この細菌の抗菌薬耐性と関係していると推定される遺伝子が、少なくとも30個以上存在しているが、肺炎桿菌の多剤耐性化とゲノム中の原因遺伝子という観点からは、あまり研究が行われていなかった。

ゲノムに由来する重要な多剤耐性因子の1つである多剤排出ポンプは、大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性菌において、多剤耐性化に密接な関連があることが報告されている。申請者は、肺炎桿菌の多剤排出ポンプに注目し、本課題申請時まで実際にゲノム由来の遺伝子の変異により、肺炎桿菌が多剤耐性化するということを明らかにした。

申請者は抗菌薬に対する感受性が高い肺炎桿菌 ATCC10031 株から、抗菌薬耐性変異株を多数分離し、これらの中の13株が抗菌薬のみでなく、消毒薬や色素などを含む様々な抗菌物質に対しても、高度に多剤耐性化していることを示した。このような多剤耐性化現象には、多剤排出ポンプが関係していると考えられる。

多剤排出ポンプは、抗菌薬など細胞に対して毒性を示す化学物質を細胞外に能動的に排出する膜タンパク質である。多剤排出ポンプの基質特異性は広く、全く構造の異なる化学物質を基質として認識することができる。従って、多剤排出ポンプにより抗菌薬に耐性化した場合、同時に複数の抗菌薬や消毒薬に対して耐性を獲得することができる。

高度多剤耐性変異株の中には、申請者がこれまでに解析を行った多剤排出ポンプの基質特性パターンと非常によく類似したパターンを示すものが存在していた。さらに RT-PCR により、いくつかの株において、多剤排出ポンプ遺伝子の発現が上昇していることを明らかにした。この結果から、肺炎桿菌においても、多剤耐性化にゲノム由来の多剤排出ポンプが関与している可能性があるこ

とが予想された。

2. 研究の目的

先述の様な背景を受けて、申請者は、本研究で次の点について明らかにすることを目指した。

13株の多剤耐性変異株のうち、原因遺伝子を明らかにできていない株の原因遺伝子を同定すること、多剤耐性の原因遺伝子が推定されている株について、推定された遺伝子が事実、多剤耐性化の原因遺伝子であるかどうかを実験的に調べることで、そして、原因遺伝子が同定された株について、どのようなメカニズムにより生じたのか、その直接的な原因を明らかにすること、である

3. 研究の方法

(1) 分離した高度多剤耐性株13株のうち、原因遺伝子に関する解析をまだ行っていない9株について、原因遺伝子の探索を行う。これら9株の抗菌薬耐性上昇パターンと、申請者らが以前に調べた肺炎桿菌の14種類の多剤排出ポンプ(*acrAB*, *kexAB*, *kexC*, *kexD*, *kexEF*, *kexGH*, *kexJK*, *kexLM*, *kexRS*, *kexTU*, *kexVWX*, *kmrA*, *kdeA*, *ketM*)の基質特異性が完全に一致したものはなかった。しかし、いくつかのポンプではある程度の類似は認められている。そこで、以前に解析済み遺伝子の mRNA 発現が、変異株において変化しているかどうか RT-PCR で調べた。

(2) 項目(1)で発現上昇が生じている遺伝子が同定できた株について、該当遺伝子とその周辺領域の DNA シーケンスを決定した。

(3) 多剤排出ポンプ *kexD*, *kexG* の発現上昇が認められたが、変異株該当遺伝子とその周辺領域に変異が認められなかった変異株について、原因遺伝子の探索を行った。申請当初はトランスポゾンを利用した解析を予定していたが、次世代シーケンサーによる解析が普及してきたことから、次世代シーケンサーによるゲノム変異解析を行った。なお、*kexD*、あるいは *kexG* の発現上昇株は複数分離されているため、それぞれ1株を選択し次世代シーケンサーによる解析を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

13株の肺炎桿菌高度多剤耐性変異株のうち、12株について、発現が上昇している多剤排出ポンプ遺伝子を同定した(表1参照)。

① *KexD* 発現上昇株について

13株のうち8株が多剤排出ポンプ *KexD* の発現上昇株であった。しかし、*kexD* 遺伝子及びその周辺領域について DNA シーケンスを決定した結果、いずれの変異株においても調べた領域には変異が同定されなかった。従って、

表1 肺炎桿菌高度多剤耐性変異株の解析結果

変異株名	耐性が上昇した抗菌薬	発現上昇した多剤排出ポンプ遺伝子	備考
1 Em16-1	Em, Tc, Nov, Clox, EtBr, Rh6G, TPP, Cho	<i>kexD</i>	次世代シーケンサーによるゲノム変異解析を実施
2 Em16-2			
3 Em16-3			
4 Em16-4			
5 Em32-9			
6 Em32-10			
7 Tc4-21			
8 Tc4-22			
9 EB256-1	Em, Nov, Clox, NLFX, EtBr, Rh6G, TPP	<i>kexGH</i>	次世代シーケンサーによるゲノム変異解析を実施
10 EB256-2	Em, Nov, Clox, NLFX, EtBr, Rh6G, TPP, SDS	<i>kexAB</i>	<i>kexAB</i> 遺伝子上流域に点変異を同定
11 Oxa128			
12 Nov2-2			
13 Nov1-8	Nov, Clox, EtBr, Rh6G, TPP, SDS	未同定	

Em: エリスロマイシン, Tc: テトラサイクリン, Nov: ノボビオシン, Clox: クロキサシリン, NLFX: ノルフロキサシリン, EtBr: エチジウムブロマイド, Rh6G: ローダミン6G, TPP: テトラフェニルホスホニウム, Cho: コール酸, SDS: ソディウムドデシルサルフェイト

kexD の発現上昇は *kexD* プロモーターの変異ではないと考えられた。*kexD* は、変異株の親株において、通常の培養条件下では発現が認められない遺伝子である。従って、*kexD* 遺伝子はその近傍にない遺伝子産物に通常は発現が抑制されており、変異株ではそのような発現抑制因子に変化が生じていると考えられた。そこで、変異株の中から1株を選択し、次世代シーケンサーによる変異解析を行った。この結果から、*kexD* 発現上昇株においては、変異が入っている可能性が高い4つの遺伝子について、これまでに実際にサンガー法でシーケンスの確認を行ったが、予想された変異は擬陽性であり、変異は同定されなかった。今後、残りの候補遺伝子について、変異の有無を確認する必要がある。

② *kexGH* 発現上昇株について

kexG の発現上昇株は13株中2株存在していた。これらについても *kexGH-kocA* 遺伝子 (*kexG* と *kexH*, *kocA* はオペロンを形成している。) 及びその周辺領域について DNA シーケンスを決定したが、いずれの変異株においても調べた領域には変異が同定されなかった。*kexD* と同様に、*kexG* は親株において、通常の培養条件下では発現が認められない遺伝子である。そこで、*kexG* についても1株を選択し、次世代シーケンサーによる変異解析を行った。その結果、TetR ファミリーに属する推定の発現制御遺伝子の変異を見出した。

③ *kexAB* 発現上昇株について

kexAB (*oqxAB*) 発現上昇株は13株中1株 (Oxa128株) 存在していた。*kexAB* 及びその周辺領域について DNA シーケンスを決定した。なお、*kexAB* 上流、下流には推定の発現制御遺伝子が複数存在していたため、それらについてもシーケンスを決定した。その結果、Oxa128株において、*kexA* とその上流に位置する遺伝子 *rara* の遺伝子間領域内に点変異 (G→T) を同定した。なお、本課題遂行中にイ

ギリスのグループにより *rara* が *kexA* のアクチベーターをコードする遺伝子であり、この遺伝子の発現上昇により *kexAB* の発現上昇が起こると報告された (Antimicrob Agents Chemother. 2012 Aug;56(8):4450-8)。しかしこのグループが同定した変異の位置と、申請者が同定した点変異の位置は異なっていた。そこで、申請者が分離した変異株 Oxa128株において *rara* の mRNA 発現を調べた結果、Oxa128株では *rara* の発現上昇は生じていないことが明らかになった。このことから、イギリスのグループが用いた肺炎桿菌と我々が分離した株では異なる機構で *kexA* の発現上昇が引き起こされていると考えられる。

そこで次に GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子が組み込まれた市販のプラスミド pZsGreen1-DR に ATCC10031 株および Oxa128 株由来の *kexA-rara* 遺伝子間領域をクローニングし、GFP の発現を調べたが、点変異の有無に関わらず、GFP の発現に大きな変化は見られなかった。

一方、変異型の制御領域を持つプラスミドを導入した時、oxacillin や chloramphenicol など *kexAB* の基質となる抗菌物質の MIC が上昇し、実際に *kexA* の発現上昇が起こっていることが明らかとなった。

kexAB の上流領域には *kexAB* のアクチベーター RarA とリプレッサー OxaR 両方の結合領域があるのではないかと考えられる。そして、肺炎桿菌 ATCC10031 ではリプレッサー OxaR が優位にこの領域に結合しているが、Oxa128 株で見出された点変異はリプレッサー OxaR の結合の優位性を弱めるものではないかと考えている。その結果、アクチベーター RarA が結合可能となり、*kexAB* の発現上昇が観察されるのではないかと考えられる。一方、この点変異があっても、リプレッサー OxaR の結合能がゼロになるわけではなく、変異型の結合領域をプラスミドで導入した場合、ゲノムから発現したリプレッサー OxaR がプラスミド上の配列にトラップされる。そして、ゲノム上にあるアクチベーター RarA の結合部位がフリーとなった結果、プラスミド上に変異型の制御領域を持つ肺炎桿菌 ATCC10031 の *kexAB* の発現が上昇するのではないかと考察している。この点についての検証は今後行う予定である。

④ *kexF* 発現上昇株について

13株中1株は *kexF* 発現上昇株 (Nov2-2株) であった。シーケンスシグリングを行った結果、この株では *kexF* と同一オペロン上に存在する *kexE* 遺伝子の途中から上流にかけての領域 (約 3kbp) が大きく欠損していた。本来、*kexEF* 遺伝子の上流にはこのオペロンのリプレッサーであると推定される *envR* 遺伝子が

存在している。しかし、Nov2-2 株では *envR* 及び *kexEF* 遺伝子の上流域が失われたために、*kexEF* 遺伝子の発現抑制が解除され多剤耐性化したものと考えられる。

(2) 成果の国内外における位置づけ

多剤耐性肺炎桿菌の問題は、日本においてはまだそれほど顕著にはなっていないが、欧米では非常に深刻な問題となっている。このような多剤耐性肺炎桿菌はプラスミドの獲得により、耐性を獲得する例が数多く報告されているが、本研究により、抗菌薬に曝されることで、肺炎桿菌が容易に多剤耐性化することが示された。そして、その耐性化には多剤排出ポンプの発現上昇が重要であることが明らかとなった。研究室ではプラスミドの獲得による耐性化を考慮する必要はないが、多剤排出ポンプの発現上昇に加えて、プラスミドの獲得が生ずれば、実際の臨床現場における大きな脅威となることが予想される。

(3) 今後の展望

今回、多剤排出ポンプの発現上昇の原因となる遺伝子がある程度同定することが出来た。従って、この情報を基に次の段階として、多剤排出ポンプの発現制御メカニズムを詳細に明らかにしたいと考えている。本研究は基礎研究であるが、私は次の2つの点において、将来の臨床応用を期待している。

1 つはこの各過程に関わる因子を明らかにすることで、抗菌薬に対する耐性化を抑制する薬の開発に繋げられるのではないかとという点である。また、本課題の前に、私は耐性菌を分離した経緯から、抗菌薬によって耐性菌の出現頻度が異なることを定量的に明らかにした。そこで、2 番目の可能性として、耐性化のメカニズムを明らかにすることで、抗菌薬が多剤耐性菌を出現させやすいかどうかの評価システムを作成できるのではないかと考えている。

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 5 件) (全て査読有)

- 1) Hashimoto K, Ogawa W, Nishioka T, Tsuchiya T, Kuroda T, Functionally cloned *pdrM* from *Streptococcus pneumoniae* encodes a Na⁺ coupled multidrug efflux pump. PLoS One. 2013;8(3):e59525 (査読有)
- 2) Ogawa W, Onishi M, Ni R, Tsuchiya T, Kuroda T, Functional study of the novel

multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. Gene. 2012 498(2):177-82. (査読有)

- 3) Watanabe K, Ishima Y, Akaike T, Sawa T, Kuroda T, Ogawa W, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, Otagiri M, Maruyama T. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. FASEB J. 2013 27(1):391-8. (査読有)

[学会発表] (計 29 件)

- 1) 黒田照夫、小川和加野 多剤耐性菌はどのようにして出現するのか? (シンポジウム、日本薬学会第133年会(横浜))2013/3/27-3/30
- 2) 森田大地、澤田紘実、小川和加野、宮地弘幸、黒田照夫 Riccardin誘導体のMRSAに対する抗菌作用の解析 (日本薬学会第133年会(横浜))2013/3/27-3/30
- 3) 岡村真弥、西山永理、山崎智広、小川和加野、谷口抄子、波多野力、黒田照夫 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性及び既存抗菌薬との併用活性を併せ持つ生薬成分の単離・同定 (日本薬学会第133年会(横浜))2013/3/27-3/30
- 4) 異島優、渡辺佳織、赤池孝章、澤智裕、黒田照夫、小川和加野、渡辺博志、甲斐俊哉、小田切優樹、丸山徹 S-ニトロソ化により獲得する α 1-酸性糖タンパク質 (AGP)の抗菌活性 (日本薬学会第133年会(横浜))2013/3/27-3/30
- 5) 小川和加野、黒田照夫 緑膿菌PA01株由来の多剤耐性変異株における変異部位の解析 (第86回日本細菌学会総会(千葉)) 2013/3/18-3/20
- 6) 藤岡 孝浩、保田 菜美、土屋 友房、小川和加野、黒田 照夫 多剤耐性緑膿菌の

- 出現と抗菌薬曝露の関係 (第86回日本細菌学会総会(千葉)) 2013/3/18-3/20
- 7) 峠 雄太, 小川 和加野, 土屋 友房, 後藤直正, 黒田 照夫 *Serratia marcescens* における新規消毒薬耐性因子の解析 (第86回日本細菌学会総会(千葉)) 2013/3/18-3/20
- 8) W. Ogawa, R. Ni, M. Mizusawa, M. Onishi, R. Kitagawa, T. Tsuchiya, and T. Kuroda Isolation and analysis of *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031 multidrug resistant mutants (II International Conference on Antimicrobial Research (Lisbon, Portugal)) 2012/11/21-11/23
- 9) 北川良子, 倪蕊婷, 大西元康, 土屋友房, 小川和加野, 黒田照夫 多剤耐性肺炎桿菌 Oxa128株における RND型排出ポンプOqxABの解析(第65回 日本細菌学会中国・四国支部総会(徳島)) 2012/10/20-10/21
- 10) 堂段駿太, 高桂鳳, 岸野孝則, 大西元康, 土屋友房, 黒田照夫, 小川和加野 肺炎桿菌のMATE型多剤排出ポンプKrtM、DinF、Yee0の解析(第85回日本細菌学会総会(長崎)) 2012/3/27-3/29
- 11) 小川和加野、水澤実名子、Ni Ruiting、大西元康、土屋友房、黒田照夫 肺炎桿菌の多剤耐性変異株の分離とその解析(第33回生体膜と薬物の総合作用シンポジウム(岡山)) 2011/11/24-11/25
- 12) Wakano Ogawa, Motoyasu Onishi, Rui-ting Ni, Teruo Kuroda, and Tomofusa Tsuchiya Functional study of RND-type multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae* (IUMS2011(Sapporo, Japan)) 2011/9/6-9/10
- 13) 小川和加野、大西元康、Ni RuiTing、水澤実名子、岸野孝則、高 桂鳳、黒田照夫、土屋友房 肺炎桿菌の多剤排出ポンプと多剤耐性化 (第32回生体膜と薬物の総合作用シンポジウム(富山)) 2010/11/29-11/30
- 14) 水澤実名子, 大西元康, 倪蕊婷, 小川和加野, 黒田照夫, 土屋友房 肺炎桿菌のRND型多剤排出ポンプAcrABの性質(第63回日本細菌学会中国・四国支部総会(松山)) 2010/10/16-10/17

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 和加野 (OGAWA WAKANO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90397878

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

黒田照夫 (KURODA TERUO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80304327

土屋友房 (TSUCHIYA TOMOFUSA)
立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：80012673