

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670211

研究課題名(和文)メンブレンベジクルを介した薬剤耐性遺伝子の高効率伝達・転移機構の解明

研究課題名(英文)Horizontal transfer of antibiotic resistance genes through outer membrane vesicles

研究代表者

荒川 宜親 (Arakawa, Yoshichika)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10212622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌が産生する細胞外膜小胞(以下OMVs)にはDNA、RNA、タンパク質などが含まれている。私たちは、OMVs中のDNAには薬剤耐性遺伝子が含まれ、その薬剤耐性遺伝子が水平伝播するという仮説を立て、検証を開始した。臨床分離多剤耐性Acinetobacter baumanniiからOMVsを回収し、それを薬剤感受性A.baumanniiに添加した。その結果、薬剤耐性遺伝子を含んだ10-kb超のDNA断片が、薬剤感受性A.baumanniiの染色体DNA中に挿入される現象を確認した。これらDNA断片の挿入は、相同組換え機構によるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bacterial outer membrane vesicles (OMVs) contain several biological materials such as DNA, RNA, and proteins. We hypothesized that antibiotic resistance genes, included in OMVs, have a role in the transfer of these genes to other bacterial cells. To test this, we purified OMVs from the culture supernatant of a multidrug resistant Acinetobacter baumannii strain (donor cells), and applied them to an antibiotic susceptible A. baumannii strain (recipient cells). We obtained several transformants that acquired antibiotic resistance genes derived from the donor A. baumannii cells. Whole genome sequence analyses of the transformants revealed that DNA fragments longer than 10-kb, and those including antibiotic resistance genes, could be inserted into the chromosomal DNA of recipient cells. These DNA fragments appeared to be inserted via homologous recombination.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性遺伝子 水平伝播 Acinetobacter baumannii

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループでは、様々な薬剤耐性グラム陰性病原細菌から、新規の薬剤耐性機構を見出し、解析を行ってきた。これらグラム陰性菌における外来性薬剤耐性遺伝子の多くは、プラスミド上に存在する。したがって、近縁菌種同士でプラスミドが接合伝達した場合には、容易に薬剤耐性遺伝子の水平伝達が生じる。

その一方で、外来性の薬剤耐性遺伝子が、染色体ゲノム DNA 上に見出されることもある。染色体ゲノム DNA 上にある薬剤耐性遺伝子の水平伝達を媒介する分子機構としては、conjugative transposon がこれまでに報告されている。しかし、DNA データベースを俯瞰すると、腸内細菌科細菌やブドウ糖非発酵菌群などのグラム陰性菌の染色体 DNA 上にある薬剤耐性遺伝子が、conjugative transposon に媒介されている例はほとんどない。

したがって、菌種を超えて染色体ゲノム DNA 上に存在する薬剤耐性遺伝子を、細菌同士で授受しているか否かについては、それを媒介する分子機構がこれまでに発見されていないため、不明な点が多い。しかし、実際には、既知の挿入配列(IS)や繰り返し DNA 配列などの特定の構造とともに、薬剤耐性遺伝子を含め、酷似した遺伝子ユニットやそのクラスターが多数確認されるという事実は、何らかの未知の分子機構により、菌種を超えて、それらが染色体ゲノム DNA 上を転移している可能性を示唆するものと考えられる。

2. 研究の目的

近年、細胞同士の新たなコミュニケーションツールとして、エキソソームの解析が精力的に行われている。エキソソームには DNA、RNA (含 microRNA)、タンパク質などの生体成分が含まれており、細胞間の情報伝達に寄与しているとの報告がある。エキソソームに該当する細菌由来成分として outer membrane vesicle (以下 OMV) が挙げられる。OMV にもエキソソーム同様、DNA、RNA、タンパク質などが含まれることが分かっている。OMV には、病原因

子に相当するタンパク質(ベロ毒素など)が含まれていることがあきらかにされており、細菌が産生する OMV の意義として、病因因子の輸送が報告されている。しかし、DNA や RNA などの核酸成分の意義については、これまでにあまり検討されていない。そこで我々は、OMV に含まれる DNA が、細菌間における遺伝子の授受に寄与しているという仮説を立て、検証を開始することとした。OMV に薬剤耐性遺伝子が含まれていた場合には、OMV が菌種を超えた薬剤耐性遺伝子の水平伝達に寄与する可能性が考えられる。本研究では、OMV による薬剤耐性遺伝子水平伝播について検証する。

3. 研究の方法

(1) OMV の回収と精製 :

多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* ARS60 株を LB 培地で液体培養し、培養液を超遠心(150,000 g, 90 min)することで、OMV を回収した。回収した成分を、オプチプレップを用いた密度勾配遠心法により分画し、精製作業を行った。

(2) 電子顕微鏡による観察 :

(1)にて精製した各画分を限外ろ過により濃縮し、それらに含まれる構造物を、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。染色はネガティブ染色法により行った。

(3) 形質転換体の全ゲノム解析 :

各画分と薬剤感受性 *A. baumannii* ATCC17978 株を混和し、一定時間インキュベーションした。その後、至適な濃度に調整した抗菌薬(アミカシン、テトラサイクリン、カルベニシリン)を含んだ LB 寒天培地に、菌塊を塗布した。37 で1晩培養した後、抗菌薬入り寒天培地に発育した形質転換体から DNA を精製し、Miseq を用いて、全ゲノム解析を行った。

(4) 薬剤感受性試験 :

薬剤感受性試験を寒天平板希釈法に準じて行った。また、Etest を用いて行った。

4. 研究成果

Acinetobacter 属菌は、生来、形質転換能力が高く、外来性の DNA を獲得しやすい菌種とされている。臨床で分離される *Acinetobacter* 属菌、特に *Acinetobacter baumannii* は、多剤耐性化傾向が強いため、形質転換など、何らかの方法で薬剤耐性遺伝子を効率的に取り込んでいるものと考えられる。また、ゲノム解析の結果から、*A. baumannii* 同士で薬剤耐性遺伝子を授受している可能性も考えられ、それには何らかの分子機構が関与しているものと予測された。そこで、本研究では臨床分離多剤耐性 *Acinetobacter* をモデルに、OMV を介した薬剤耐性遺伝子水平伝播について検討を行った。

臨床分離多剤耐性 *A. baumannii* ARS60 株 (アミノグリコシド耐性、テトラサイクリン耐性、 β -ラクタム薬耐性) の培養上清中から、超遠心により、OMV を回収した。この粗精製 OMV を、薬剤感性 *A. baumannii* ATCC17978 株に添加した。一定時間インキュベーションした後に、抗菌

薬含有培地に塗布し、薬剤耐性形質転換体を選択した。

アミノグリコシド入りの寒天培地上で選択した形質転換体は、ARS60 株由来のアミノグリコシド耐性遺伝子を獲得していた。テトラサイクリン入りの寒天培地で選択した形質転換体、 β -ラクタム薬入りの寒天培地で選択した形質転換体は、各々、ARS60 株由来のテトラサイクリン耐性遺伝子、 β -ラクタム薬耐性遺伝子を獲得していた。Etest による薬剤感受性試験結果を図 1 に示す。*A. baumannii* ARS60 株はアミカシン、アンピシリン、テトラサイクリンの MIC が $>256 \mu\text{g/ml}$ と高値であった。また、形質転換体 (*A. baumannii* ATCC17978tra) の MIC も、親株である *A. baumannii* ARS60 株と同等、高値であった。

対数増殖期、静止期、衰退期にある培養液から回収した粗精製 OMV を用い、形質転換体の作製率を比較したところ、静止期から回収した粗精製 OMV を使用した場合に、最も高率に形質転換体を得ることができた。また、衰退期から回収した粗精製 OMV を使用した場合が、最も低率であった。以降、静止期にある培養液から回収した粗精製 OMV を実験に供することとした。

静止期にある培養液から回収した粗精製 OMV を、密度勾配遠心法により、さらに分画した。各分画を薬剤感性 *A. baumannii* ATCC17978 株と一定時間混和し、前述と同様にして、形質転換体を選択した。その結果、高密度側の分画に形質転換体を出現させる成分が集約されていることがわかった。さらに、密度勾配遠心法によって得られた各分画を濃縮し、各分画に含まれる構造物を、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。結果を下に示す (図 2)。

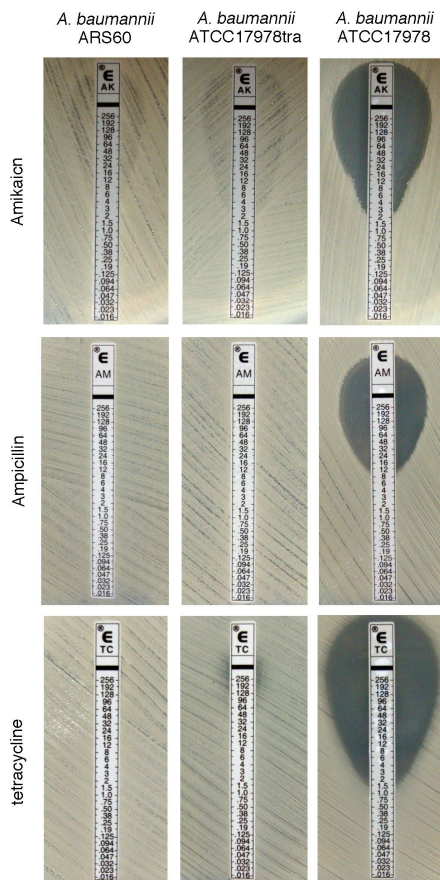


図 1. 薬剤感受性試験結果

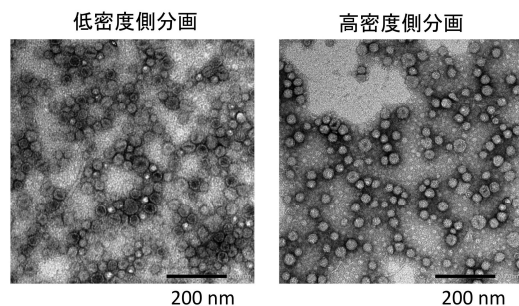


図2.透過型電子顕微鏡による観察像
いずれの分画にも、OMV に相当する 50 nm 程度の球状構造物が観察された。また、200~500 nm 程度の棒状の構造物が少数ではあるが観察された。

また、得られた薬剤耐性形質転換体について全ゲノム解析を行ったところ、薬剤耐性遺伝子を含め、10-kb 超の DNA 断片が、形質転換体の染色体 DNA に挿入されていることがわかった。一例を図3に示す。図3はアミノグリコシド耐性遺伝子である *armA* の転移の詳細を解析したものである。*armA* 周辺を含め、およそ 30-kb 程度の DNA 断片の組み換えが確認された。*armA* 周辺には *mph* (マクロライド耐性遺伝子)、*catB3* (クロラムフェニコール耐性遺伝子)、*sul1* (スルホンアミド耐性遺伝子) など、他の薬剤耐性遺伝子も確認されたため、この DNA 断片の獲得により、薬剤感性 *A. baumannii* ATCC17978 株は複数の抗菌薬に対し、耐性を獲得したことになる。したがって、本転移現象は、*A. baumannii* の多剤耐性化に関与するものと考えられた。

複数の形質転換体のゲノム解析を行ったところ、挿入された DNA 断片の長さは、形質転換体ごとに異なっていた。挿入された DNA 断片の末端領域の塩基配列は、*A. baumannii* ATCC17978 株の染色体 DNA 中にある遺伝子の塩基配列と酷似していた。したがって、DNA 断片の挿入は、相同組換えによるものと考えられた。今後は、*recA*, *comEC*, *pilT* など、*A. baumannii* において DNA の組み換えに関与していると報告がある遺伝子を欠損させ、DNA 断片の挿入が生じるか否かの検討が必要であると考えられた。

上述のような薬剤耐性遺伝子転移現象は、*A. baumannii* ARS60 株を OMV の供与株として使用した時のみならず、他の臨床分離 *A. baumannii* を OMV の供与株として使用した場合にも見られた。特に、International Clone II (以下 IC II) と呼ばれ、流行株として拡散している、いわゆる世界流行株を OMV の供与体として用いた時に、薬剤耐性遺伝子転移現象を確認する

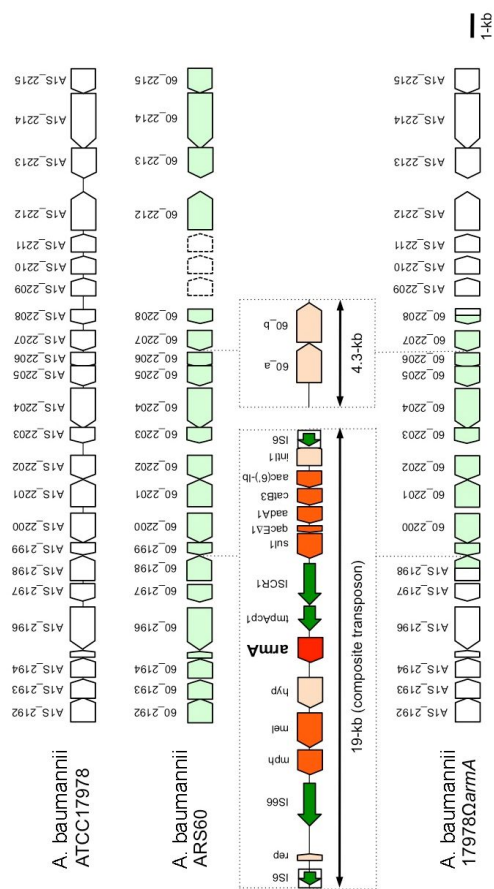


図3.アミノグリコシド耐性遺伝子転移
ことができた。しかし、これら ICII *A. baumannii* が有する薬剤耐性遺伝子が全て転移するのではなく、菌株ごとに転移する薬剤耐性遺伝子の種類に違いが見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 宜親 (ARAKAWA, Yoshichika)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10212622

(2) 研究分担者

和知野 純一 (WACHINO, Jun-ichi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号：00535651