

令和元年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19133

研究課題名(和文) 高度多剤耐性緑膿菌染色体に特異的に存在するゲノミックアイランドの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of genomic islands in highly multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

多田 達哉 (Tada, Tatsuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00624644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高度多剤耐性緑膿菌による院内感染は、医療安全を根底から脅かしている。申請者はこれまでの多剤耐性緑膿菌株の全ゲノム解析を通じ、薬剤耐性遺伝子がプラスミドを介して菌種間に水平伝播することによって播種されるだけでなく、特定の株では薬剤耐性遺伝子を積極的に染色体ゲノムに取り込むことによって流行株に変貌していくことを明らかにした。本研究により、高度多剤耐性緑膿菌が特異的に保有するゲノミックアイランドの特定の遺伝子が外部遺伝子の取り込み促進に関与するのではなく、緑膿菌が一般に保有する遺伝子に変異が入ることによって取り込みを促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度多剤耐性緑膿菌は日本を含むアジアの医療施設で大きな問題となっている。これらの多剤耐性菌の耐性化にはプラスミドではなく染色体上に薬剤耐性因子を取り込む機構が存在することが示唆されている。この取り込み機構の解明は医療施設で蔓延する緑膿菌の高度耐性化のメカニズムの解明につながり、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The nosocomial infection due to highly multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* threatens medical security worldwide. Our previous studies on whole genome analysis revealed that highly multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains were disseminated in medical settings while uptaking drug-resistant genes through plasmid horizontally among these pathogens as well as uptaking these genes in the chromosomes. Our present study suggested that specific genes of genomic islands in highly multidrug-resistant *P. aeruginosa* are not associated with uptaking of outside genes, but the mutations of genes which *P. aeruginosa* generally harbor will be promote uptaking outside genes.

研究分野：微生物学

キーワード：高度多剤耐性緑膿菌 ゲノミックアイランド 薬剤耐性因子 インテグレーション

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性緑膿菌の新興は、医療安全にとって大きな脅威となっている。多剤耐性緑膿菌は、カルバペネム、アミノグリコシド、フルオロキノロンの3系統の薬剤に耐性を示す緑膿菌と定義される。申請者は、2003年、院内感染多発事例の原因菌として、上記の薬剤に対し最小阻止濃度が128mg/Lを超える高度多剤耐性緑膿菌株を見出した。2004年、仙台の医療施設においてカテーテル関連尿路感染症のアウトブレイクの原因となった高度多剤耐性緑膿菌株が分離された。この株は、染色体ゲノム上にメタロ-β-ラクタマーゼをコードする遺伝子 blaIMP-1 および新規アミノグリコシドアセチル化酵素をコードする遺伝子 aac(6')-Iae を含むインテグロン In113 を保有していた。これらの遺伝子は、染色体上に存在するクラス1インテグロンと呼ばれる遺伝子構造上に存在していた。その後、このような高度多剤耐性株が宮城県の地域医療施設間に伝播拡大しているだけでなく、全国の医療施設で分離されることを明らかにしてきた。2005年以降、このような高度多剤耐性緑膿菌株は日本中の医療施設から分離された。申請者が実施した分子疫学解析の結果、PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) パターンの相同性が80%を超えており、全国でクロナリに伝播・拡大していることがわかった。薬剤耐性遺伝子を解析した結果、メタロ-β-ラクタマーゼをコードする遺伝子 blaIMP およびアミノグリコシドアセチル化酵素をコードする遺伝子 aac(6')-Iae あるいは aac(6')-Ib を含むインテグロンが多く、の菌株から同定された。これらの解析で、高度多剤耐性緑膿菌株が全国の医療施設に伝播拡大し、薬剤耐性遺伝子の獲得と遺伝子変異を繰り返しながら進化していることを明らかにしてきた。また、近年、細菌の分子タイピングに繁用されるようになった7つのハウスキーピング遺伝子によって菌の遺伝的背景を明らかにする MLST (Multilocus Sequence Typing) 法により、薬剤耐性菌流行株は特定の遺伝子背景を持ったストレインであることが明らかとなってきた。2012年以降、申請者は日本の他にベトナム、ネパールおよびミャンマーの医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌の解析も実施し、同様の高度多剤耐性緑膿菌ストレインがアジア諸国でも伝播・拡大し、医療機関の脅威となっていることが分かってきた。

2. 研究の目的

申請者が実施してきた日本、ベトナム、ネパールおよびミャンマーの医療施設で分離される3200株の多剤耐性緑膿菌の全ゲノム解析に基づく分子疫学解析から、特定の MLST タイプである ST235 に属する高度多剤耐性緑膿菌がアジア諸国で伝播拡大していることを明らかにした。この ST235 緑膿菌株は欧米諸国でも広く分離されており、International High Risk Clone と呼ばれ、地球規模で医療安全を脅かしている。2013年から沖縄総合科学研究所との共同研究では PacBio を用いた完全長ゲノムのシーケンスも実施し、比較ゲノム解析の結果、高度多剤耐性緑膿菌では薬剤耐性遺伝子がプラスミドを介して菌種間に水平伝播することによって播種されるだけでなく、特定の株では薬剤耐性遺伝子を積極的に染色体ゲノムに取り込むことによって流行株へと変貌していくことが分かってきた。

しかし、その特定の遺伝子背景を持つものがどのようなメカニズムで耐性化し、流行株となるのかは分かっていない。本研究の独創的な点は多剤耐性緑膿菌流行株が出現するメカニズムを分子レベルで説明することにある。本研究では以下の2点を明らかにすることを目的とした。

1) 高度多剤耐性緑膿菌固有に持っている遺伝子の特定:

完全長ゲノム決定した3株の高度多剤耐性緑膿菌(日本由来2株、ネパール由来1株)および MiSeq で全ゲノム配列を決定している高度多剤耐性緑膿菌400株(日本、ベトナムおよびネパール)の配列情報を、完全長ゲノムが公開されている感受性臨床分離株(PA01)および環境由来株(MTB-1)と比較し、高度多剤耐性緑膿菌に固有に持っている遺伝子(群)を特定する。予備的な実験で、高度多剤耐性緑膿菌株(NCGM1984)株が、試験管内で新たに薬剤耐性遺伝子を染色体上に獲得できることを確認した。

2) 特定した遺伝子の機能解析と機能部位の特定:

1) で特定した遺伝子が外来遺伝子の染色体ゲノムへの取り込みに関与するかどうかを明らかにする。さらに、特定した遺伝子が他の遺伝子と菌体内でどのような相互作用を有しているかを RNA-seq を利用した網羅的発現解析により検証する。感受性緑膿菌株 PA01 の染色体ゲノムに特定した遺伝子を発現させた緑膿菌変異株を作製し、外来遺伝子取り込みに適した培養条件下で PA01 株と比較する。特定した因子の機能部位を特定するため、遺伝子配列から高次構造を予測し、変異を入れた組み換え遺伝子を作製する。作製した組み換え遺伝子を緑膿菌内で発現させ、薬剤耐性因子の取り込みを評価することで、その機能部位を特定する。

3. 研究の方法

高度多剤耐性緑膿菌が固有に保持している遺伝候補子を薬剤感受性緑膿菌株に発現させ、外来遺伝子の染色体ゲノムへの取り込みに関与する因子のスクリーニングを実施した。予備試験ではマーカー遺伝子が継代の結果、高度多剤耐性緑膿菌株染色体ゲノムにインテグレートされていることを確認している。特定した遺伝子を導入した遺伝子改変株を作製し、その機能的意義を明らかにするとともに、特定遺伝子の組み換え遺伝子を作製し、その機能部位の同定を試みた。具体的な研究方法を下記に示す。

高度多剤耐性緑膿菌固有に持っている遺伝子の特定:

28年度は完全長ゲノム決定した3株の高度多剤耐性緑膿菌(日本由来2株、ネパール由来1

株) および次世代シーケンサ MiSeq で全ゲノム配列を決定している高度多剤耐性緑膿菌 415 株 (日本 300 株、ベトナム 100 株およびネパール 15 株) の配列情報を用いて、完全長ゲノムが公開されている感受性臨床分離株 (PA01) および環境由来株 (MTB-1) と比較し、高度多剤耐性緑膿菌に固有に持っている遺伝子 (群) を特定した。

特定した遺伝子の機能解析および機能部位の特定:

予備的な実験では、アルベカシン (アミノグリコシド系薬の 1 種) 高度耐性を付与する遺伝子 16S rRNA メチラーゼ遺伝子 *rmtB* を含むプラスミドを導入させた高度多剤耐性緑膿菌株 (NCGM1984) を試験管内でアルベカシン存在下で 200 継代した結果、*rmtB* 遺伝子が染色体ゲノムにインテグレートされていることを確認している。感受性緑膿菌実験株 PA01 をベースにシャトルベクター 1 に候補遺伝子を、シャトルベクター 2 にはトランスポゼース領域を両端に付加したアミノグリコシド高度耐性遺伝子 *rmtB* をそれぞれ発現させた。ベクター 1 および 2 を薬剤感受性緑膿菌 PA01 株に発現させ、継代培養を行う。外来遺伝子獲得能力の変化やトランスポジションの発生については世代時間を考慮した次世代シーケンサによる全ゲノムレベル網羅的変異頻度解析を実施した。

4. 研究成果

完全長ゲノムが明らかとなっている多剤耐性緑膿菌 3 株 (日本由来 2 株、ネパール由来 1 株) および感受性株 (PA01) 1 株との比較解析から、高度薬剤耐性緑膿菌が特異的に保有している 17 遺伝子の ORF をスクリーニングした。さらにそこから病原性、鞭毛・繊毛形成およびバイオフィーム形成に関する ORF を除いた結果、10 遺伝子 (*OrfA* ~ *OrfJ*) に絞り込んだ。これら 10 遺伝子は、すべて 11158 bp の 1 つのゲノミックアイランドに存在することが分かった (Fig.1)。

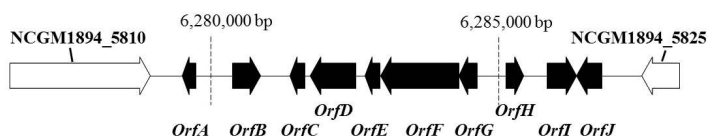


Fig.1. 高度多剤耐性緑膿菌 NCGM1984 のゲノミックアイランド:領域内の黒矢印は高度多剤耐性緑膿菌が特異的に保有する 10 遺伝子 (*OrfA* ~ *OrfJ*) を示す。

このゲノミックアイランドの、*OrfJ* の下流域に強力なプロモーター領域が存在し、これらの ORF のいくつかはオペロンとして機能していることが示唆された。スクリーニングした 10 遺伝子についての詳細を Table 1 に示す。

Table 1. 予備的解析でスクリーニングした10種の ORF

ORF	長さ (nt)	予想される機能
A	282	unknown
B	549	GCN5 family acetyltransferase
C	300	unknown
D	891	chromosomesegrgation protein
E	297	unknown
F	1551	unknown
G	375	similar to DNA binding protein
H	356	unknown
I	587	unknown
J	512	unknown

沖縄総合科学研究所との共同研究で新たに多剤耐性緑膿菌 3 株 (日本 1 株、ベトナム 2 株) の完全長ゲノムおよび、GenBank に新たに登録された完全長ゲノムの情報を新たに追加し、詳細な比較ゲノム解析を実施したところ、10 遺伝子からさらに 6 遺伝子、*OrfC*, *OrfD*, *OrfE*, *OrfF*, *OrfG* および *OrfH* までに絞り込んだ。それぞれの遺伝子をシャトルベクターにクローニングして *rmtB* 遺伝子をクローニングしたベクターと共に PA01 にトランスフォームさせ、10 継代、20 継代および 50 継代と継代を重ね、それぞれの継代あたり 3 株からゲノムを抽出した。抽出したゲノムを次世代シーケンサで全ゲノム解析を実施したところ、染色体に *rmtB* がインテグレートされたものはなかった。次に *OrfB* から *OrfH* までのすべての遺伝子をベクターにクローニングし、*rmtB* クローニングベクターと共に PA01 にトランスフォームさせ、同様の実験を試みたところ、染色体に *rmtB* がインテグレートされたものはなかった。これらの結果から、2 つの可能性が示唆された。

これらの遺伝子がオペロンとして機能しており、単独の遺伝子をクローニングしただけでは外来遺伝子を染色体にインテグレートできない。いくつかの組み合わせを考慮し、クローニングを実施する必要がある。

これらの遺伝子の他に、別の部位にある遺伝子との相互作用により多剤耐性緑膿菌は外来遺伝子を染色体にインテグレートしている。

現在、トランスポゾン移動促進因子 IS-Enhancer-Element (IEE) に類似した (アミノ酸ホモロジー 37%) ORF 領域を多剤耐性緑膿菌中に見出した。この領域をシャトルベクターに組み込み、緑膿菌 PA01 で発現させ、その機能解析を行っている。トランスポジションは次世代シーケンサを用いた全ゲノムを網羅解析することで検証を行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

・ Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shiroma A, Nakano K, Teruya K, Satou K, Hirano T, Shimojima M, Kirikae T. A Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Harboring Two Copies of blaIMP-34 Encoding a Metallo-β-Lactamase. PLoS One. 2016 Apr 7;11(4):e0149385. doi: 10.1371/journal.pone.0149385.

・ Tada T, Nhung PH, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Tsuchiya M, Phuong DM, Anh NQ, Ohmagari N, Kirikae T. Multidrug-Resistant Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Producing IMP-26 with Increased Carbapenem-Hydrolyzing Activities in Vietnam. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Oct 21;60(11):6853-6858. doi: 10.1128/AAC.01177-16.

・ Tada T, Shimada K, Satou K, Hirano T, Pokhrel BM, Sherchand JB, Kirikae T. *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Nepal Coproducing Metallo-β-Lactamases and 16S rRNA Methyltransferases. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Aug 24;61(9). pii: e00694-17. doi: 10.1128/AAC.00694-17.

・ Uechi K, Tada T, Shimada K, Kuwahara-Arai K, Arakaki M, Tome T, Nakasone I, Maeda S, Kirikae T, Fujita J. A Modified Carbapenem Inactivation Method, CIMTris, for Carbapenemase Production in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Species. J Clin Microbiol. 2017 Dec;55(12):3405-3410. doi: 10.1128/JCM.00893-17.

・ Tada T, Shimada K, Mya S, Zan KN, Kuwahara K, Kirikae T, Tin HH. A New Variant of 16S rRNA Methylase, RmtD3, in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in Myanmar. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Dec 21;62(1). pii: e01806-17. doi: 10.1128/AAC.01806-17.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：平野 隆

ローマ字氏名：HIRANO, Takashi

研究協力者氏名：佐藤 万仁

ローマ字氏名：SATOU, Kazuhito

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。