

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24年 5月31日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790958

研究課題名（和文）

細菌ストレス応答におけるキノロン耐性化因子の役割に関する研究

研究課題名（英文）

Role of quinolone resistance determinant in bacterial stress responses

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。本研究では、*Citrobacter*属菌にキノロン耐性化遺伝子 $qnrB$ を保有する菌株があることに焦点を当て、ストレス応答における役割を明らかにすることを目的とした。決定的な情報を得るために*C. braakii* ATCC51113^T株の $qnrB$ 様遺伝子ノックアウト株の作成を、 λ -Red recombinaseの系を利用して取り組んだ。*C. braakii* ATCC51113^T株の $qnrB$ 様遺伝子は、キノロン曝露によって、SOS応答遺伝子とともに発現亢進していた。キノロン以外の抗菌薬も同遺伝子の発現に影響を与えている可能性がみられた。

研究成果の概要（英文）：

Increase of quinolone-resistant bacteria is an important clinical problem. In the current project, the role of quinolone resistance determinant $qnrB$, which is located in the chromosome of certain *Citrobacter* species, for the bacterial stress response was focused. λ -Red recombinase system was applied for generating knock out $qnrB$ -like gene in the chromosome of *C. braakii* ATCC51113^T. Expression of $qnrB$ -like gene, as well as SOS-response genes, was increased when *C. braakii* ATCC51113^T was exposed to quinolone. Other antimicrobials might affect the expression of $qnrB$ -like gene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：キノロン耐性化遺伝子、 qnr 、ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌（以下、耐性菌）は临床上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汎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。

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、多くの報告が世界

各地域の細菌から報告されている (Robicsek A et al. Lancet Infect Dis, 2006)。

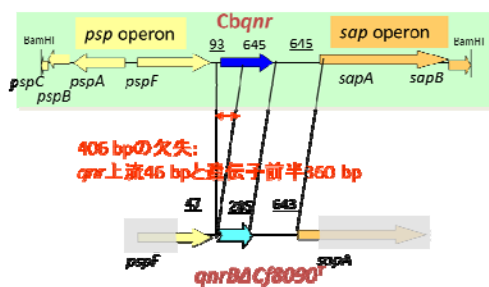
研究代表者は前回までの科学研究費助成事業で、*Citrobacter* 属菌のうち *C. freundii* 群が多様な *qnrB* 遺伝子を高率に保有することに着目し、*qnrB* は *Citrobacter* 属菌株にその起源を有する可能性が高いことを明らかにしてきた。多菌種間を水平伝播する同遺伝子の機能の解明は本質的な困難を伴うが、*qnrB* の起源が *Citrobacter* 属であるという前提に立つことで初めて議論可能である。

研究代表者はその過程でまた、合成抗菌薬であるキノロンが使用されるずっと以前に分離された菌株が *qnr* 遺伝子を保有することも明らかにした。

キノロン薬は SOS 応答と呼ばれるストレス応答を引き起こすことが知られている。*qnrB* 遺伝子は大腸菌において SOS 応答というストレス応答制御下にあることが報告された。しかしストレス応答因子としての QnrB の役割は十分説明されているとはいえない。菌側の重要な生存戦略であるストレス応答は SOS 応答以外にも多種存在し役割や誘因も多様であるが、遺伝子水平伝播の促進を通じて細菌の薬剤耐性化や病原因子獲得に関与する例も知られる。*qnr* 遺伝子も薬剤耐性以外の役割を有する可能性も考えられる。

これを踏まえて研究代表者は、*C. freundii* 群が染色体上に保有している *qnrB* 遺伝子は、薬剤耐性以外に、ストレス応答を介して細菌生存に役割を果たしていると思及するに至った。

***C. braakii* ATCC51113^T : *qnrB* 様遺伝子全長を保有**



***C. freundii* ATCC8090^T : 前半部を欠く遺伝子を保有**

2. 研究の目的

研究代表者は、*qnrB* の細菌における薬剤耐性、およびそれ以外における役割を解明することを通じて、病原微生物の薬剤耐性および病原性制御につながる重要な基礎的知見を得ることを目的として本研究を計画した。

本研究では、*C. freundii* 群が染色体上に保有する *qnr* 遺伝子の意義を明らかにするため、同菌群のノックアウト株を作成して検証することを試みた。またそれと並行して、SOS 応答を基軸としたストレス応答につき評価

を行った。

3. 研究の方法

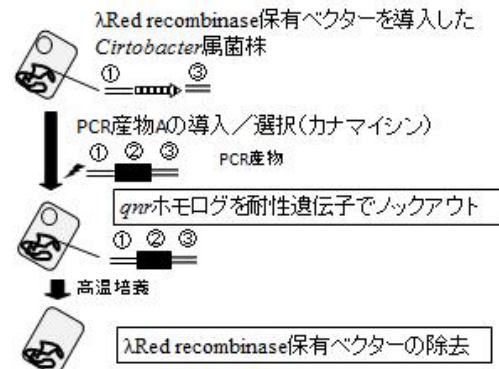
(1) 対象菌株

Citrobacter 属菌として、菌株バンクである American type culture collection (ATCC) 由来の *C. freundii* ATCC 8090^T, *C. braakii* ATCC 51113^T を解析対象とした。また、ノックアウト株作成につき、*E. coli* CGSC7739 (pKD46 保有株), *E. coli* CGSC7631, 7632, 7633, 7988 株 (薬剤耐性ベクター保有株), および *E. coli* DH5α を使用した。

(2) ノックアウト株の作成

λ-Red recombinase を用いる系を利用した (Datsenko KA and Wanner BL. PNAS, 2000)。その概略は次の通りである。λ-Red recombinase 遺伝子群を有する温度感受性ヘルパープラスミド pKD46 を導入し、予め作成した薬剤耐性マーカーを含む核酸を電気穿孔法で導入し、アラビノースで λ-Red recombinase 発現を誘導し、薬剤で相同組換えを起こした菌株を選択し、42°C 培養で pKD46 を脱落させる。

導入核酸は PCR 産物を用いた。Overlap PCR 法およびその変法を利用した。pCR2.1 ベクターは遺伝子クローニングに用いた。



(3) 薬剤感受性測定

薬剤感受性は定法に従い微量液体希釈法またはディスク法で評価した。

(4) ストレス応答遺伝子の転写解析

定量 RT-PCR 法で検討した。16S rDNA 遺伝子を参照遺伝子とし、 $\Delta\Delta Ct$ 法で *qnrB* 様遺伝子および SOS 応答関連遺伝子の転写量を比較した。

4. 研究成果

(1) *C. braakii* ATCC 51113^T ノックアウト株の作成

遺伝子の役割の解明には isogenic な菌株同士と比較が必須である。今回は *C. freundii* 群菌株が染色体上に保有する *qnrB* 様遺伝子が果たしている生理的役割を解明することを目的としているため、同ノックアウト株作成は非常に大きな意義をもつ。

同菌群の代表的菌株として *C. braakii* ATCC 51113^T を対象とした。また *C. freundii* 群は生物学的に大腸菌と近縁であるため、大腸菌で広く応用実績があり、他菌種にも応用の報告がある λ -Red recombinase を用いる系を応用した。

しかし *C. braakii* への同法の応用は他に見当たらず、下記のようにいくつかの工程での検討が必要であった。

同菌株は染色体上にコードされるクラス C 型 β ラクタマーゼを産生するため、大腸菌で汎用される選択薬剤アンピシリンを使用することができない（自然耐性である）ことが障壁であった。しかし、pKD46 等で一般にアンピシリン耐性マーカーとして使用されている β ラクタマーゼはクラス A 型 (TEM 型) であることに着目した。 β ラクタマーゼのうちクラス A が作用しやすくクラス C が作用しにくい薬剤を求め、ピペラシリン 1 μ g/ml (力価) が有用であることを見出した。

実際に、*C. braakii* ATCC 51113^T 菌株にヘルパープラスミド pKD46 を導入した菌株の選択に成功し、ピペラシリン感受性および抽出プラスミドの電気泳動で確認した。また、温度感受性についても、pKD46 導入菌株は 30°C 培養でプラスミドを保持し、42°C での培養でプラスミドを脱落することを、ピペラシリン感受性で確認した。この導入は、 λ -Red recombinase の系における必要条件となる。

このほかに現在までに行った条件検討は以下である。

・導入核酸：OverlapPCR 法の工程

非特異的増幅が出現して、目的産物の増幅が不十分だったため、産物を一旦クローニングしたものをテンプレートとして確実な増幅を行った。

また、通常の PCR に先立ちプライマを加えずにサーマルサイクル反応を行う工程を加えた。(Extension-overlap-purification 法)。

- 導入核酸：OverlapPCR の際の各産物のクロスオーバー

通常は 20-30bp 程度だが、最終的に 200-300 bp まで拡大した。

- 導入核酸：透析

ゲル切り出し後に透析を行い塩除去した。

- 導入核酸：収量

上記の改善により、電気穿孔法に適したマイクログラム単位の核酸が得られるようになった。導入核酸量がノックアウトの成否に決定的という意見があり、大きな好材料と考

えている。

- 導入核酸：染色体配列とのクロスオーバー
通常は 100bp 以下でも可能とされるが、長いほうが相同組換えの効率が高いとされる。最終的に 1000bp のものを作成した。

- 薬剤マーカー／選択薬剤濃度

カナマイシン 10 μ g/ml (力価) での選択が最善と考えている。カナマイシン 5 μ g/ml では組換不成功菌株の発育が多くみられた。クロラムフェニコールは組換不成功菌株の発育が多くみられた上、キノロン感受性にも影響がみられたため、第一選択にはしなかった。

- アラビノース濃度

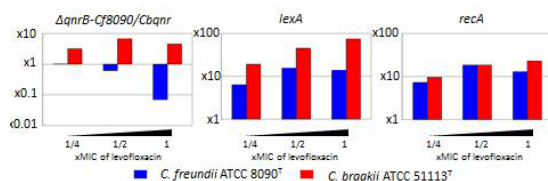
1-50 mM で検討した。50 mM では菌発育がやや遅れるものの、最終的にコンピタント細胞化するのに問題はないようにみえた。

ノックアウト菌株は現時点で得られていないが、条件の最適化は進んでおり、障壁は乗り越えることができつつあると考えている。

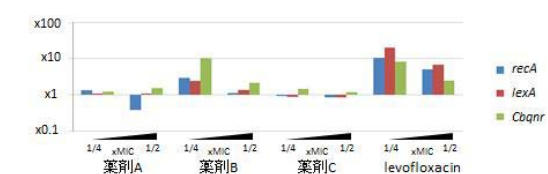
(2) *C. freundii* 群菌株におけるストレス応答

Citrobacter 属菌のうち、*qnrB* 様遺伝子全長を保有する菌株と、偽遺伝子を保有する菌株いずれにおいても、キノロン曝露によって SOS 応答が起こることが確認された。同時に、*C. braakii* ATCC 51113^T 菌株では *qnrB* 様遺伝子の発現の亢進も確認された。

これは大腸菌の結果と同様で、大腸菌と *Citrobacter* 属菌が生物学的に近縁であることを反映していると考えられた。



また、SOS 応答および *qnrB* 様遺伝子の発現は、曝露する抗菌薬の種類によってさまざまな場合があることも明らかとなった。



なお、*qnrB* 様遺伝子の役割に関する決定的な情報は(1)のノックアウト株が得られるのを待って解析する必要があり、現在も引き続き取り組んでいる。

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3件)

- (1) 嵯峨 知生. 【多剤耐性菌-多剤耐性菌の最新動向-】新しいキノロン耐性機序. 日本臨床 (査読無), 70 巻, 2012 年, pp333-338.
- (2) 嵯峨 知生. 耐性菌への対応方法. Journal of Otolaryngology, Head & Neck Surgery (査読無), 27 巻, 2011 年, pp60-64.
- (3) 嵯峨 知生. Qnrによるキノロン耐性化の促進. 呼吸器内科 (査読無), 20 巻, 2011 年, pp543-548.

[学会発表] (計2件)

- (1) 青池 望, 嵯峨 知生, 他 6 名. 大腸菌キノロン耐性決定領域 (QRDR) 変異の Pyrosequencing法を用いた解析法の構築. 第23回日本臨床微生物学会総会. 平成24年1月22日, 横浜.
- (2) 嵯峨 知生, 他 1 名. キノロン耐性化遺伝子qnrBと細菌ストレス応答に関する研究. 第136回東邦医学会例会. 平成22年6月18日, 東京.

[図書] (計1件)

- (1) 嵯峨 知生, 医薬ジャーナル社, 感染症診療の基礎と臨床～耐性菌の制御に向けて～, 2010, 8

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