

令和元年5月31日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08781

研究課題名(和文)ブドウ球菌の動く遺伝因子「SCC複合体」の新規遺伝子構造と分子疫学的性状解析

研究課題名(英文) Characterization of Novel Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC) Composite Islands in MRSA clinical isolates, and application to molecular epidemiology

研究代表者

漆原 範子 (Urushibara, Noriko)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80396308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ブドウ球菌属の細菌は、可動性遺伝因子 Staphylococcus Cassette Chromosome (SCC) を通じ遺伝情報を共有し、素早く環境に適応する。最もよく研究されている SCCmec は宿主細菌にメチリン耐性を付与する。SCCmec 以外の SCC にも様々な耐性遺伝子が見られる。本研究では北海道にて分離されたブドウ球菌の SCC の遺伝子構造を解析し、ポリアミン耐性を付与する遺伝子 speG をコードする新規の SCC、新規の SCCmec 型(XIV型)を見いだした。さらにその染色体 DNA との結合部位を欠いている SCCmec XIV-like構造を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌の蔓延は世界的な問題である。新規の抗生剤の開発が停滞している現状では、耐性菌の動向調査に基づく感染制御・投薬管理が必要不可欠である。本研究ではブドウ球菌の可動性遺伝子 SCC の構造に着目し、遺伝子再編が現在も進行中であり、更に複雑化・多様化していることを明らかにした。分子疫学解析を行う際の基盤となる遺伝情報を拡充し、分子多型に基づく耐性菌監視の改善に資する結果と言える。他方、再編に伴い宿主細菌が新たな生物学優位性を持つことも予測され、継続的な動向調査の必要性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The staphylococcal cassette chromosome (SCC) is a bacterial mobile genetic element inserted in the genome of staphylococcal species. SCC contains a variety of functional genes that provide biological benefits to the host bacteria. Staphylococcal species exchange genetic information by horizontal gene transfer of SCCs, which enables rapid adaptation to changing environments. Three ST5-MRSA strains (SC640, SC792, and SC955) positive for both ACME-arc and speG were subjected to whole-genome sequencing, and their SCC composite islands (SCC-CIs) were determined. The SCC-CIs of these strains contained following novel SCCs: novel SCCs containing speG gene (SC640, SC792, and SC955), a novel SCCmec type XIV (SC792), and a truncated SCCmec type XIV-related structure (SC640).

研究分野：衛生学

キーワード：ブドウ球菌 MRSA SCCmec 水平伝播 アルギニン代謝 ポリアミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌属細菌は、可動性遺伝子エレメント Staphylococcus Cassette Chromosome (SCC) の水平伝播により遺伝情報を共有すると考えられている。SCC は両端に直接反復配列 (DR) が存在し、内部に挿入・切り出しを担う組換え酵素 (cassette chromosome recombinase: *ccr*) をコードする。最も良く研究されている SCC としてメチシリン耐性を担う *SCCmec* を挙げることができる。SCC*mec* は多様性に富み、13 種の遺伝子型が報告されている。

non-*mec* SCC にも多様な耐性遺伝子が見られる。市中感染型 MRSA の中で世界的に最も広く分布するクローン USA30 に見いだされた I 型 arginine catabolic mobile element (ACME) は、本クローンの広範囲な伝播に寄与したと考えられている。ACME にコードされるアルギニン代謝系酵素群 (ACME-*arc*) が低 pH 耐性を付与し、アセチルトランスフェラーゼ酵素遺伝子の一つ *speG* がポリアミン耐性に関与する。これらの形質が USA300 に選択的優位性を与えたと考えられている。

我々は北海道の医療施設から分離された MRSA ゲノム中の SCC に関し、特に *SCCmec* と ACME に着目して調査を行ってきた。日本で最も多い *SCCmec* II 型の MRSA において ACME-*arc* の保有率が 0.5% (2008 年) から 4.5% (2011 年) に上昇したことを示し、USA 300 での仮説に矛盾しないことを確かめてきた。更に *SCCmec*、ACME、その他 SCC が連結して挿入された SCC 複合体 (SCC composite islands: SCC-CIs) の構造多様性を明らかにした。

2. 研究の目的

わが国では黄色ブドウ球菌をはじめとするブドウ球菌は最も多く分離される感染起因菌であり (30-40%)、薬剤耐性率も高い。既報及びこれまでの我々の成果から、本邦から分離される MRSA においても SCC/SCC-CIs の遺伝子構造再編が現在も進んでいると考えられる。本研究は、北海道で得られた MRSA 臨床分離株に見いだされた SCC/SCC-CIs の遺伝子構造を明らかにし、(1) 分子疫学解析を行うにあたり必要な新規遺伝子データを追加し充実させること、(2) 比較ゲノム解析により、その由来を考察すること、(3) 遺伝子再編の結果どのような生物学的性質の変化が起こるか考察し、今後の動態予測の基盤とすること、以上の三点を目的とした。

3. 研究の方法

申請期間前の 2013-2014 年に収集・保管された 624 株の MRSA 臨床分離株について、ACME-*arc* の有無、*spa*-type を初めとした分子性状解析、MLST を用いた系統解析 (Sequence type 即ち ST の決定) を行った。ACME-*arc* 陽性の ST-5 MRSA 株のうち、3 株に *speG* 遺伝子が検出された (SC640, SC792, SC955 株)。これら 3 株のゲノムを用いて全ゲノム配列決定を行い、*SCCmec*、ACME を含む SCC-CIs の全領域を決定した。DNA Data Bank of Japan Fast Annotation and Submission Tool (DFAST, <https://dfast.nig.ac.jp>) を用いてアノテーションを行い、コードされている遺伝子の機能を考察した。更に Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn?lang=ja>) にて既存の類似配列と比較検討することにより、SCC-CIs 上にある配列の由来を解析した。

4. 研究成果

(1) ACME 保有率とその推移

本邦は他国と比較して *SCCmec* II 型が多く検出される。この *SCCmec* II 型における ACME-*arc* 検出率は 6.9% となり、2008 年から 2011 年までにみられた上昇傾向が継続していた。USA300 と同様に宿主 MRSA に低 pH 条件下での増殖を可能にするなどの選択優位性をもたらしている推測される。また、いずれの ACME-*arc* も短縮型の亜型 ACME、すなわち II' 型 ACME 内にコードされており、I 型 ACME は ST5 系統の MRSA には検出されないという既報と矛盾しない結果であった。

(2) 新規 SCC-CIs とその構造

SC640, SC792 は 4 つの SCC/SCC-like からなっており, 一方 SC955 は 3 つの SCC で構成されていた。図 1 に, それらの模式図を, 既報の二つの類似配列 (代表的な表皮ブドウ球菌株 ATCC12228 株, 及びデンマークにて得られた MRSA 臨床分離株 M1 由来の SCC-CIs) と並べて示す。USA300 の I 型 ACME は一つの遺伝因子内に ACME-arc と *speG* 遺伝子の両方をコードしているが, 今回明らかにした SCC-CIs では, *speG* は II' 型 ACME とは異なる SCC 内にコードされていた (SCC_{SC640} 及び SCC_{SC955})。これまで本邦で分離された ST-5 系統の MRSA で ACME-arc と *speG* の二つの locus を併せ持つ菌体の報告は無く, USA300 同様の選択的優位性を持つか否か, 引き続き調査・検討が必要と考えられた。

speG 遺伝子をコードする SCC, すなわち SCC_{SC640}, SCC_{SC955} は, ATCC12228 株 SCC-CIs 中に見られる配列に相関性が高かった (図 1)。表皮ブドウ球菌をはじめとするコアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) は, 黄色ブドウ球菌に比較して薬剤耐性や重金属耐性を担う遺伝子の獲得が早く, 黄色ブドウ球菌は, それらを CoNS から水平伝播にて獲得していると考えられている。今回の結果は現在の仮説に矛盾しない結果と言える。

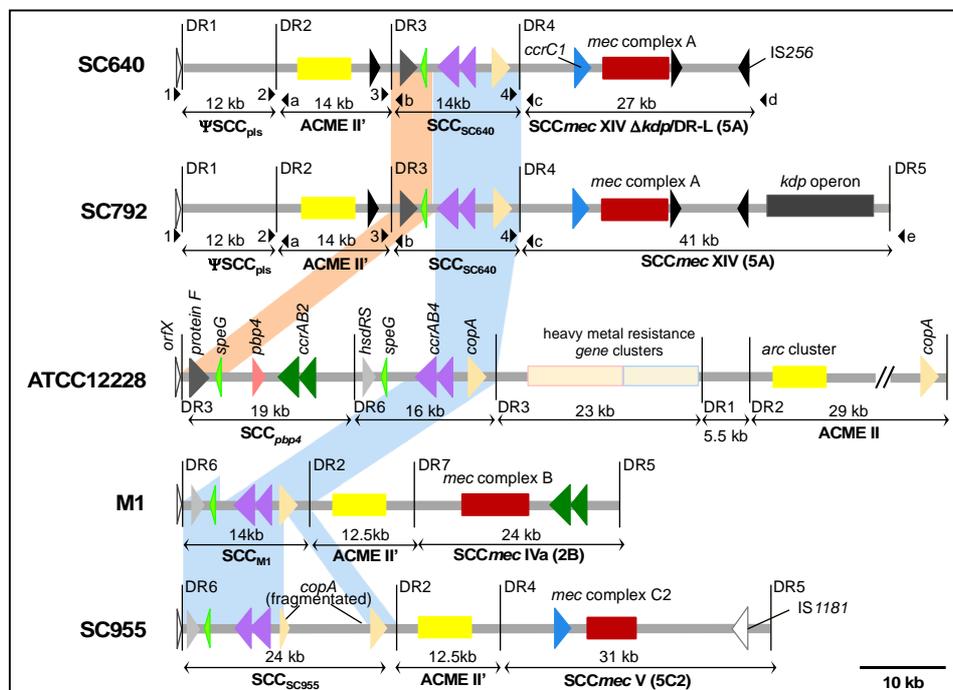


図 1. 本研究で決定した SCC-CIs 略図

水色, 及び薄いオレンジで示した領域は, ヌクレオチド配列で 96% 以上の一致率を示す。

(3) 新規 SCCmec XIV 型とその構造

SCCmec は多様性に富み, メチシリン耐性を担う *mecA* 遺伝子構造 (*mec complex*) の多型と *ccr* 遺伝子の多様性を組み合わせた型別決定法が確立しており, 分子疫学解析に用いられている。5 種の *mec complex* (A, B, C1, C2, E) と 9 種の *ccr* の組合せにより, I-XIII の 13 種類の SCCmec 型が報告されてきた。SC792 の SCC-CIs に含まれる SCCmec は A 型の *mec complex* とタイプ 5 の *ccr* (*ccrC1*) を保有していた (5A)。この組合せは新規であり, 国際的な SCCmec の命名組織 International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements より, 新規の XIV 型と認定された。図 2 に, その模式図を, 既報の類似配列 (JCSC6944 株, N315 株, そして SA1213 株由来の SCCmec) と併せて示す。SCCmec XIV 型はこれら既報の配列から進化した可能性が考えられた。一方, SC640 株の SCC-CIs に含まれる SCCmec は SC792 株の SCCmec XIV 型と DR 配列から 27 kb までは同一であるが, *mec complex*

以降の配列を欠いていた(図2)。染色体遺伝子との接合部位の DR 配列,すなわち組換え酵素の認識配列が無いため可動性を失っているものと予測された。同様の構造はルーマニア,及び韓国から分離された MRSA にも見られ,同じく可動性を失っているものと考えられている。なお,(2)および(3)に記載した内容は,現在投稿中である。

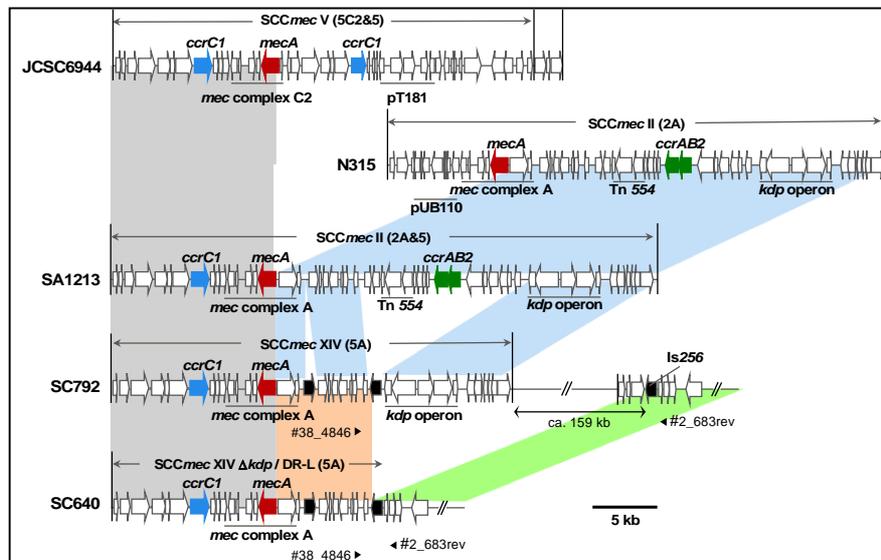


図2. 新規 SCCmec XIV 型(SC792 株) と truncated form (SC640)

灰色,水色,薄いオレンジ,黄緑で示した領域は,ヌクレオチド配列で 98% 以上の一致率を示す。

(4) 結語

本調査により SCC の再編が現在においても細菌内で進行中であることが示された。再編によって得られた形質がどのように伝播するのか今後の動態の把握が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Haque N, Aung MS, Paul SK, Bari MS, Ahmed S, Sarkar SR, Roy S, Nasreen SA, Mahmud MC, Hossain MA, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Kobayashi N. Molecular Epidemiological Characterization of Methicillin-Susceptible and -Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Skin and Soft Tissue Infections in Bangladesh. Microb Drug Resist (査読有) 2019; 25: 241-50. doi: 10.1089/mdr.2018.0123.

Kobayashi N, Ahmed S, Sumi A, Urushibara N, Kawaguchiya M, Aung MS. Collaborative Research on Puerperal Infections in Bangladesh. Nihon Eiseigaku Zasshi (査読無し) 2017; 72: 106-11. doi: 10.1265/jjh.72.106.

Aung MS, San T, Aye MM, Mya S, Maw WW, Zan KN, Htut WHW, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Prevalence and Genetic Characteristics of Staphylococcus aureus and Staphylococcus argenteus Isolates Harboring Panton-Valentine Leukocidin, Enterotoxins, and TSST-1 Genes from Food Handlers in Myanmar. Toxins (Basel) (査読有) 2017; 9. doi: 10.3390/toxins9080241.

Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N, Sumi A, Ito M, Kudo K, Morimoto S, Hosoya S, Kobayashi N. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Outpatients in Northern Japan: Increasing Tendency of ST5/ST764 MRSA-IIa

with Arginine Catabolic Mobile Element. *Microb Drug Resist* (査読有) 2017; 23: 616-25. doi: 10.1089/mdr.2016.0176.

Pokhrel RH, Aung MS, Thapa B, Chaudhary R, Mishra SK, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N, Detection of ST772 Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Bengal Bay clone) and ST22 *S. aureus* isolates with a genetic variant of elastin binding protein in Nepal. *New Microbes New Infect* (査読有) 2016; 11: 20-7. doi: 10.1016/j.nmni.2016.02.001.

[学会発表](計 9 件)

Aung MS, Nahar S, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Molecular epidemiology, virulence and drug resistance profile of extended-spectrum of or b-lactamases (ESBLs) producing extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. 30th International Congress of Chemotherapy and Infection 2017, Taipei (Republic of China), 2017. 漆原範子, 川口谷充代, メイジ・ソウ・アウン, 小林 宣道, 本邦での黄色ブドウ球菌ゲノム中の ACME (アルギニン代謝系可動性遺伝子要素), 第 62 回 日本ブドウ球菌研究会, 十和田市, 2017.

Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Molecular epidemiology of MRSA isolates harbouring PVL genes and/or ACME (arginine catabolic mobile element) in Hokkaido, 第 62 回 日本ブドウ球菌研究会, 十和田市, 2017.

Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) from Outpatients in Hokkaido, Japan, IUMS2017 (International Union of Microbiological Societies Congress 2017) & 15th international congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Singapore, 2017.

Urushibara N, Aung MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Variation in ACME-SCCmec composite elements in MRSA clinical isolates in the CC5 lineage in Japan. IUMS2017 (International Union of Microbiological Societies Congress 2017) & 15th international congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Singapore, 2017.

Kobayashi N, Aung MS, Kawaguchiya M, Urushibara N. Molecular epidemiological study of MRSA harbouring ACME (arginine catabolic mobile element) in Hokkaido, Japan, 87 回日本衛生学会学術総会, 宮崎, 2017.

Urushibara N, Aung MS, Kawaguchiya M, Kobayashi N. Molecular epidemiological characterizations of MRSA isolates harbouring PVL genes and/or ACME (arginine catabolic mobile element) in Hokkaido, northern main island of Japan, 16th Asia Pacific congress of clinical microbiology and infection (Melbourne, Australia, 2016.

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Kobayashi N. Panton-valentine leukocidin (PVL)/Arginine catabolic mobile element (ACME)-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the community and hospital in Japan, 17th International Symposium on Staphylococci 2016 Seoul (Korea), 2016.

Kobayashi N, Ahmed S, Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung M, Sumi A. バングラデシュにおける産褥期感染症由来の大腸菌と黄色ブドウ球菌の分子疫学的解析. 第 86 回日本衛生学会学術総会, 旭川市, 2016.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 宣道

ローマ字氏名：KOBAYASHI, Nobumichi

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：80186759

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。