

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08824

研究課題名(和文) バクテロイデス・フラジリス由来の新規カルバペナム耐性遺伝子の網羅的発現と機能解明

研究課題名(英文) Comprehensive expression and functional elucidation of a novel carbapenem resistance gene derived from *Bacteroides fragilis*

研究代表者

後藤 隆次 (Goto, Takatsugu)

岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・助教

研究者番号：80326355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：解読した carbapenem 中等度耐性 *Bacteroides fragilis* GAI92214 株の全ゲノム配列中には、複数の薬剤耐性遺伝子(tetracycline、erythromycin 耐性、class D  $\beta$ -lactamase 遺伝子)が集積した領域が存在していた。class D  $\beta$ -lactamase の組換え大腸菌は ampicillin を分解したが meropenem を分解しなかった。同酵素の *B. fragilis* 組換え体も carbapenem 系を分解しなかった。今後、本研究で得た全ゲノム情報を活かし他の耐性因子の寄与も含めた耐性機構の全貌解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト腸管に常在する嫌気性菌 *Bacteroides fragilis* の耐性株は国内外で多剤耐性傾向にあり、時に化学療法を難渋させる。本耐性株の約 80% は carbapenem 中等度耐性を呈するが、その耐性機構は世界において未だ解明されていない。我々は本研究にて、世界に先立ち carbapenem 中等度耐性株の全ゲノム配列の解読に成功し、本菌株特有の薬剤耐性遺伝子領域などを見出した点で学術的・社会的意義は高い。本領域中で今回機能解析を行った class D  $\beta$ -lactamase は、当該中等度耐性に寄与していなかったものの、獲得した全ゲノム情報は今後の耐性因子の網羅的探索に役立つ。

研究成果の概要(英文)：We determined the complete genome sequence of the *Bacteroides fragilis* GAI92214, a strain intermediately resistant to carbapenems. The GAI92214 chromosome had a unique region, including erythromycin-, tetracycline resistance genes, and an uncharacterized class D  $\beta$ -lactamase gene. Recombinant class D  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli* significantly degraded ampicillin (64-fold higher MIC than that of the negative control strain) but did not degrade carbapenems. The recombinant enzyme in *B. fragilis* also did not degrade carbapenems. Other genomic approaches are needed to identify other factors contributed to carbapenem intermediate resistance in the GAI92214 strain.

研究分野：細菌学

キーワード： *Bacteroides fragilis* carbapenem 耐性 中等度耐性 全ゲノム解析 class D  $\beta$ -lactamase 薬剤耐性機構

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト腸管に常在する嫌気性菌 *Bacteroides fragilis* は腹腔内感染症等の起因菌の一つで、嫌気性菌感染巣から最も高頻度に検出される。*B. fragilis* は様々な抗菌薬に多様な耐性を示すが、国内外で多剤耐性傾向にある。既に殆どの *B. fragilis* 臨床分離株は、cephalosporinase を産生し、多くの  $\beta$ -lactam 系薬に耐性を示す。中でも carbapenem 系薬にすら耐性を示す株が国内で約 2% 存在する。当該耐性株は、既に多剤耐性 (tetracycline 系など他の主要な薬剤にも耐性) である場合も多く、治療の困難さが患者の直接の死因になる事もある。例えば国外で、carbapenems を含む  $\beta$ -lactam 系、macrolides、tetracyclines、metronidazole 等に耐性を示し、linezolid のみが有効であった *B. fragilis* 多剤耐性株の例も報告されており (引用文献 ) 多剤耐性株の出現と拡大が懸念されている。carbapenem 耐性株の約 20% は、carbapenem 分解酵素 CfiA を産生する高度耐性株 [最小発育阻止濃度 (MIC): 25~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] である。残る約 80% は、CfiA 非産生性の中等度耐性株 (MIC: 6.25~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) である。しかしながら、このような中等度耐性株の耐性機構は殆ど研究されていない。*B. fragilis* が多剤耐性化する中、数少ない治療薬の一つである carbapenem 系薬に対して中等度でも耐性を示す株 (高度耐性株の約 4 倍の頻度) は、時に治療の障壁となるため、その耐性機構の解明と対応が急がれる。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、*B. fragilis* の新規 carbapenem 中等度耐性因子を同定し、その構造と機能を解明する事で化学療法に貢献することを目指してきた。近年に carbapenem 中等度耐性を呈する *B. fragilis* GAI92214 株 (CfiA 非産生性) のゲノムライブラリーを作製し、新規耐性因子の同定を試みたが、耐性の決め手となる主因子は同定できなかった (引用文献 )。そこで本研究では、*B. fragilis* GAI92214 株の全ゲノム配列を決定し、ゲノム情報を基に耐性因子を同定・機能解析することを試みた。決定した全ゲノム配列を、本菌種で既知の他の全ゲノム配列と比較ゲノム解析を行い、本菌株に特異性の高い領域を探索した。さらに、carbapenem 中等度耐性に寄与する可能性のある因子を選出し (本研究では class D  $\beta$ -lactamase に着目) 当該遺伝子を大腸菌ならび *B. fragilis* へ導入し、遺伝子の機能解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用菌株

全ゲノム解析には、*B. fragilis* GAI92214 株 (carbapenem 系薬 MIC: 6~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1990 年、臨床分離株) を用いた。

#### (2) 全ゲノム解析

*B. fragilis* GAI92214 株の染色体配列をシーケンサー PacBio RS II (114 倍長) ならびに MiSeq (49 倍長) を併用して決定した。データのアセンブリには、FALCON (一部は HGAP) ならびに SPAdes を使用した。数か所の Gap 領域は、contig 末端間で設計したプライマーを用いた long PCR 産物の配列決定により閉鎖した。タンパク質コード領域 (CDSs)、tRNA 遺伝子、CRISPR 領域、prophage 領域の推定には、順に MetaGeneAnnotator、tRNAscan-SE、CRISPR finder、PHASTER を使用した。全 CDSs の機能は、NCBI NR データベースに対する BLASTx 検索 (スコアの高い上位 30 番までのデータ) の結果を基本とした目視により推定した。 $\beta$ -lactamase の機能は、 $\beta$ -lactamase database (3283 個) に対する BLASTP 検索により推定した。

#### (3) 比較ゲノム解析

*B. fragilis* GAI92214 株と本菌種で既知の代表的な全ゲノム株 (NCTC 9343、YCH46、638R) との比較ゲノム解析には、*in silico* Molecular Cloning software (Link map 作成用) ならびに Mauve ver. 2.4.0 (べん図作成用) を使用した。

#### (4) class D $\beta$ -lactamase の大腸菌内での機能解析

GAI92214 株染色体にコードされた class D  $\beta$ -lactamase の機能を大腸菌内で調べた。具体的には、本酵素遺伝子領域 (*Bacteroides* 属で既知の酵素 promoter 配列含有および非含有の 2 通り) を pHSG398 (大腸菌用ベクター) へ挿入し (*lacZ* に対して順向き、および逆向きの 2 通り)、大腸菌 KAM3 *tolC* 株へ導入後、得た組換え体の ampicillin と meropenem の MIC 値を寒天平板希釈法により測定した。

#### (5) class D $\beta$ -lactamase の *B. fragilis* 内での機能解析

class D  $\beta$ -lactamase の機能を *B. fragilis* 内で調べた。具体的には、(4) で述べた本酵素遺伝子領域 (計 4 通り) を、大腸菌-*Bacteroides* 属間のシャトルベクター (pNLY1 *amp<sup>r</sup>*) へ挿入後、*B. fragilis* NCTC 9343 株 (carbapenem 感受性) へ導入した。得た組換え体の ampicillin、meropenem、cefoxitin の MIC 値を微量液体希釈法により測定した。

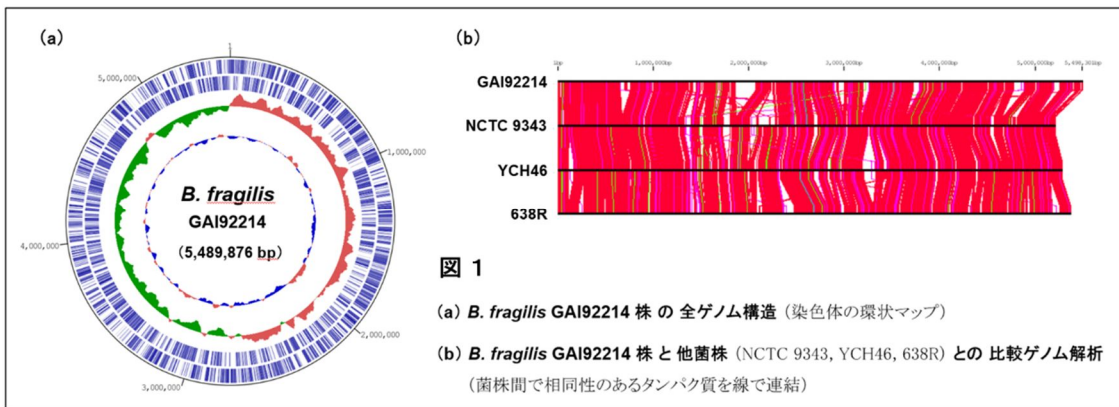
#### 4. 研究成果

##### (1) *B. fragilis* GAI92214 株の全ゲノム配列決定

carbapenem 中等度耐性 *B. fragilis* GAI92214 株の全ゲノム配列を決定し、ORF 抽出、命名を行った。染色体サイズ、ORF 数、rRNA 数、tRNA 数、prophage 数、CRISPR 数は、順に、5,489,876 bp、4,528 個、18 個、71 個、0 個、2 個であった (図 1a)。

##### (2) 比較ゲノム解析

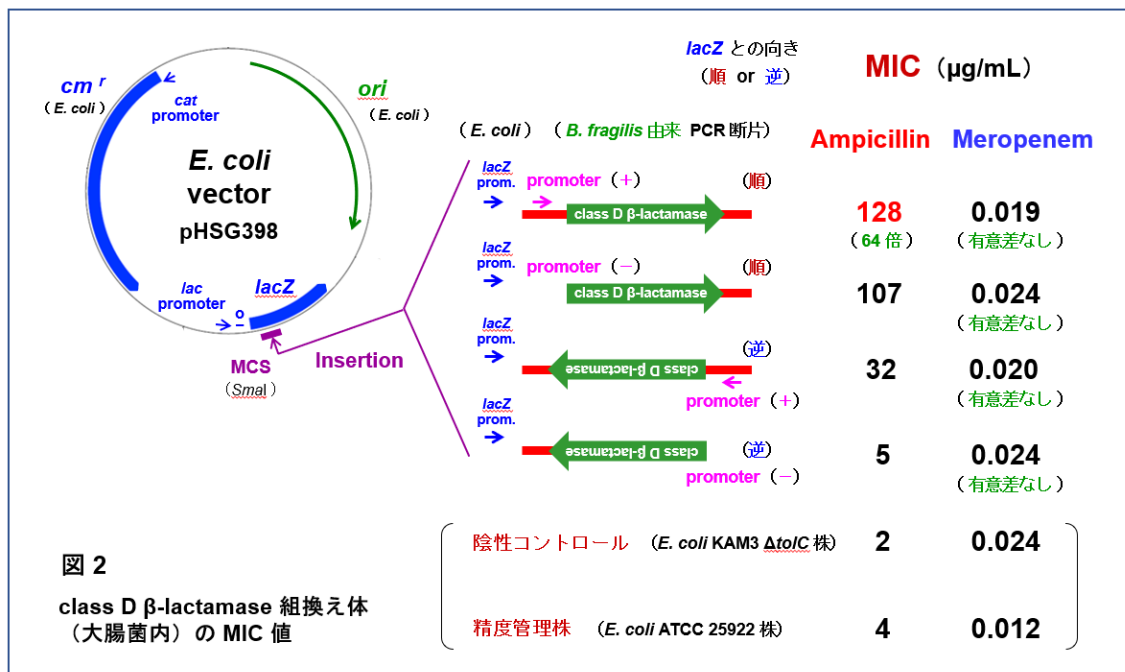
GAI92214 株と既知の全ゲノム株 (NCTC 9343 株、YCH46 株、638R 株) の 4 菌株間で比較ゲノム解析を行った (図 1b)。GAI92214 株に特異的な複数の領域中には、不完全な conjugative transposon や不完全な prophage 構成遺伝子等が多くコードされる傾向にあった。また、既知ゲノム株に無く GAI92214 株に特異性の高い約 210 kb の領域が存在し、本領域中には、tetracycline や erythromycin 耐性遺伝子の他、class D  $\beta$ -lactamase の遺伝子が含まれていた。本  $\beta$ -lactamase は GAI92214 株の中等度耐性に寄与する可能性があると考え、機能解析 (後述) を行った。



##### (3) class D $\beta$ -lactamase の大腸菌内での機能解析

*B. fragilis* GAI92214 株の全ゲノム情報より見出した class D  $\beta$ -lactamase が carbapenem 中等度耐性に寄与するか否かを探るべく、本酵素およびその上流の promoter 領域を大腸菌用ベクター pHSG398 へ挿入後、多剤感受性大腸菌株 (*E. coli* KAM3 *tolC* 株) へ形質転換し、得られた組換え体 (4 通り) の ampicillin と meropenem の MIC 値を測定した。結果、本酵素組換え体の ampicillin MIC 値は、陰性コントロールの 64 倍を示したが、meropenem MIC 値の上昇は見られなかった (図 2)。

class D  $\beta$ -lactamase の一部は、元の菌種内でのみ活性を示した報告例があることから、我々は *Bacteroides* 属間のシャトルベクター pNLY1 を入手し、本酵素を *B. fragilis* 内で機能解析することを目指した。



#### (4) class D $\beta$ -lactamase の *B. fragilis* 内での機能解析

シャトルベクター pNLY1 のサイズを縮小化させて形質転換効率を上昇させるべく、はじめに pNLY1 の全塩基配列を決定した (MiSeq でベクターの 165 倍長を解読)。次に、pNLY1 内の ampicillin 耐性遺伝子を削除した。次に、縮小化ベクター (pNLY1 *amp<sup>r</sup>*) へ次の 4 通りの断片を挿入した: promoter 保有-class D  $\beta$ -lactamase (*lacZ* と順向き挿入) promoter 非保有-class D  $\beta$ -lactamase (順向き) promoter 保有-class D  $\beta$ -lactamase (逆向き) promoter 非保有-class D  $\beta$ -lactamase (逆向き)。これらの各組換えプラスミドを *E. coli* 4 株 [KAM3 *tolC*, HST08 (*endA<sup>-</sup>/recA<sup>-</sup>*), HB101 (*endA<sup>-</sup>*), HST04 (*dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup>*)] および *B. fragilis* NCTC 9343 株への導入することを試みた。結果、*E. coli* 4 株へは、上記の全ての組換えプラスミドを導入できた。一方、*B. fragilis* へは、上記を導入できなかったが (大量発現酵素の細胞毒性、DNA-タンパク質間結合障害等の可能性あり) 上記を導入できた。の 3 種の組換え体について、meropenem、imipenem、cefoxitin の MIC 値を測定したが、陰性コントロールと比べて MIC 値の上昇は見られなかった。

#### (5) 考察

本菌株より見出した class D  $\beta$ -lactamase の配列を、他菌種 (肺炎桿菌) 由来の class D  $\beta$ -lactamase として有名な OXA-48 の立体構造と比較すると (引用文献) meropenem 結合に重要なアミノ酸のうち、5 つは我々の酵素で保存されていたが、3 つは保存されていなかった。このことが、我々の酵素の meropenem 分解能を低下させているのかも知れない。また、既報の class D  $\beta$ -lactamase 系統樹 (1843 variants を含む) (引用文献) に我々の酵素配列を追加し、系統樹を再作成すると、我々の酵素は OXA-48 を含むクラスターと少し離れた所に位置していた。従って、当該酵素の基質分解能が、既知の carbapenem 分解酵素のものとは異なる可能性もある。

現在は、他の系統を含む複数の薬剤についての詳細な基質特異性の解析を行っている。また、本研究で GAI92214 株の全ゲノム配列を解読できたため、今後は、耐性因子の網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-Seq 等) も可能となる。これら他の耐性因子の寄与も含めて、総合的に本菌株 carbapenem 中等度耐性機構を解明していきたい。

#### <引用文献>

Wareham, D. W., *et al.*, Anaerobic sepsis due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*: microbiological cure and clinical response with linezolid therapy, Clin. Infect. Dis., **40**, 2005, e67-68

後藤隆次ら, メロペネム中等度耐性 *Bacteroides fragilis* GAI92214 株ゲノムライブラリーを用いた新規メロペネム耐性因子の同定, 日本嫌気性菌感染症学会雑誌, **46**, 2016, 68-74

Docquier, J. D., *et al.*, Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases, Chem. Biol., **29**, 2009, 540-547  
Christian, B., *et al.*, *In silico* serine  $\beta$ -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species, Sci. Rep., **7**, 2017, 43232

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 後藤 隆次、林 将大、森田 雄二、田中 香お里
2. 発表標題 カルバペナム中等度耐性 <i>Bacteroides fragilis</i> GAI92214 株由来 class D $\beta$ -lactamase の大腸菌ならびに <i>B. fragilis</i> 内での機能解析
3. 学会等名 第 50 回 日本嫌気性菌感染症学会学術集会（一般演題）（国内学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takatsugu Goto, Masahiro Hayashi, Yuji Morita, Kaori Tanaka
2. 発表標題 Characterization of class D $\beta$ -lactamase from <i>Bacteroides fragilis</i> GAI92214, a strain intermediately resistant to carbapenems
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021（一般演題）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takatsugu Goto, Masahiro Hayashi, Yuji Morita, Kaori Tanaka
2. 発表標題 Complete genome sequence of <i>Bacteroides fragilis</i> strain GAI92214 conferred carbapenem-intermediate resistance
3. 学会等名 ASM microbe 2020（一般演題）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 隆次、林 将大、森田 雄二、田中 香お里
2. 発表標題 カルバペナム中等度耐性 <i>B. fragilis</i> 由来 class D $\beta$ -lactamase の <i>E. coli</i> ならびに <i>B. fragilis</i> 内での機能解析
3. 学会等名 第 93 回 日本細菌学会総会（一般演題）（国内学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 隆次、林 将大、森田 雄二、田中 香お里
2. 発表標題 カルバペネム中等度耐性 <i>Bacteroides fragilis</i> GA192214 株由来 class D $\beta$ -lactamase の機能解析
3. 学会等名 第 56 回 日本細菌学会中部支部総会・第53回 ピブリオシンポジウム（一般演題）（国内学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤 隆次、林 将大、森田 雄二、田中 香お里
2. 発表標題 カルバペネム中等度耐性 <i>Bacteroides fragilis</i> 由来 class D $\beta$ -lactamase の機能解析
3. 学会等名 第 92 回 日本細菌学会総会（一般演題）（国内学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤 隆次、森田 雄二、林 将大、田中 香お里
2. 発表標題 カルバペネム中等度耐性 <i>Bacteroides fragilis</i> GA192214 株の全ゲノム解析
3. 学会等名 第 48 回 日本嫌気性菌感染症学会総会・学術集会（一般演題）（国内学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤 隆次、森田 雄二、林 将大、田中 香お里
2. 発表標題 カルバペネム中等度耐性 <i>Bacteroides fragilis</i> の全ゲノム構造解析
3. 学会等名 第 91 回 日本細菌学会総会（一般演題）（国内学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤 隆次、森田 雄二、林 将大、田中 香お里
2. 発表標題 カルバペネム中等度耐性 <i>Bacteroides fragilis</i> GAI92214 株の全ゲノム構造解析
3. 学会等名 第 54 回 日本細菌学会中部支部総会（一般演題）（国内学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田中 香お里  (Tanaka Kaori)  (20242729)	岐阜大学・高等研究院・教授   (13701)	研究全体の助言。特に薬剤感受性試験の指導・一部実施を行う。

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	森田 雄二  (Morita Yuji)  (00454322)	明治薬科大学・薬学部・教授   (32684)	新規カルバペネム耐性遺伝子の発現・機能解析についての助言・一部実施を行う。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------